

Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes)

Actinoycetes isolated from compost and antagonistic activity against potato phytopathogens (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes)

Fernanda Pérez Rojas, Jorge León Quispe* y Nadia Galindo Cabello. Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela s/n, Ciudad Universitaria, Lima – Perú. * Correspondencia: jorgeleonq@yahoo.com

Recibido: Noviembre 05, 2014. Aceptado: Junio 11, 2015.

Pérez-Rojas F, León-Quispe J y Galindo-Cabello N. 2015. Actinomicetos Aislados del Compost y su Actividad Antagonista a Fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes). Revista Mexicana de Fitopatología 33: 116-139.

Resumen. Una de las formas de control de fitopatógenos es a través del uso de microorganismos antagonistas. El compost, un producto orgánico es fuente de microorganismos capaces de producir metabolitos secundarios de interés agrícola. Se aislaron y evaluaron mediante cultivos *in vitro* la capacidad antagonista de 85 actinomicetos frente a fitopatógenos que afectan a *Solanum tuberosum*. De los aislados, 23.5% tuvieron actividad antagonista a *Ralstonia solanacearum*, 16.4% a *Pectobacterium carotovorum*, 43.5% a *Phytophthora infestans*, 25.8% a *Fusarium* sp y 61.1% a *Rhizoctonia solani*. Extractos orgánicos obtenidos con acetato de etilo y diclorometano de las cepas seleccionadas (AACI-5, ACZI-22, ACZII-35, ACZIII-84 y ACZIII-88) mostraron actividad antimicrobiana,

Abstract. One way of controlling phytopathogens is through the use antagonistic microorganisms. Compost is a source of microorganisms capable of producing secondary metabolites of agricultural interest. We isolated 85 actinomycetes *in vitro* cultures and evaluated their antagonist capacity against phytopathogens affecting *Solanum tuberosum*. Of the isolates, 23.5 % showed antagonistic activity against *Ralstonia solanacearum*, 16.4 % against *Pectobacterium carotovorum*, 43.5 % against *Phytophthora infestans*, 25.8 % against *Fusarium* sp., and 61.1% against *Rhizoctonia solani*. Organic extracts obtained from the selected strains (AACI-5, ACZI-22, ACZII-35, ACZIII-84 y ACZIII-88) with ethyl acetate and dichloromethane showed antimicrobial activity. The most important was the ethyl acetate extract from the AACI-5 strain, which had a broader spectrum of activity and showed a minimum inhibitory concentration (MIC) against *Phytophthora infestans* of 0.0625 mg.mL⁻¹. The most active strains were identified as members of the genus *Streptomyces*. Due to the antagonist

siendo el de mayor importancia el extracto de acetato de etilo de la cepa AACI-5 por tener mayor espectro de actividad y presentar una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0.0625 mg.mL⁻¹ frente a *Phytophthora infestans*. Las cepas con mayor actividad se identificaron como miembros del género *Streptomyces*. Los actinomicetos por su capacidad antagonista mostrada en el presente trabajo podrían ser considerados potenciales candidatos en el control de patógenos de este tubérculo en el marco de una agricultura sostenible.

Palabras clave: *Streptomyces*, compuestos bioactivos, microorganismos de suelos, patógenos de la papa, antagonismo.

El control biológico o biocontrol utilizando microorganismos se ha convertido en una alternativa en el tratamiento de patógenos de plantas, siendo considerado como una de las prácticas más eficientes y ecológicamente sanas en el desarrollo de una agricultura sostenible (Franco-Correa, 2009). Los fitopatógenos originan grandes pérdidas económicas en la agricultura, al disminuir tanto la cantidad, como la calidad de los productos cosechados, y por lo tanto su valor comercial. El control de estos patógenos por lo general se ha realizado empleando plaguicidas y otros químicos, los cuales han tenido efectos negativos sobre el ambiente y la calidad de vida de las poblaciones humanas (Serrano y Galindo, 2007). La aplicación sistemática de productos químicos en la agricultura implica actualmente dificultades como el resurgimiento de plagas, el desarrollo de resistencia genética de microorganismos, la contaminación del ambiente y daños a la salud humana (Pérez, 2004).

El interés en el biocontrol de patógenos de plantas se ha incrementado actualmente, particularmente como una respuesta a la preocupación de los consumidores frente al uso de los agroquími-

capacity showed by actinomycetes in this work, they could be considered as potential candidates for controlling potato pathogens under the framework of sustainable agriculture.

Key words: *Streptomyces*, bioactive compounds, soil microorganisms, potato pathogens, antagonism.

Biological control (or biocontrol) through the use of microorganisms has become an alternative for the treatment of plant pathogens; it is considered one of the most efficient and ecologically sound practices for a sustainable agriculture (Franco-Correa, 2009). Phytopathogens cause great economic losses in agriculture, reducing both the quantity and the quality of harvested products, and thus their commercial value. The control of these pathogens has usually been done with pesticides and other chemicals, which has had negative effects on the environment and the quality of life of human populations (Serrano and Galindo, 2007). The systematic application of chemicals in agriculture currently faces difficulties such as the resurgence of pests, the development of genetic resistance in microorganisms, environmental pollution and damage to human health (Pérez, 2004).

The interest in biocontrol of plant pathogens has increased recently, particularly as a response to consumer concerns over the use of agrochemicals. Currently, biocontrol is already considered as one of the standard management practices of plant diseases caused mainly by pathogens of the genera *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* and *Fusarium* (Serrano and Galindo, 2007). In the control of these pathogens, it is important to select potential antagonists that can be used as biological controls, for which it is necessary, initially, to perform *in vitro* assays that provide information about their antagonist capacity in order to use them later in the field (Gohel *et al.*, 2006).

cos. Actualmente, el biocontrol ya es considerado como una de las prácticas de manejo de enfermedades de las plantas causadas principalmente por patógenos de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium* (Serrano y Galindo, 2007). En el control de dichos patógenos, resulta importante la selección de potenciales antagonistas que pueden ser utilizados como controladores biológicos, para lo cual es necesario realizar inicialmente ensayos *in vitro* que generen una orientación respecto a su capacidad antagonista y permitan potencialmente ser formulados y utilizados posteriormente en campo (Gohel *et al.*, 2006).

Entre los microorganismos útiles en el biocontrol de fitopatógenos se encuentran bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y *Bacillus* (Whipps, 2001). Estos microorganismos se encuentran en suelos fértiles, siendo el grupo más prolífico los actinomicetos, bacterias Gram positivas, aerobias y principales degradadores de la materia orgánica en el suelo con capacidades de producir compuestos antimicrobianos, terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares (Ezziymani *et al.*, 2004). Representan entre 20 a 60 % de la población microbiana del suelo fértil, siendo sus principales actividades las de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos, promover el crecimiento de las plantas y producir una serie de metabolitos secundarios como vitaminas, enzimas y otros compuestos benéficos para las plantas (Bobadilla y Rincón, 2008). Adicionalmente, los actinomicetos ayudan a mejorar la fertilidad del suelo y a la vez producen compuestos bioactivos que permiten ejercer acción directa o indirecta como organismos de biocontrol de eventuales patógenos (Franco-Correa, 2008).

Los actinomicetos se caracterizan por producir metabolitos con actividad antimicrobiana, incluyendo biocontrol de fitopatógenos (Crawford *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2002). Cepas de *Streptomyces* sp. han mostrado capacidad de suprimir el crecimiento

Among the microorganisms useful for biocontrol of phytopathogenic bacteria are *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* and *Bacillus* (Whipps, 2001). These microorganisms are found in fertile soils; the most prolific group are the actinomycetes, aerobic Gram positive bacteria that are the main degraders of organic matter in the soil, with a capacity to produce antimicrobial compounds, terpenoids, pigments and extracellular enzymes (Ezziymani *et al.*, 2004). They represent about 20-60 % of the microbial population of fertile soil; their main activities are to fix nitrogen, solubilize phosphates, promote plant growth and produce a series of secondary metabolites such as vitamins, enzymes and other beneficial compounds for plants (Bobadilla and Rincon, 2008). In addition, actinomycetes help improve soil fertility and produce bioactive compounds that allow them to serve directly or indirectly as biocontrol organisms of potential pathogens (Franco-Correa, 2008).

Actinomycetes are characterized by producing enzymes with antimicrobial activity, including the biocontrol of phytopathogens (Crawford *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2002). Strains of *Streptomyces* sp. have shown an ability to suppress *in vitro* growth of pathogens, and, therefore, many of their metabolites have been proposed to inhibit the growth of these pathogens *in vivo* (Franco-Correa, 2009). Extracellular enzymes such as chitinases and β -1,3- glucanases play a significant role in antifungal and biocontrol activity, and are responsible for the mycoparasitism of certain strains of *Streptomyces* and the suppression of plant diseases (Goodfellow and Williams, 1983; Gonzales *et al.*, 2003).

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth most important crop worldwide, with an annual output of 328,865,936 MT (FAO, 2008). The potato crop of Peru is the most important in the

de fitopatógenos *in vitro*, y por ello, muchos de sus metabolitos han sido propuestos para inhibir el crecimiento de estos patógenos *in vivo* (Franco-Correa, 2009). Enzimas extracelulares como quitinasas y β -1,3-glucanasas desempeñan una función significativa en la actividad antifúngica y biocontroladora, siendo responsables del micoparasitismo ejercido por ciertas cepas de *Streptomyces* y la supresión de enfermedades de las plantas (Goodfellow y Williams, 1983; González *et al.*, 2003).

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es el cuarto cultivo más importante en el ámbito mundial, con una producción anual de 328, 865, 936 TM (FAO, 2008). En Perú, el cultivo de papa es el más importante en la zona andina, siendo la superficie cultivada de 249,000 ha. La producción de la papa en Perú se incrementó de 3,8 millones de TM en 2004 a 4,5 millones de TM en 2013, lo cual significó un crecimiento de 45% y una tasa promedio anual de 3,8% (INEI, 2014). Sin embargo, el cultivo de este tubérculo es afectado por varias enfermedades, siendo importantes las causadas por hongos y bacterias (Farfán y Gutiérrez, 2009). El “tizón tardío”, causada por el Chromista *Phytophthora infestans* ha sido considerado como el principal patógeno a escala mundial (Agrios, 2005). *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la rizoctoniasis o costra negra (por la formación de esclerocios) y chancro del tallo (por las lesiones necróticas en los tallos) es un patógeno fúngico presente en todas las zonas productoras de papa del mundo (Torres, 2002). Son varias las especies de *Fusarium* que se citan como responsables de la “pudrición seca”. La bacteria *Ralstonia solanacearum* causante de “marchitez bacteriana” (Yabuuchi *et al.*; 1995) tiene gran impacto en el cultivo de la papa en climas fríos, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 28°C (He *et al.*, 1983). Las bacterias *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (antes *Erwinia carotovorum*) y *P. chrysanthemi*,

Andean region, with a cultivated surface of 249,000 ha. Potato production in Peru increased from 3.8 million MT in 2004 to 4.5 million MT in 2013, an increase of 45 % and an average annual growth rate of 3.8 % (INEI, 2014). However, the cultivation of potatoes is affected by various diseases; among the most important are those caused by fungi and bacteria (Farfan and Gutierrez, 2009). The “late blight”, caused by Chromista *Phytophthora infestans*, has been regarded as the major pathogen worldwide (Agrios, 2005). *Rhizoctonia solani* Kühn, which causes rhizoctoniasis or black scurf (due to the formation of sclerotia) and stem blight (due to the necrotic lesions on the stems), is a fungal pathogen present in all potato producing areas of the world (Torres, 2002). Several species of *Fusarium* are cited as responsible for the “dry rot”. The bacterium *Ralstonia solanacearum*, which causes “bacterial wilt” (Yabuuchi *et al.*, 1995), has a great impact on potato crops in cold climates, although its optimum growth temperature is 28 °C (He *et al.*, 1983). The bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (previously *Erwinia carotovora*) and *P. chrysanthemi*, cause the “soft rot” of potato tubers in both the field and in the store, as well as the “stem rot” or “blackleg” in growing plants (Elphinstone, 1987).

Compost is a highly humified organic fertilizer, rich in nutrients and a source of a variety of aerobic microorganisms, including actinomycetes, which develop in response to different levels of temperature, humidity, oxygen and pH (Arslan *et al.*, 2008). This research seeks to select strains of actinomycetes isolated from compost with potential inhibitory activity against pathogens affecting the potato crop (*Solanum tuberosum* L) and that could be subsequently used as biocontrol agents in the field.

causan la “pudrición blanda” de los tubérculos de la papa tanto en el campo como en el almacén, así como la “pudrición de los tallos” o “pierna negra” en plantas en crecimiento (Elphinstone, 1987).

El compost es un abono orgánico altamente humificado, rico en nutrientes y fuente de una variedad de microorganismos aerobios, entre ellos los actinomicetos, que se desarrollan en respuesta a diferentes niveles de temperatura, humedad, oxígeno y pH (Arslan *et al.*, 2008). Esta investigación busca seleccionar cepas de actinomicetos aislados del compost con potencial actividad inhibitoria de patógenos que afectan al cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L) con posterior aplicación potencial como agentes de biocontrol en el campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de compost. Fueron recolectadas 10 muestras de compost (100 g de muestra como promedio) de las instalaciones del predio conocido como “Casa Blanca” (propiedad particular) ubicado a 47 km de Lima – Perú. La toma de muestras se realizó en condiciones de esterilidad y posteriormente dichas muestras fueron colocadas en envases de primer uso y con tapa hermética. Fueron transportadas al laboratorio de Ecología Microbiana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su inmediato procesamiento.

Patógenos de *Solanum tuberosum*. Las cepas de patógenos fueron proporcionados por el Centro Internacional de la Papa (CIP), de Lima, Perú. Éstos incluyeron cultivos bacterianos de *Ralstonia solanacearum* (cepa 204 Biovar 2A aislada de *Solanum tuberosum* - Huambos – Cajamarca, Perú) y *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (aislado de *Solanum tuberosum* - Chiras - Comas, Perú); así como los hongos *Rhizoctonia solani* (aislado de

MATERIALS AND METHODS

Compost samples. We collected 10 samples of compost (an average of 100 g of sample) from the facilities of the land property known as “Casa Blanca” located at 47 km from Lima, Peru. Sampling was conducted under sterile conditions; the samples were placed in single-use containers with a tight lid. The samples were then transported to the laboratory of Microbial Ecology at the Universidad Nacional Mayor de San Marcos for immediate processing.

Pathogens of *Solanum tuberosum*. The pathogenic strains were provided by the International Potato Center (CIP) in Lima, Peru. These included bacterial cultures of *Ralstonia solanacearum* (strain 204 Biovar 2A, isolated from *Solanum tuberosum*; Huambos, Cajamarca, Peru) and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (isolated from *Solanum tuberosum*; Chiras, Comas, Peru), as well as the fungi *Rhizoctonia solani* (isolated from *Solanum tuberosum*; Huancayo, Peru), *Fusarium* sp., (isolated from *Solanum tuberosum*; Huancayo, Peru) and Chromista *Phytophthora infestans* (isolated from *Solanum tuberosum* L. var canchan; Serrana, Oxapampa, Peru).

Isolation of Actinomycetes from compost. To isolate the actinomycetes, the compost samples were diluted one-tenth in saline 0.85 % (w/v) to 10⁻⁶, and 0.1 mL of each dilution was seeded by spreading it on Agar Czapek Dox, pH 7.2, and Agar starch Casein, pH 7.2 (Gurung *et al.*, 2009), adding in both cases nystatin (Merck) (50 µg.mL⁻¹) and cycloheximide (Merck) (50 µg.mL⁻¹). The cultures were incubated at 28 °C for 15 d. The actinomycetes colonies were collected and stored refrigerated in vials containing agar Czapek Dox plus glycerol (20 % v/v), according to Leon *et al.* (2007).

Solanum tuberosum Huancayo, Perú), *Fusarium* sp., (aislado de *Solanum tuberosum* Huancayo, Perú) y el Chromista *Phytophthora infestans* (aislado de *Solanum tuberosum* L. var. *canchan* Serrana – Oxapampa, Perú).

Aislamiento de actinomicetos a partir del compost. Para el aislamiento de actinomicetos, las muestras de compost fueron diluidas al décimo en solución salina 0.85 % (p/v) hasta 10^{-6} y se sembró 0.1 mL de cada dilución por diseminación en Agar Czapeck-Dox pH 7.2 y Agar Almidón Caseína pH 7.2 (Gurung *et al.*, 2009) suplementado en ambos casos con nistatina (Merck) ($50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y cicloheximida (Merck) ($50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los cultivos fueron incubados a 28°C por 15 d. Se colectaron las colonias de actinomicetos y se conservaron en refrigeración en viales conteniendo agar Czapeck - Dox más glicerina (20% v/v) según León *et al.* (2007).

Selección de actinomicetos con actividad antagonista a bacterias fitopatógenas. Se realizó mediante el método modificado de “segunda capa” (Dopazo *et al.*, 1988). Los actinomicetos fueron sembrados como macrocolonias en Agar Czapeck Dox pH 7.2 e incubadas a 28 °C por 7 d. Las bacterias fitopatógenas fueron reactivadas en caldo nutritivo + 1% de glucosa (p/v), pH 7.0, y posteriormente inoculadas (10 μL) (0,5 escala Mac Farland) a 3 mL de agar semisólido licuado y temperado a 50°C y luego agregado rápidamente sobre los cultivos de los actinomicetos. Los cultivos fueron incubados a sus respectivas temperaturas de crecimiento (*R. solanacearum* a 30 °C por 48 h y *P. carotovorum* a 26°C por 48 h), realizándose luego las evaluaciones del tamaño (en mm) de los halos de inhibición (diámetro). Se consideró como positivo un diámetro \geq a 5 mm.

Selection of actinomycetes with antagonistic activity against plant pathogenic bacteria. This was performed by the modified “second layer method” (Dopazo *et al.*, 1988). The actinomycetes were seeded as macro-colonies on Agar Czapek Dox (pH 7.2) and incubated at 28 °C for 7 d. The phytopathogenic bacteria were reactivated in nutrient broth plus 1% glucose (w/v), pH 7.0, and then inoculated (10 μL) (0.5 McFarland scale) into 3 mL of liquefied semisolid agar, tempered at 50 °C and then added quickly on the actinomycetes cultures. The cultures were incubated at their respective growth temperatures (*R. solanacearum* at 30 °C for 48 h and *P. carotovorum* at 26 °C for 48 h); afterwards, we evaluated the size (in mm) of the inhibition zones (mm diameter). A diameter \geq 5 mm was considered positive.

Selection of actinomycetes with antagonistic activity against chromista and fungi. This test was performed by the coculture method indicated by Taechowisan *et al.* (2005). *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* sp. were reactivated and seeded on potato dextrose agar (PDA; Merck), while the oomycete *Phytophthora infestans* was seeded on rye agar; all cases were incubated at 28 °C for 7 d. The actinomycetes were seeded on PDA at one end of the plates. The pathogen cultures were cut into small pieces (0.5 cm per side) and placed at the opposite end from each actinomycete culture. This was incubated at 28 °C for 4-5 d; we then proceeded to assess the extent of the growth distance (mm) between the actinomycete and the phytopathogen. A distance \geq 5 mm was considered positive.

Microscopic and macroscopic analysis of selected actinomycetes. This was done using microcultures of actinomycetes previously selected for their higher antagonistic activity. We used the

Selección de actinomicetos con actividad antagonista al cromista y hongos. Esta prueba se realizó mediante el método de co-cultivo señalado por Taechowisan *et al.*, (2005). *Rhizoctonia solani*, y *Fusarium* sp, fueron reactivados y sembrados en agar papa dextrosa (APD) (Merck); mientras el oomiceto *Phytophthora infestans* en agar centeno, incubándose en todos los casos a 28 °C por 7 d. Los actinomicetos se sembraron en APD en un extremo de las placas. Los cultivos de patógenos se cortaron en trozos pequeños (0,5 cm de lado) y se colocaron al extremo opuesto del cultivo de cada actinomiceto. Se incubó por 4-5 d a 28 °C; luego se procedió a efectuar la evaluación de la medida de la distancia de crecimiento (mm) entre el actinomiceto y el fitopatógeno. Se consideró como positiva una distancia \geq a 5 mm.

Análisis microscópico y macroscópico de actinomicetos seleccionados. Se realizó mediante microcultivos de actinomicetos previamente seleccionados por su mayor actividad antagonista. Se aplicó el método de “bloques de agar” según Holt *et al.*, (1994) con incubación en cámara húmeda a 28 °C por 5-7 d. La observación de las características morfológicas de su estructura micelial y de esporulación se realizó utilizando un microscopio compuesto (Nikon) con el objetivo de inmersión (100X) en láminas portaobjeto preparadas con Azul de Lactofenol (Merck). En la evaluación macroscópica se tuvo en cuenta características fenotípicas de las colonias, tales como color, forma, tamaño, elevación, textura y pigmento difusible de las mismas.

Obtención del extracto crudo del compuesto antimicrobiano. Se realizó según Pandey *et al.* (2004) modificada para actinomicetos de suelos. Actinomicetos seleccionados, se inocularon en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 150 mL del medio extracto de levadura más glucosa (Sultan *et al.*,

“method of agar blocks” according to Holt *et al.* (1994), with incubation in a moist chamber at 28 °C for 5-7 d. The morphological characteristics of the mycelial and sporulation structure were observed using a compound microscope (Nikon) with immersion objective (100X) on slides prepared with Lactophenol blue (Merck). For the macroscopic evaluation, we considered the phenotypic characteristics of the colonies, such as color, shape, size, elevation, texture and diffusible pigment.

Obtaining the crude extract of antimicrobial compound. This was done according to the method of Pandey *et al.* (2004) modified for soil actinomycetes. Selected actinomycetes were inoculated in 500 mL Erlenmeyer flasks with 150 mL of the yeast extract-glucose medium (Sultan *et al.*, 2002). The cultures were incubated at 28 °C for 10 d with constant stirring of 250 rpm, and then centrifuged at 4,000 rpm for 25 min. The recovery of antimicrobial metabolites from the supernatant was carried out by extraction with ethyl acetate and dichloromethane (Merck) (1:1, v/v), and vigorous stirring for 1 h (Liu *et al.*, 1986). The crude extract was concentrated and separated using a rotary evaporator (Buchi R-3000) at 40 °C; the residue was then weighed and reconstituted with dimethyl sulfoxide (DMSO; 10%) for storage and later analysis.

Determining the antimicrobial activity of the crude extract. Volumes of 50 μ L of crude extract recovered and reconstituted (4 mg/mL) were placed in wells (5mm) bored in Nutrient Agar medium plus 1 % glucose, where the control phytopathogenic bacteria had been previously seeded. The cultures were incubated at 30 °C for 48 h (*R. solanacearum*) and at 26 °C for 48 h (*P. carotovorum*). The medium used in the tests with phytopathogenic

2002). Los cultivos fueron incubados a 28 °C por 10 d en agitación constante de 250 rpm, y posteriormente centrifugados a 4000 rpm por 25 min. La recuperación de metabolitos antimicrobianos a partir del sobrenadante se realizó mediante extracción con acetato de etilo y diclorometano (Merck) en una proporción 1:1 (v/v) y agitado vigorosamente por 1 h (Liu *et al.*, 1986). El extracto crudo fue concentrado y separado con ayuda de un evaporador rotatorio (BUCHI R- 3000) a 40 °C; luego el residuo fue pesado y reconstituido con dimetilsulfoxido (DMSO) al 10 % para su conservación y análisis posterior.

Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto crudo. Volúmenes de 50 µL del extracto crudo recuperado y reconstituido (4 mg/mL), se colocó en pocillos (5 mm) practicados sobre el medio Agar Nutritivo + 1 % de glucosa, donde fue previamente sembrada la bacteria testigo fitopatógena. Los cultivos fueron incubados a 30 °C por 48 h (*R. solanacearum*) y a 26 °C por 48 h (*P. carotovorum*). En las pruebas frente a los hongos fitopatógenos el medio utilizado fue APD con incubación a 28 °C por 5 d. La actividad antimicrobiana en todos los casos se determinó por la medida del tamaño del halo de inhibición (mm de diámetro) según Pandey *et al.* (2004).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto crudo. Se realizó según Caviedes *et al.* (2002) en microplacas de 96 pocillos (Pure Grade – Merck). Las pruebas se realizaron distribuyendo las diluciones de los extractos crudos de los actinomicetos seleccionados en el caldo nutritivo + 1% de glucosa a doble concentración para las bacterias y caldo extracto de levadura + glucosa a doble concentración para los hongos y el oomiceto *P. infestans*. La cepa fitopatógena agregada a cada pocillo fue de 20 µL. Se incubó por 48 h para las bacterias

fungi was PDA, with incubation at 28° C for 5 d. In all cases, the antimicrobial activity was determined by measuring the size of the inhibition zone (mm in diameter) according to Pandey *et al.* (2004).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of crude extract. This was performed according to Caviedes *et al.* (2002) in 96-well microplates (Pure Grade-Merck). The tests were performed by spreading the dilutions of the crude extracts of the selected actinomycetes on the nutrient broth plus 1 % glucose, with double concentration of the bacteria and the yeast extract broth plus glucose, and double concentration also of the fungi and the oomycete *P. infestans*. The volume of the phytopathogenic strain added to each well was 20 µL. This was incubated for 48 h in the case of bacteria and for 5 d in the case of fungi and chromista. After this time, 50 µL of tetrazolium (Sigma) were added to all wells, which were then incubated for 24 h. A color change from yellow to purple was interpreted as bacterial growth.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of Actinomycetes from compost. A total of 85 strains of actinomycetes were isolated from compost piles from the land property “Casa Blanca”. Of these isolates, 51 were recovered from Czapek Dox agar (CDA) and 34 from starch casein agar (SCA). The isolates stored for further study were labelled according to their growth in the primary isolation medium and the sample number. In this work, the primary isolate of actinomycetes from compost was slightly higher in CDA compared to SCA (Table 1). These results are similar to those obtained by Horna (1996), although it should be noted that in that case the isolation was made from marine sediment, a completely different substrate to the one used in the present work.

y 5 d para los hongos y el cromista. Al cabo de este tiempo, se agregó 50 µL de tetrazolium (Sigma) a todos los pocillos y se incubaron durante 24 h. Un cambio de color del amarillo al púrpura fue interpretado como crecimiento de bacterias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de actinomicetos del compost. Se aislaron un total de 85 cepas de actinomicetos provenientes de pilas de compost del predio “Casa Blanca”. De los aislados, 51 actinomicetos se recuperaron del agar Czapeck Dox (ACZ) y 34 del agar almidón caseína (AAC). Los aislados para estudios posteriores se codificaron de acuerdo a su crecimiento en el medio de aislamiento primario y el número de muestreo.

En el presente trabajo, el aislamiento primario de actinomicetos a partir del compost fue ligeramente mayor en ACZ en comparación al AAC (Cuadro 1). Estos resultados son similares a los obtenidos por Horna (1996), aunque cabe señalar que en este último caso el aislamiento se realizó a partir de sedimento marino, un sustrato totalmente diferente al del presente trabajo.

Actinomicetos antagonistas a fitopatógenos de papa. De la totalidad de actinomicetos aislados (n=85), 65 (76.4 %) mostraron tener actividad antagonista al menos frente a un fitopatógeno en prueba y 20 (23.5 %) resultaron negativos. Asimismo, 20 (23.5 %) resultaron tener actividad en contra de *Ralstonia solanacearum* y 14 (16.4 %) frente a *Pectobacterium carotovorum* (Figura 1). El aislamiento con mayor actividad contra *R. solanacearum* fue la cepa ACZII-35 (32 mm de diámetro), en cambio contra *P. carotovorum* mostró mayor actividad la cepa AACI-5 (30 mm) (Cuadro 2). Asimismo, los actinomicetos del compost evaluados por su

Actinomicetes antagonistic to potato pathogens.

Of all the isolated actinomyces (n=85), 65 (76.4 %) showed antagonistic activity against at least one plant pathogen in the tests, while 20 (23.5 %) did not show any. Likewise, 20 isolated actinomyces (23.5 %) showed activity against *Ralstonia solanacearum*, and 14 (16.4 %) against *Pectobacterium carotovorum* (Figure 1). The isolate with the highest activity against *R. solanacearum* was the ACZII-35 strain (32 mm in diameter), while against *P. carotovorum*, the highest activity was shown by the AACI-5 strain (30 mm) (Table 2). In addition, the evaluation of actinomyces from compost by their antagonism against fungi, indicated that 22 strains (25.8 %) have activity against *Fusarium* sp., 52 isolates (61.1 %) against *Rhizoctonia solani* and 36 strains (43.5 %) against *Phytophthora infestans* (Figure 1). Of the evaluated actinomyces, 4 strains (4.7 %) (ACZI-24, ACZII-34, ACZII-52, ACZIII-69) showed a broad spectrum of antagonistic activity against the 5 phytopathogens, 10 strains showed antagonistic activity against 3 fungal pathogens, and 12 strains against the 2 bacterial pathogens (Table 2 and 3; Figure 2). The percentage of actinomyces that inhibited at least one fungal pathogen was 72.9 %; in contrast, 43.5% inhibited chromista and 23.5 %

Cuadro 1. Actinomicetos aislados de pilas de compostaje en proceso final, en el predio “Casa Blanca”, ubicado en Lurín, Lima, Perú.

Table 1. Isolated actinomyces from piles of compost in the final process, in the property of “Casa Blanca”, located in Lurín, Lima, Peru.

Medio de cultivo	Muestras			Total (%)
	I	II	III	
Agar Czapeck (ACZ)	16	16	19	51 (60)
Agar Almidón Caseína (AAC)	12	13	9	34 (40)
Total	28	29	28	85 (100)

antagonismo frente a hongos indican que 22 cepas (25.8 %) tienen actividad contra *Fusarium* sp., 52 cepas (61.1 %) contra *Rhizoctonia solani* y 36 cepas (43.5 %) contra *Phytophthora infestans* (Figura 1). De los actinomicetos evaluados, 4 cepas (4.7 %) (ACZI-24, ACZII-34, ACZII-52, ACZIII-69) mostraron amplio espectro de actividad antagonista a los 5 fitopatógenos; 10 cepas a los 3 patógenos fúngicos y 12 cepas a las 2 bacterias patógenas (Cuadros 2 y 3; Figura 2). El 72.9 % de actinomicetos inhibieron por lo menos un patógeno fúngico, en contraste el 43.5 % lo hicieron al cromista y el 23.5 % inhibieron por lo menos una de las bacterias patógenas. Los aislamientos con mayor actividad de inhibición fueron ACZI-22 frente a *R. solani* (inhibición de 27 mm de distancia) (Figura 3); ACZII-84 y ACZIII-88 a *Fusarium* sp (18 mm de distancia) (Figura 4) y AACI-5 a *P. infestans* (22 mm de distancia) (Cuadro 3 y Figura 5). Prapagdee *et al.* (2008) aislaron 146 cepas de actinomicetos de rizosfera y los confrontaron con dos hongos fitopatógenos (*Colletotrichum gloeosporioides* y *Sclerotium rolfsii*), solo 10 aislamientos mostraron capa-

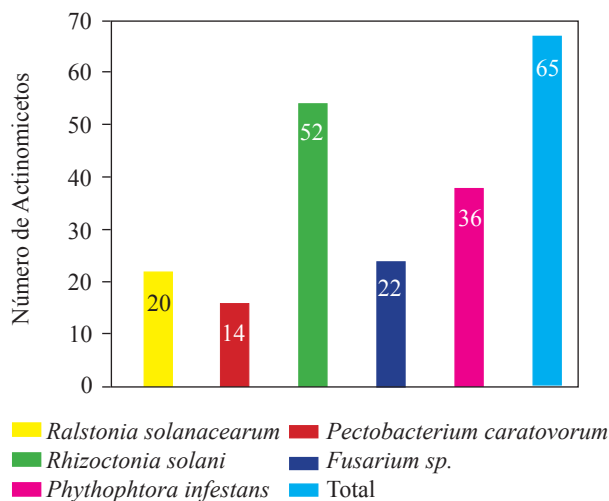


Figura 1. Actividad de antagonismo de actinomicetos del compost frente a 5 patógenos de papa.

Figure 1. Antagonistic activity of actinomycetes from compost against 5 potato pathogens.

Cuadro 2. Tamaño de los halos de inhibición originados por actinomicetos aislados de compost frente a bacterias patógenas de *Solanum tuberosum*.

Table 2. Size of the halos of inhibition caused by actinomycetes isolated from compost to combat pathogenic bacteria of *Solanum tuberosum*.

Actinomicetos	Halos de inhibición (mm)	
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
ACZI-2	11	(-)
ACZI-8	17	14
ACZI-24	21	21
ACZII-2	9	(-)
ACZII-34	25	17
ACZII35	32	24
ACZII-42	17	(-)
ACZII-52	16	20
ACZIII-62	19	17
ACZIII-69	19	19
ACZIII-75	14	(-)
ACZIII-82	15	(-)
AACI-5	28	30
AACI-9	18	18
AACII-41	18	(-)
AACII-44	17	(-)
AACII-45	10	13
AACIII-60	20	22
AACIII-65	17	20
AACIII-71	18	19
AACIII-72	16	(-)

Actividad de inhibición: buena ≥ 25 mm; intermedia <25 y >15 mm; escasa ≤ 15 mm; no actividad (-) / Inhibitory activity : Good ≥ 25 mm ; Intermediate <25 and >15 mm ; ≤ 15 mm Scarce ; No activity (-).

inhibited at least one of the pathogenic bacteria. The isolates with the highest inhibitory activity were ACZI-22, against *R. solani* (inhibition of 27 mm in distance) (Figure 3), ACZII-84 and ACZIII-88 against *Fusarium* sp. (18 mm in distance) (Figure 4) and AACI-5 against *P. infestans* (22 mm in distance) (Table 3 and Figure 5). Prapagdee *et al.* (2008) isolated 146 strains of actinomycetes from rhizosphere soil and confronted them with two pathogenic fungi (*Colletotrichum gloeosporioides*

Cuadro 3. Cepas de actinomicetos del compost seleccionados por su mayor actividad antagonista a hongos fitopatógenos de *Solanum tuberosum* (zona de inhibición en mm).

Table 3. Actinomycete strains from compost selected for its greater antagonist activity to phytopathogenic fungi of *Solanum tuberosum* (Inhibition zone in mm).

Actinomicetos	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Phytophthora infestans</i>
ACZI-8	20	9	9
ACZI-10	18	(-)	16
ACZI-11	21	(-)	14
ACZI-13	18	(-)	12
ACZI-18	21	(-)	(-)
ACZI-21	24	(-)	14
ACZI-22	27	(-)	17
ACZII-34	17	12	15
ACZII-37	15	(-)	10
ACZII-38	14	11	14
ACZII-43	15	11	11
ACZII-47	21	(-)	(-)
ACZII-52	17	14	12
ACZII-53	18	(-)	11
ACZIII-66	16	(-)	14
ACZIII-67	17	(-)	13
ACZIII-69	15	15	7
ACZIII-75	14	13	17
ACZIII-84	25	18	12
ACZIII-88	25	18	22
AACI-5	(-)	11	21
AACI-6	17	(-)	(-)
AACI-9	15	12	12
AACI-14	23	(-)	(-)
AACI-15	19	(-)	(-)
AACI-19	20	(-)	(-)
AACI-20	24	(-)	11
AACII-36	19	(-)	10
AACII-39	17	(-)	16
AACII-41	16	10	12
AACII-44	20	15	(-)
AACII-48	17	(-)	17
AACII-49	19	(-)	14
AACIII-68	13	(-)	16
AACIII-71	(-)	16	(-)
AACIII-76	18	(-)	14

Actividad de inhibición: Buena ≥ 20 mm; intermedia ≤ 20 mm > 15 mm; escasa < 15 mm; no actividad (-) / Inhibition activity: Good ≥ 20 mm; intermediate ≤ 20 mm > 15 mm; meagre < 15 mm; no activity (-).

idad antagonista a ambos patógenos; de manera similar, en el presente trabajo solo 10 aislados mostraron tal capacidad frente a los tres hongos fitopatógenos evaluados. Los actinomicetos de suelos han resultado ser excelentes antagonistas a fitopa-

and *Sclerotium rolfsii*); only 10 isolates showed antagonistic capacity against both pathogens. Similarly, in the present work only 10 isolates showed such capacity against the three pathogenic fungi tested. Soil actinomycetes have proved

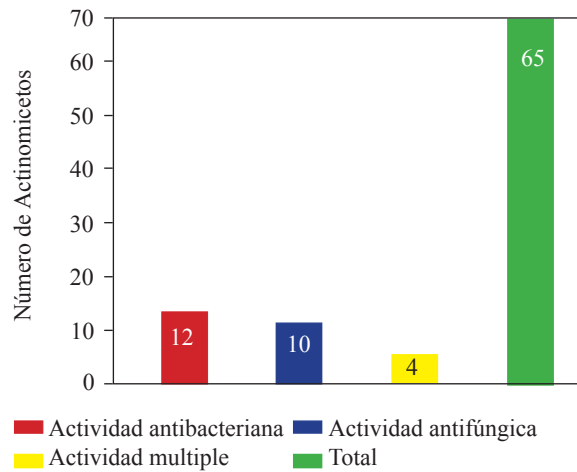


Figura 2. Actividad antagonista (múltiple, antibacteriana y antifúngica) de actinomicetos.

Figure 2. Antagonist activity (multiple, antibacterial and anti-fungal) of actinomycetes.

tógenos. Así, Ningthoujam *et al.* (2009) evaluaron 33 cepas de actinomicetos de suelos, de los cuales 4 mostraron actividad frente a patógenos de cultivos de arroz como *Curvularia oryzae*, *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris oryzae* y *Fusarium oxysporum*.

excellent antagonists against plant pathogens. Thus, Ningthoujam *et al.* (2009) evaluated 33 strains of soil actinomycetes, of which 4 showed activity against rice pathogens such as *Curvularia oryzae*, *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris oryzae* and *Fusarium oxysporum*. Furthermore, Iznagas *et al.* (2004) reported that of 563 actinomycetes isolated from Cuban soils, 286 showed antifungal activity against plant pathogens. In this study, 23.5 % of the isolates showed antagonistic activity against *R. solanacearum*, a slightly lower percentage than that obtained by Bittencourt & Da Silva (1999), who evaluated 190 actinomycetes isolated from the soil and rhizoplane of a tomato crop, and found that 52 of them showed active against *R. solanacearum*. Toledo (2004) evaluated three strains of *Bacillus* sp. obtained from soils that showed biocontrol activity *in vitro* against the pathogen *P. carotovorum*. Likewise, Reinozo *et al.* (2006) isolated *Bacillus* sp. from soil and found 7 strains with inhibitory effect *in vitro* against *P. carotovorum*. Although bacteria of the genus *Bacillus* are generally use for

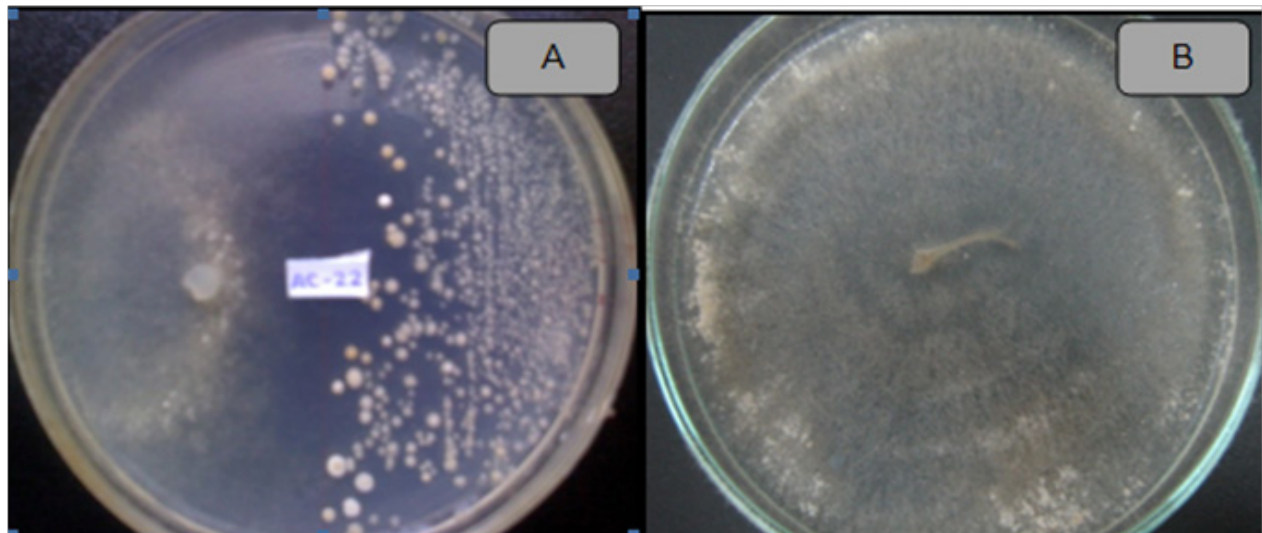


Figura 3. Actividad antifúngica del actinomiceto ACZI-22 frente a *Rhizoctonia solani* (A), control (B).

Figure 3. Antifungal activity of actinomycete ACZI-22 against *Rhizoctonia solani* (A), control (B).

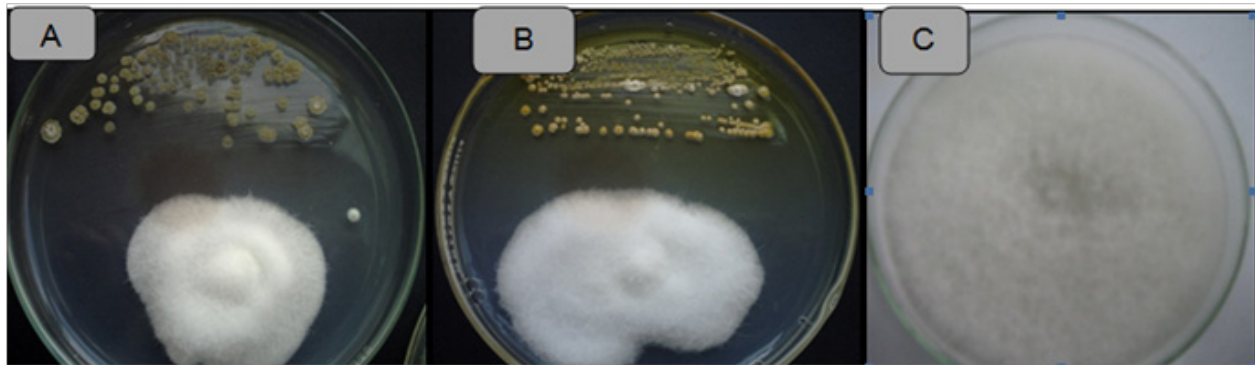


Figura 4. Actividad antagonista de actinomicetos frente a *Fusarium* sp. Cepa ACZIII-84 (A), cepa ACZIII-88 (B), control (C).
Figure 4. Antagonistic activity of Actinomycetes against *Fusarium* sp. Strain ACZIII-84 (A), strain ACZIII-88 (B), control (C).

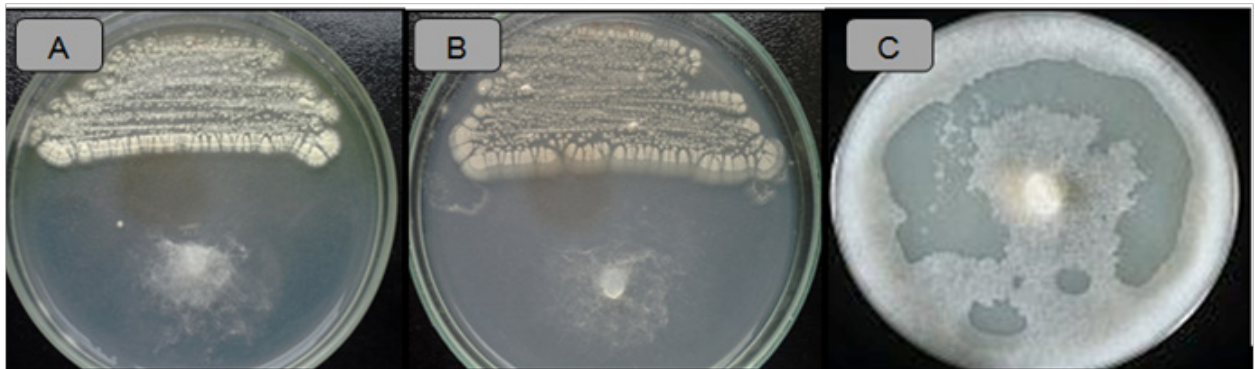


Figura 5. Actividad antagonista de actinomicetos frente a *Phytophthora infestans*. Cepa ACZIII-88 (A), cepa AACI-5 (B), control (C).
Figure 5. Antagonistic activity of Actinomycetes against *Phytophthora infestans*. Strain ACZIII-88 (A), strain AACI-5 (B), control (C).

Por otro lado, Iznaga *et al.*, (2004) reportaron que de 563 actinomicetos aislados de suelos cubanos, 286 mostraron actividad antifúngica a patógenas de plantas. En el presente trabajo, el 23.5 % de los aislados tuvieron actividad antagonista frente a *R. solanacearum*, porcentaje ligeramente menor a los resultados obtenidos por Bittencourt & Da Silva (1999), quienes evaluaron 190 actinomicetos aislados de suelo y rizoplano del cultivo de tomate frente a *R. solanacearum*, resultando 52 de ellos activos contra este patógeno. Toledo (2004), evaluó tres cepas de *Bacillus* sp, obtenidas de suelos, las cuales presentaron capacidad biocontroladora *in vitro*

the biocontrol of crop diseases, it is also important to note that actinomycetes play an important role in soil colonization. Oskay *et al.* (2004) tested 50 soil actinomycetes against plant pathogens and found 3 strains that were active against *Pectobacterium amylovora*, 5 against *Pseudomonas viridiflava*, 4 against *Agrobacterium tumefaciens*, and 5 against *Clavibacter michiganensis*. In this study, 13 actinomycetes were antagonistic against *P. carotovorum*, indicating that strains isolated from compost had a higher inhibitory capacity. These strains showed antibacterial and antifungal capacity.

sobre el patógeno *P. carotovorum*. Así mismo, Reinozo *et al.* (2006) aislaron *Bacillus* sp. del suelo, y 7 cepas tuvieron efecto inhibitorio *in vitro* sobre *P. carotovorum*; si bien las bacterias del género *Bacillus* son generalmente usadas para el biocontrol de enfermedades de cultivos, también es importante resaltar que los actinomicetos juegan un papel muy importante en la colonización de los suelos. Oskay *et al.* (2004) evaluaron 50 actinomicetos de suelos frente a fitopatógenos, de los cuales 3 tuvieron actividad contra *Pectobacterium amylovora*, 5 contra *Pseudomonas viridiflova*, 4 contra *Agrobacterium tumefaciens* y 5 contra *Clavibacter michiganensis*. En el presente trabajo, 13 actinomicetos fueron antagonistas contra *P. carotovorum*, mostrando que las cepas aisladas del compost resultan tener mayor capacidad de inhibición. Estas cepas mostraron capacidad antibacteriana y antifúngica.

Respecto a *Fusarium* sp., el presente estudio revela que el 25.8 % de los aislados resultaron antagonistas a este hongo, porcentaje considerablemente mayor comparado con los estudios de Oskay (2009), quien evaluó la actividad antifúngica de *Streptomyces* aislados de suelos frente a fitopatógenos como *Penicillium* sp., *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, siendo éste último ser menos sensible a la actividad antagonista del *Streptomyces*. De Boer *et al.* (1998) demostraron que 12 % de las bacterias quitinolíticas generaron inhibición frente a *F. oxysporum*, mientras que 56 % inhibió a *F. culmorum*. Por otro lado, Ikeda *et al.* (2000) evaluaron 4000 actinomicetos, de los cuales solo 27 % resultaron ser antagonistas contra *Fusarium* sp. De estas investigaciones se puede concluir que *Fusarium* sp. tiene una gran variación en términos de susceptibilidad frente a los compuestos activos de actinomicetos.

El antagonismo de actinomicetos a *R. solani* en este estudio estuvo representado por 61.2 % de los aislados. Kathiresan *et al.* (2005) evaluaron

Regarding *Fusarium* sp., this study revealed that 25.8 % of the isolates were antagonistic to the fungus, a considerably higher percentage compared to the studies by Oskay (2009), who evaluated the antifungal activity of *Streptomyces* isolated from soil against plant pathogens such as *Penicillium* sp., *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*; the latter was the least sensitive to the antagonistic activity of *Streptomyces*. De Boer *et al.* (1998) demonstrated that 12% of chitinolytic bacteria had inhibitory effects against *F. oxysporum*, while 56% inhibited *F. culmorum*. In addition, Ikeda *et al.* (2000) evaluated 4000 actinomycetes, of which only 27% were found to be antagonists against *Fusarium* sp. From these studies, it can be concluded that the susceptibility of *Fusarium* sp. to the active compounds of actinomycetes varies greatly.

In this study, 61.2 % of the isolates of actinomycetes showed antagonism against *R. solani*. Kathiresan *et al.* (2005) evaluated actinomycetes, though isolated from marine sediment, against different plant pathogens, reporting that 31% were effective against *R. solani*. That result is lower than the one found in this study; even though marine actinomycetes are considered greater producers of these metabolites. Meanwhile, Farfan and Gutierrez (2009) evaluated the antagonistic effect of 13 compost actinomycetes against *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* sp.; 3 of these isolates were found to have the highest percentages of inhibition against *Rhizoctonia* sp., and 5 against *Fusarium* sp.

Regarding the size of the inhibition zones, in the present study, actinomycetes inhibited up to 27 mm in distance against *R. solani*. Rothrock and Gottlieb (1981) reported inhibition zones of up to 15 mm, which indicates that our strains had higher antagonistic activity against this plant pathogen. Furthermore, *P. infestans* was inhibited by 43.5% of the actinomycete strains evaluated in this study;

actinomicetos, aunque aislados de sedimento marino contra diferentes fitopatógenos, reportando entre otros que 31 % tuvieron efectividad contra *R. solani*. Este resultado es menor al registrado en este estudio, a pesar que los actinomicetos marinos son considerados como mayores productores de estos metabolitos. Por su parte, Farfán y Gutiérrez (2009) evaluaron el efecto antagonista de 13 actinomicetos del compost sobre *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp.; 3 de estos aislados resultaron tener los mayores porcentajes de inhibición de *Rhizoctonia* sp. y 5 de *Fusarium* sp.

Respecto al tamaño de las zonas de inhibición, en el presente estudio los actinomicetos llegaron a inhibir hasta 27 mm de distancia frente a *R. solani*. Rothrock y Gottlieb (1981) reportaron zonas de inhibición de hasta 15 mm, lo que nos indica que nuestras cepas presentan mayor capacidad de antagonismo a este fitopatógeno. Por otro lado, *P. infestans* fue inhibida por 43.5 % de las cepas de actinomicetos evaluadas en este estudio; este valor es menor comparado a los resultados de Valois *et al.* (1996) quienes reportaron que *Phytophthora* sp. fue inhibida por 72 % de los actinomicetos aislados de suelos.

En las pruebas de antagonismo en el presente estudio se utilizó con éxito el agar Czapeck (ACZ); sin embargo, Al-Zahrani (2007) quien evaluó la actividad antagonista de *Streptomyces* sp. frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* y hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* reportó mejores resultados en los medios agar almidón caseína para bacterias y agar extracto de malta-levadura, agar Sabouraud dextrosa y agar avena para los hongos. Las pruebas de antagonismo frente a los hongos patógenos efectuadas en el presente estudio se realizaron en el medio APD, demostrando que este medio es adecuado para las evaluaciones efectuadas. Otros autores

this value is lower compared to the results of Valois *et al.* (1996), who reported that *Phytophthora* sp. was inhibited by 72 % of the actinomycetes isolated from soils.

In the present study, Czapek agar (CZA) was used successfully in antagonism tests; however, Al-Zahrani (2007), who evaluated the antagonistic activity of *Streptomyces* sp. against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* and fungal phytopathogens such as *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*, reported better results in media starch casein agar media against bacteria, and in yeast-malt extract agar, Sabouraud dextrose agar and oatmeal agar against fungi. The antagonism tests against pathogenic fungi made in the current study were performed on PDA medium, which demonstrated its suitability for such tests. Other authors also used PDA in similar tests, even suggesting that it enhanced pathogen inhibition (Ezziyyani *et al.*, 2004; Farfan and Gutiérrez, 2009). Oatmeal agar (recommended for growing *Phytophthora infestans*) was also used successfully in this work, unlike the findings of Duke and Quintana (2008) in similar tests of actinomycetes against *F. oxysporum*. These results indicate that the mode of action of the antagonists may vary according to the control pathogen. The antagonism varies not only between fungi of different genera, as is the case in this study, but also between fungi of the same genus but different species; one example is the case of De Boer *et al.* (1998), who reported that 12 % of chitinolytic bacteria inhibited the growth of *F. oxysporum*, while 56 % inhibited the growth of *F. culmorum*.

Macroscopic and microscopic analysis of selected strains. For the macroscopic and microscopic evaluation, we considered only the actinomycetes the showed the highest antagonism

en pruebas similares también utilizaron APD, sugiriendo inclusive su uso porque consideran que intensifica la inhibición del patógeno (Ezziyyani *et al.* 2004; Farfán y Gutiérrez, 2009). El agar avena (recomendado para el crecimiento de *Phytophthora infestans*) también se utilizó con éxito en el presente trabajo, a diferencia de lo encontrado por Duque y Quintana (2008) en pruebas similares de actinomicetos frente a *F. oxysporum* no tuvieron los mismos resultados. Estos resultados nos indican que el modo de acción de los antagonistas puede variar según el patógeno testigo. El antagonismo no solo varía entre hongos de diferente género como es el caso de este estudio, sino también entre hongos del mismo género pero diferentes especies; por mencionar el caso de De Boer *et al.* (1998) quienes reportaron que 12 % de las bacterias quitinolíticas antagonistas inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum*, mientras que 56 % inhibió el crecimiento de *F. culmorum*.

Análisis macroscópico y microscópico de cepas seleccionadas. En la evaluación macroscópica y microscópica se tuvo en cuenta sólo a los actinomicetos que mostraron mayor antagonismo tanto a las bacterias como a los hongos fitopatógenos. Los actinomicetos seleccionados fueron las cepas ACZII-35 y AACI-5 (por ser mejores antagonistas a *R. solanacearum* y *P. carotovorum*, respectivamente) y las cepas ACZI-22, ACZIII-88 y ACZIII-84 (por ser mejores antagonistas contra *R. solani*, *Fusarium* sp. y *P. infestans* respectivamente). Los resultados se pueden observar en la Cuadro 4. Las características de cultivo y las observaciones microscópicas a partir de microcultivos y el comportamiento cultural de las 5 cepas de actinomicetos seleccionados nos indican que todos son posibles miembros del género *Streptomyces* (Figura 6), sin embargo se debe confirmar mediante pruebas moleculares.

against both phytopathogenic bacteria and fungi. The selected actinomycetes were the strains ACZII-35 and AACI-5 (better antagonists against *R. solanacearum* and *P. carotovorum*, respectively), and strains ACZI-22, ACZIII-88 and ACZIII-84 (better antagonists against *R. solani*, *Fusarium* sp. and *P. infestans*, respectively). The results are shown in Table 4. The culture characteristics, the microscopic observations in microcultures and the culture behavior of the 5 selected strains of actinomycetes, indicated that all were potential members of the genus *Streptomyces* (Figure 6), but this must be confirmed by molecular testing.

According to the literature, the genus *Streptomyces* is the main responsible for the production of most bioactive metabolites. In particular, *Streptomyces* is part of an important group within the actinomycetes, as these are able to produce various types of secondary metabolites (Baltz, 2006).

But soil, including compost, is not only inhabited by *Streptomyces*; there are also other kinds of actinomycetes, as reported by Remya and Vijayakumar (2008), who in 64 colonies of actinomycetes, identified *Streptomyces* (30) (47 %), *Galactomyces* (10), *Nocardiosis* (7), *Nocardioides* (4), *Actinopolyspora* (3), *Nocardia* (3), *Kibdelosporangium* (2), *Actinosynnema* (1), *Kineosporia* (1) and *Saccharopolyspora* (1). Similarly, Nakashima *et al.* (2009) isolated 800 strains of actinomycetes, and compared them with strains from the NBRC (National Biological Research Center); 64 of them showed similarity to 36 *Streptomyces* NRBC, specifically to the *Streptomyces griseus* group, which has activity against *Kocuria rhizophila* and *Aspergillus oryzae*, and produces compounds such as streptomycin and bafilomycin, with antibacterial and antifungal activity, respectively. Yuan and Crawford (1995) pointed to mechanisms of *Streptomyces lydicus*

Cuadro 4. Características fenotípicas de actinomicetos seleccionados por su mayor actividad inhibitoria de fitopatógenos de *Solanum tuberosum*.

Table 4. Phenotypic characteristics of Actinomycetes selected by the most inhibitory activity of pathogenic of *Solanum tuberosum*.

Actinomicetos	Pigmento del micelio aéreo	Pigmento del micelio substrato	Elevación	Textura
AACI – 5	Grisáceo	No	Si	Pulverulenta
ACZI – 22	Blanquecino	No	Si	Seca
ACZII – 35	Blanco-grisáceo	No	Si	Rugosa
ACZIII – 84	Verdoso, con borde blanquecino	Marrón-verdoso	Si	Rugosa
ACZIII – 88	Blanquecino	Amarillento	Si	Seca

Según la literatura consultada, el género *Streptomyces* es el principal responsable en la producción de la mayoría de los metabolitos bioactivos. En particular, *Streptomyces* forma parte de un grupo importante dentro de los actinomicetos, porque éstos son capaces de producir varios tipos de metabolitos secundarios (Baltz, 2006).

WYEC108 (isolated from the rhizosphere of plants) for controlling *Pythium ultimum* through antifungal compounds and extracellular chitinase, which destroy not only the spores, but also damage the hyphal cell wall; this showed that *S. lydicus* WYEC108 has biocontrol potential against *P. ultimum*.

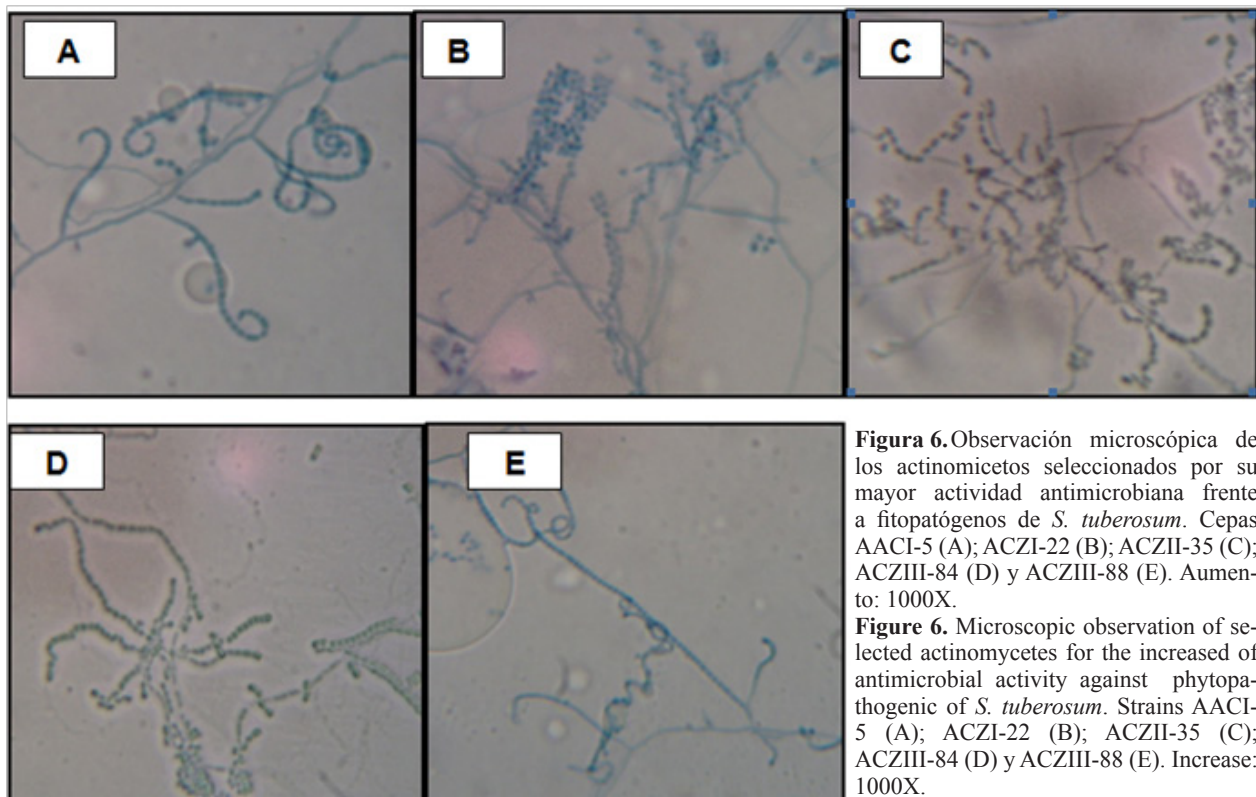


Figura 6. Observación microscópica de los actinomicetos seleccionados por su mayor actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos de *S. tuberosum*. Cepas AACI-5 (A); ACZI-22 (B); ACZII-35 (C); ACZIII-84 (D) y ACZIII-88 (E). Aumento: 1000X.

Figure 6. Microscopic observation of selected actinomycetes for the increased of antimicrobial activity against phytopathogenic of *S. tuberosum*. Strains AACI-5 (A); ACZI-22 (B); ACZII-35 (C); ACZIII-84 (D) y ACZIII-88 (E). Increase: 1000X.

Pero no solo *Streptomyces* habita en el suelo, incluido el compost; también otros géneros de actinomicetos como lo reportaron Remya y Vijayakumar (2008); quienes de 64 colonias de actinomicetos, identificaron *Streptomyces* (30) (47%), *Glicomyces* (10), *Nocardiosis* (7), *Nocardiodes* (4), *Actinopolispora* (3), *Nocardia* (3), *Kibdelosporangium* (2), *Actinosinnema* (1), *Kineosporia* (1) y *Saccharopolyspora* (1). De igual manera, Nakashima *et al.* (2009) aislaron 800 cepas de actinomicetos, los cuales fueron comparados con cepas de NBRC (National Biological Reserch Center), 64 de ellas mostraron similitud con 36 *Streptomyces* NRBC, específicamente al grupo *Streptomyces griseus*, con actividad frente a *Kocuria rhizophila* y *Aspergillus oryzae*; además productoras de compuestos como streptomycin y bafilomicin con actividad antibacteriana y antifúngica, respectivamente. Yuan y Crawford (1995) señalaron mecanismos de *Streptomyces lydicus* WYEC108 (aislado de la rizósfera de plantas) en el control de *Pythium ultimum* a través de antifúngicos y quitinasa extracelular que destruye no solo las esporas, también dañan la pared celular de las hifas, demostrando que *S. lydicus* WYEC108 tiene potencial biocontrolador sobre *P. ultimum*.

Obtención del extracto crudo y actividad antimicrobiana. Los extractos obtenidos después del cultivo y posterior obtención con solventes orgánicos fueron concentrados hasta obtener los pesos secos de cada cepa (Cuadro 5). La extracción de compuestos activos se realizó utilizando dos solventes de polaridad distinta como son el diclorometano (DCM) y el acetato de etilo (EtAC). Se observó ligera variación en la recuperación de extractos crudos; en este caso los extractos de EtAC mostraron cierta ventaja a los del DCM. Asimismo, en cuanto al rendimiento antimicrobiano, el extracto recuperado con EtAC tuvo mejor actividad inhibitoria que

Obtention of crude extract and antimicrobial activity. The extracts obtained after the culture with organic solvents were concentrated until obtaining the dry weight of each strain (Table 5). The extraction of active compounds was carried out using two solvents of different polarity: dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (EtAc). We observed a slight variation in the recovery of crude extracts; in this case, the EtAC extracts showed a certain advantage over DCM extracts. Likewise, regarding the antimicrobial performance, the extract recovered with EtAc had better inhibitory activity than the DCM extract. Leiva *et al.* (2004) selected 13 strains out of a total of 31 actinomycetes in order to obtain extracts using 5 solvents of increasing polarity; these were petroleum ether, chloroform, ethyl methyl ketone, ethyl acetate and butanol; the most active extracts were those obtained with ethyl methyl ketone and ethyl acetate. In addition, Remya and Vijayakumar (2008) used extracts obtained with ethyl acetate, methanol, chloroform and ethanol against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*; the ethyl acetate extract showed the greatest inhibition capacity. Other authors such as Dhanasekaran *et al.* (2005) obtained different results with extracts obtained

Cuadro 5. Extracto crudo obtenido del cultivo de las cepas seleccionadas.

Table 5. Crude extract obtained from selected crop strains.

Actinomicetos	Peso seco (mg)	
	Acetato de etilo	Diclorometano
AACI – 5	9.0	2.5
ACZI – 22	11.5	16.3
ACZII – 35	2.2	2.8
ACZIII – 84	9.2	3.2
ACZIII – 88	30.7	4.3

el de DCM. Leiva *et al.* (2004) seleccionaron 13 cepas de un total 31 actinomicetos para obtener extractos con 5 solventes de polaridad creciente; éstos fueron éter de petróleo, cloroformo, etilmetilcetona, acetato de etilo y butanol; siendo los extractos más activos los obtenidos con etilmetilcetona y acetato de etilo. Asimismo, Remya y Vijayakumar (2008) utilizaron extractos obtenidos con acetato de etilo, metanol, cloroformo y etanol frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*; siendo el extracto de acetato de etilo el de mayor capacidad de inhibición. Otros autores como Dhanasekaran *et al.* (2005), obtuvieron resultados distintos a partir de extractos con anilina, cloroformo, piridina y acetato de etilo frente a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*, *V. cholerae*, *S. typhi*, *Sh. dysenteriae*, *S. aureus*, *P. mirabilis* y *B. subtilis*; sin embargo, los extractos de acetato de etilo fueron los que generaron mejores resultados. Narayana *et al.* (2008) separaron 4 fracciones bioactivas del extracto crudo de acetato de etilo de *Streptomyces* sp. y los enfrentó a hongos fitopatógenos, resultando *Fusarium udum* y *Penicillium citrinum* susceptible a las 4 fracciones, mientras *Fusarium oxysporum* mostró resistencia a una de las fracciones. En este sentido, nuestros resultados ratifican al EtAC como uno de los mejores solventes en la recuperación de metabolitos bioactivos de actinomicetos. La actividad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos con los dos solventes fue evidente tanto para las bacterias como los hongos patógenos de la papa. Algunos resultados de estas pruebas se pueden observar en la Figura 7. Respecto a la actividad antimicrobiana de los actinomicetos existen diversos trabajos que señalan su producción durante la fase exponencial final y la estacionaria. Prapagdee *et al.* (2008) aislaron *S. hygrosopicus* productor de un potente inhibidor de fitopatógenos; estos productos fueron una quiti-

with aniline, chloroform, pyridine and ethyl acetate against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*, *V. cholerae*, *S. typhi*, *Sh. dysenteriae*, *S. aureus*, *P. mirabilis* and *B. subtilis*, but the ethyl acetate extracts had the best results. Narayana *et al.* (2008) separated 4 bioactive fractions from the crude ethyl acetate extract of *Streptomyces* sp. and confronted them with phytopathogenic fungi; *Fusarium udum* and *Penicillium citrinum* showed susceptibility to the 4 fractions, while *Fusarium oxysporum* showed resistance to one of the fractions. In this respect, our results confirm the EtAC as one of the best solvents for recovering bioactive metabolites from actinomyces. The antimicrobial activity of the crude extracts obtained with the two solvents was evident both in bacterial and fungal pathogens of potato. Some results of these tests can be seen in Figure 7. Regarding the antimicrobial activity of actinomyces, there are several studies that indicate its presence during the final exponential and stationary phases. Prapagdee *et al.* (2008) isolated *S. hygrosopicus*, which produces potent inhibitory compounds of plant pathogens; these compounds are an extracellular chitinase and a β -1,3-glucanase produced during the exponential and late exponential phases, respectively. According to Joo (2005), *Streptomyces halstedii* AJ-7 produces a cellular chitinase that causes abnormal morphologies in fungal hyphae, growth aberrations, hyphal swelling and cell wall lysis. Farfan and Gutierrez (2009) note that there may be synergy between chitinase-type enzymes and other antifungal metabolites in the inhibition process of fungal pathogens.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of extracts of actinomyces against plant pathogens. The results of this test are show in Table 6. We used extracts of AACI-5 and ACZII-35 to determine the MIC of *P. carotovorum* and *R.*

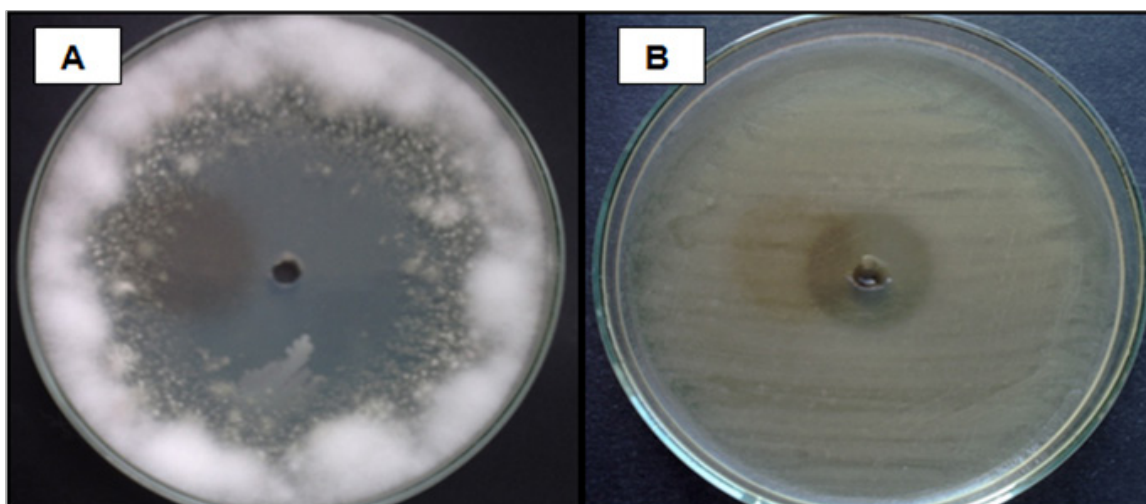


Figura 7. Actividad inhibitoria del extracto obtenido con Acetato de Etilo a partir de la cepa ACZIII-88 frente a *Fusarium sp.*, (A) y de la cepa ACZII-35 frente a *Pectobacterium carotovorum* (B).

Figure 7. Inhibitory activity of the extract obtained with Ethyl Acetate from the strain ACZIII-88 compared to a *Fusarium sp.*, (A) and strain ACZII-35 compared to *Pectobacterium carotovorum* (B).

nasa extracelular y una β -1,3-glucanasa producida durante la fase exponencial y exponencial tardía respectivamente. Según Joo (2005), *Streptomyces halstedii* AJ-7 produce una quitinasa celular, la cual causa en las hifas de los hongos morfologías anormales, aberraciones en su crecimiento, hinchazón de las hifas y lisis de la pared celular. Farfán y Gutiérrez (2009) señalan que es posible que exista sinergismo en el proceso de inhibición de los hongos fitopatógenos entre enzimas tipo quitinasas y otros metabolitos antifúngicos.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de extractos de actinomicetos frente a fitopatógenos.

Los resultados de esta prueba se observan en la Cuadro 6. Se utilizaron los extractos de AACI-5 y ACZII-35 para determinar la CMI de *P. carotovorum* y *R. solanacearum*. La concentración inicial para los extractos de EtAC y DCM fue de 2 mg.mL⁻¹. En términos generales, se puede afirmar que el extracto DCM de la cepa ACZII-35 tuvo mejor rendimiento, alcanzando una CMI de

solanacearum. The initial concentration of the EtAC and DCM extracts was 2 mg.mL⁻¹. Overall, we can say that the DCM extract of the ACZII-35 strain had a better performance, reaching a MIC of 0.125 mg.mL⁻¹ against *R. solanacearum*, while the EtAC extract of the AACI-5 strain reached a MIC of 0.2 mg.mL⁻¹ against *P. carotovorum*. To determine the MIC of *Fusarium sp.*, we chose the extracts of the strains ACZIII-84 and ACZIII-88, with an initial concentration of 2 mg.mL⁻¹. Both extracts showed low performance (Table 6). For the MIC of *R. solani*, we used the extracts of ACZI-22 and ACZIII-88 with an initial concentration of 2 mg.mL⁻¹. The results indicate that inhibiting this pathogen required 0.125 mg.mL⁻¹ of the DCM extract of the ACZIII-88 strain. The other extracts achieved poor results. Finally, the extracts of AACI-5 and ACZIII-88 were used to determine the MIC of *P. infestans*; both extracts had an initial concentration of 4 mg.mL⁻¹. In this case, the extracts showed good performance at fairly low concentrations; only 0.0625 mg.mL⁻¹

Cuadro 6. Concentración Mínima Inhibitoria ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de extractos crudos de actinomicetos.
Table 6. Minimum Inhibitory Concentration ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) of crude extracts of actinomycetes.

Patógenos	Actinomicetos									
	AACI-5		ACZI-22		ACZII-35		ACZIII-84		ACZIII-88	
	EtAC	DCM	EtAC	DCM	EtAC	DCM	EtAC	DCM	EtAC	DCM
<i>R. solanacearum</i>	0.25	(-)	ND	ND	0.5	0.125	ND	ND	ND	ND
<i>P. carotovorum</i>	0.2	(-)	ND	ND	1	0.25	ND	ND	ND	ND
<i>R. solani</i>	ND	ND	0.5	1.0	ND	ND	ND	ND	0.5	0.125
<i>Fusarium</i> sp.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	(-)	(-)	1	2
<i>P. infestans</i>	0.063	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.125	0.125

Extractos: EtAC (Acetato de Etilo); DCM (Diclorometano); (-) Negativo; ND: no determinado / EtAC (Ethyl acetate); DCM (dichloromethane); (-) Negative; ND: undetermined.

0.125 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente *R. solanacearum*; en tanto que para *P. carotovorum* fue el extracto EtAC de la cepa AACI-5 que alcanzó una CMI de 0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para determinar la CMI de *Fusarium* sp. se eligió los extractos de las cepas ACZIII-84 y ACZIII-88, siendo la concentración inicial de 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. El rendimiento de ambos extractos fue bajo (Cuadro 6). En el caso de la CMI de *R. solani* se utilizaron los extractos de ACZI-22 y ACZIII-88 con una concentración inicial de 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los resultados señalan que para inhibir a este patógeno fue necesario 0.125 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ del extracto DCM de la cepa ACZIII-88. Los otros extractos alcanzaron resultados bajos. Finalmente, los extractos de AACI-5 y ACZIII-88 se utilizaron para determinar la CMI de *P. infestans*; siendo la concentración inicial para ambos extractos de 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. En este caso los extractos mostraron buen rendimiento a concentraciones bastante bajas, siendo suficiente 0.0625 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) del extracto EtCA de la cepa AACI-5 para inhibir el desarrollo del oomiceto *P. infestans*. Trabajos similares al presente fueron realizados por Narayana *et al.* (2008), quienes determinaron la CMI de 4 fracciones del compuesto bioactivo de *Streptomyces* sp. ANU 6277 frente

(62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of the EtCA extract of the AACI-5 strain was required to inhibit the growth of the oomycete *P. infestans*. Similar studies to this one were conducted by Narayana *et al.* (2008), who determined the MIC of 4 fractions of the bioactive compound of *Streptomyces* sp., ANU 6277, against *F. udum*, *Penicillium citrinum* and *F. oxysporum*, all of which were susceptible to the AF3 fraction at concentrations of 2, 5 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. Taechowisan *et al.* (2005) determined the MICs of two fractions, (i) and (ii), of the bioactive compound of *Streptomyces aureofaciens*, CMUAc 130, against *Colletotrichum musae*; the values were 120 and 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively.

Although in this study the MIC was evaluated from crude extract containing the bioactive compound, other authors, such as Taechowisan *et al.* (2005) and Narayana *et al.* (2008), evaluated the MIC from purified fractions, and thus the inhibitory activity was more efficient. Preliminary *in vitro* assays allow to know if the microorganisms are good antagonists, in order to evaluate their possible use in *in vivo* assays, as proposed by Bittencourt *et al.* (1998), who evaluated 190 actinomycetes isolated from rhizosphere of tomato against

a *F. udum*, *Penicillium citrinum* y *F. oxysporum*, resultando susceptibles a la fracción AF3 a concentraciones de 2, 5 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. Taechowisan *et al.* (2005) determinaron la CMI de dos fracciones (i) y (ii) del compuesto bioactivo de *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 frente a *Colletotrichum musae*, siendo estos valores de 120 y 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

Si bien, en este trabajo la CMI se evaluó a partir del extracto crudo que contenía el compuesto bioactivo, otros autores como Taechowisan *et al.* (2005) y Narayana *et al.* (2008), evaluaron la CMI a partir de fracciones purificadas, por lo tanto la actividad inhibitoria fue más eficiente. Los ensayos *in vitro* son preliminares para saber si los microorganismos son buenos antagonistas y de esta manera evaluar su posible uso en ensayos *in vivo*, tal como plantearon Bittencourt *et al.* (1998), quienes evaluaron 190 actinomicetos aislados de rizosfera de tomate frente a *Ralstonia solanacearum*, de los cuales 18 mostraron 100% de efectividad, siendo la mejor vía de inoculación en semillas o raíces. Tuomi *et al.* (2001) aplicaron a través de un sistema de irrigación para el control de patógenos importantes como *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola*.

CONCLUSIÓN

Este estudio demuestra que cepas de actinomicetos aislados de compost poseen un relevante antagonismo contra importante fitopatógenos fúngicos y bacterianos de *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. Esto permite afirmar que representan posibles candidatos para ser utilizados en programas de control biológico, en la producción de dicho cultivo, como parte de una práctica de agricultura sostenible.

Ralstonia solanacearum, of which 18 were 100% effective; the best inoculation pathways were seeds and roots. Tuomi *et al.* (2001) applied antagonistic microorganisms through an irrigation system to control important pathogens such as *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola*.

CONCLUSION

This study demonstrates that actinomycete strains isolated from compost have significant antagonistic capacity against important fungal and bacterial phytopathogens of *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. This allows us to affirm that they are possible candidates for use in biological control programs in the production of this crop as part of sustainable agriculture practices.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Vicerrectorado de Investigación (VRI) of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Peru for funding through the program of work Undergraduate Thesis, 2010 (RR No. 01746-R-10).

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Vicerrectorado de Investigación (VRI) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú por su financiamiento a través del Programa de Trabajos de Tesis de Pregrado, 2010 (RR N° 01746-R-10).



## LITERATURA CITADA

- AL-Zaharani S. 2007. Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from Japan. Science Journal of King Abdulaziz University 19(1): 127-138.
- Arios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press, New York, USA. 992p.
- Arslan E, Obek E, Kirbag S, Ipek U and TOPAL M. 2008. Determination of the effect of compost on soil microorganisms. International Journal of Science and Technology 3(2): 151-159.
- Baltz R. 2006. Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? Journal Indian Microbiology Biotechnology 33: 507-513.
- Bittencourt A y Da Silva R. 1999. Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum*. Ciencia y Agrotecnología Lavras 23(2): 281-288.
- Bittencourt A, Da Silva R and Prata M. 1998. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. Pesqueria Agropecuaria Brasília 33 (12): 2065-2072.
- Bobadilla C y Rincón S. 2008. Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos "plaza". Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.
- Caviedes L, Delgado J and Gilman R. 2002. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. American Society for Microbiology 40(5): 1873-1874.
- Crowford D, Lynch J, Whipps J and Ousley M. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogens. Applied and Environmental Microbiology 59: 3899-3905.
- De Boer B, Gunnewiek K, Lafeber P, Janse J, Spit B and Wolvendorp J. 1998. Antifungal properties of dune soil bacteria. Soil Biology and Biochemistry 30: 193-203.
- Dhanasekaran D, Rajakumar G, Sivamani P, Selvamani R, Panneerselvam A and Thajuddin N. 2005. Screening of Salt Pans actinomycetes for antibacterial agents. The Internet Journal of Microbiology 1(2): 6-12.
- Dopazo C, Lemos M, Lodeiros C, Bolinches J, Barja J and Toranzo A. 1988. Inhibitory activity of antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens. Journal Applied Bacteriology 65(2): 97-101.
- Duque C and Quintana M. 2008. Determinación preliminar de la actividad promotora de crecimiento vegetal de actinomicetos aislados del suelo. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Elphinstone J. 1987. La pudrición blanda y la pierna negra de la papa. *Erwinia* sp. Boletín de información técnica 21. Lima: Centro Internacional de la Papa, 18p.
- Ezziyyani M, Perez C, Requena M, Rubio L y Candela M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* - ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: 69-78.
- FAO (Food and Agricultural Organization). 2008. Material de propagación de calidad declarada. Estudio FAO. Producción y Protección Vegetal 195. p79. <http://www.fao.org/news/archive/news-by-date/2014/en/>
- Farfán D y Gutierrez C. 2009. Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetos y su efecto antagónico sobre microorganismos fitopatógenos. Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.
- Franco-Correa M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis para optar al Grado de Doctor. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Granada-España.
- Franco-Correa M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. Revista Peruana de Biología 16(2): 239-242.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P and Chhatpar H. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganism. African Journal of Biotechnology 5: 54-72.
- Gonzalez-Franco A, Deobald L, Spiak A and Crawford D. 2003. Actinobacterial chitinase-like enzymes: profiles of rhizosphere versus non-rhizosphere isolates. Canadian Journal of Microbiology 49: 683-698.
- Goodfellow M and Williams S. 1983. Ecology of Actinomycetes. Annual Reviews Microbiology 37: 189-216.
- Gurung T, Sherpa C, Prasad V and Lekhak B. 2009. Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. Nepal Journal of Science and Technology 10: 173-182.
- He L, Sequeira L and Kelman A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease 67:1357-1361.
- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J and Williams S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9ª ed. Maryland: Williams & Wilkins. Baltimore. p 800.
- Horna-Agueda J. 1996. Aislamiento, identificación y evaluación de la actividad antimicrobiana de Actinomicetos nativos de sedimentos marinos de Ancón y Pisco. Tesis de Grado, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, Lima-Perú.
- Ikeda J, Saito H, Sato S and Kodama T. 2000. Growth-inhibition effect of *Streptomyces* sp. 39L40C to mulberry twig blight pathogen *Fusarium lateritium*. The Journal of Sericultural Science of Japan 69: 163-168.
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 2014. Nota de prensa: Producción de papa creció en 45%. Informe de la Presidencia del Consejo de Ministros, Perú. <http://www.inei.gob.pe/prensa/noticias/produccion-de-papa-crecio-45-7582/>
- Iznaga Y, Lemus M, Gonzales L, Garmendia L, Nadal L and Vallin C. 2004. Antifungal activity of actinomycetes from Cuban soils. Phytopherapy Reserch 18: 494-496.
- Joo G. 2005. Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. Biotechnology 27: 201-205.
- Kathiresan K, Balagurunathan R and Masilamani M. 2005. Fungicidal activity of marine actinomycetes against Phytopathogenic fungi. Indian Journal of Biotechnology 4: 271-276.



- Leiva S, Yañez M, Zaror L, Rodriguez H y García H. 2004. Actividad antimicrobiana de Actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del Sur de Chile. *Revista Médica de Chile* 132: 151-159.
- León J, Liza L, Soto I, Cuadra D, Patiño L y Zerpa R. 2007. Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista Peruana Biología* 14(2): 259-270.
- Liu C, Westley J, Herman T, Prasser B, Palleroni N, Evans R and Miller P. 1986. Novel polyether antibiotics, X-14873 A, G and H produced by *Streptomyces*. Taxonomy of the producing culture, fermentation, biological and ionophore properties of the antibiotics. *Journal of Antibiotics* 39(12): 1712-1718.
- Nakashima T, Anzai K, Suzuki R, Kuwahar N, Takeshita S, Kanamoto A and Ando K. 2009. Productivity of bioactive compounds in *Streptomyces* species isolated from Nagasaki marine environments. *The Society for Actinomycetes Japan* 23(1): 16-20.
- Narayana K, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y and Krishna S. 2008. Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Polish Journal of Microbiology* 57(1): 35-39.
- Ningthoujam D, Sanasam S, Tamreihao K, Nimaichand S. 2009. Antagonistic activities of local Actinomycetes isolates against rice fungal pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 3(11): 737-742.
- Oskay M, Usame A and Azeri C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology* 3(9): 441-446.
- Oskay M. 2009. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *African Journal of Biotechnology* 8(13): 3007-3017.
- Pandey B, Ghimire P and Agarwal V. 2004. Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal. *Journal Biology Science* 23: 44-53.
- Park J, El-Tarabily K, Ghisalberti E and Sivasithamparam K. 2002. Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *caenorhabditis elegans* and its antagonism to soilborne fungal pathogens. *Applied Microbiology* 35: 361-365.
- Pérez N. 2004. Control biológico de patógenos vegetales. *Manejo Ecológico de Plagas* 7: 231-247.
- Prapagdee B, Kuekulvong C and Mongkolsuk S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences* 4: 330-337.
- Reinozo Y, Casadeus L, García A, Gutierrez J y Pazos V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad* 10(3): 187-191.
- Remya M and Vijayakumar R. 2008. Isolation and characterization of marine antagonistic Actinomycetes from West Coast of India. *Medicine and Biology* 15(1): 13-19.
- Rothrock C and Gottlieb D. 1981. Importance of antibiotics production antagonism of selected *Streptomyces* strains to two soilborne plant pathogens. *The Journal of Antibiotics* 34:830-835.
- Serrano L y Galindo E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias* 58(1): 77-88.
- Sultan M, Khatune N, Sathi Z, Bluiyan S, Choudury M, Sadik G, Gafur M and Rahman A. 2002. *In vitro* antibacterial activity of an active metabolite isolated from *Streptomyces* species. *Biotechnology Research* 1(2): 100-106.
- Taechowisan T, Lu C and Shen Y. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and their antifungal activity. *Microbiology Research* 151: 1691-1695.
- Toledo D. 2004. Evaluación *in vitro* del efecto de cepas nativas de la bacteria *Bacillus* sp. en el biocontrol de la bacteria *Erwinia carotovora*. Tesis de Grado. Universidad de Talca. Chile.
- Torres H. 2002. Manual de enfermedades más importantes de la papa en el Perú. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú, p 59.
- Tuomi T, Heino M, Nordstrom K and Laakso S. 2001. Fiber fractions from processing of barley in production and conservation of a biology control agent. *Applied Biochemical Biotechnology* 94(2): 135-145.
- Valois D, Fayad K, Barasubiye T, Garon M, Dery C, Brzezinski R, Singh P, Shin Y, Park C and Chung Y. 1996. Biological control of *Fusarium* wilt of *Cucurbit* by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89(1): 92-99.
- Whipps J. 2001. Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52(1): 487-511.
- Yabuuchi E, Kosato Y, Yano I, Hotta H and Nishiuchi Y. 1995. Transfer of Two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleronii and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb.nov.and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969). *Microbiology and Immunology* 39(11): 897-904.
- Yuan W and Crawford D. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108. As a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied Environment Microbiology* 61(8): 3119-3128.