



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas  
provenientes de maíz (*Zea mays*) y jitomate (*Lycopersicum  
esculentum* Mill) del Estado de Puebla.**

Tesis que para obtener el título de  
BIÓLOGA

PRESENTA:  
THANIA SOLEDAD GONZALEZ MONTFORT

TUTORA: DRA. ROCÍO PÉREZ Y TERRÓN



SEPTIEMBRE 2014

# ÍNDICE

## Índice tablas, figuras y gráficas

### Abreviaturas

### Resumen

## 1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 Interacciones antagónicas
- 1.2 Tipos de control biológico
- 1.3 *Quorum Sensing*
- 1.4 Maíz
  - 1.4.1 Producción de maíz
- 1.5 Jitomate
  - 1.5.1 Producción de jitomate
  - 1.5.2 Patologías del maíz y jitomate

## 2. ANTECEDENTES

- 2.1 *Burkholderia cepacia*
  - 2.1.2 Antagonismo
  - 2.1.3 Agente benéfico
  - 2.1.4 Patogenicidad
- 2.2 Cepas utilizadas como antagonistas

## 3. JUSTIFICACIÓN

## 4. HIPÓTESIS

## 5. OBJETIVOS

- 5.1 Objetivo general
- 5.2 Objetivos particulares

## 6. MATERIALES Y METODOS

- 6.1 Crecimiento y preservación de cepas
- 6.2 Cuantificación de unidades formadoras de colonias (ufc)
- 6.3 Pruebas de antagonismo microbiano
  - 6.3.1 Inhibición simultánea
  - 6.3.2 Difusión en agar

6.3.3 Detección con sensi-disco	28
6.3.4 Doble capa	29
6.4 Pruebas de patogenicidad en maíz y jitomate	30
6.4.1 Lavado de las semillas	31
6.4.2 Germinación y crecimiento de maíz y jitomate	
6.4.3 Infección en semilla y plántulas de maíz y jitomate	32
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>7.1 Pruebas antagónicas</b>	<b>34</b>
7.1.1 Inhibición simultánea	
7.1.2 Difusión en agar	35
7.1.3 Detección con sensi-disco	36
7.1.4 Doble capa	37
<b>7.2 Pruebas de Patogenicidad de <i>B. cepacia</i> en maíz y jitomate</b>	<b>38</b>
7.2.1 Maíz	38
7.2.2 Jitomate	44
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>9. CONCLUSIÓN</b>	<b>53</b>
<b>10.PERSPECTIVAS</b>	<b>54</b>
<b>11.BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>55</b>
<b>12. ANEXOS</b>	

## Índice de tablas

	<b>Título de tabla</b>	<b>Página</b>
1	Países con mayor producción de toneladas de maíz 2013-2014.	14
2	Producción Nacional de jitomate (Tomate rojo) en el año 2013.	16
3	Bacteria patógenas del maíz y jitomate	16
4	Características claves del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> y <i>B. gladioli</i>	18
5	Atributos complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	19
6	Cepas utilizadas en los ensayos antagónicos	25

## Índice de gráficas

	<b>Título gráfica</b>	<b>Página</b>
1	Prueba T-student comparativa para la longitud (cm) de la plántula de maíz en dos grupos.	42
2	Prueba T-student comparativa para el largo (cm) de la raíz de maíz en dos grupos.	43
3	Prueba T-student comparativa para la longitud (cm) de la plántula de jitomate en dos grupos.	46
4	Prueba T-student comparativa para el largo (cm) de la raíz de jitomate en dos grupos.	47

## Índice de figuras

	<b>Título de figura</b>	<b>Página</b>
1	Diagrama conteo unidades formadoras de colonias	26
2	Pruebas antagónicas realizadas	27
3	Esquema inhibición simultánea	27
4	Esquema difusión en agar	29
5	Diagrama detección con sensi-disco	30
6	Diagrama doble capa	31
7	Diagrama prueba de patogenicidad en maíz y jitomate	33
8	Inoculación hoja de jitomate con <i>Burkholderia cepacia</i>	34
9	Resultados prueba inhibición simultánea	35
10	Resultados prueba difusión en agar	36
11	Resultados detección con sensi-discos	37
12	Resultados doble capa	38
13	Observación microscópica hongo <i>Fusarium</i> sp.	39
14	Comparación placas de semillas de maíz (control y con <i>B. cepacia</i> )	40
15	Comparación semillas germinadas a los 4 días (control y con <i>B. cepacia</i> )	40
16	Comparación entre el grupo control y el inoculado con <i>B. cepacia</i>	41
17	Comparación largo plántula maíz (control y con <i>B. cepacia</i> )	41
18	Observación microscópicas de hojas de maíz 10x (control y con <i>B. cepacia</i> )	43
19	Acercamiento 40x hoja inoculada de maíz con <i>B. cepacia</i>	44
20	Comparación largo plántula de jitomate (control y con <i>B. cepacia</i> )	46
21	Observación microscópica de hojas de jitomate inoculado desde la semilla	48
22	Observación microscópicas de hojas de jitomate 4x (control y con <i>B. cepacia</i> )	48
23	Observación microscópicas de hojas de jitomate 10x (control y con <i>B. cepacia</i> )	48
24	Comparación entre el efecto causado por la inoculación de <i>B. cepacia</i> en cebolla, maíz y jitomate.	49

## ABREVIATURAS

AHL: *N*-acetil homoserina lactona

cm: centímetros

FQ: fibrosis quística

ha: hectárea

h: horas

LB: Luria Bertani

min: minutos

mL: mililitros

mm: milímetros

µm: micrómetros

µL: microlitros

nm: nanómetros

rpm: revoluciones por minuto

sp: especie

ton: toneladas

TSA: Agar Soya Trypticaseína

ufc: unidades formadoras de colonias

## RESUMEN

Se evaluó el efecto antagónico de cepas bacterianas provenientes de maíz y jitomate del Estado de Puebla contra la bacteria *Burkholderia cepacia* (H1A). Se utilizaron 15 cepas de las cuales ninguna presentó antagonismo hacia *B. cepacia* para los ensayos de inhibición simultánea, difusión en agar y detección con sensidisco. Para la prueba de doble capa el 26.6% de las cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *B. cepacia*, estas cepas pertenecen a los géneros de *Pseudomonas* (2S3B, 2H4B), *Sphingomonas* (2S1A) y *Chromobacterium* (2S1C).

Posteriormente se realizaron ensayos de patogenicidad de *B. cepacia*, en semillas y hojas de maíz y jitomate; encontrándose así que, para ambas plantas infectadas desde la semilla, existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la longitud de la planta respecto a el grupo control, pero no para el largo de la raíz. Con respecto a las hojas, la inoculación en maíz y jitomate se hizo a los 21 y 43 días respectivamente, se hicieron observaciones microscópicas encontrándose así que, las hojas presentaban muerte celular alrededor de la zona de inoculación, además de una coloración amarilla-café.

## 1. INTRODUCCIÓN

De manera natural las fluctuaciones en la densidad de una población se encuentran dentro de ciertos límites definidos, tanto máximos como mínimos, es decir que no disminuye ni aumenta más de lo que el ambiente puede sostenerla, restringiendo así su crecimiento en un periodo de tiempo como consecuencia de la interacción con factores bióticos y abióticos, a este proceso se le denomina control natural. Así las plantas como los animales se encuentran en gran punto reducidas por acciones de sus depredadores, parásitos, antagonistas, competidores y enfermedades. Los factores que intervienen en el control natural pueden dividirse en dos: 1) factores dependientes de la densidad de población (espacio, cantidad disponible de alimento, enemigos naturales); son aquellos que regulan de manera directa a las poblaciones, y 2) factores independientes de la densidad de población (clima, calidad del alimento); los cuales no regulan las poblaciones pero pueden causar un cambio drástico e inmediato en la abundancia de los organismos (**Johnson, 2000; Nicholls, 2008**).

Cuando estas características son utilizadas para el control de plagas y malezas se denomina control biológico o biocontrol. Por tanto es la acción benéfica de parásitos, depredadores, patógenos y competidores específicos para mantener la densidad de otros organismos en niveles bajos. En patología vegetal se refiere al uso de antagonistas microbianos que suprimen enfermedades, así como la utilización de huéspedes-patógenos para el control de malezas (**Pal et al, 2006; Pest notes, 2007**).

Las bacterias asociadas a las plantas pueden comportarse como benéficas o dañinas, todos los vegetales tienen *microbiota*, ya sea superficial (*epífita*) o en su interior (*endófita*); por tanto, diversos microorganismos saprófitos de la rizosfera y de la filosfera protegen a las plantas contra patógenos. Las bacterias se encuentran entre los microorganismos que colonizan a las plantas en forma sucesiva, con el paso del tiempo se hacen visibles formando agregados denominados *biofilms* los cuales producen un taponamiento de los vasos de las plantas. En los últimos años se ha incrementado el interés en la superficie de la

hoja debido a la epífita que existe, la cual reduce infecciones y puede realizar antagonismo, además, la presencia de exudados foliares que contienen sustancias que pueden estimular o inhibir patógenos. **(Atlas y Bartha, 2002; Pérez et al, 2013).**

El antagonismo microbiano es entendido como la inhibición o muerte de una especie microbiana por efecto de otra, es una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos o negativos a la otra **(Andrews J. et al, 1983).**

### **1.1 Interacciones antagónicas microbianas**

En condiciones naturales los microorganismos se encuentran en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas. En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de tal forma que estos favorecen a que en la mayoría de los casos no se desarrolle la plaga **(Fernández-Larrieta, 2001).**

*COMPETENCIA*: es la relación entre la limitación (concentración) de nutrientes y crecimiento bacteriano; la competencia entre dos poblaciones tiende a eliminar a una de ellas del hábitat en común, especialmente cuando se centran en un solo recurso **(Fredrickson y Stephanopoulos, 1981; Hibbing et al, 2010).**

*AMENSALISMO*: Es una relación negativa, basada en la producción de sustancias tóxicas (ej, antibióticos) o la creación de condiciones intolerables de una cepa bacteriana hacia otra **(Martín, Universidad de Granada)**. Un ejemplo son las Bacteriocinas, compuestos proteicos letales para una bacteria que son producidos por otras cepas. Las bacteriocinas pueden servir como defensa antimicrobiana ayudando al huésped a combatir microorganismos patógenos. Existe una amplia diversidad de estas sustancias y se sabe que aún dentro de una misma especie podrían producirse diferentes tipos. El 99% de las bacterias pueden al menos producir una bacteriocina, un ejemplo son las halocinas que son producidas por halobacterias **(Joerger, 2002; Monroy et al, 2009)**. Las bacteriocinas más

estudiadas son las producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) o probióticas, las cuales están asociadas a la microflora intestinal y ejercen una competencia contra patógenos **(Settanni y Corsetti, 2008)**.

*PARASITISMO*: es una interacción en la cual un organismo (parásito) se beneficia a expensas del otro (hospedero), normalmente el parásito obtiene nutrientes del hospedero y la asociación es perjudicial para este **(Singleton y Sainsbury, 1993)**.

## 1.2 Tipos de control biológico

El control biológico tiene un fundamento ecológico en el que se implican 3 factores; población-comunidad, equilibrio natural y control natural. El primer fundamento se refiere a las especies como un conjunto de individuos que viven en una zona y se reproducen, formando así una población, además de las relaciones que establecen con otras poblaciones generando una comunidad; el segundo son las variaciones en el tamaño que sufre una población debido a la interacción con factores bióticos y abióticos en un cierto periodo de tiempo, y el tercero se da cuando una población oscila en torno a un punto de equilibrio estable debido a las interacciones con el ambiente. Hay fundamentalmente 4 tipos de control biológico; conservación, clásico, inundativo o aumentativo e inoculativo **(Jacas et al, 2005)**.

### a) Conservación

La conservación de enemigos naturales es probablemente la práctica más importante y realmente fácil para los productores. Se encuentran en todos los sistemas de producción y están adaptados al ambiente local y para la plaga, su conservación es generalmente de bajo costo **(Shelton, Cornell University)**.

### b) Clásico

Es la introducción de nuevas especies de enemigos naturales para plagas de nuevas especies recientemente ingresadas o registradas en un territorio. Se basa en la introducción de un enemigo natural en un nuevo ambiente con el fin de que

se establezca de forma permanente y regule a la plaga de manera sostenida en el tiempo **(Ripa et al, 2008; Fischbein D., 2012)**.

c) Inundativo o aumentativo

Una sola liberación de un gran número de antagonistas; puede ser en una área grande o pequeña, los antagonistas no llegan a establecerse y reproducirse, el objetivo reducir en una sola vez la plaga. Es decir se hacen liberaciones elevadas para aumentar las poblaciones de enemigos naturales para control eficiente de la plaga **(Hajek, 2004; Alston, 2011)**.

d) Inoculativo:

Es la liberación en bajas cantidades de enemigos naturales, se hace de manera periódica o estacional para restablecer un equilibrio que no se ha mantenido de forma natural o ha sido interrumpido por otros tipos de control, en este tipo de control se busca que los enemigos naturales se establezcan y multipliquen, además de que sus descendientes continúen controlándola durante un amplio tiempo **(Unruh, 1993; Rogg, 2000)**.

### **1.3 Características óptimas de un antagonista microbiano**

Son aquellas que le permite ser genéticamente estable, efectivo a bajas concentraciones, no exigente en requerimientos nutritivos y fácil de reproducir en medios de bajo costo, hábil para sobrevivir condiciones adversas del medio ambiente, resistente al ataque de hiperparásitos, efectivo para una amplia gama de microorganismos patógenos en una variedad de frutas y hortalizas, fácil de manipular, resistente a los fungicidas, debe establecerse con rapidez para minimizar la destrucción realizada por la plaga, no patogénico en el hospedero y que no produzca metabolitos secundarios dañinos a la salud humana **(Bautista, 2006)**.

El uso indiscriminado de antibióticos y pesticidas, así como la resistencia por parte de las bacterias a estos químicos, amenaza con reducir el antagonismo natural de los microorganismos nativos contra las poblaciones patógenas o invasoras. La

alteración de la microflora autóctona puede ayudar al establecimiento de microorganismos patógenos **(Atlas y Bartha, 2002; Robles et al, 2011)**.

Generalmente se requieren poblaciones de  $10^6$  UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonia/mililitro) o mayores para que las bacterias funcionen como agentes de control biológico, con fines benéficos, o como patógenos **(Vidaver y Lambrecht, 2004)**.

#### **1.4 Quorum Sensing**

Descrito por primera vez en 1966 por J.W. Hasting, como auto-inducción, el termino *Quorum sensing* fue asignado por W. Claribone *et al*, en 1994. Se refiere a la regulación de la expresión de genes en respuesta a la fluctuación de la densidad poblacional, mediante la producción de moléculas químicas auto-inductoras. Tanto las bacterias gram negativas como las gram positivas utilizan esta forma de comunicación para regular actividades fisiológicas como lo son: simbiosis, virulencia, competencia, conjugación, producción de antibióticos, movilidad, esporulación y formación de biofilms. La regulación del *quorum sensing* en las bacterias gram negativas esta dado por la producción de *N*-acetil homoserina lactona (AHL) mientras que en las gram positivas se da por oligopéptidos procesados **(Piqueras, 2001; Miller y Bossler, 2001)**.

## 1.5 Maíz

El maíz (*Zea mays* L), es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen y es el cultivo más importante de México; pertenece a la familia de las *Poáceas* (Gramíneas) a la tribu *Maydeas*, y es la única especie cultivada de este género. Otras especies del género *Zea*, comúnmente llamadas teosinte y las especies del género *Tripsacum* conocidas como arrocillo o maicillo son formas salvajes parientes de *Zea mays* (FAO, 1993). Existe una gran diversidad de tamaños, texturas, colores, formas y adaptaciones a diversos ambientes, constituyendo numerosas variedades primitivas o tradicionales; la diferenciación en tipos o razas del maíz no corresponde a una clasificación botánica más bien utilitaria, es así que todos los maíces pertenecen a la misma especie (Gear, 2006).

El maíz presenta un solo tallo robusto de gran longitud, llegando a alcanzar los 4 m de altura, no tiene ramificaciones y al hacerle un corte presenta una médula esponjosa. Cuenta con flores masculinas que son un espigón o penacho amarillo, el cual puede almacenar de 20 a 25 millones de granos de polen; y con flores femeninas las cuales tiene menos granos de polen 1000 como máximo, los granos de polen se forman en unas estructuras vegetativas denominadas espádices. Sus hojas son lanceoladas, largas y extensas, de extremos cortantes y con vellosidades en la parte superior. Sus raíces son fasciculadas es decir que todas presentan más o menos el mismo grosor aportando un perfecto anclaje a la planta, requiere una temperatura cálida, entre 25 y 30°C, no crece a temperaturas mayores a 30°C o menores a 8°C. Además necesita mucha agua, alrededor de cinco milímetros de lluvia o riego diarios, en promedio (SIAP, 2012). El maíz frecuentemente se usa como modelo para ensayar la capacidad colonizadora de bacterias, evaluar su capacidad promotora del crecimiento de plantas e incluso en estudios de interacción molecular entre microorganismos y raíces (Morales *et al*, 2010).

### 1.5.1 Producción de maíz

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) en abril de 2014 mencionó que en el 2013 la producción de maíz fue de 862.84 millones de toneladas y en una proyección hecha para el 2014 se esperan una producción de 966.63 millones de toneladas lo que podría significar un aumento de 103.79 millones de toneladas o del 12.03% en la producción de maíz alrededor del mundo (Agropanorama, 2014).

**Tabla 1.** Países con mayor producción de toneladas de maíz 2013-2014.

País	Valores en toneladas métricas
Estados Unidos	353,715,000
China	217,000,000
Brasil	70,000,000
Unión Europea	64,685,000
Ucrania	30,900,000
Argentina	24,000,000
India	23,000,000
México	<b>21,700,000</b>
Canadá	14,200,000
Sudáfrica	13,000,000
Rusia	10,682,000
Indonesia	9,200,000
Nigeria	7,700,000
Filipinas	7,315,000
Serbia	6,000,000
Egipto	5,600,000
Otros	87,934,000

Tomada de: Agropanorama.com.

En 2013 Puebla fue el décimo lugar en producción anual de maíz con 942,170.67 toneladas, el primer lugar lo ocupó el estado de Sinaloa con 3,627,777.51 toneladas y el último lugar lo ocupa el Baja California con 1472.35 toneladas (SIAP-SAGARPA, 2014).

## 1.6 Jitomate

*Fruto con ombligo* llamado así por los antiguos *Tenochcas*, es un alimento con pocas calorías; sus principales componentes son agua e hidratos de carbono, ácidos orgánicos (sabor ácido) y azúcares (sabor dulce) los cuales le confieren el sabor característico **(SAGARPA, 2010)**.

Es una planta de tallos trepadores y largos, sus hojas tienen bordes dentados y presenta flores laterales de color amarillo de cinco piezas reunidas en ramilletes. El fruto tiene una forma redondeada y achatada, excepto la variedad llamada *Saladette* la cual es alargada; presenta un coloración verde al principio pero que al madurar adquiere un color rojo en la cáscara y en la pulpa, la cual es un tanto gelatinosa y se encuentra dividida en lóculos con semillas, el cambio de coloración es debido a la sustitución de clorofila por carotenos. Las variedades más conocidas son *saladette*, *bola* y *cherry*. Crece bien en casi todos los climas y terrenos principalmente los neutros, sueltos y sin encharcamientos, ricos en nutrientes, otro factor que puede afectar su crecimiento son los vientos fuertes y secos **(SAGARPA, 2012)**.

### 1.6.1 Producción de jitomate.

En 2009 la producción nacional ubicó en 2, 727, 691 ton suficiente para repartir 25 kilos a cada habitante del país **(SAGARPA, 2010)**.

En 2012 Puebla ocupó el *dieciseisavo* lugar en producción anual de jitomate con 52,849.79 toneladas, el primer lugar lo ocupa el estado de Sinaloa con 1,039,367.64 toneladas y el último lugar lo ocupa el Distrito Federal con 135 toneladas **(SIAP-SAGARPA, 2013)**.

**Tabla 2.** Producción Nacional de jitomate (Tomate rojo) en el año 2013.

Cultivo	Superficie sembrada(Ha)	Superficie Cosechada (Ha)	Producción (Ton)
Tomate rojo (Jitomate semilla)	12.00	12.00	63.20
Tomate rojo (jitomate)	48,234.01	47,099.36	2,694,358.19

Tomado de: SIAP, SAGARPA. Cierre de la producción agrícola por cultivo. 2013

Para el 2013, Puebla ocupó el treceavo lugar en producción anual de jitomate con 68,123.23 toneladas, el primer lugar lo ocupa el estado de Sinaloa con 983,288.14 toneladas y el último lugar lo ocupa el Distrito Federal con 135.30 toneladas (SIAP-SAGARPA, 2014).

### 1.6.2 Patologías del maíz y jitomate

A continuación se muestran algunos ejemplos de bacterias patógenas del maíz y jitomate así como la patología que producen.

**Tabla 3.** Bacterias patógenas del maíz y jitomate

Planta	Bacterias	Patología
Maíz	<i>Pseudomonas rubrilineans</i>	Rayado foliar bacteriano
	<i>Pantoea stewartii</i>	Marchitez de Stewart
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Mancha foliar de Holcus
	<i>Dickeya zeae</i>	Pudrición acuosa del tallo
Jitomate	<i>Xanthomonas campestris</i>	Mancha bacteriana
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Marchitez bacteriana o tizón bacteriano del Sur
	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Chancro bacteriano

CIMMYT, 2004; Gleason y Edmunds, 2006, Varón y Sarria, 2007; Peltier *et al*, 2008; Sweets y Wright, 2008; Palacio *et al*, 2010; Williamson, 2012.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Burkholderia cepacia*

Bacteria identificada en 1950 por Burkholder como un agente fitopatógeno responsable de la podredumbre de los bulbos de cebolla. Fue originalmente asignado al género *Pseudomonas* como *P. cepacia* **(Aranque et al, 2008)**.

*Burkholderia cepacia*, es un bacilo gram negativo no fermentador, mide de 1.06 a 3.02  $\mu\text{m}$  de longitud, es un aerobio estricto y quimiorganótrofo, la temperatura óptima de crecimiento es entre 30° C y 35° C **(Liazid, 2012)**, no presenta crecimiento a los 4° C ni superior a los 41° C, la mayoría de las cepas producen pigmentos no fluorescentes, de color amarillento o verdoso, la desnitrificación es negativa, mientras que el nitrato se reduce a nitrito, la oxidasa es positiva y arginina dihidrolasa negativa y puede licuar la gelatina **(Schwatz y Mohan, Aps.net)**.

Esta bacteria exhibe una gran variabilidad, diversidad genética y capacidad de producir interacciones complejas, presentándose así como estimulador del crecimiento vegetal debido a la producción de fitohormonas (ácido indolacético); como agente biocontrol en diferentes cultivos de interés agrícola, pero también como patógeno de plantas y saprófito, además de provocar infección en hombres y animales, aparte de actuar biorremediador (degradación de compuestos aromáticos clorados). Entre sus mecanismos de acción se destaca el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta **(Toledo et al, 2002; Parra et al, 2009)**.

*B. cepacia* es en general un complejo de 9 especies genómicas (genomovariedades), estrechamente relacionadas que incluye a *B. cepacia* (genomovariedad I), *B. multivorans* (genomovariedad II), *B. cenocepacia* (genomovariedad III), *B. stabilis* (genomovariedad IV), *B. vietnamiensis* (genomovariedad V), *B. dolosa* (genomovariedad VI), *B. ambifaria* (genomovariedad VII), *B. anthina* (genomovariedad VIII) y *B. pyrrocinia* (genomovariedad IX) **(Speert, 2002)**.

**Tabla 4.** Características claves del complejo *Burkholderia cepacia* y *B. gladioli*

Prueba	I	II	III	VI	V	VI	VII	VIII	IX	<i>B. gladioli</i>
Oxidasa	100	100	100	100	100	100	100	100	+	0
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa OF	100	100	95	100	100	100	100	100	+	100
Maltosa OF	39	98	78	93	97	100	100	100	V	0
Lactosa OF	61	100	79	93	97	100	100	100	+	0
Xilosa OF	87	98	88	44	75	100	100	100	ND	96
Sacarosa OF	87	0	88	0	94	0	95	V	+	0
Adonitol OF	70	91	79	78	0	100	100	V	ND	93
Lactosa al 10%	100	100	36	100	100	ND	ND	ND	ND	8
ONPG	100	98	99	0	100	100	100	V	-	100
Lisina	100	53	99	100	100	0	100	V	+	0
Ornitina	30	0	71	100	0	0	0	0	ND	0
Nitrato reducido	4	94	31	4	47	100	67	V	+	33
Gelatina	74	2	55	93	0	0	94	0	V	70
Esculina	56	2	33	0	0	0	56	V	V	11
Ureasa	91	100	8	60	100	0	0	ND	-	75
Colistina 10 µg	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Crecimiento agar MacConkey	83	96	84	93	83	100	100	100	+	96
Crecimiento a 42°C	43	100	84	0	100	100	26	V	-	4
Utilización de malonato	100	90	42	100	100	ND	ND	ND	ND	0
Pigmento amarillo	78	2	3	0	0	0	0	0	-	44

Tomado de Koneman *et al* 2008.

☞ *B. cepacia* (I), *B. multivorans* (II), *B. cenocepacia*(III), *B. stabilis* (IV), *B. vietnamiensis*(V), *B. dolosa* (VI), *B. ambifaria* (VII), *B. anthina* (VII) y *B. pyrrocinia* (IX).

☞ +:90% o más de cepas positivas, -: 90% o más cepas negativas, V: 11-89% de cepas positivas, Los números constituye el porcentaje de cepas que dan reacciones positivas, R: Resistente, ND: No disponible, Los resultados de las pruebas de oxidación fueron registrados luego de 3 días de incubación.

**Tabla 5.** Atributos complejo *Burkholderia cepacia*

	Especie	Fuente	Actividad PGP	Patógeno de plantas	Frecuencia de recuperación FQ	Transmisibilidad en pacientes con FQ
I		Patógeno de plantas (cebolla); Rizosfera, suelo, agua, humanos (con/sin FQ).	?	+++++	+	-
II	<i>B. multivorans</i>	Rizosfera, humanos (con/sin FQ).	?	?	+++	+
III		Rizosfera, suelo, agua, ambientes hospitalarios, humanos (con/sin FQ).	?	?	+++++	+++++
IV	<i>B. stabilis</i>	Ambientes hospitalarios, humanos (con/sin FQ).	?	?	++	-
V	<i>B. vietnamiensis</i>	Rizosfera, suelo, humanos (con/sin FQ).	+++	?	+	-
VI		Humanos (FQ)	-	?	++	?
VII	<i>B. ambifaria</i>	Rizosfera, suelo, humano (FQ).	+++++	?	+	?
VIII	<i>B. anthina</i>	?	?	?	?	?
IX	<i>B. pyrrocinia</i>	Agua, suelo, humano (FQ).	?	?	+	?

**Tomado de:** Tabacchioni *et al*, 2002

Genomovariedades: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX; PGP: Promotor crecimiento vegetal; FQ: Fibrosis Quística.

### 2.1.2. Antagonismo

La actividad inhibitoria de *B. cepacia* contra una variedad de microorganismos fitopatógenos ha sido atribuida a la producción de metabolitos secundarios como cepacina, pirrolnitrina, altericidina y otros compuestos volátiles y no volátiles aun no identificados (**Parra et al, 2009**).

Las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*, son de los grupos más estudiados porque tienen la capacidad de producir reguladores del crecimiento vegetal y otros metabolitos con efecto antagónico y represivo del crecimiento de patógenos en la rizosfera **(Trujillo et al, 2007)**.

### **2.1.3 Agente benéfico**

Se sabe que *B. cepacia* se encuentra de manera natural en la rizosfera, de tal manera que se puede encontrar en asociación con las raíces de las plantas, además de conferir a las semillas protección contra la invasión temprana de patógenos y de presentar capacidades para competir con otros microorganismos incluyendo hongos fitopatógenos, es capaz de promover el crecimiento vegetal por la producción de auxinas **(Cartwright y Benson, 1995; Parke y Gurian-Sherman, 2001; Tabacchioni et al, 2002)**.

### **2.1.4 Patogenicidad**

Desde comienzos de la década de 1980 ha surgido como causa de infecciones humanas oportunistas sobre todo en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica y fibrosis quística. Estas bacterias también se asocian con mayor frecuencia con la propagación epidémica, con la putrefacción en los pies (putrefacción de la jungla) de los seres humano y con el “síndrome de cepacia”, que se manifiesta por insuficiencia respiratoria progresiva grave y bacteriemia **(Koneman y Allen, 2008)**, presentando aproximadamente un 20% una neumonía fulminante. En los pacientes neutropénicos puede producir bacteremia de curso fatal por tratarse de un microorganismo oportunista de difícil manejo terapéutico debido a su multiresistencia a antibióticos **(Gil, 2001)**.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente la pérdida de cultivos causada por patógenos microbianos es muy alta, particularmente en México el maíz y el jitomate forman parte de la alimentación diaria de la mayoría de los mexicanos. Se ha logrado identificar a los principales patógenos que afectan a estos cultivos, por eso ahora se podrían buscar y utilizar agentes antagonistas para el biocontrol de estos.

En estudios anteriores realizados en el Laboratorio de Biología Molecular y Genética, se han aislado y caracterizado a bacterias que provienen de muestreos de zonas productoras de jitomate en el Estado de Puebla, principalmente Izúcar de Matamoros, Tecali, Tecamachalco y Tehuacán. El sitio de aislamiento de estas es de hoja, fruto y suelo. Por lo anterior, parece importante su utilización en ensayos de antagonismo microbiano, ya que estas cepas pueden presentar características adaptativas que posibiliten competir con otras.

#### **4. HIPÓTESIS**

Que las cepas de bacterias obtenidas de la microflora del jitomate, presenten un comportamiento antagónico hacia *Burkholderia cepacia*.

## 5. OBJETIVOS

### ∞ 5.1 Objetivo general

- Determinar el efecto antagónico de cepas provenientes de la microbiota del jitomate hacia *Burkholderia cepacia*.

### ∞ 5.2 Objetivos particular

- Observar el antagonismo ejercido de las bacterias hacia *B. cepacia*, mediante las pruebas de inhibición simultánea, difusión en agar, detección con sensi-disco y doble capa.
- Realizar ensayos de comportamiento patogénico en maíz y jitomate.
- Realizar ensayos de comportamiento promotor del desarrollo en maíz y jitomate.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Crecimiento y preservación bacteriana

Todas las cepas utilizadas se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) líquido, a una temperatura de 30°C en agitación a 100 rpm por 24 h.

Para su preservación se utilizó el método a mediano plazo, el cual se conoce como “congelación”, este método es utilizado en muchos laboratorios por su fácil manejo (Morales *et al*, 2010). Para su realización, se utilizó un cultivo de 24 h de crecimiento, posteriormente esto se vació en un tubo eppendorf estéril para centrifugarlo a 13000 rpm durante 5 minutos con el fin de obtener un paquete celular, por último se le adicionó 1 mL de LB y 250 µL de glicerol estéril.

### 6.2 Cepas utilizadas como antagónicas.

Las bacterias utilizadas provienen de muestreos de zonas productoras de jitomate del Estado de Puebla, principalmente de Izúcar de Matamoros, Tecali de Herrera, Tcamachalco y Tehuacán; éstas fueron aisladas de hoja, fruto y suelo (Herrera, 2013). Adicionalmente, se utilizaron 2 cepas tipo, las cuales corresponden a *Pantoea ananatis* y *Pantoea stewartii*.

**Tabla 6.** Cepas utilizadas en los ensayos antagónicos (Inhibición simultánea, difusión en agar, detección con sensi-disco, doble capa).

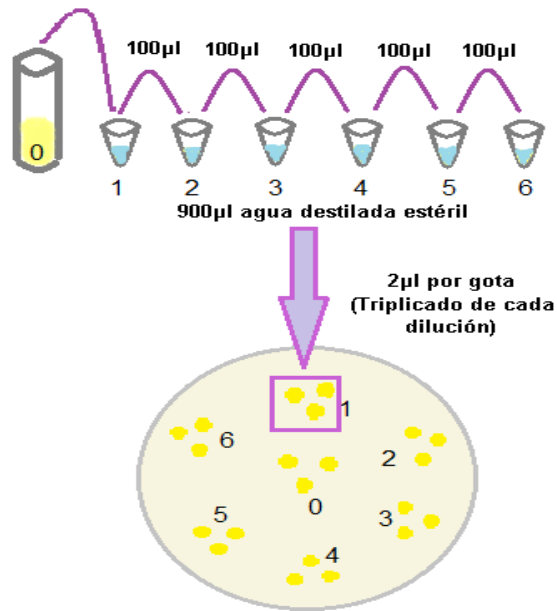
	<b>Cepa</b>	<b>Especie</b>	<b>Patogenicidad</b>
<b>1</b>	F1A	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Animales / Oportunista humanos
<b>2</b>	F2A	<i>Pasteurella trehalosi</i>	Animales
<b>3</b>	H2CB	<i>Burkholderia gladioli</i>	Plantas
<b>4</b>	H1A	<i>Burkholderia cepacia</i>	Plantas / Humano
<b>5</b>	H2F	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	Oportunista humano
<b>6</b>	2S3B	<i>Pseudomonas luteola</i>	Animales
<b>7</b>	2S1B	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Oportunista humanos
<b>8</b>	TS2A	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-
<b>9</b>	1h4b	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Animales / Humanos
<b>10</b>	2S1A	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-
<b>11</b>	2H2B	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Oportunista humano
<b>12</b>	2H4B	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	-
<b>13</b>	2S1C	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Raramente en humano
<b>14</b>	2S3BA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Humanos
<b>Cepas tipo</b>			
<b>15</b>	2665	<i>Pantoea ananatis</i>	Plantas
<b>16</b>	2715	<i>Pantoea stewartii</i>	Plantas

**Tomado de:** Herrera, 2013 (De la cepa 1-14); - No se tiene información

### 6.3 Cuantificación de unidades formadoras de colonias (ufc).

Con la finalidad de establecer la concentración a inocular en cada una de las pruebas, se procedió a realizar un conteo de ufc; para este proceso se utilizó un cultivo de 24 h de incubación, después se hicieron diluciones seriadas con factor de 1:10; la muestra se agitó en vortex para después tomar 100  $\mu$ L de cultivo y colocarlos en un tubo eppendorf que contenía 900  $\mu$ L de agua destilada estéril. Por último en placas con medio LB se sembraron por triplicado tres gotas de 2  $\mu$ L cada una y se llevaron a incubación a 29° C por 24 h (**Hoben y Somasegaran, 1982; Herigstad et al, 2001; Herrera, 2013**), pasado el tiempo; se procedió a su conteo mediante la siguiente fórmula:

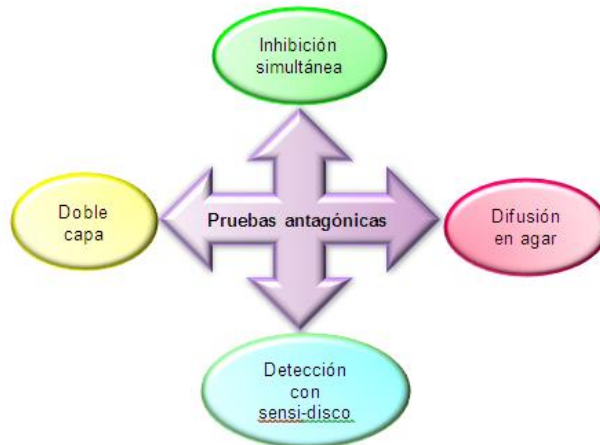
$$ufc / ml = \left( \frac{\text{Número promedio de colonias cuantificadas}}{\text{Dilución de la muestra}} \right) \times \left( \frac{1}{\text{Volumen sembrado (ml)}} \right)$$



**Fig. 1.** Descripción gráfica del conteo de diluciones seriadas por goteo (1:10), para cuantificar unidades formadoras de colonias (ufc).

#### 6.4 Pruebas antagonismo microbiano

Para cada una de las pruebas, se realizaron 3 replicas con el fin de poder comparar los resultados entre ellas. Todos los ensayos se efectuaron en agar soya tripticaseína (TSA).



**Fig. 2.** Diagrama de las pruebas antagonicas realizadas

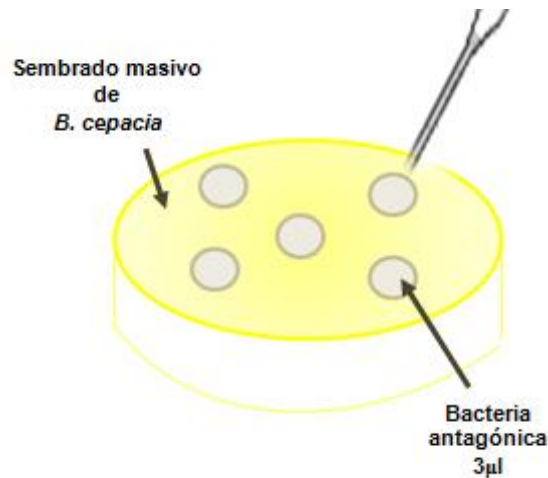
#### 6.4.1 Inhibición simultánea

Se sembró de manera masiva *B. cepacia* a un concentración de  $7 \times 10^8$  ufc/ml, en seguida con ayuda de una micropipeta se colocaron de manera radial gotas de 3  $\mu$ L de cada una de las cepas antagonicas (**Santoyo et al, 2010**) y por último se incubaron durante 24 h a 29° C (ver anexo).

#### INTERPRETACIÓN

Prueba positiva: cuando aparece un halo de inhibición (es decir sin crecimiento de *B. cepacia*) alrededor de la gota, o cuando alguna de las dos bacterias utilizadas no crece.

Prueba negativa: cuando hay crecimiento tanto de la bacteria sembrada de manera masiva, como la que fue colocada en gota.



**Fig. 3.** Esquema de la realización de la prueba de inhibición simultánea

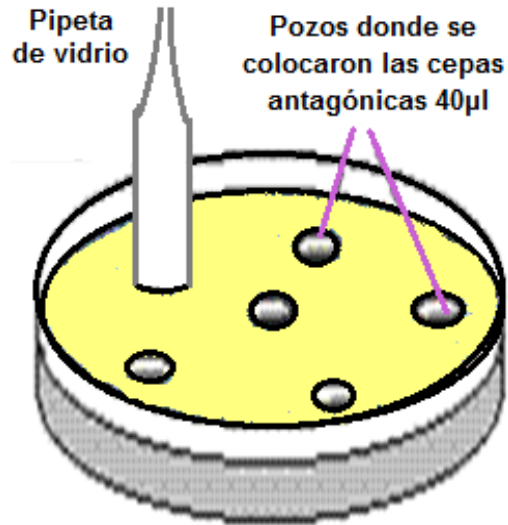
#### 6.4.2 Difusión en agar

En esta técnica se sembró *Burkholderia cepacia* en caldo LB, después esta se agregó a una dosis de  $5 \times 10^8$  ufc/ml en un matraz que contenía medio TSA a punto de solidificar y se depositó en placas Petri las cuales se dejaron enfriar durante 10 min. Posteriormente a cada una de las placas se le hicieron 5 pocillos de 6 mm de diámetro por 1 cm de alto sin que estos tocaran por completo el fondo de ésta, en los cuales se vertieron 40 µL de las bacterias antagónicas (Ruíz, 2013). Finalmente las placas se incubaron a 29° C por 24 h (ver anexo).

#### INTERPRETACIÓN

Prueba positiva: cuando aparece un halo de inhibición (es decir sin crecimiento de *B. cepacia*) alrededor del pozo.

Prueba negativa: cuando hay crecimiento tanto de la bacteria sembrada en el agar como de la bacteria colocada en el pozo.



**Fig. 4.** Esquema de la realización de la prueba difusión en agar

#### 6.4.3 Detección con sensi-disco

Se efectuó un sembrado masivo de *B. cepacia* a una dosis de  $5 \times 10^8$  ufc/ml, a continuación se depositaron discos de papel filtro estériles de 5 mm de diámetro, los cuales fueron previamente humedecidos con cada una de las cepas utilizadas como antagonistas; estos fueron colocados en la caja Petri de manera radial (**López-Granados et al, 2005**). Por último las placas fueron incubadas a 29° C por 24 horas (ver anexo).

#### INTERPRETACIÓN

Prueba positiva: cuando aparece un halo de inhibición (es decir sin crecimiento) alrededor del disco de papel filtro.

Prueba negativa: cuando hay crecimiento tanto de la bacteria sembrada de manera masiva, como la que fue colocada en los discos.

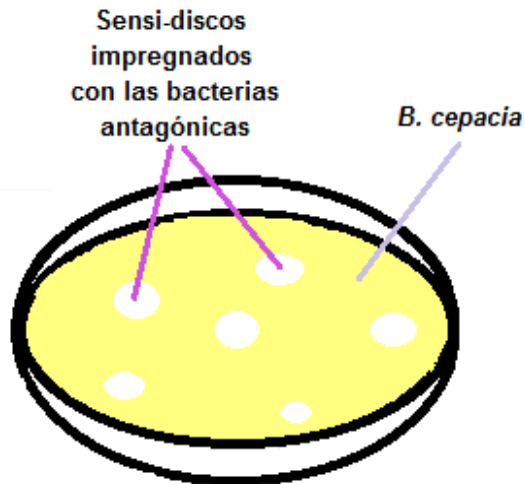


Fig. 5. Diagrama de la prueba de sensi-disco

#### 6.4.4 Doble capa

En una caja Petri que contenía medio TSA se colocaron 50  $\mu$ L de inóculo de cada una de las cepas a retar, las cuales se encontraban en fase estacionaria y se incubaron a 29° C durante 24 h; después con la ayuda de un porta objetos estéril se procedió a remover el crecimiento colonial, posteriormente la placa se expuso hacia abajo en una cama de cloroformo durante una hora, con la finalidad de remover al máximo las células bacterianas; una vez limpia, se le agregó una segunda capa de agar TSA más 100 $\mu$ l de *B. cepacia* la cual se encontraba en fase estacionaria (**Rahman et al, 2013**). Para finalizar se dejó incubar por 24 horas a 29° C (ver anexo).

##### 6.4.4.1 Fase estacionaria

Para esto se sembró cada una de las cepas utilizadas en LB líquido, se dejaron incubar a una temperatura de 30° C a 100 rpm por 24 h, después con ayuda de una celda desechable se midió la absorbancia a 625nm y esto se realizó cada hora.

## INTERPRETACIÓN

Prueba positiva: cuando en la doble capa no hay crecimiento de *B. cepacia*.

Prueba negativa: cuando hay crecimiento de *B. cepacia* en la segunda capa.

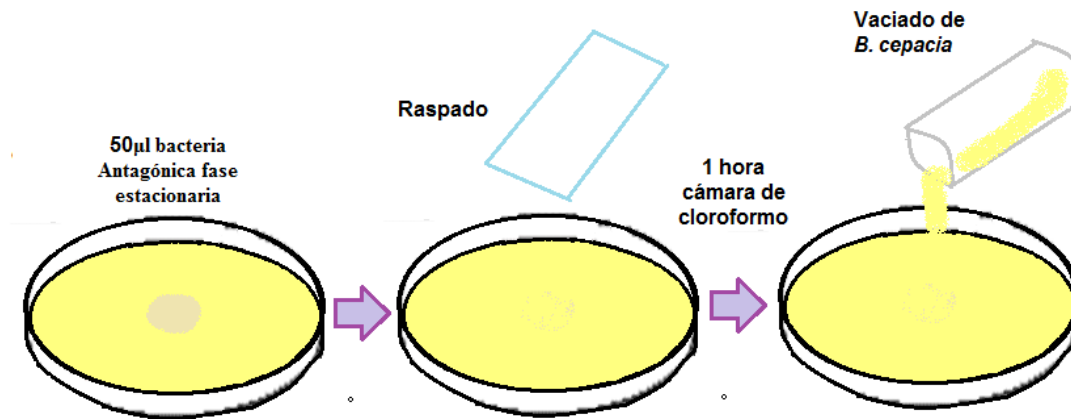


Fig. 6. Diagrama de la prueba de doble capa.

### 6.5 Pruebas de patogenicidad en maíz y jitomate

Para evaluar la posible patogenicidad de *Burkholderia cepacia* en maíz y jitomate primero se procedió a realizar la desinfección de 60 semillas de ambas plantas, para después proceder a infectar 20 semillas de cada una, las restantes se dividieron en dos grupos (un control y uno para infección en hoja) y se pusieron a germinar; una vez que presentaron la radícula se procedió a su traspaso en tubos que tenían un soporte más fertilizante tapados con algodón y aluminio, tanto para la germinación como para el crecimiento el fotoperiodo fue de 12 h/12 h luz-oscuridad. Para finalizar se realizaron pruebas de patogenicidad en las hojas de ambas plantas, en las de maíz se realizó a los 21 días y en las de jitomate a los 43 días.

### 6.5.1 Lavado de las semillas

Para eliminar la flora normal de las semillas y dejarlas lo más limpias posibles se procedió a hacer un lavado. Para las semillas de maíz se realizaron dos lavados debido a la presencia constante de un hongo:

La primera metodología consistió en colocar las semillas de maíz en un matraz y mediante una plancha de agitación se procedió a desinfectarlas con Tritón X al 10% durante 10 minutos, después se colocaron en hipoclorito de sodio al 6% durante 20 minutos y por último se dejaron en etanol al 70% durante 10 segundos. Entre cada uno de los pasos se realizó un enjuague con agua destilada estéril **(Pérez, 2008)**.

En la segunda metodología las semillas de maíz se colocaron en un matraz y se procedió a hacer dos lavados previos con agua destilada, después se lavaron con Tritón X al 10% durante 10 minutos, posteriormente se colocaron en etanol al 70% durante 10 minutos y para finalizar se dejaron 20 minutos en cloro comercial. Entre cada lavado se realizaron enjuagues con agua destilada estéril **(Morales-García et al, 2010)**.

Para el jitomate las semillas se colocaron en un matraz y mediante una plancha de agitación se procedió a desinfectarlas con Tritón X al 10% durante 10 minutos, después se colocaron en hipoclorito de sodio al 6% durante 20 minutos y por último se dejaron en etanol al 70% durante 10 segundos. Entre cada uno de los pasos se enjuagaron la semillas con agua destilada estéril.

### 6.5.2 Germinación y crecimiento de maíz y jitomate

Para la germinación las semillas de maíz y jitomate se acomodaron en cajas Petri estériles, con una cama de papel y agua destilada estéril denominado cámara húmeda con fotoperiodo de 12 horas. **(Morales-García et al, 2010)**. Las semillas de maíz se dejaron de 3 a 5 días; mientras que las de jitomate entre 5-9 días. Una vez germinadas se traspasaron a tubos de ensaye con un soporte de alambre

y con 5 ml de fertilizante estéril de manera que solo la raíz tocara el fertilizante y fueron tapados con algodón y aluminio (Pérez, 2008).

### 6.5.3 Infección en semillas y plántulas de maíz y jitomate

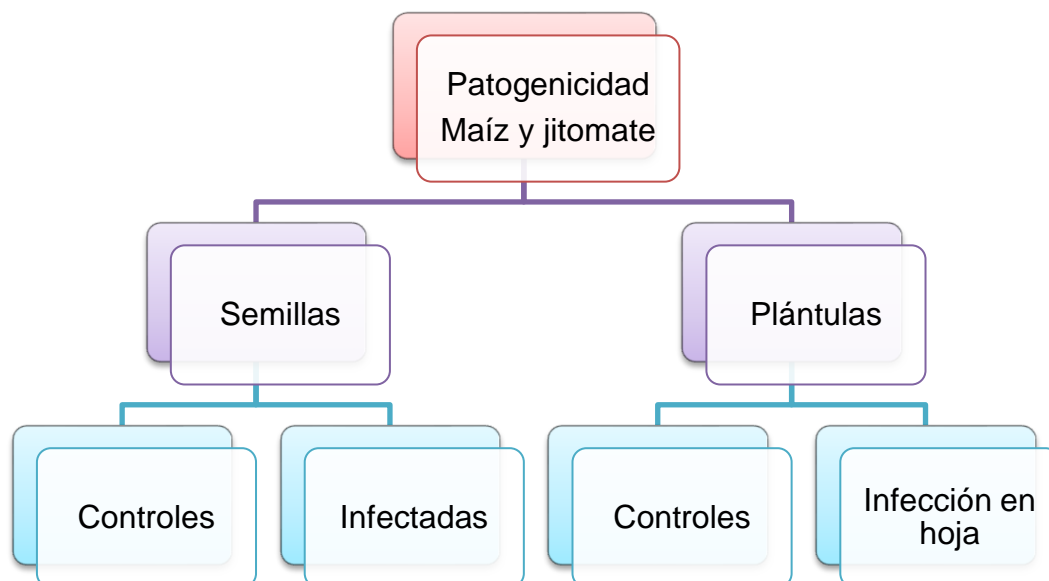


Fig.7. Diagrama que muestra como se realizó la prueba de patogenicidad en maíz y jitomate

**Infección semillas:** se infectaron 20 semillas de cada una de las plantas; las de jitomate se colocaron en un cultivo de *B. cepacia* de 24 horas; a una dosis de  $7 \times 10^8$  ufc/ml y se dejaron reposar durante una hora. Para el maíz las semillas fueron infectadas de la misma manera que las de jitomate pero con una dosis de  $6 \times 10^8$  ufc/ml (Pérez-y-Terrón, 2009). Tanto las semillas de jitomate como las de maíz se pusieron a germinar con el método antes descrito.

Las plántulas de maíz se dejaron crecer por 21 días mientras que las de jitomate por 43 días, se les realizaron revisiones diarias de la raíz, el tallo y las hojas. Pasado el tiempo de crecimiento se procedió a la medición de la longitud de las plántulas y el largo de la raíz. Para poder comparar estos datos se realizó una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov, mediante el programa STATISTICA PORTABLE 8 y después se procedió a realizar un análisis T-student (n=10) (Wayne, 2002).

**Infección hoja:** para el maíz se utilizaron 3 grupos con 3 plántulas cada uno, mientras que para el jitomate se utilizaron 3 plántulas. Para la infección en la hoja se hizo una lesión con la ayuda de una aguja de una jeringa de insulina y después se colocó una gota de *B. cepacia* con crecimiento de 24 horas, a una concentración de  $6 \times 10^8$  ufc/ml (Pérez-y-Terrón, 2009).



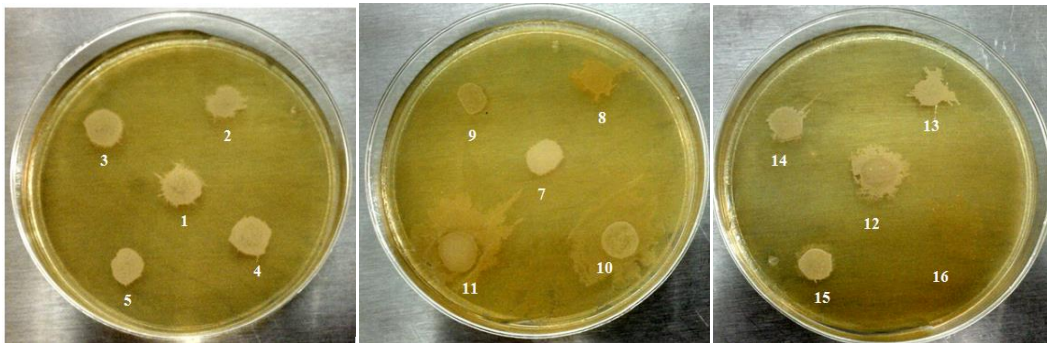
**Fig. 8.** Inoculación de la hoja de jitomate mediante incisión con aguja de insulina

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Pruebas antagónicas

#### 7.1.1 Inhibición simultánea

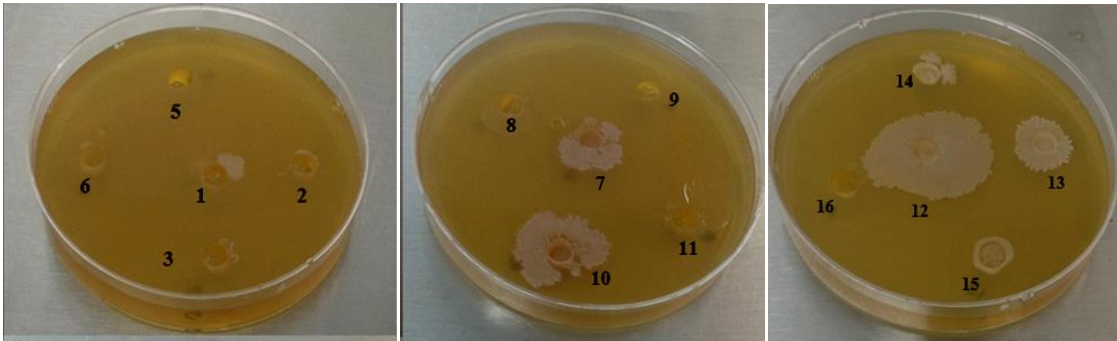
Para esta prueba de las 15 bacterias utilizadas como antagónicas ninguna presentó inhibición contra *B. cepacia* así que en el 100% de los casos ambas cepas crecieron, mostrando así un efecto sinérgico entre ellas; *Pasteurella pneumotropica* (F1B), *Pasteurella trehalosi* (F2A), *Burkholderia gladioli* (H2CB), *Psychrobacter phenylpyruvicus* (H2F), *Pseudomonas luteola* (2S3B), *Chryseobacterium meningosepticum* (2S1B), *Chryseobacterium indologenes*(TS2A), *Aeromonas salmonicida* (1h4b), *Sphingomonas paucimobilis* (2S1A), *Pseudomonas oryzihabitans* (2H4B), *Brevundimonas vesicularis* (2H2B), *Chromobacterium violaceum* (2S1C), *Stenotrophomonas maltophilia* (2S3BA), *Pantoea ananatis* (2665) y *Pantoea stewartii* (2715).



**Fig. 9.** Prueba de inhibición simultánea. Se aprecia el crecimiento de las cepas tanto antagónicas como de *B. cepacia*, 1, *Pasteurella pneumotropica*; 2, *Pasteurella trehalosi*; 3, *Burkholderia gladioli*; 5, *Psychrobacter phenylpyruvicus*; 6, *Pseudomonas luteola*; 7, *Chryseobacterium meningosepticum*; 8, *Chryseobacterium indologenes*; 9, *Aeromonas salmonicida*; 10, *Sphingomonas paucimobilis*; 11, *Brevundimonas vesicularis*; 12, *Pseudomonas oryzihabitans*; 13, *Chromobacterium violaceum*; 14, *Stenotrophomonas maltophilia*; 15, *Pantoea ananatis*; 16, *Pantoea stewartii*. El número 4 pertenece a *B. cepacia* (H1A) la cual se sembró de manera masiva.

### 7.1.2 Difusión en agar

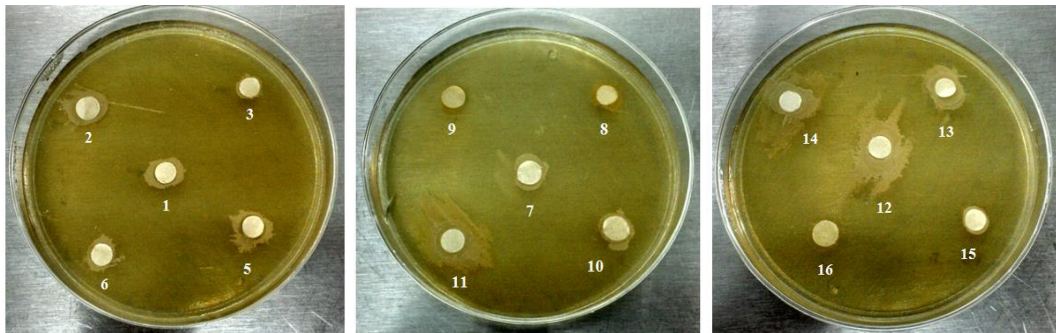
Ninguna de las cepas puestas a prueba resultó antagonista para *B. cepacia*, por tanto esta bacteria fue capaz de crecer en presencia de todas las bacterias. El 66.6% de las bacterias antagónicas creció, *Pasteurella pneumotropica* (F1B), *Pasteurella trehalosi* (F2A), *Burkholderia gladioli* (H2CB), *Pseudomonas luteola* (2S3B), *Chryseobacterium meningosepticum* (2S1B), *Sphingomonas paucimobilis* (2S1A), *Pseudomonas oryzihabitans* (2H4B), *Chromobacterium violaceum* (2S1C), *Stenotrophomonas maltophilia* (2S3BA), *Pantoea ananatis* (2665) y *Pantoea stewartii* (2715) lo que puede sugerir que existe un efecto sinérgico de *B. cepacia* hacia estas bacterias.



**Fig. 10.** Prueba de difusión en agar. 1, *Pasteurella pneumotropica*; 2, *Pasteurella trehalosi*; 3, *Burkholderia gladioli*; 5, *Psychrobacter phenylpyruvicus*; 6, *Pseudomonas luteola*; 7, *Chryseobacterium meningosepticum*; 8, *Chryseobacterium indologenes*; 9, *Aeromonas salmonicida*; 10, *Sphingomonas paucimobilis*; 11, *Brevundimonas vesicularis*; 12, *Pseudomonas oryzihabitans*; 13, *Chromobacterium violaceum*; 14, *Stenotrophomonas maltophilia*; 15, *Pantoea ananatis*; 16, *Pantoea stewartii*. El número 4 pertenece a *B. cepacia* (H1A) la cual se sembró de en el agar contenido en la placa.

### 7.1.3 Detección con sensi-disco

Se observó que no se formaron halos de inhibición, por tanto ninguna de las cepas utilizadas ejerció inhibición para *B. cepacia*, es decir que esta creció para todas las bacterias. Lo que se vio es que el 99.3% de las bacterias probadas fueron capaces de crecer en presencia de *B. cepacia* lo que se podría deber a que esta bacteria es capaz de promover un efecto sinérgico o en su caso no ejercer efecto alguno hacia ellas. Las cepas que presentaron este comportamiento fueron: *Pasteurella pneumotropica* (F1B), *Pasteurella trehalosi* (F2A), *Psychrobacter phenylpyruvicus* (H2F), *Pseudomonas luteola* (2S3B), *Chryseobacterium meningosepticum* (2S1B), *Chryseobacterium indologenes* (TS2A), *Aeromonas salmonicida* (1h4b), *Sphingomonas paucimobilis* (2S1A), *Pseudomonas oryzihabitans* (2H4B), *Chromobacterium violaceum* (2S1C), *Stenotrophomonas maltophilia* (2S3BA), *Pantoea ananatis* (2665) y *Pantoea stewartii* (2715).

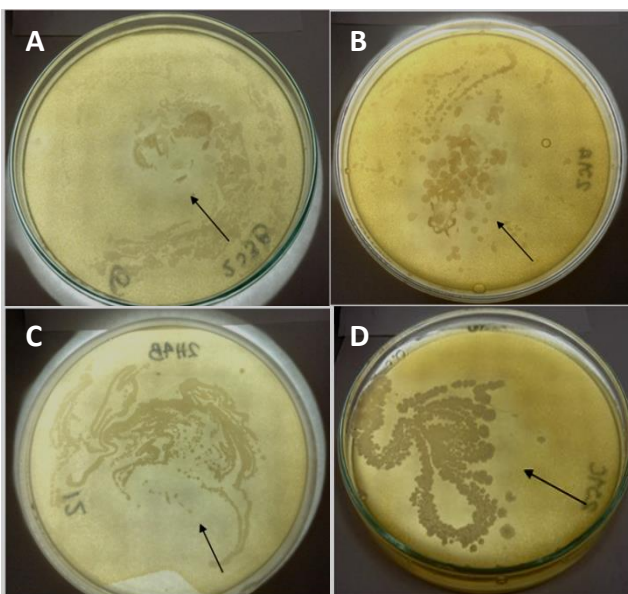


**Fig. 11.** Prueba de detección con sensi-disco. Se observa el crecimiento de las cepas antagónicas a excepción de la 3: *Burkholderia gladioli*. 1, *Pasteurella pneumotropica*; 2, *Pasteurella trehalosi*; 3, *Burkholderia gladioli*; 5, *Psychrobacter phenylpyruvicus*; 6, *Pseudomonas luteola*; 7, *Chryseobacterium meningosepticum*; 8, *Chryseobacterium indologenes*; 9, *Aeromonas salmonicida*; 10, *Sphingomonas paucimobilis*; 11, *Brevundimonas vesicularis*; 12, *Pseudomonas oryzihabitans*; 13, *Chromobacterium violaceum*; 14, *Stenotrophomonas maltophilia*; 15, *Pantoea ananatis*; 16, *Pantoea stewartii*. El número 4 pertenece a *B. cepacia* (H1A) la cual se sembró de manera masiva.

En adición, en estas pruebas se encontraron 5 casos especiales, en las cuales las bacterias antagonicas fueron capaces de crecer en inhibición simultánea y detección con sensi-disco: *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Chryseobacterium indologenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Brevundimonas vesicularis* y *Pantoea stewartii*, pero no en difusión en agar.

#### 7.1.4 Doble capa

El 26.6% de las bacterias probadas como antagonicas presentaron inhibición contra el crecimiento de *B. cepacia*, las cuales fueron *Pseudomonas luteola* (2S3B), *Sphingomonas paucimobilis* (2S1A), *Pseudomonas oryzihabitans* (2H4B) y *Chromobacterium violaceum* (2S1C); esto puede deberse a la producción de metabolitos secundarios como lo serían antibióticos, el resto de las bacterias es decir el 73.4% no presento antagonismo contra *B. cepacia* por tanto esta creció. De las 15 cepas solo 6 fueron capaces de crecer aún después de haber estado expuestas una hora a cloroformo y fueron: *Pasteurella pneumotropica* (F1B), *Pseudomonas luteola* (2S3B), *Chryseobacterium meningosepticum* (2S1B), *Sphingomonas paucimobilis* (2S1A), *Pseudomonas oryzihabitans* (2H4B) y *Chromobacterium violaceum* (2S1C).



**Fig. 12.** Técnica doble capa.

A) *Pseudomonas luteola* (2S3B),  
B) *Sphingomonas paucimobilis* (2S1A),  
C) *Pseudomonas oryzihabitans* (2H4B),  
D) *Chromobacterium violaceum* (2S1C), las  
flecha muestra las zonas de inhibiciones  
ejercidas por las bacterias antagonicas hacia  
*B. cepacia* (H1A).

## 7.2 Prueba de patogenicidad de *B. cepacia* en maíz y jitomate

Tanto para el maíz como para el jitomate se hicieron observaciones diarias del color de la raíz, las hojas (color, tamaño, presencia de daño) y si existía la presencia de algún hongo, esto fue tanto para las semillas inoculadas como para las no inoculadas. Al final del experimento se procedió a la medición de la longitud (cm) de la raíz y el largo (cm) de la región aérea de la plántula.

### 7.2.1 Maíz

Durante los primeros ensayos se detectó la presencia de un hongo, el cual fue identificado como *Fusarium* sp., por tanto se cambió a la segunda metodología descrita anteriormente. Después de controlar el hongo se procedió a realizar todas las pruebas de patogenicidad para esta plántula.



**Fig. 13.** Observación microscópica (100x) del hongo encontrado (*Fusarium* sp.) en las semillas y plántulas de maíz.

Se observó que las semillas que menos días tardaron en germinar fueron las control, debido a que a los 7 días ya estaba el 100% germinadas; mientras que para las infectadas con *B. cepacia* fueron 9 días y de las 20 semillas inoculadas solo germinó el 55% es decir 11 semillas. El traspaso a los tubos se realizó cuando la radícula medía aproximadamente 1cm.

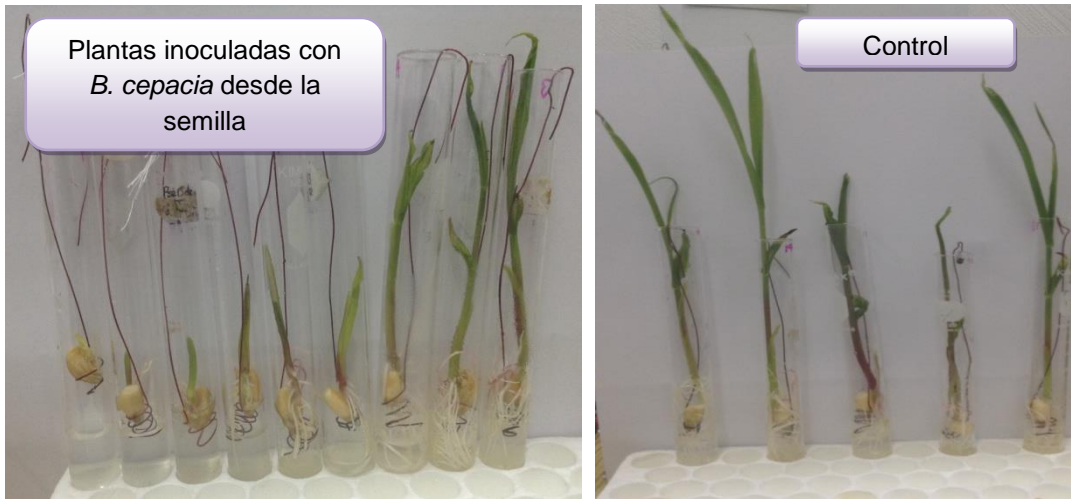


**Fig. 14.** Comparación de la germinación del maíz en las placas, se puede observar que el grupo control presenta mayor número de semillas germinadas en comparación con las inoculadas con *B. cepacia*.

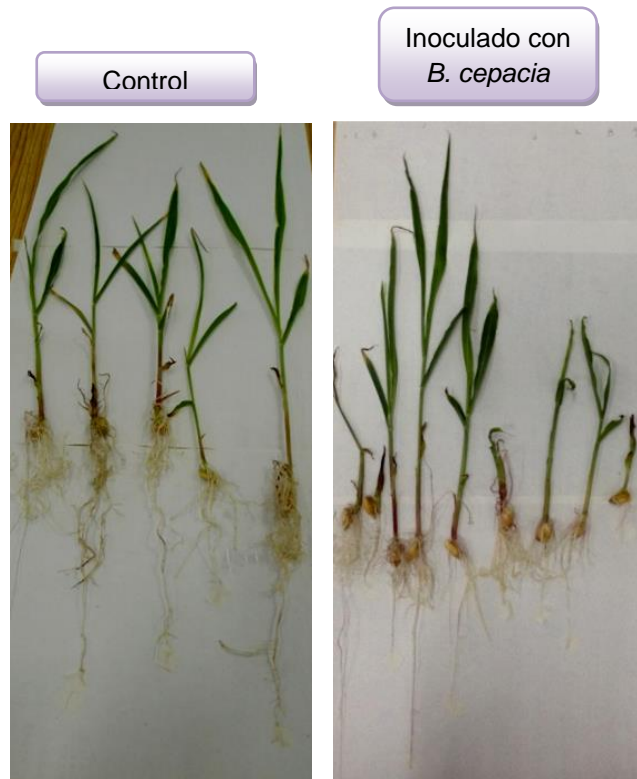


**Fig. 15.** Comparación maíz germinado después de 4 días, se observa la semilla perteneciente al grupo control y la semilla infectada con *B. cepacia*.

Las plántulas de maíz se dejaron crecer por 21 días y se observaron diariamente. En comparación con las plántulas control se encontró a primera vista una diferencia entre el largo de las plántulas control con respecto a las infectadas con *B. cepacia* desde la semilla.



**Fig. 16.** Comparación entre el grupo control y el inoculado desde la semilla con *Burkholderia cepacia*.

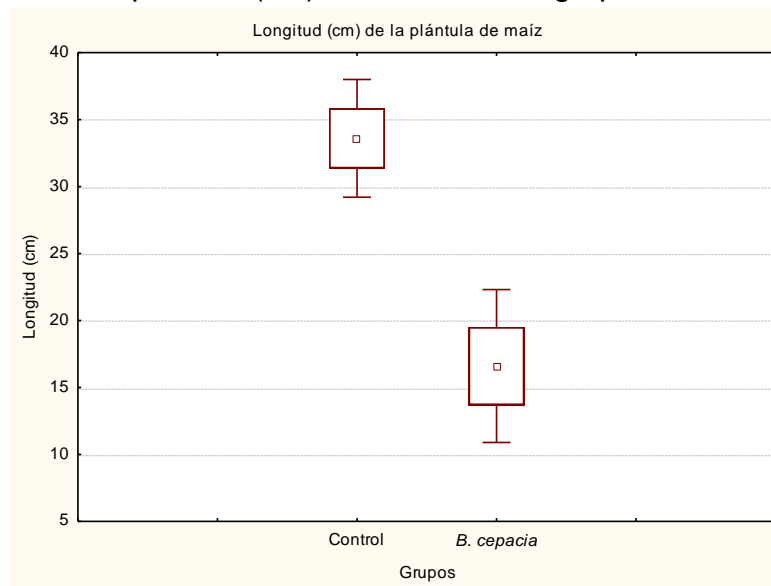


**Fig. 17.** Comparación entre el largo de la plántula de maíz del grupo control y el inoculado de desde la semilla.

Una vez que se realizaron las mediciones se encontró que el promedio de la longitud de las plántulas infectadas fue de 16.6 cm con respecto a las control el cual fue de 33.25; para la longitud de la raíz el promedio de las infectadas fue de

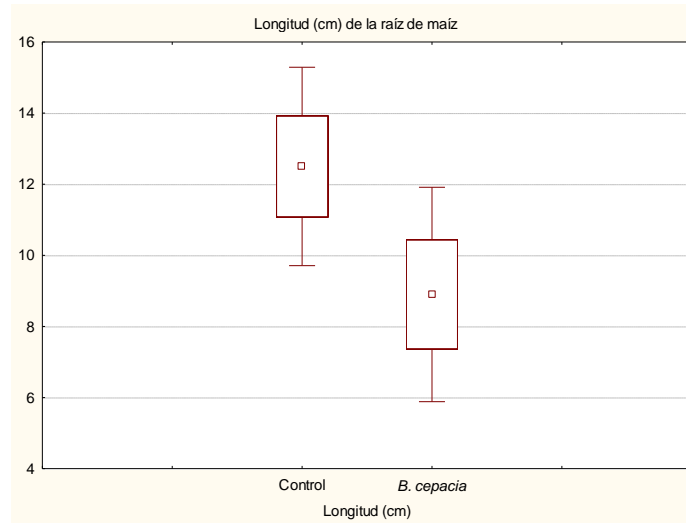
8.9 cm con respecto a las control 12.5 cm; además de que no se observó diferencia entre la cantidad de pelos radiculares entre un el grupo control y el inoculado con *B. cepacia* desde la semilla. Encontrándose así una diferencia significativa en la longitud de la región aérea de la plántula (Gráfica 1) pero no en la longitud de la raíz (Gráfica 2).

**Gráfica 1.** Prueba T-student comparativa para la longitud de la región aérea de la plántula (cm) de maíz en dos grupos.



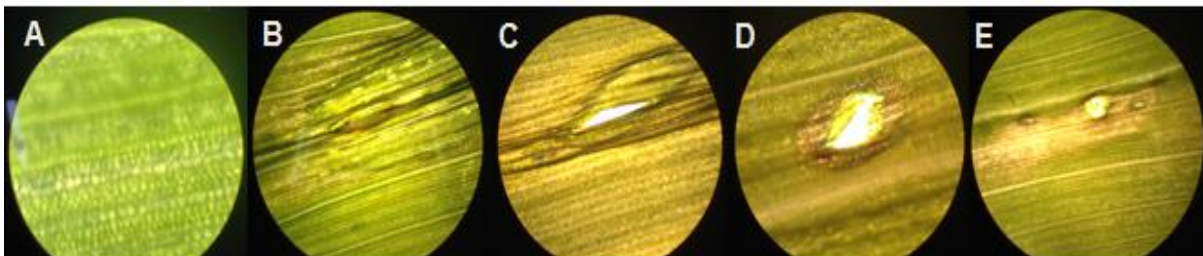
Se observa el grupo control y el grupo inoculado con *B. cepacia* desde la semilla. Prueba significativa. ( $t= 4.624$ ,  $p=0.00021$ ,  $n=10$ ).

**Gráfica 2.** Prueba T-student comparativa para el largo (cm) de la raíz de maíz en dos grupos.

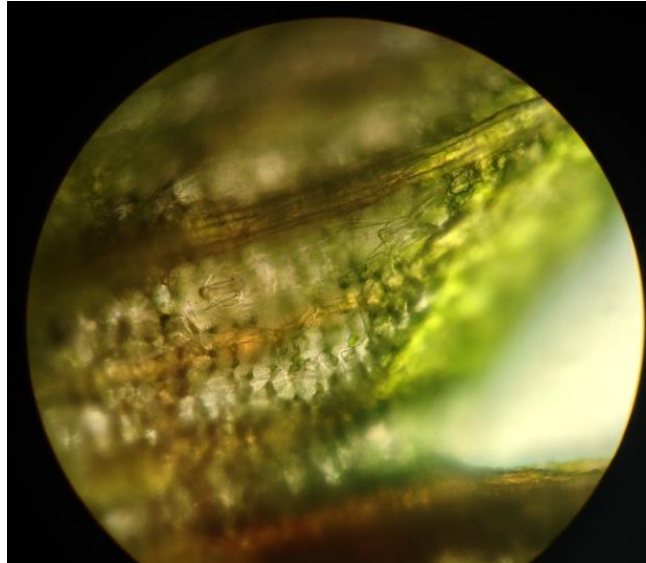


Se observa el grupo control y el grupo inoculado con *B. cepacia* desde la semilla. Prueba significativa. ( $t= 1.717$ ,  $p=0.103$ ,  $n=10$ ).

Para la prueba de patogenicidad en hoja se tomaron 9 plantas teniendo en cuenta que no tuvieran signos de daño en las hojas; se realizaron 3 grupos de 3 plantas cada uno y se hicieron observaciones diarias. Se encontró que las hojas presentaron coloración amarillenta-café, además de muerte celular alrededor del sitio de inoculación.



**Fig. 18.** Observación microscópica de hojas de maíz (10X) A) Control: tejido sin daño; B) Control negativo: inoculación de LB; CDE: Sitio de inoculación con *B. cepacia*; C) Se observa el sitio de inoculación, generado por la inyección con aguja de insulina y cambio de coloración de la hoja; D y E) Se nota el sitio de inoculación, la lesión rodeado por un halo de muerte celular además de cambio de color.



**Fig. 19.** Acercamiento (40x) de la zona de inoculación de *B. cepacia* en hoja de maíz, se puede observar pérdida de la estructura celular y cambio en la coloración.

### 7.2.2 Jitomate

Se observó que las semillas sin inóculo de *B. cepacia* empezaron su germinación a los 5 días, aunque la radícula era muy pequeña y no se procedió a su traspaso, pero en comparación con las que fueron inoculadas estas tardaron 3 días más en presentar la radícula y una vez así se procedió a el traspaso de todas las semillas a los tubos.

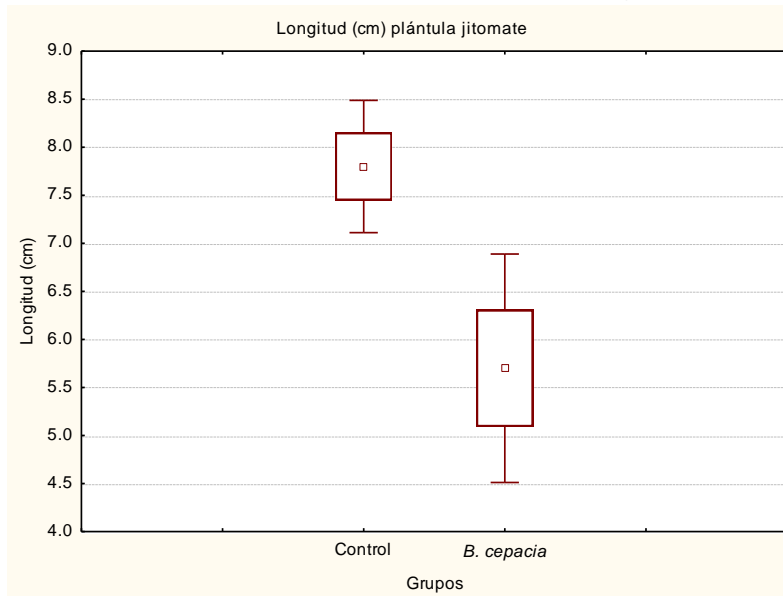
De 20 semillas inoculadas solo 14 germinaron, de éstas 4 no crecieron y por tanto no se tomaron en cuenta para la obtención de datos. De las 10 restantes, el 40% de las plántulas murieron entre los días 20 y 23 de crecimiento, presentando una coloración café en el tallo, refiriendo así un proceso de pudrición; la longitud de la raíz oscilaba entre los 0.5 cm a 2 cm y el largo de la región aérea de la plántula entre 3 y 5 cm. El 80% de las plantas presentaron coloración amarilla en las hojas y de estas el 37.5% tardaron en perder la semilla y que salieran las hojas; además de que estas estaban podridas y algunas secas.

Se encontró que el promedio de la raíz de las plántulas infectadas desde la semilla fue de 4.55 cm en comparación con el grupo control que fue de 8.1 cm, mientras que para la región aérea de la plántula fue de 6.5 cm para las inoculadas y 7.8 cm para el grupo control. Encontrándose así una significancia en la longitud de la plántula (Gráfica 3) entre el grupo control y el inoculado con *B. cepacia* desde la semilla, pero no para el largo de la raíz (Gráfica 4).



**Fig. 20.** Comparación entre el largo de la plántula de jitomate inoculada de desde la semilla, respecto a las plantas control

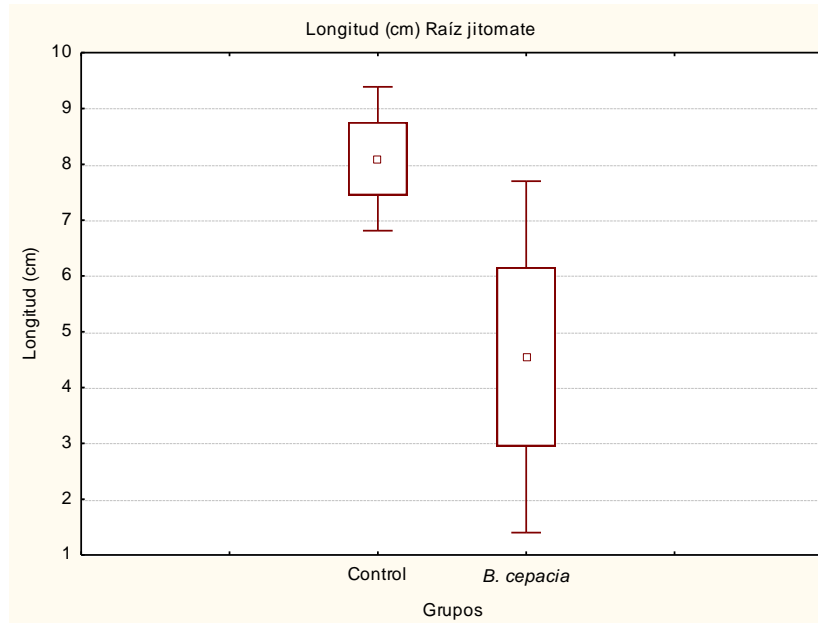
**Gráfica 3.** Prueba T-student comparativa para la longitud de la región aérea de la plántula (cm) de jitomate en dos grupos.



Se observa el grupo control y el grupo inoculado con *B. cepacia* desde la semilla.

Prueba significativa. ( $t= 2.996$ ,  $p=0.0077$ ,  $n=10$ ).

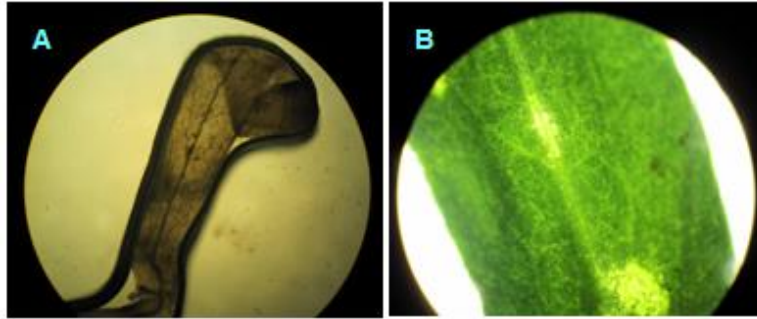
**Gráfica 4.** Prueba T-student comparativa para el largo (cm) de la raíz de jitomate en dos grupos.



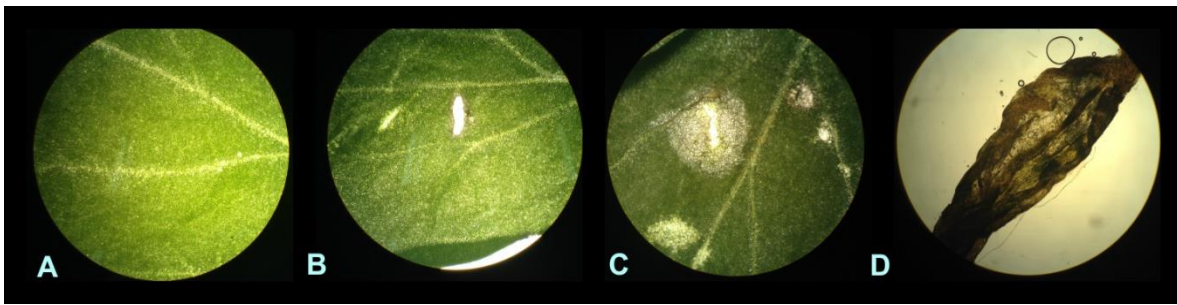
Se muestra el grupo control y otro infectado con *B. cepacia* desde la semilla. Prueba no significativa ( $t= 2.045$ ,  $p=0.05$ ,  $n=10$ ).

Las 3 plántulas de jitomate infectadas en hoja se dejaron en observación durante una semana, encontrándose así que una de ellas presentó necrosis celular al siguiente día de haber sido infectada en comparación de las 2 restantes las cuales empezaron a tener una coloración amarilla.

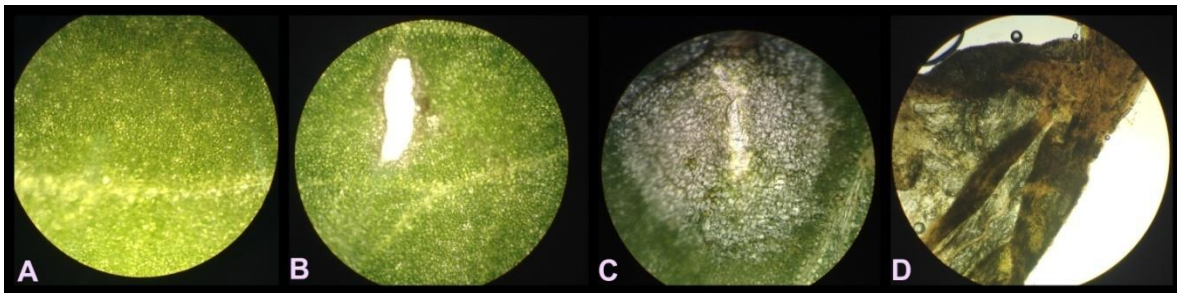
Mediante observaciones microscópicas se comparó el daño tisular ocasionado por *B. cepacia* en las hojas, tanto de las planta inoculadas desde la semilla como en las que fueron inoculadas en las hojas en las cuales se observó la presencia de pérdida de la organización celular además de pérdida en la forma de la pared celular.



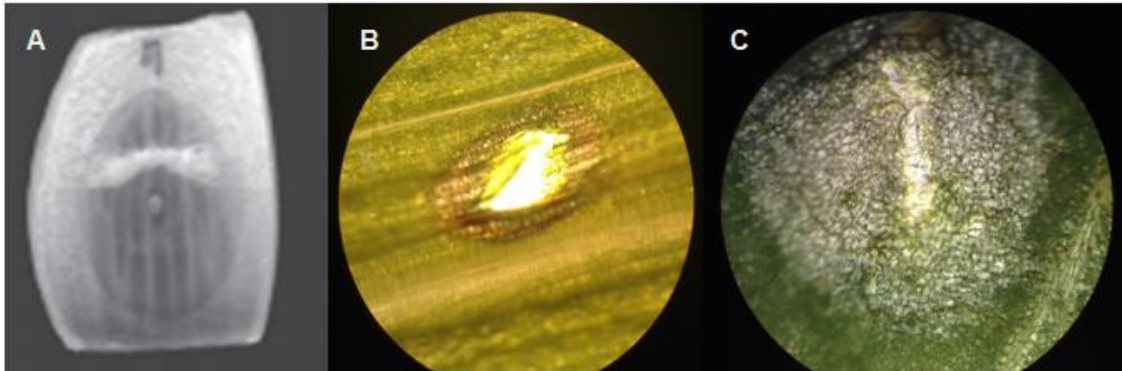
**Fig. 21.** Observación microscópica de hojas de jitomate inoculado desde la semilla; A) Hoja de jitomate, con retraso en la pérdida de la semilla, muestra signos de pudrición (4x); B) Hoja de jitomate que muestra manchas con cambio de coloración



**Fig. 22.** Observación microscópica de hojas de jitomate (4X) A) Control negativo: hoja sin daño; BCD: Sitio de inoculación con *B. cepacia*; B) Se observa el sitio de inoculación, generado por la inyección con aguja de insulina; C) Se nota el sitio de inoculación, la lesión y muerte celular. D) Hoja totalmente seca, es decir con un nivel alto de muerte tisular.



**Fig. 23.** Observación microscópica del daño tisular causado por *B. cepacia* (10x), A) Control negativo; morfología normal de la hoja; BCD: Inoculación con *B. cepacia*; B) puede verse el sitio de inoculación y una pequeña zona de muerte celular C) zona de inoculación, rodeado por un halo de daño tisular; D) se observa tejido necrosado.



**Fig. 24.** Comparación entre el efecto causado por la inoculación de *B. cepacia* en cebolla, maíz y jitomate. A) Lámina de cebolla inoculada con *B. cepacia* a una concentración de  $10^7$  ufc/ml, estudios realizador por Jacobs *et al*, 2008.. Sitio de inoculación con *B. cepacia* a una dosis de  $10^8$  ufc/ml en maíz (B) y jitomate (C). En los tres casos se puede apreciar una zona muerte celular alrededor del inoculo.

## 8 DISCUSIÓN

Para determinar el efecto antagónico entre dos especies microbianas, si bien algunas de las técnicas utilizadas en este trabajo como difusión en agar y detección con sensi-disco, son comúnmente ensayos inmunológicos, representan ser las adecuadas junto con la técnica de inhibición simultánea y doble capa para poder evaluarlo, debido a que se logra visualizar en un medio sólido la actividad productora de metabolitos tóxicos de una cepa antagónica hacia la que es sensible (**Monroy et al, 2009**).

En las pruebas realizadas correspondientes a inhibición simultánea, detección con sensi-disco y difusión radial no se presentó antagonismo de las cepas procedentes de jitomate contra *B. cepacia*, sino que ambas cepas crecieron, es decir, ninguna inhibió el desarrollo de la otra. Aunque *B. cepacia* puede producir metabolitos secundarios para la inhibición del desarrollo de otras cepas, el hecho de que no tenga efecto sobre las cepas antagónicas podría explicarse asociando lo reportado por Joerger, 2002, quien puntualiza que pueden presentarse ciertos genes en algunas bacterias, que les confieren un incremento en la resistencia a péptidos antimicrobianos producidos por otras.

En adición, en estas pruebas se encontraron 5 casos especiales, en las cuales las bacterias antagónicas fueron capaces de crecer en inhibición simultánea y detección con sensi-disco: *Psychrobacter phenylpyruvicus*, *Chryseobacterium indologenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Brevundimonas vesicularis* y *Pantoea stewartii*, pero no en difusión en agar, esto podría deberse a que en esta técnica se necesita que las muestras utilizadas sean suficientemente solubles para que puedan difundir (**Luttmann et al, 2008**).

En la técnica de doble capa se presentaron 4 cepas capaces de inhibir el crecimiento de *B. cepacia*, esto puede deberse a que, como primero se hace crecer a la cepa productora de una sustancia inhibidora, permitiendo su liberación en el medio de cultivo, y después se siembra la cepa contra la cual se desea

observar el efecto antagónico, la que resulta sensible a dicho efecto, manifestando presentando un halo de inhibición **(Monroy et al, 2009)**.

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *B. cepacia* en el ensayo de doble capa; esto podría deberse a que el género *Pseudomonas* es capaz de producir metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de otras bacterias, así como de enzimas extracelulares incluyendo lipasas y amilasas. Además, los miembros de este género se encuentran involucrados en la biodegradación tanto de compuestos naturales como de componentes químicos **(Khannous et al, 2014)**. Se sabe que las lipasas son ampliamente aplicadas en la industria debido a que hidrolizan triacilgliceroles, ácidos grasos y acilgliceroles **(Litthauer et al, 2002)**.

Como en el caso anterior otra cepa capaz de inhibir el crecimiento de *B. cepacia* fue *Sphingomonas paucimobilis*; este hecho puede ser explicado porque es un buen agente antagónico hacia hongos y otras bacterias, mediante la producción de exopolisacáridos **(White, 1996)**. Diferentes estudios han demostrado que esta especie es un buen agente biorremediador; ya que es capaz de metabolizar contaminantes orgánicos complejos, así como compuestos refractarios, aromáticos simples e hidrocarburos poli-aromáticos, así como la habilidad para descomponer y sintetizar macromoléculas **(Özdemir et al, 2011; Toh et al, 2011)**. Aparte de que pueden sobrevivir en ambientes con bajos nutrientes; producir biofilms o adherirse a los preexistentes e integrarse y sobrevivir por días o semanas dependiendo de las condiciones ambientales **(Ryan et al, 2010; Gusman et al, 2012)**.

Y por último, *Chromobacterium violaceum* logró inhibir el crecimiento de *B. cepacia*; esto se explicaría debido a que *C. violaceum* es capaz de producir un compuesto pigmentado de color púrpura, con actividad bactericida y de amplio espectro, llamado violaceina **(August et al, 2000)**. Además se sabe que las cepas pertenecientes a esta especie son capaces de producir cianuro de hidrogeno y exoproteasas, las cuales junto con la violaceina son reguladas mediante la producción endógena de AHL (*N*-acil homoserina lactona) **(Chernin et al, 1998)**.

Se sabe que en animales la violaceina tiene actividad, tripanocida, tumoricida y antiviral (**Rettori y Durán, 1998**).

También en la prueba de doble capa, se encontraron 6 casos especiales: *Pasteurella pneumotropica*, *Pseudomonas luteola*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas oryzae* y *Chromobacterium violaceum*; que junto con *Burkholderia cepacia*, fueron capaces de crecer aún después de haberlas expuesto una hora a cloroformo, esto podría explicarse debido a que estudios realizados por Suryanarayana *et al*, 2013; quien menciona que este solvente no interfiere con la síntesis de AHL (*N*-acetil homoserina lactona), por lo tanto se sigue dando la producción de factores de virulencia, síntesis de exopolisacáridos, formación de biofilms, producción de antibióticos, pigmentos y movilidad (“swarming”). Además se ha visto que cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* spp. son capaces de degradar 1.9 nmol por minuto por proteína de la célula (**McClay *et al*, 1996**). Para el caso de *Chromobacterium violaceum* se ha visto que el compuesto violaceina producido por esta es soluble en etanol e insoluble en agua y cloroformo (**Kaufman *et al*, 1986**).

### **Pruebas de Patogenicidad**

En los primeros ensayos de maíz existió un alto nivel de contaminación por el hongo *Fusarium* sp., se sabe que este hongo causa putrefacción de la raíz, tallo y mazorca en esta planta. Se sabe que algunas cepas pertenecientes a este hongo tienen la capacidad de producir micotoxinas; las cuales se pueden formar post-cosecha o en granos almacenados (**Logrieco *et al*, 2002**).

Se sabe que de manera natural *B. cepacia* se encuentra de manera predominante en la rizosfera, en una íntima asociación con las raíces de algunas plantas y puede comprender entre el 0.6% al 4% de bacterias cultivables. Se ha visto que algunas cepas no solo se encuentran en la superficie de las raíces, pueden colonizar tejido interno y puede comprender el 73% de la comunidad bacteriana endófitas; alcanzando poblaciones de  $10^5$  ufc/g<sup>-1</sup>; estas cepas se

relacionan con la fijación de N<sub>2</sub>. Esta bacteria es dominante en la rizosfera de *perennial ryegrass*, maíz, chícharo, algodón, arroz, café y jitomate. Esta bacteria también está relacionada con la promoción del crecimiento vegetal, debido a la producción de ciertos compuestos como el ácido indolacético (**DiCello et al, 1997; Parke J. y Gurian-Sherman, 2001; Tabacchioni et al, 2002; Caballero-Mellado et al, 2007; Dalmastri et al, 2007**). Esto no pudo ser observado en este estudio, debido a que tanto las plántulas de maíz como de jitomate inoculadas desde la semilla, presentaron menor longitud en cuanto a la región aérea de la plántula. Además de que los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad en hoja concuerdan con los encontrados por Jacobs *et al*, 2008, los cuales realizaron pruebas de patogenicidad en cebolla, encontrando en la hoja, pérdida celular, esto concuerda con lo encontrado tanto en hojas de maíz como de jitomate, debido a la observación de halos de pérdida celular alrededor de la zona de inoculación.

## 9 CONCLUSIÓN

- De las cuatro técnicas utilizadas, la más eficaz en este estudio resultó ser la de doble capa para la observación del efecto antagónico hacia *Burkholderia cepacia*.
- De las 15 cepas probadas no se encontró inhibición contra el crecimiento de *Burkholderia cepacia* para 3 de las 4 pruebas realizadas: inhibición simultánea, difusión en agar y detección con sensi-disco.
- En la prueba de doble capa se encontró inhibición contra *B. cepacia*, la cual fue ejercida por: *Pseudomonas luteola*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas oryzihabitans* y *Chromobacterium violaceum*.
- *B. cepacia* afecto la longitud de la plántula tanto de maíz como de jitomate pero no el largo de la raíz. Además de que resultó patógena en la inoculación de las hojas.

## 10 PERSPECTIVAS

En las pruebas de antagonismo microbiano se recomienda que de los datos obtenidos a través de la prueba de doble capa se hagan estudios de manera *in vivo* en plantas.

Para las pruebas de patogenicidad de *Burkholderia cepacia* en maíz y jitomate se recomienda la utilización de un mayor número de muestras, con la finalidad de poder extrapolar de manera correcta los datos.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

1. **August P.R., Grossman T.H., Minor C., Draper M.P., MacNeil I.A., Pemberton J.M., Call K.M, Holt D. and Osburne M.S.** 2000. Sequence Analysis and Functional Characterization of the Violacein Biosynthetic Pathway from *Chromobacterium violaceum*, *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*. 2(4): 513-519.
2. **Alston D. G.** 2011. General Concepts of Biological Control, Published by Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory IPM-015-11.
3. **Andrews J. H., Berbee F. M. and Nordheim E. V.** 1983. Microbial Antagonism to the Imperfect Stage of the Apple Scab Pathogen, *Venturia inaequalis*, *Phytopathology* 73:228-234.
4. **Atlas, R.M. y Bartha, R.** 2002 *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*, Pearson Educación, S. A. Madrid, 4ta edición.
5. **Araque Y., Vitelli-Flores J., Ramírez A., Alonso G., Rodríguez L. V.** 2008. Identificación bioquímica y PCR especie específica de cepas de *Burkholderia cepacia* de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28:82-88.
6. **Bautista B. S.** 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades post-cosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos, *Revista Iberoamericana de Tecnología Post-cococha*, Hermosillo Sonora, México, 8(7), núm. 001.
7. **Caballero-Mellado J., Onofre-Lemus J., Estrada-De los Santos P. and Martínez-Aguilar L.** 2007. The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Biorremediation, *Applied and Environment Microbiology*, p. 5308-5319.
8. **Cartwright D. K. and Benson D. M.** 1995. Optimization of Biological Control of Rhizoctonia Stem Rot of Poinsettia by *Paecilomyces lilacinus* and *Pseudomonas cepacia*, *Plant Diseases* 79: 301-308.

9. **Chernin S. L., Winson M. K., Thompson J. M., Haran S., Bycroft B. W., Chet I., Williams P. and Stewart G. S. A. B.**, 1998. Chitinolytic Activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing, *Journal of Bacteriology*, 180(17):4435.
10. **CIMMYT.** 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Programa de del CIMMYT. 4ed. ISBN: 970-648-128-1.
11. **Dalmastri C., Baldwin A., Tabacchioni S., Bevivino A., Mahenthiralingam E., Chiarini L. and Dowson C.** 2007. Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing, *Environmental Microbiology* 9(7), 1632-1639.
12. **DiCello F., Bevivino A., Chiarini L., Fani R., Paffetti D., Tabacchioni S. and Dalmastri C.** 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* Population Isolated from the Maize Rhizosphere at Different Plant Growth Stages, *Applied and Environmental Microbiology*, Noviembre, p. 4485-4493, Vol. 63, No.11
13. **FAO.** 1993. El maíz en la nutrición humana (Colección Alimentación y nutrición, N°25), ISBN 92-5-303013-5.
14. **Fernández-Larrea V. O.** 2001. Microorganismos antagonistas para el control Fitosanitario, Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos, Manejo Integrado de Plagas, Costa Rica, No. 62 p. 96-100.
15. **Fredrickson A.G. and Stephanopoulos G.** 1981. Microbial Competition, *Science* Vol. 213, 28 Agosto.
16. **Fischbein D.** 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas, Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias Argentina, Cuadernillo n° 15 ISSN 1851-4103
17. **Gear J. R. E.** 2006. Maíz y nutrición; El cultivo de maíz en argentina, Recopilación de ILSI Argentina, Serie de Informes Especiales.
18. **Gil D. De M. M.** 2001. Bacteremia de curso fatal por *Burkholderia cepacia*: Revisión de la literatura a propósito de un caso clínico, *Revista Chilena de Infectología*, 18 (1): 41-44.

19. **Gleason M. L. and Edmunds B. A.** 2006. Tomato diseases and disorders, Iowa State University, PM 1266.
20. **Gusman V., Medic D., Jelesic Z. and Mihajlovic-Ukropina M.** 2012. *Sphingomonas paucimobilis* as a biofilm producer, *Archives of Biological Sciences Belgrade*, 64(4), 1327-1331.
21. **Hajek E. A.** 2004. Natural Enemies: An Introduction to Biological Control, Cambridge University Press; First Edition edition, 396 paginas, April 5.
22. **Herigstand B., Hamilton M., Heersink J.** 2001. How optimize the drop plate method for enumerating bacteria, *Journal of Microbiological Methods*, 44(2):121-129.
23. **Herrera H. J. R.** 2013. Flora bacteriana asociada a cultivos de jitomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) en el estado de puebla (Tesis de licenciatura), BUAP, Escuela de Biología.
24. **Hibbing M. E., Fuqua C., Parsek M. R., Peterson S. B.** 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle, *Nature Reviews Microbiology* 8, 15-25.
25. **Hoben H. J. and Somasegaran P.** 1982. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. In inoculants made from presterilized peat, *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5): 1246-1247.
26. **Jacas J., Caballero P., Avilla J. (eds).** 2005. El control biológico de plagas y enfermedades. La sostenibilidad de agricultura mediterránea, Castelló de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I, D.L.
27. **Johnson M.W.** 2000. Nature and scope of biological control, *Biological Control of Pests*, ENTO 675, UH-Manoa.
28. **Joerger R.D.** 2002. Alternative to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages, Symposium: use of antimicrobials in production.
29. **Kaufman S. C., Ceraso D. and Schugurenky.** 1986. First Case Report from Argentina of Fatal Septicemia Caused by *Chromobacterium violaceum*, *Journal of Clinical Microbiology*, Mayo, p.956-958

- 30. Khannous L., Jrad M., Dammak M., Miladi R., Chaaben N., Khemakhem B., Gharsallah N. and Fendrilmen.** 2014. Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions, *Lipids in Health and Disease* 13:9.
- 31. Koneman W. E. y Allen S.** 2008. Koneman Diagnostico Microbiológico: Texto y atlas en color, 6ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- 32. Liazid A. M.** 2012. Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du C.H.U de Tlemcen, (Tesis de maestría, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Département de Biologie).
- 33. Litthauer D., Ginster A., Skein E. van E.** 2002. *Pseudomonas luteola* lipase: A new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family, *Enzyme and Microbial Technology* 30 209-215.
- 34. Logrieco A., Mulè G., Moretti A. and Bottalico A.** 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe, *European Journal of Plant Pathology* 108: 597–609.
- 35. López-Granados G., Fernández-Pavía S.P., Cárdenas-Navarro R., Sánchez –Yáñez J.M.** 2005. Antagonismo Microbiano Contra Bacterias Activadoras de Núcleos de Hielo: *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas syringae* Van Hall, *Revista Chapingo*, Serie Horticultura, Vol. 11, Núm 1, enero-junio, pp. 105-111, Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- 36. Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D.; tr. de la Fuente M. J. L.** 2008. Inmunología : manual de técnicas de investigación en el laboratorio, Acribia.
- 37. McClay K., Fox B. G. and Steffan R. J.** 1996. Chloroform Mineralization by Toluene-Oxidizing Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, vol 62. No.8, Agosto, p.2716-2722.
- 38. Miller M. B. and Bassler B. L.** 2001. Quorum Sensing in bacteria, *Annual Review of Microbiology*, Vol 55; 165-169.

- 39. Monroy D. M. del C., Castro B. T., Fernández P. F. J. y Mayorga R. L.** 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas, *Contacto S* 73, 63-72.
- 40. Morales G. Y. E., Pazos R. L. A., Bustillos C. M. R., Krell T., Muñoz R. J.** 2010. Método rápido para la obtención de maíz axénico a partir de semillas. *Elementos* 80 (2010) 35-38.
- 41. Morales G. Y. E., Duque E., Rodríguez A. O., De la Torre J., Martínez Contreras R. D., Pérez y T. R., Muñoz R. J.** 2010. Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos, *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, BioTecnología Vol. 14 No.2
- 42. Morales-García Y. E., Juárez-Hernández D., Ramos-Castillo G., Muñoz-Rojas J.,** 2010. Germinación de Semillas Axénicas de Maíz en Procesos Celulares Fundamentales: Manual de Prácticas de Laboratorio, Ediciones Color 2000, México.
- 43. Nicholls E. C. I.** 2008. Control Biológico de Insectos: un enfoque agroecológico, Ciencia y Tecnología Editorial Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia.
- 44. Özdemir M., Pekcan S., Emin D. M., Tasbent E. F., Feyzioglu B., Pirinc S., Baykan M.** 2011. A rare cause of bacteremia in a pediatric patient with down syndrome: *Sphingomonas paucimobilis*, *International Journal of Medical Sciences*, 8(7):537-539.
- 45. Palacio B. A., Aguado M. A., Cambra Á. M.** 2010. El chancre bacteriano del tomate *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michinganensis*, Dirección General de Alimentación, Centro de Protección Vegetal, Gobierno de Aragon, Departamento de Agricultura y Alimentación.
- 46. Pal K. K. and B. McSpadden G.,** 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health*, DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- 47. Parke J. L. and Gurian-Sherman D.** 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* Complex and Implications for Risk Assessment of Biological Control Strains, *Annual Review of Phytopathology*, 39:225-58.

- 48. Parra G. E., Centeno B. S., Araque C. Y.** 2009. Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29:103-109.
- 49. Peltier A. J., Esker P. D., Bradley C. A., Robertson A., Paul P. A.** 2008. Corn Foliar Diseases: Identification and Management Field Guide, Iowa State University, University Extension.
- 50. Pérez y T. R.** 2008. Evaluación de la diversidad genética y bioquímica de *Pantoea* sp. en maíz, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala. Tesis para obtener el grado de doctor.
- 51. Pérez-y-Terrón R., Villegas M.C., Cuellar A., Muñoz-Rojas J., Castañeda-Lucio M., Hernández-Lucas I., Bustillos-Cristales R., Bautista-Sosa L., Munive J. A., Caicedo-Rivas R., and Fuentes-Ramírez L. E.** 2009. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico
- 52. Pérez y T. R., Cebada R. J. A., Munive H. J. A., Carmona D. J. C.** 2013. Prácticas educativas desde la perspectiva iberoamericana; dimensiones psicológicas, pedagógicas y sociales, Umbral Editorial, S.A. de C. V.
- 53. Pest Notes.** 2007. Biological control and natural enemies, University of California, *Agriculture and Natural Resources*, Publication 74140.
- 54. Piqueras M.** 2001. Fichas de MedTrad: *quorum sensing*, Panace@, Vol. 2, n.º6.
- 55. Rahman M. M., Khan A.A. and Ali M. E.** 2013. Screening of Antagonistic Bacteria against Bacterial Wilt of Tomato, Eggplant and Potato in Bangladesh, *International Journal of Agriculture & Biology*, 15: 973-977.
- 56. Rettori D. and Durán N.** 1998. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol 14, 685-688.
- 57. Ripa R., Larra P., Rodríguez S.** 2008. Control biológico, Capítulo 4.

- 58. Robles C. A., Díaz S. A., Herrera I. L., Cupull S. R.** 2011. Utilización de antagonistas como una alternativa ecológica en el control de enfermedades foliares en tomate, *Centro Agrícola*, 38(3): 37-43; julio-sept., 2011.
- 59. Rogg W. H.** 2000. Manual: Manejo Integrado y Control Biológico de Plagas y Enfermedades, Proexant.
- 60. Ruíz H. C.** 2013. Respuesta Antagónica de Microorganismos Aislados de los Cultivos de Microalgas en el Laboratorio de Cultivos Marinos, *DELOS Revista Desarrollo Local Sostenible*, Universidad de Málaga, Vol. 6, N° 18.
- 61. Ryan M.P. and Adley C.C.** 2010. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism, *Journal of Hospital Infection*.
- 62. SAGARPA.** 2012. Tomate rojo (jitomate) *Lycopersicon esculentum*
- 63. SAGARPA.** 2010. Produce México 39.5 toneladas de jitomate por cada hectárea.
- 64. Santoyo G., Valencia-Cantero E., Orozco-Mosqueda Ma. Del C., Peña-Cabriales J. J., Farías-Rodríguez.** 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos, *Terra Latinoamericana, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C.*, México, vol. 28, núm 1, enero-marzo, pp. 53-60.
- 65. Settanni L., Corsetti A.** 2008. Review: Application of bacteriocin in vegetable food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology* 121, 123-138.
- 66. SIAP.** 2012. Maíz grano *Zea mays*.
- 67. Shelton A.** Biological control: A guide to Natural Enemies in North America, What is Biological Control?, Cornell University; College of Agriculture and Life Sciences, Department of Entomology.
- 68. Singleton P. y Sainsbury D.** 1993. Dictionary of microbiology and molecular Biology, 2ed, John Wiley & Sons Ltd.
- 69. Speert P. D.** 2002. Advances in *Burkholderia cepacia* complex. *Paediatric Respiratory Reviews*, Series: New Biology of the Airways 230-235, Canada.

- 70. Sweets L. E. and Wright S.** 2008. Integrated Pest Management Corn Diseases; Plant Protection Programs, College of Agriculture, Food and Natural Resources, Universidad de Missouri.
- 71. Tabacchioni S., Bevivino A., Dalmastrì C., Chiarini L.** 2002. *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: a minireview, *Annals of Microbiology*, 52, 103-117.
- 72. Toh Han-Siong, Tay Hung-Tze, Kuar Wei-Khie, Weng Tzu-Chieh, Tang Hung-Jen, Tan Che-Kim.** 2011. Risk factors associated with *Sphingomonas paucimobilis* infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 44, 289e295.
- 73. Toledo Y., Hernández A., Alvarez M., Martín G. M., Marquez R.** 2002. Determinación del efecto antagónico de un biopreparado a partir de una cepa de *Burkholderia cepacia* ante *Fusarium* sp. en el cultivo del gladiolo (*Gladiolu ssp*), *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 4, p. 11-15.
- 74. Trujillo I., Díaz A., Hernández A., Heydrich M.** 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz, *Rev. Protección Veg. Vol. 22 No. 1 (2007): 41-46.*
- 75. Unruh T. R.** 1993. Biological Control, Tree Fruit Research & Extension Center Orchard Pest Management Online, Washington State University.
- 76. Vidaver A. K. and Lambrecht P. A.** 2004. *Las Bacterias como Patógenos Vegetales*. Trans. Ana María Romero. *The Plant Health Instructor*.
- 77. Wayne W. D.** 2002. Bioestadística; Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa S.A de C.V.
- 78. White D. C., Sutton S. D. and Ringelberg D. B.** 1996. The genus *Sphingomina*s. *Physiology and Ecology*, *Current Opinion in Biotechnology* 7:301-306
- 79. Williamson J.** 2012. Tomato Diseases, CLEMSON Cooperative Extension, Home & Garden Information Center (HGIC) 2217.

## PÁGINAS WEB CONSULTADAS

1. **AgroPanorama.com** una forma diferente de ver el agro en América Latina. Panorama Global, Producción mundial de maíz 2013/14. Recuperado de <http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Maiz.htm>
2. **Martín S. I.** Universidad de Granada. Diversidad microbiana y taxonomía, Amensalismo, Departamento de Microbiología de la URG, recuperado de [http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=376&Itemid=459](http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=376&Itemid=459).
3. **Schwartz H, F. and Mohan S. K.,** Sour Skin, from the *Compendium of Onion and Garlic Diseases*, recuperado de <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/OnionGarlicSourSkin.aspx>.
4. **SIAP-SAGARPA.** Cierre de la producción agrícola por estado 2012 (jitomate), recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
5. **SIAP-SAGARPA.** Cierre de la producción agrícola por estado 2013 (jitomate), recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
6. **SIAP-SAGARPA.** Cierre de la producción agrícola por estado 2013 (maíz grano), recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
7. **SIAP-SAGARPA.** Cierre de la producción agrícola por cultivo (jitomate). Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.

## 12. ANEXOS

### Cepas utilizadas como antagonicas para la confrontación con *Burkholderia cepacia*.

	<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Obtención</b>	<b>Zona</b>
1	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	F1B	Fruto	IM
2	<i>Pasteurella trehalosi</i>	F2A	Fruto	IM
3	<i>Burkholderia gladioli</i>	H2CB	Hoja	IM
4	<i>Burkholderia cepacia</i>	H1A	Hoja	IM
5	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	H2F	Hoja	IM
6	<i>Pseudomonas luteola</i>	2S3B	Suelo	TE
7	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2S1B	Suelo	TE
8	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	TS2A	Suelo	TEC
9	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1h4b	Hoja	TEH
10	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2S1A	Suelo	TE
11	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2H2B	Hoja	TE
12	<i>Pseudomonas oryzae</i>	2H4B	Hoja	TE
13	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2S1C	Suelo	TE
14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2S3BA	Suelo	TE
<b>Cepas tipo*</b>				
15	<i>Pantoea ananatis</i>	2665		
16	<i>Pantoea stewartii</i>	2715		

IM:

Azúcar de Matamoros; TE: Tecamachalco; TEC: Tecali; TEH: Tehuacán

### Conteo de unidades formadoras de colonias (ufc)

Se muestran la especie y cepa de las bacterias utilizadas las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

	<b>Nombre</b>	<b>Cepa</b>	<b>Abs.</b>	<b>UFC/ML</b>
1	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	F1B	0.387	6x10 <sup>8</sup>
2	<i>Pasteurella trehalosi</i>	F2A	0.386	6x10 <sup>7</sup>
3	<i>Burkholderia gladioli</i>	H2CB	0.405	1x10 <sup>8</sup>
4	<i>Burkholderia cepacia</i>	H1A	0.508	5x10 <sup>8</sup>
5	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	H2F	0.882	5x10 <sup>7</sup>
6	<i>Pseudomonas luteola</i>	2S3B	0.301	2x10 <sup>7</sup>
7	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2S1B	0.311	4x10 <sup>8</sup>
8	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	TS2A	0.223	2x10 <sup>7</sup>
9	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1h4b	0.317	5x10 <sup>7</sup>
10	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2S1A		
11	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2H2B	0.280	2X10 <sup>9</sup>
12	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	2H4B	0.232	5x10 <sup>7</sup>
13	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2S1C		
14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2S3BA		
<b>CEPAS TIPO</b>				
15	<i>Pntoeaanatis</i>	2665	0.136	3x10 <sup>7</sup>
16	<i>Pantoea stewartii</i>	2715	0.612	6x10 <sup>8</sup>

Las cepas 2S1A, 2S1C y 2S3BA, no cuentan con conteo debido a que su crecimiento es de manera agregada

### Sensi-disco

Se muestra el número de disco junto con la cepa que fue humedecido, la absorbancia y su equivalencia en ufc/ml.

	<b>Nombre</b>	<b>Cepa</b>	<b>Abs (Å)</b>	<b>UFC/ML</b>
<b>1</b>	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	F1B	0.750	1x10 <sup>9</sup>
<b>2</b>	<i>Pasteurella trehalosi</i>	F2A	0.963	1x10 <sup>8</sup>
<b>3</b>	<i>Burkholderia gladioli</i>	H2CB	0.787	3x10 <sup>8</sup>
<b>5</b>	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	H2F	0.949	5x10 <sup>7</sup>
<b>6</b>	<i>Pseudomonas luteola</i>	2S3B	0.338	2x10 <sup>7</sup>
<b>7</b>	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2S1B	0.485	7x10 <sup>8</sup>
<b>8</b>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	TS2A	0.462	5x10 <sup>7</sup>
<b>9</b>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1h4b	0.398	6x10 <sup>7</sup>
<b>10</b>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2S1A	0.134	-
<b>11</b>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2H2B	0.166	1x10 <sup>9</sup>
<b>12</b>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	2H4B	0.444	1x10 <sup>8</sup>
<b>13</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2S1C	0.155	-
<b>14</b>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2S3BA	0.280	-
<b>15</b>	<i>Pantoea ananatis</i>	2665	0.938	2x10 <sup>8</sup>
<b>16</b>	<i>Pantoea stewartii</i>	2715	0.630	7x10 <sup>8</sup>

\*El número 4 no se incluye pues corresponde a *B. cepacia*.

### Inhibición simultánea

Se muestra el número de la gota y cepa colocada, la absorbancia y su equivalencia en ufc/ml.

	<b>Nombre</b>	<b>Cepa</b>	<b>Abs. (Å)</b>	<b>UFC/ML</b>
1	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	F1B	.785	1x10 <sup>9</sup>
2	<i>Pasteurella trehalosi</i>	F2A	.747	1x10 <sup>8</sup>
3	<i>Burkholderia gladioli</i>	H2CB	.466	1x10 <sup>8</sup>
5	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	H2F	.696	4x10 <sup>7</sup>
6	<i>Pseudomonas luteola</i>	2S3B	.313	2x10 <sup>8</sup>
7	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2S1B	.474	7x10 <sup>8</sup>
8	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	TS2A	.493	5x10 <sup>7</sup>
9	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1h4b	.080	1x10 <sup>7</sup>
10	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2S1A	.104	X
11	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2H2B	.398	3x10 <sup>9</sup>
12	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	2H4B	.374	9x10 <sup>7</sup>
13	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2S1C	.236	X
14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2S3BA	.230	X
15	<i>Pantoea ananatis</i>	2665	.163	3x10 <sup>7</sup>
16	<i>Pantoea stewartii</i>	2715	.700	7x10 <sup>7</sup>

\*El número 4 no se incluye pues corresponde a *B. cepacia*.

### Difusión en agar

Se muestra el número de pozo y la cepa colocada en él, la absorbancia y su equivalencia en ufc/ml.

	<b>Nombre</b>	<b>Cepa</b>	<b>Abs. (Å)</b>	<b>UFC/ML</b>
<b>1</b>	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	F1B	.970	1x10 <sup>9</sup>
<b>2</b>	<i>Pasteurella trehalosi</i>	F2A	.894	1x10 <sup>8</sup>
<b>3</b>	<i>Burkholderia gladioli</i>	H2CB	.824	3x10 <sup>8</sup>
<b>5</b>	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	H2F	1.057	6x10 <sup>7</sup>
<b>6</b>	<i>Pseudomonas luteola</i>	2S3B	.771	5x10 <sup>7</sup>
<b>7</b>	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	2S1B	.676	1x10 <sup>9</sup>
<b>8</b>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	TS2A	.404	4x10 <sup>7</sup>
<b>9</b>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	1h4b	.611	9x10 <sup>7</sup>
<b>10</b>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2S1A	.462	X
<b>11</b>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2H2B	.535	4x10 <sup>9</sup>
<b>12</b>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	2H4B	.822	1x10 <sup>8</sup>
<b>13</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	2S1C	.084	X
<b>14</b>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2S3BA	.362	X
<b>15</b>	<i>Pantoea ananatis</i>	2665	.626	1x10 <sup>8</sup>
<b>16</b>	<i>Pantoea stewartii</i>	2715	1.030	1x10 <sup>9</sup>

\*El número 4 no se incluye pues corresponde a *B. cepacia*.

### **MEDIO LIQUIDO LURIA BERTANI (LB)**

<b>Fórmula para 1000 ml</b>	
Peptona o triptona de caseína	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de Sodio	10.0 g
<b>pH final 7.2 ± 0.2</b>	

#### **Método de preparación.**

Suspender la peptona o triptona de caseína, el extracto de levadura y el cloruro de sodio en un litro de agua destilada, mezclar, vaciar en tubos de ensaye y esterilizar a 120° C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

### **MEDIO AGAR SOYA TRIPTICASEÍNA (TSA)**

<b>Fórmula para 1000 ml</b>	
Peptona de caseína	15.0g
Peptona de soya	5.0g
Cloruro de Sodio	5.0g
Agar	15.0g
<b>pH final 7.3 ± 0.2</b>	

#### **Método de preparación.**

Suspender 40g en un litro de agua destilada, mezclar y esterilizar a 120° C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45° C-50° C y vaciar en placas Petri estériles.