

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Actividad Bactericida de Filtrados Antagónicos de *Bacillus licheniformis* para  
Bacterias Fitopatógenas

**KARLA CRUZ ALDACO**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Actividad Bactericida de Filtrados Antagónicos de *Bacillus licheniformis* para  
Bacterias Fitopatógenas

Por:

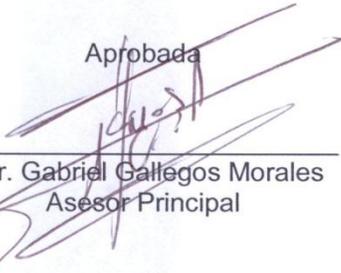
**KARLA CRUZ ALDACO**

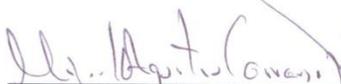
Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

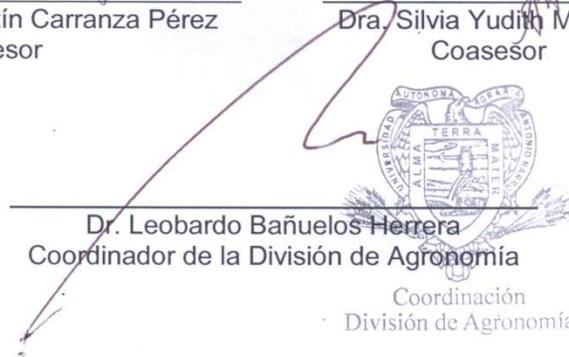
**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Aprobada

  
Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Asesor Principal

  
Biol. Miguel Agustín Carranza Pérez  
Coasesor

  
Dra. Silvia Yudit Martínez Amador  
Coasesor

  
Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía

  
Coordinación  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre 2012

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Gabriel Gallego Morales**, por darme la confianza para realizar el trabajo experimental, por ser un guía en el trabajo de laboratorio y de la revisión de tesis.

Al Biol. **Miguel Agustín Carranza Pérez**, por darse a la tarea de aceptar ser mi sinodal y contribuir en la revisión de este trabajo de tesis.

A la Dra. **Silvia Yudith Martínez Amador**, por darse a la tarea de aceptar ser mi sinodal y contribuir en la revisión de este trabajo de tesis.

A **Cristina Sánchez Flores**, por apoyarme en parte del trabajo de laboratorio, por darme la confianza en todo momento.

A M. C. **Laura María González**, por ser mi asesora durante la carrera y por apoyarme durante el periodo de prácticas profesionales.

A la empresa **Greencorp Biorganiks de México S.A. de C.V.**, y al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otórgame la beca a través del proyecto: “Selección y desarrollo de antagonistas microbianos para el control de bacterias fitopatógenas foliares en cultivos hortícolas”, con la clave del proyecto 109692.

## DEDICATORIA

A mis padres:

A ellos que siempre me han apoyado en el cumplimiento de mis objetivos y metas, ellos con lo que e compartido cada una de mis experiencias de vida.

Gracias papá Sergio Luis Cruz Esquivel por tu cariño, comprensión y amor en todo momento.

Gracias mama Ma. Del Carmen Aldaco Díaz por cuidarme siempre, por escucharme en todo momento, por tu cariño, amor y apoyo.

Por ser un gran ejemplo para mi, gracias a mi hermana Karina Cruz Aldaco por ser mi gran inspiración, admiración, apoyo en todo momento.

Gracias a mi hermanito Sergio Luis Cruz Aldaco por cuidarme en todo momento y por compartir juntos parte de nuestra infancia.

A Dios por haberme dado una gran familia y brindarme su apoyo en todo momento, por darme la esperanza de seguir y no desistir, por regalarme perseverancia y escucharme en mis momentos de alegría y tristeza, por ser un gran amigo para mí.

A mis amigos, Cristina Alejandra, Irasema, Gorety, Abihail Angélica, Anabel, Magda, Silverio, Daniel, Adrián, Salvado por ser parte de mi vida y apoyarme en todo momento, por sus consejos, por la confianza, por su cariño que me han brindado en todo momento, y sobre todo gracias por ser mis amigos.

## RESUMEN

El cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ocupa el segundo lugar en volumen de producción agrícola de importancia en México, con una cantidad de 1, 442, 107 millones de toneladas y con un rendimiento promedio de 44.776 T/ Ha (SAGARPA, 2012). Las bacterias fitopatógenas son responsables de grandes pérdidas económicas para cultivos tanto vegetales como frutales. *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* puede entrar a la planta a través de heridas y aberturas naturales como los estomas, puede infectar semillas y ser transmitida a las áreas libres por este mismo medio (Luo *et al.*, 2007). El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de cepas de *Bacillus* sp., y *Lactobacillus* spp., en bacterias fitopatógenas. Las pruebas obtenidas mostraron que la bacteria benéfica *B. licheniformis* tubo actividad microbiana contra las bacterias fitopatógenas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas* sp., durante la 24, 48 y 72 horas de cultivo a una dosis de 500 µl del sobrenadante (licor) libre de células, pero esta actividad se redujo o fue nula para la bacteria *Erwinia amylovora* durante las 48 y 72 horas del ensayo. El sobrenadante (licor) libre de células de *Lactobacillus* spp., mostraron actividad para inhibir *Xanthomonas* sp., en los bioensayos *in vitro* en placas Petri confrontando los discos impregnado con el preparado en la placa de crecimiento de la bacteria fitopatógena. Sin embargo este mismo preparado no mostro actividad al confrontarlo contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Ninguna de las dos cepas inhibió el crecimiento de *Erwinia amylovora*.

## ABSTRACT

The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) occupies the second place in agricultural production volume of importance in Mexico, with a quantity of 1, 442, 107 million tonne and with an average yield of 44,776 T/Ha (SAGARPA, 2012). The phytopathogenic bacteria are responsible for large economic losses for both vegetable crops such as fruit trees. *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* can enter the plant through wounds and natural openings such as stomata, can infect seeds to be transmitted to the free areas by this same means (Luo *et al.*, 2007). The general objective of this study was to evaluate the inhibitory effect of strains of *Bacillus* sp., and *Lactobacillus* spp., in phytopathogenic bacteria. The evidence showed that the beneficial bacteria *B. licheniformis* tube microbial activity against phytopathogenic bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Xanthomonas* sp., during the 24, 48 and 72 hours of culture at a dose of 500 µl of the supernatant (liquor) cell-free, but this activity was reduced or was zero for the bacterium *Erwinia amylovora* during the 48 and 72 hours of the test. The supernatant (liquor) free of cells of *Lactobacillus* spp., showed activity to inhibit *Xanthomonas* sp., in the bioassays *in vitro* in Petri dishes confronting discs impregnated with the prepared in the growth plate of the phytopathogen bacterium. However, this same preparation showed no activity to the showdown against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. None of the two strains inhibited the growth of *Erwinia amylovora*.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivo general .....	3
Objetivos específico.....	3
Hipótesis.....	3
ANTECEDENTES .....	4
Ecología y diseminación .....	4
Enfermedades bacterianas que afectan los cultivos de importancia económica .....	5
Género <i>Clavibacter</i> .....	10
Clasificación taxonómica <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	10
Distribución geográfica.....	11
Morfología.....	11
Etiología .....	11
Sintomatología .....	11
Género <i>Erwinia</i> .....	12
Clasificación taxonómica de <i>Erwinia amylovora</i> .....	13
Distribución geográfica.....	13
Sintomatología .....	13
Diseminación.....	14
Morfología.....	14
Impacto económico .....	14
Género <i>Xanthomonas</i> .....	15
Morfología.....	15
Clasificación Taxonómica de <i>Xanthomona</i> spp. ....	15
Control biológico.....	15
Bacterias benéficas .....	16
Género <i>Bacillus</i> .....	16
Importancia del género.....	17
Género <i>Lactobacillus</i> .....	17
Importancia de los <i>Lactobacillus</i> .....	18
Inhibición .....	18
Antagonismo.....	19
Antibiosis .....	20

Antibiótico .....	20
Bacteriocinas .....	21
MATERIAL Y METODOS .....	23
Ubicación del experimento.....	23
Material Biológico .....	23
Aislamiento de <i>Xanthomonas</i> sp.....	24
Propagación del antagonista <i>Bacillus licheniformis</i> .....	24
Obtención del sobrenadante (licor de fermentación) libre de células .....	24
Propagación de bacterias fitopatógenas .....	25
Preparación de la suspensión de la bacteria.....	25
Técnicas de bioensayo de actividad .....	25
<b>a) Prueba de impregnación de papel filtro</b> .....	25
<b>b) Técnica de dispersión en placa</b> .....	25
<b>c) Técnica de inhibición por estría</b> .....	26
Cualificación de la actividad microbiana .....	27
Caracterización e identificación de <i>Bacillus</i> spp.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Recolección de muestras para el aislamiento de la bacteria fitopatógena .....	28
Aislamiento de <i>B. licheniformis</i> .....	28
Purificación de bacterias fitopatógenas.....	29
Evaluación de la actividad de <i>Lactobacillus</i> spp., en bacterias fitopatógenas .....	29
Actividad antagonista de <i>Bacillus licheniformis</i> .....	30
Evaluación del sobrenadante de <i>B. licheniformis</i> en placa.....	33
Caracterización morfológica de <i>B. licheniformis</i> .....	36
Fisiología de la bacteria <i>B. licheniformis</i> .....	38
Caracterización bioquímica de <i>B. licheniformis</i> .....	38
CONCLUSIONES .....	41
LITERATURA CITADA.....	42
APÉNDICE DE MEDIO DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS .....	46

## CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Síntomas de enfermedades bacterianas que afectan a los diferentes cultivos de importancia económica en México.....	8
Tabla 2. Aplicación de tratamientos de licor de <i>B. licheniformis</i> para las bacterias fitopatógenas.....	26
Tabla 3. Análisis comparativo de las pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas del aislado BXB, <i>B. licheniformis</i> y <i>B. subtilis</i> .....	40

## CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Plantas del cultivo de tomate manifestando los síntomas de la mancha bacteriana .....	28
Figura 2. Placas con medio de cultivo King B para el cultivo de la bacteria <i>B. licheniformis</i> .....	28
Figura 3. Placas con medio de cultivo King B para el cultivo de bacterias fitopatógenas.....	29
Figura 4. Evaluación sobrenadante (licor) libre de células de <i>Lactobacillus</i> spp., impregnadas en discos de papel filtro sobre bacterias fitopatógenas.....	30
Figura 5. Actividad microbiana de <i>B. licheniformis</i> cultivado por 24 horas en caldo nutritivo contra las bacterias fitopatógenas.....	31
Figura 6. Actividad microbiana de <i>B. licheniformis</i> cultivado por 48 horas en caldo nutritivo contra las bacterias fitopatógenas.....	31
Figura 7. Actividad microbiana de <i>B. licheniformis</i> cultivado por 72 horas en caldo nutritivo contra las bacterias fitopatógenas.....	31
Figura 8. Bioensayos de actividad de <i>B. licheniformis</i> cultivado por 48 h contra la <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	32
Figura 9. Bioensayo de actividad <i>B. licheniformis</i> cultivado por 48 horas sobre <i>Xanthomonas</i> sp.....	32
Figura 10. Muestra de actividad <i>B. licheniformis</i> cultivado por 72 horas sobre <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> y <i>Xanthomonas</i> sp.....	33
Figura 11. Bioensayo de actividad de <i>B. licheniformis</i> contra las bacterias fitopatógenas.....	34
Figura 12. Bioensayo de la actividad de <i>B. licheniformis</i> en agar placas de cultivo contra las bacterias fitopatógenas.....	34
Figura 13. Tinciones diferenciales de <i>B. licheniformis</i> .....	37
Figura 14. Crecimiento de la bacteria <i>B. licheniformis</i> a diferentes temperaturas de incubación.....	37
Figura 15. Pruebas fisiológicas de <i>B. licheniformis</i> .....	38
Figura 16. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>B. licheniformis</i> (BxB).....	39

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ocupa el segundo lugar en volumen de producción agrícola de importancia en México, con una cantidad estimada de 1, 442, 107 millones de toneladas programadas a producir para el año 2012, con un rendimiento promedio de 44.776 T/ Ha (SAGARPA, 2012).

Para la región noreste de México este cultivo representa una alternativa agrícola bajo condiciones de agricultura protegida, debido a la poca disponibilidad de agua y a las temperaturas extremas que suelen llegar hasta de 48 °C en verano (Aspeytia *et al.*, 2010).

Las bacterias fitopatógenas son responsables de grandes pérdidas económicas para cultivos tanto vegetales como frutales. La mayor dificultad para el control de enfermedades vegetales causada por bacterias es encontrar un control efectivo. La protección de las plantas contra estos patógenos es el uso de productos base de derivados del cobre y antibióticos. Sin embargo estos compuestos son considerados contaminantes para el medio ambiente y generan resistencia en las bacterias fitopatógenas (Ferre *et al.*, 2006).

El cancro bacteriano es una de las principales limitantes en la producción de cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Flores *et al.*, 2009), el agente causal de esta enfermedad es una bacteria cuyo nombre científico es *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Smith 1910, Davis *et al.*, 1984). Esta es una de las enfermedades bacterianas más destructivas tanto en campo como en invernadero y de mayor dispersión mundial. La enfermedad fue observada inicialmente en 1909 en los Estados Unidos de América y hasta 1927 se creyó confinada al noreste de ese país (INIFAP, 2004).

La bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Smith 1910, Davis *et al.*, 1984), puede sobrevivir durante 2 o 3 años en restos de plantas que se encuentran en el suelo, y puede entrar a la planta a través de heridas y aberturas

naturales como los estomas. El patógeno puede infectar las semillas y también puede ser transmitido a las áreas libres por este mismo medio (Luo *et al.*, 2007).

Existe un grupo muy importante tanto de bacterias como de hongos que presentan efectos antagónicos contra otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como medio de control biológico de patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* (Fernández y Larrea, 2001).

A través de la producción de bacteriocinas o antibióticos, ciertos microorganismos afectan negativamente el desarrollo de fitopatógenos, limitando así la iniciación y propagación de la enfermedad (Ahmed *et al.*, 1999). Uno de estos géneros antagónicos es el género *Bacillus*, que inhibe de fitopatógenos de suelos y promueve el crecimiento de las plantas (Noja y Medina, 2010).

## **Objetivo general**

Evaluar el efecto inhibitorio de cepas de *Bacillus* sp., y *Lactobacillus* spp., en bacterias fitopatógenas.

## **Objetivos específico**

- ❖ Detección de la actividad biocida de licores o sobrenadantes de fermentación de *Lactobacillus* spp., y *Bacillus* sp., para bacterias fitopatógenas.
- ❖ Evaluar la actividad antagonista de *Bacillus licheniformis* para bacterias fitopatógenas.
- ❖ Identificación bioquímica y morfológica de *Bacillus licheniformis*.

## **Hipótesis**

Los licores o sobrenadantes de fermentación de *Lactobacillus* spp., y *Bacillus* sp., inhiben el crecimiento de las bacterias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia amylovora* y *Xanthomonas* sp.

## **Palabras claves**

Inhibición, antagonismo, antibiosis, bacteriocinas, antibióticos.

## ANTECEDENTES

Las bacterias fitopatógenas son microorganismos unicelulares con estructura tipo procariótico que causan enfermedades en las plantas. Actualmente existen unas 60 especies reconocidas que incluyen alrededor de 300 subespecies y patovares. La estructura celular de las bacterias fitopatógenas igual que la de otros procariotas se caracteriza por la falta de compartimentación intracelular en forma de orgánulos. La célula se compone de una envoltura o pared celular y una membrana que engloba el citoplasma. Este contiene un cromosoma único constituido de ADN bicatenario y circular que no está aislado del citoplasma por ningún tipo de membrana, y posee ribosomas de pequeño tamaño del tipo 70 S (Llácer *et al.*, 1996).

La morfología de las bacterias fitopatógenas corresponde esencialmente a formas alargadas o cilíndricas denominadas bacilos. Existen bacilos cortos denominados cocobacilos, o incluso muy largos que constituyen formas filamentosas.

La agrupación celular es también característica y es consecuencia generalmente de una separación incompleta tras la división celular. En los bacilos se observan células libres o bien unidas por los extremos formando cadenas.

Las bacterias fitopatógenas al igual que otras bacterias, son microorganismos unicelulares cuya ultraestructura no es observable, excepto algunas inclusiones, con el microscopio óptico.

### **Ecología y diseminación**

Las bacterias fitopatógenas en su mayoría son saprofitas facultativas, que se multiplican principalmente en su hospedero, pero tiene la habilidad de mantenerse como saprofitas en residuos de la planta o el suelo. Esto hace que en términos generales puedan sobrevivir en el suelo, mientras haya tejido del hospedero no compuesto o los factores abióticos no le sean adversos. Durante el proceso evolutivo de las bacterias fitopatógenas, estas han adoptado diversas formas de sobrevivencia y diseminación. Algunas sobreviven sobre o dentro de ella o en cualquier propágulo

asexual, en malezas que actúan como hospederos secundarios, plantas voluntarias, prácticamente pueden sobrevivir en tejidos vivos (material de siembra o lesiones viejas), como epifitos sobre la superficie de las plantas hospedantes y no hospedantes (superficie de la hoja, yemas y raíces), o dentro de insectos (Rivera, 2006 y Cavallini, 1998).

Muchas bacterias fitopatógenas pueden infectar las semillas y sobrevivir en ellas hasta la siembra. Mas de 50 bacterias fitopatógenas sobreviven en semillas, siendo esta la principal fuente del inoculo en el caso de bacterias foliares. A esto debe añadirse que un buen número de bacterias sobreviven en material vegetativo de siembra. Las yemas de las plantas constituyen un ambiente adecuado para la supervivencia de algunas bacterias, tal es el caso de las *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Cavallini, 1998).

### **Enfermedades bacterianas que afectan los cultivos de importancia económica**

Las plantas cultivadas tienen problemas parasitológicos causados por plagas, enfermedades y malezas. Estos daños varían de acuerdo con el año, lugar, cultivo y problema que se trate (De la Garza, 1996).

La mancha bacteriana es una de las enfermedades mas importantes en los cultivos de tomate y chile en el estado de Sinaloa, el agente causal de esta enfermedad es la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Dodgie) Dye, la cual se manifiesta en plantas adultas. Esta bacteria ocasiona grandes perdidas en la producción y los factores del clima, calor y humedad en la parte costera de México constituyen un ambiente ideal para la infección de hojas, peciolo, tallos y frutos (Fasio *et al.*, 2001).

La bacteriosis o tizón común del frijol causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye es una de las enfermedades más importantes en las áreas de producción de frijol, especialmente en las regiones tropical y subtropicales (Izquierdo *et al.*, 2001). Generalmente ataca al frijol en la etapa reproductiva en las siembras de temporal (Prudencio *et al.*, 2008).

La enfermedad conocida como marchitez bacteriana del maíz es causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Schuster, Hoff, Mendel y Lazar, 1975) Vidaver y Mendel, la cual es un bacteria limitante del cultivo, afectando especialmente a maíces dentados, híbridos de maíces dulces y palomeros (Labarrios *et al.*, 2004).

El tizón foliar de la cebolla es una enfermedad severa causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, que puede causar epidemias, la cual surgió en la década pasada en varias áreas productoras de cebolla, es una enfermedad que ocasiona que el tamaño del bulbo se reduzca provoca pérdidas importantes en el rendimiento del cultivo, en los estados de California y Colorado se han reportado pérdidas del 10 y 50 % respectivamente. Esta enfermedad también afecta al cultivo del ajo (Gent and Schwartz, 2005).

La bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* es causante de la marchitez bacteriana en diversos cultivos en regiones de clima tropical y subtropical, así como en algunos países de clima templado. La enfermedad afecta a varios cientos de especies vegetales distribuidas en más de cincuenta familias. Dentro de ellas se encuentran cultivos de importancia económica como papa (*Solanum tuberosum*, Sw.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), y Chile (*Capsicum annum*, L.) (Tejada, 2006).

En cultivos perennes a menudo las bacterias sobreviven en lesiones viejas como las *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causante del cranco de los cítricos y *Erwinia amylovora*, causante del tizón del fuego en el manzano (Cavallini, 1998).

La papa es un cultivo de hortalizas de mucha importancia; el tubérculo y el tallo frecuentemente pueden presentar pudrición blanda, oscura o ligeramente oscuras. Estos ataques se deben usualmente a la bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *artroseptica* que causa la enfermedad llamada pierna negra, mientras que *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* produce la pudrición blanda del tallo y/o tubérculo.

La calabaza, planta de mucha apreciación y especialmente su fruto, puede sufrir pudrición blanda causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y las hojas

pueden mostrar manchas necróticas y cloróticas producidas por *Pseudomonas syringae* (Rosales y Napoles, 1999).

El control de este patógeno se dificulta mucho debido a que se disemina a través del agua de riego, sobrevive en la maquinaria agrícola y en los restos de cosechas infestadas. Otra opción adoptada por los agricultores, en aras de prevenir la enfermedad, es la desinfección del material de trabajo con sustancias químicas, el tratamiento de aguas de riego con luz UV, y el de los cultivos con antibióticos y otras sustancias químicas (Pozo *et al.*, 2006).

Tabla 1. Síntomas de enfermedades bacterianas que afectan a los diferentes cultivos de importancia económica en México.

Agente causal	Enfermedad	Síntomas	Cultivo
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Mancha bacteriana	En el tomate, en las hojas de las plantas aparecen pequeñas manchas de casi 3 mm de diámetro, irregulares y de color gris púrpura, que presentan un halo amarillo estrecho con la parte central de color negro.	Tomate
		En el chile, las lesiones se presentan en las partes de la hoja (limbo y peciolo) y los frutos incluyendo el pedúnculo y el cáliz. Los tallos también son susceptibles, pero generalmente el follaje es infectado en mayor grado, a menudo causa desprendimiento de la inflorescencia.	Chile
<i>Pseudomonas corrugata</i>	Medula negra	Hinchazón y eclosión de los tallos, así como podredumbre negruzca.	Tomate
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Marchitamiento bacteriano	En el tomate, marchitamiento total de la planta sin amarilleo o moteado de las hojas. La medula tiene apariencia oscura y acuosa. La presencia de exudados. Los frutos no presentan manchas o motas como en otras enfermedades bacterianas.	Tomate
	Marchitez bacteriana de la papa	En la papa, se caracteriza por el desarrollo de marchitez parcial o generalizada y por la presencia de necrosis del tejido vascular (Xilema), la cual se evidencia al cortar longitudinalmente los tallos infectados. Es posible observar exudado blanco cremoso al comprimir los tallos. Aparece en la planta como un marchitamiento de las partes más tiernas. En las plantas infectadas pueden aparecer raíces adventicias. El sistema vascular en el tallo de una planta joven enferma se observa de un color amarillento o café claro. Esto se convierte posteriormente en un café oscuro de acuerdo al progreso de la enfermedad. Una invasión masiva en la corteza del tallo puede dar la apariencia de lesiones húmedas sobre la superficie externa del tallo.	Papa
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	Pierna negra	En invierno, las plantas afectadas al inicio de su desarrollo quedan en pequeño tamaño, las hojas suelen estar cloróticas y enrolladas y las plantas se pueden marchitarse y hasta llegan a morir. Las hojas y los tallos también pueden ser afectados a través de heridas o cicatrices foliares y a partir de ellos puede descender la infección hasta el cuello, provocando coloración oscura y podredumbre blanda de los tejidos.	Papa

<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Podredumbre blanda	Pero en meses mas cálidos de primavera y verano, las plantas afectadas al inicio de su desarrollo quedan en pequeño tamaño, las hojas suelen estar cloróticas y enrolladas y las plantas se pueden marchitarse y hasta llegan a morir. Las hojas y los tallos también pueden ser afectados a través de heridas o cicatrices foliares y a partir de ellos puede descender la infección hasta el cuello, provocando coloración oscura y podredumbre blanda de los tejidos.	Papa
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	Tizón foliar	Los síntomas de la enfermedad son variados e incluyen manchas acuosas lenticulares, que se alargan en bandas cloróticas, muerte regresiva, retraso en el crecimiento de la planta, reducción del tamaño del bulbo y muerte de la planta.	Cebolla Ajo
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Marchitez sistémica	Se distingue porque los vasos son afectados y también suelen observarse manchas en la hoja.	Cebolla
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Bacteriosis o tizón común	Manchas foliares necróticas irregulares, rodeadas por un delgado halo amarillento, que se desarrollan en el borde o en diferentes áreas de la lámina foliar. En las vainas y semillas son pequeñas manchas rojizas irregulares, con exudados amarillos.	Frijol
<i>Clavibacter michiganensis</i> pv. <i>nebraskensis</i>	Marchitez bacteriana	Puntos de color verde oscuro o negruzco a lo largo de las venas de las hojas infectadas, las cuales a menudo se unen y pueden causar la muerte de grandes porciones de las hojas infectadas.	Maíz
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Pudrición blanda	Las plantas afectadas permanecen marchitas durante varios días. Los tallos afectados presentan una apariencia acuosa y mucosa debido al crecimiento bacteriano. Puede detectar el tallo hueco presionando ligeramente el tallo entre los dedos.	Calabacita
<i>Pseudomonas syringae</i>	Mancha foliar angular	Manzano, son la necrosis pustulosa del fruto y de la corteza de las ramas, y necrosis de las yemas en periodo de dormancia.	Manzano
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Mancha angular de la hoja	Calabacita, manchas foliares se hallan rodeadas de un halo amarillo. Causa lesiones foliares angulares y machado de fruto (mucus blancuzco), pequeñas manchas acuosas en las hojas que se van expandiendo y su crecimiento se limita por las venas de las hojas, en tallos y peciolo aparecen lesiones hidrópicas cubiertas a veces con exudados blancos.	Calabacita

## **Género *Clavibacter***

Comprende a las bacterias fitopatógenas más importantes que originalmente fueron clasificadas bajo el género *Corynebacterium*, son bacilos pleomórficos, no móviles que con frecuencia se ordenan en agregaciones en forma de V., y son organismos aerobios obligados. Su proporción de DNA (G + C) es de  $70 \pm 5\%$  mol. Algunas de sus especies son fastidiosas, están limitadas al xilema y crecen lentamente y sólo en medios de cultivo especializados. Unas cuantas especies fitopatógenas del género original *Corynebacterium*., aún se incluyen dentro de este género, pero se cree que también que sean clasificadas en otros géneros (Agrios, 2008).

### **Clasificación taxonómica *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Reino-----Procarionte

Filo-----Actinobacteria

Orden-----Actinomycetales

Suborden-----Micrococccinae

Familia-----Microbacteriaceae

Género-----*Clavibacter*

Especie-----*michiganensis*

(Staley *et al.*, 2005).

### **Distribución geográfica**

La bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* provoca síntomas, conocidos como cancro bacteriano, ampliamente distribuida en Estados Unidos de América, Canadá, Europa, Australia, Nueva Zelanda (incluyen recientemente Rodesia, Kenia y Suráfrica) China, Sudamérica y prácticamente en todo el mundo (Rodríguez *et al.*, 2001).

### **Morfología**

Esta bacteria es un bacilo Gram positivo, no móvil, aeróbico, productor de cápsula, que en agar nutritivo desarrolla colonias de color amarillo claro a naranja, mucosoide, una temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de 25 a 28 °C (Flores *et al.*, 2009).

### **Etiología**

Desde el primer informe de la enfermedad causada por *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en los EE. U.U., el cancro bacteriano se ha dispersado en el mundo y ha causado pérdidas serias a las cosechas de tomate de invernadero y de campo, infectando plantas jóvenes y reduciendo la producción comercial.

A pesar de que la enfermedad se consideraba confinada en los estados del noroeste de los E. U., en Sinaloa, México se ha detectado el cancro bacteriano en el Valle de Culiacán, y de 1994 a 1996 se extendió rápidamente y en las principales áreas hortícolas de exportación de Jalisco, San Luis Potosí, Baja California Sur y Baja California Norte (Flores, *et al.*, 2009).

### **Sintomatología**

La bacteriosis ocasionada por *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (sin. *Corybacterium michiganensis*) es conocida como “Cancro bacteriano”. El nombre común de la enfermedad responde a uno de los síntomas poco comunes: necrosis y estallamiento del tallo con aparición de esbozos radiculares en los bordes de la abertura. En realidad, lo más común es encontrar una flacidez de proporciones interna de los folíolos que rápidamente se deseca. En el interior de los tallos se aprecia un amarillamiento de los tejidos medulares en

contacto con los vasos; tejidos que comienzan a pardear rápidamente. Estos síntomas sistémicos pueden no ser únicos. Pequeñas pústulas grises o negras sobre las hojas, tallos y frutos pueden hacerse patentes como consecuencia de penetraciones bacterianas por estomas y/o heridas.

La enfermedad se desarrolla con rapidez a temperaturas comprendidas de entre 18 y 24°C. El patógeno puede ser transportado por las semillas y quizás esta vía explicaría su rápida propagación a las distintas áreas tomateras del mundo (Nuez *et al.*, 2001).

### **Género *Erwinia***

Se creó inicialmente para agrupar a las enterobacterias asociadas a las plantas, Gram negativas, bacilares, no formadoras de esporas y móviles. Además, se incluyeron miembros que en casos muy concretos pueden estar asociados también al hombre y a los animales (Ordax, 2008).

Algunas especies de *Erwinia* no producen enzimas pécticas y causan marchitamientos o manchas necróticas (como el grupo "*amylovora*"), mientras que otras presentan una notable actividad pectinolítica y causan pudriciones blandas en las plantas (como el grupo "*carotovora*") (Agrios, 2008).

*Erwinia amylovora*: El tizón de fuego de las rosáceas es una de las enfermedades mas graves que pueden afectar a los frutales como el manzano y el peral, así como numerosos ornamentales silvestres. Esta bacteriosis es económicamente muy importante, tanto por la gravedad de los daños directos que causa en muy distintas zonas, como por su enorme facilidad de diseminación y la carencia de medios eficaces de control.

## Clasificación taxonómica de *Erwinia amylovora*

Reino-----Procarionte

Filo-----Proteobacteria

Clase-----Proteobacteria

Orden-----Enterobacteriales

Familia-----Enterobacteriaceae

Género-----*Erwinia*

Especie -----*amylovora*

(Staley *et al.*, 2005).

### Distribución geográfica

La bacteria *Erwinia amylovora* esta presente en la mayoría de los países del centro y norte de Europa, identificándose sucesivamente en Gran Bretaña, Polonia, Dinamarca, Holanda, Francia, Bélgica, Alemania, Suecia, Noruega y Suiza. *E. amylovora* esta también presente en otros países como Estados Unidos, Canadá, México, Nueva Zelanda y Egipto (Llácer *et al.*, 1996).

### Sintomatología

El síntoma más característico de esta bacteriosis es el aspecto quemado de las hojas de las plantas afectadas, que da nombre a la enfermedad.

Los primeros síntomas de ataque del fuego bacteriano aparecen generalmente en primavera, durante la floración, ya que en casi todas las especies las flores son los órganos principalmente afectados, seguidas de los brotes jóvenes. En las variedades con floraciones secundarias en verano y otoño, estas serán también atacadas si se dan con las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad.

El primer síntoma característico es el ennegrecimiento de una o varias flores del corimbo, que suele comenzar en los nectarios. La enfermedad progresa hasta el pedúnculo floral que se oscurece externamente y se marchita sin caer, tomando un aspecto húmedo y finalmente negruzco en el peral, pardo en manzano, llega rápidamente a través del pedúnculo a las hojas de la base y avanza hasta las ramas secundarias y principales (Llácer *et al.*, 1996).

### **Diseminación**

El tizón fuego es una de las enfermedades que históricamente ha demostrado mayor capacidad de diseminación a cortas y largas distancias. El viento la lluvia y especialmente distintos insectos (abejas, distintas especies de pulgones, moscas, hormigas, etc.) pueden transportar muy eficazmente bacterias viables a pocos kilómetros. A más largas distancias la diseminación tiene lugar mediante el material vegetal con síntomas, o con infecciones latentes o con bacterias epifitas o endófitas, los frutos y sus embalajes, las herramientas y posiblemente por los pájaros migratorios.

### **Morfología**

Es una bacteria en forma de bacilo, Gram negativo, con dimensiones de 1.1-1.6 x 0.6-0.9 $\mu$ m, que posee flagelos peritricos y que no produce enzimas pectolíticas ni pigmentos amarillos (Agrios, 2008).

### **Impacto económico**

Las pérdidas ocasionadas por este patógeno ascendieron a 300 millones de pesos durante la epidemia de 1999 en Chihuahua y a 42 millones de dólares en el estado de Michigan durante el año 2000. El esquema de manejo convencional por productores de manzana en México y otros países, es la aspersión de antibióticos basada en el pronóstico de la infección con un análisis de variables de clima durante el estadio de floración (Ramírez *et al.*, 2009).

## **Género *Xanthomonas***

### **Morfología**

Bastones rectos, con dimensiones de 0.4 a 1.0 x 1.2 a 3 µm. Se desplazan por medio de un flagelo polar. Cuando se desarrolla en un medio de agar a menudo son de color amarillo, pero pocas color blancas a crema. La mayoría de ellas crecen muy lentamente. Todas las especies son fitopatógenas y se encuentran sólo en asociación con plantas o con órganos de éstas (Rodríguez *et al.*, 2001).

El género *Xanthomonas* producen polisacáridos tóxicos que producen una cubierta mucilaginosa de la célula, estos pueden desprenderse de la célula y depositarse en sistema vascular del hospedante produciéndole marchitamiento (De la Garza, 1996).

### **Clasificación Taxonómica de *Xanthomona* spp.**

Reino -----Procarionte

Filo-----Proteobacteria

Clase-----Proteobacteria

Orden-----Xanthomonadales

Familia-----Xanthomonadaceae

Género -----*Xanthomonas*

(Staley *et al.*, 2005).

### **Control biológico**

El control biológico es el uso de un organismo (o de sus metabolitos o subproductos) enemigo naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos. De manera similar al uso de bacterias benéficas (como los *Lactoabacillus*) para preservar alimentos o prevenir infecciones gastrointestinales, el control biológico de patógenos ha sido

utilizado en la agricultura de manera empírica desde sus inicios. La razón principal por la cual muchos productos agrícolas no son destruidos completamente por las plagas y las enfermedades es la presencia natural de agentes de control biológico: organismos capaces de antagonizar con las plagas o patógenos, reduciendo sus efectos nocivos. El desarrollo y la aplicación de este potencial cobra cada vez mayor importancia, y seguramente tendrá un gran impacto en la agricultura en el futuro cercano (Janisiewicz y Korsten, 2002). Para que un organismo sea un buen controlador debe poseer alta movilidad, alta capacidad reproductiva y estar adaptado a las condiciones ambientales del medio donde ha de ser liberado.

### **Bacterias benéficas**

La filosfera y rizosfera son áreas de actividad microbiana potencialmente fuertes, y muchos organismos se encuentran en estas áreas ecológicas, como las bacterias, son útiles para el biocontrol de hongos que causan enfermedades en las plantas. El biocontrol de patógenos es más exitoso en la rizosfera que en la filosfera. Los microorganismos que crecen en la rizosfera son ideales como agentes de biocontrol, desde esta región proveen una línea de defensa. El éxito de las bacterias como agentes de biocontrol depende de sus habilidades de competencia *in situ* con la microflora que se encuentra en las raíces de las plantas contra patógenos, expresando sus genes de control (Luna *et al.*, 2007).

### **Género *Bacillus***

Familia *Bacillaceae*, contiene bacilos Gram positivos, formadores de endosporas, quimioheterotrofos, normalmente móviles y rodeados de flagelos peritricos, aerobio, y puede ser facultativo, catalasa positiva. Muchas especies de *Bacillus* producen antibióticos, por ejemplo bacitracina, gramicidina y polimixina, mientras que *B. cereus* causan algunas formas de intoxicación alimentaria y pueden infectar a los seres humanos. *B. anthracis* es el agente productor del carbunco, que puede afectar tanto a los animales como al hombre, además varias especies se emplean como insecticidas, tal es el caso *B. thuringensis* y *B. sphaericus* que durante el proceso de formación de endosporas, sintetizan un cristal proteico sólido,

denominado el cuerpo paraesporal, que contiene toxinas proteicas letales que tras disolverse en el contenido intestinal alcalino de las larvas de insecto son capaces de destruir el epitelio intestinal de mas de 100 especies de plagas. Las toxinas proteicas solubilizadas se activan por las proteasas del intestino medio y se generan pequeños polipéptidos tóxicos capaces de unirse a las células epiteliales. El contenido intestinal alcalino escapa a la sangre, causando parálisis y muerte. Una de estas toxinas forma poros en la membrana plasmática. La mayoría de los genes que codifican para las toxinas de *B. thuringensis* se encuentran en plásmidos de gran tamaño (Prescott *et al.*, 2002).

### **Importancia del género**

Las especies del género *Bacillus* poseen características especiales que los hacen buenos candidatos como agentes de control biológico. Su utilización para el biocontrol de las enfermedades de las plantas es de gran interés, debido a la capacidad que presentan para producir antibióticos y otras sustancias con capacidad antibacteriana y antifúngica que impiden el establecimiento de patógenos vegetales. Entre las especies más utilizadas con este propósito se encuentran: *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. pumillus*.

El rápido crecimiento que muestran estas bacterias en cultivo líquido, la formación de endosporas resistentes al calor y la desecación, y la producción de metabolitos secundarios son características que permiten considerar a estos microorganismos como potenciales agentes de control biológico (Pozo *et al.*, 2006).

### **Género *Lactobacillus***

Contiene bacilos no esporulados y a veces cocobacilos habitualmente facultativos o microaerófilos, carecen de catalasa y citocromos, producen ácido láctico como principal o único producto de fermentación, y presentan requerimientos nutricionales complejos. Los *Lactobacillus* realizan la fermentación homoláctica a través de la vía de Embden- Meyerhof o una fermentación heteroláctica por la vía de las pentosas fosforo (ED). Crecen de forma óptima en condiciones ligeras de acidez, a un pH de entre 4.5 y 6.4. Normalmente, se encuentra sobre las superficies de las

plantas y en productos lácteos, la carne, aguas residuales, cerveza, frutas y muchos otros materiales. Los lactobacilos son también parte de la microbiota normal del cuerpo humano, de la boca, el tracto digestivo y la vagina y en general no son patógenos (Prescott *et al.*, 2002).

### **Importancia de los *Lactobacillus***

Es indispensable para la industria alimentaria y láctea, se emplean para producir alimentos fermentados (encurtidos y ensilaje), bebidas (cerveza, vinos, zumos), masa, queso suizo y otros quesos duros, yogur, y embutidos.

El yogur es probablemente el producto de leche fermentada más popular en el mundo occidental y se produce industrialmente y familiarmente. En la producción industrial, se pasteuriza la leche desnatada o semidesnatada, se enfría hasta los 43°C aproximadamente, y se inocula con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. El *Streptococcus thermophilus* crece más rápidamente al inicio y hace que la leche quede anaerobia y ligeramente ácida, y *L. bulgaricus* acidifica todavía más la leche.

Los *Lactobacillus* son responsables de que se deteriore la cerveza, la leche y la carne, degrada por que los productos finales de su metabolismo producen sabores y olores desagradables (Prescott *et al.*, 2002).

### **Inhibición**

La capacidad que tienen muchos miembros del género *Lactobacillus* para inhibir bacterias indeseables tiene importantes aplicaciones en la industria alimentaria y en la selección de cultivos con fines probióticos.

La utilidad de especies de *Lactobacillus* en la industria alimentaria es invaluable porque aparte de conferir características organolépticas deseables a los productos fermentados, aseguran la estabilidad y seguridad de estos alimentos debido a la producción de metabolitos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, acetaldehído y bacteriocinas que ejercen efecto antagónico contra

bacterias Indeseables (*Salmonella entiritidis*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*) (Alvarado *et al.*, 2009).

## **Antagonismo**

El antagonismo es la relación entre dos especies opuestas de organismos, en la cual un organismo afecta la vida del otro, inhibiendo parcialmente o totalmente crecimiento o hasta matarlo. Los mecanismo de antagonismo se observan en la naturaleza, son la competencia, antibiosis, predación e hiperparasitismo (Luna *et al.*, 2007).

Los organismos que influyen en la sanidad de las plantas se conocen como agentes de biocontrol, biocontroladores, antagonistas u organismos antagónicos; tal fenómeno se conoce como control biológico o biocontrol. El uso de organismos naturales modificados, genes o productos de genes para reducir los efectos de organismos indeseables y favorecer organismos deseables, como cultivos, árboles y microorganismos e insectos benéficos es denominado control biológico (Cerrato y Alarcón, 2007).

Se ha observado que numerosas clases de microorganismos antagónicos prosperan en suelos supresores; sin embargo, también se ha observado con más frecuencia que la supresión tanto del patógeno como de la enfermedad se debe a hongos como *Trichoderma*, *Penicillium* y *Sporodesmium* o bien a bacterias de los géneros *Pseudomonas*, y *Bacillus* (Agrios, 2008).

Las bacterias del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces. Dada la diversidad genética en el género *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizosfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces.

## **Antibiosis**

La antibiosis se considera como uno de los principales mecanismos de control biológico que tiene como base la producción de metabolitos tipo antibióticos. Esto se define como “un grupo químicamente heterogéneo y de bajo peso molecular, secretado por algunos microorganismos que, en baja concentraciones, demeritan el crecimiento o actividades metabólicas de otros organismos”.

El efecto de antibiosis sobre patógenos manifiesta principalmente como inhibición de la esporulación, reducción de crecimiento micelial, alteración en la actividad metabólica bacteriana, retardación en la germinación de esporas, inhibición de la melanización, germanización y supervivencia de esclerocios (Cerrato y Alarcón, 2007).

## **Antibiótico**

Patiño (2003) los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias y hongos), sintetizados por métodos de laboratorio, cuya función es inhibir el crecimiento o destruir otros microorganismos.

El término antibiótico fue propuesto para definir sustancias dotadas de actividad antimicrobiana y extraída de estructuras orgánicas vivientes.

La acción de un antibiótico se mide en términos de espectro bacteriano, se observa que algunos antibióticos actúan en un sector restringido (en un grupo selecto de microorganismos, por esta razón se le denomina espectro limitado. Otros antibióticos lo hacen en varios grupos de microorganismos por eso se les denomina amplio espectro. Algunos antibióticos actúan en un sector muy limitado (en un solo grupo de microorganismos) a estas drogas se les llama de espectro selectivo.

La pared de las bacterias esta constituida por una molécula denominada peptidoglicano, cuya síntesis se divide en tres etapas principales, cada una de estas es inhibida por un grupo de antibióticos diferentes, los antibióticos que ejercen su función a través de la membrana celular y efectúan su permeabilidad: la membrana citoplasmática es fundamental para la regulación del medio intracelular de la bacteria

y puede lesionarse por algunos productos de esta forma se obtiene una actividad antimicrobiana selectiva.

El género *Bacillus* ha recibido menos atención que las *Pseudomonas* como agentes potenciales de control biológico, a pesar de que existen evidencias que indican su efectividad en la supresión de enfermedades. Las bacterias del género *Bacillus* son particularmente atractivas por su producción estable de endosporas, cuya supervivencia es alta en condiciones de calor y desecación (Cerrato y Alarcón, 2007).

### **Bacteriocinas**

Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos, se ha observado que algunas de estas moléculas poseen mayor actividad que los péptidos antimicrobianos producidos por los eucariotas.

Las bacteriocinas son sintetizadas por la gran mayoría de los grupos bacterianos, se ha propuesto que el 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina, ya que éstas se han encontrado en la mayoría de las especies examinadas que abarcan los grupos de bacterias Gram positivas, Gram negativas y también en las Arqueas. Estas moléculas han sido utilizadas como una importante herramienta en estudios evolutivos y ecológicos.

Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas representan un grupo heterogéneo de péptidos antimicrobianos; sin embargo, sólo se han constituido dos principales categorías con base en sus modificaciones estructurales, su tamaño, su termoestabilidad y sus mecanismos de acción. La constituyen péptidos catiónicos de 19 a 38 residuos de aminoácidos, los cuales sufren modificaciones postraduccionales y ejercen su efecto a nivel de la membrana y la pared celular. Las modificaciones postraduccionales que se les realizan son diversas, las más importantes involucran reacciones de deshidratación de residuos de serina y treonina, lo que da lugar a la

formación de dehidroalanina (DHA) y dehidrobutirina (DHB), respectivamente (López *et al.*, 2008).

Este trabajo se llevo a cabo con la finalidad de evaluar material bacteriano producto del crecimiento de *Bacillus sp.*, y *Lactobacillus sp.*, que pudiera tener aspecto antagónico debido a la producción de bacteriocinas, antibióticos, u otras sustancias sobre bacterias fitopatógenas, como estrategia para el desarrollo de material técnico para el control biológico de fitopatógenos.

## MATERIAL Y METODOS

### Ubicación del experimento

El experimento se llevo a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología, en Buenavista Saltillo Coahuila. El trabajo experimental consistió en evaluar los sobrenadantes de la fermentación del producto del crecimiento de *Lactobacillus spp.*, de la empresa Greencorp Biorganiks de México y de la bacteria *Bacillus licheniformis* aislada para el presente trabajo, como bacteria antagonista productora de sustancias bioactivas contra bacteria fitopatógenas. La evaluación se realizó mediante distintos procedimientos técnicos confrontando al patógeno contra el sobrenadante libre de células y cualificando los niveles de inhibición.

### Material Biológico

Las cepas de bacterias fitopatógenas del tipo *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* y *Erwinia amylovora*, fueron utilizadas en los bioensayos experimentales de actividad, siendo cultivadas en el medio de cultivo King B. Estas cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

La bacteria antagonista *Bacillus licheniformis*, fue recuperada como contaminante de una placa Petri con cultivo de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* observándose a simple vista la inhibición de esta.

El licor de fermentación (sobrenadante) de *Lactobacillus spp.*, fue proporcionado por la empresa Greencorp Biorganiks de México S.A. de C.V., como un producto inhibitorio con bacteriocinas para inhibir fitopatógenos en pruebas de laboratorio.

### **Aislamiento de *Xanthomonas* sp.**

Se colectaron muestras de material vegetativo (hojas y tallos) del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) del área del bajío de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, colocando en bolsas plásticas de primer uso para su traslado al laboratorio.

El material fresco (hojas, tallos, y frutos) fue lavado con agua y jabón para eliminar los residuos de tierra u organismos que se puedan encontrar del medio ambiente a los que se encuentra expuesto el material, posteriormente se cortó con una bisturí estéril de disección cada muestra y se colocaron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% con agua destilada estéril, durante 2 minutos, posteriormente se utilizaron pinzas para colocar las muestras en agua estéril para quitar los residuos del hipoclorito de sodio (esto se repitió 5 veces). Después de un proceso de secado, las muestras, se colocaron en cajas Petri con Agar Nutritivo (AN). También se presiono el tallo o peciolo tratando de extraer una gota del interior y colocándola sobre el agar, se incubo a 30 °C por 36 horas aproximadamente. La colonia con crecimiento característico, se purificaron en el mismo medio y se mantuvieron en refrigeración para su uso en la identificación.

### **Propagación del antagonista *Bacillus licheniformis***

Se prepararon 100 ml de caldo King B (KB) en matraces de 500 ml, esterilizándose en autoclave por 15 minutos a 121 °C, y se inocularon con la bacteria *B. licheniformis*, los matraces se colocaron en agitación rotatoria a 160 rpm durante 24, 48 y 72 horas para su crecimiento y su evaluación de actividad inhibitoria.

### **Obtención del sobrenadante (licor de fermentación) libre de células**

Los sobrenadantes libres de células, se obtuvieron centrifugando a 6000 rpm durante 15 minutos a 5 °C de temperatura, dejando la pastilla de células al final del tubo de centrifugación y recuperando el sobrenadante que se esterilizó mediante filtros Millipore de 0.22  $\mu$  de diámetro de poro para finalmente obtener el sobrenadante libre de células (licor) de *B. licheniformis*.

## **Propagación de bacterias fitopatógenas**

Para la propagación de bacterias fitopatógenas, se utilizaron cajas Petri con medio de cultivo King B, y resembradas con las bacterias en condiciones asépticas, incubadas a 37°C, por 36 a 48 h. Posteriormente a su crecimiento y se refrigeraron para tener disponible el material biológico.

## **Preparación de la suspensión de la bacteria**

Se preparó una suspensión de cada una de las bacterias fitopatógenas en tubos de ensayo con agua destilada estéril, a partir de placas de cultivo y con asa bacteriológica, las bacterias concentradas se diluyendo hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml aproximadamente.

## **Técnicas de bioensayo de actividad**

### **a) Prueba de impregnación de papel filtro**

Discos papel filtro whatman 1, fueron maquilados con una perforadora de papel de secretaria, posteriormente fueron esterilizados, y colocados en una caja Petri estéril vacía donde se impregnaron con 500 µl de licor o sobrenadante del producto de *Lactobacillus* spp.

### **b) Técnica de dispersión en placa**

En una prueba complementaria se agregó una concentración de 500 µl del licor de *B. licheniformis* al agar y se difundió en el medio, se dejó en reposo por 24 horas se impregno el licor, para después agregar las suspensión de las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas* sp., *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en una concentración de 500 µl por caja y por separado, se difundió la bacteria por medio de un varilla de vidrio en condiciones asépticas, se incubaron a temperatura ambiente durante 72 horas.

El experimento fue también incubado en las siguientes diluciones para el producto de *B. licheniformis*:

Tabla 2. Aplicación de tratamientos de licor de *B. licheniformis* para las bacterias fitopatógenas.

<b>Tratamientos</b>	<b>Dosis</b>
T1. Licor de <i>B. licheniformis</i> + Agua destilada estéril	50 µl/450 µl
T2. Licor de <i>B. licheniformis</i> + Agua destilada estéril	125 µl/325 µl
T3. Licor de <i>B. licheniformis</i> + Agua destilada estéril.	250µl/250µl
T4. Testigo absoluto	--

### **c) Técnica de inhibición por estría**

Esta técnica se empelo para evaluar el licor o el sobrenadante de *B. licheniformis*; para ello el licor fue mezclado o añadido al medio de cultivo KB para crecimiento de las bacterias fitopatógenas y para su evaluación mediante dos procedimientos; el primero consistió en mezclar el medio KB estéril con 750 µl del sobrenadante de *B. licheniformis* antes de que este solidificara, se dejo en reposo por 24 horas y posteriormente se sembró por estría con la bacteria fitopatógenas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia amylovora* y *Xanthomonas* sp., para observar inhibición. El segundo procedimiento consistió en agregar 500 µl del sobrenadante asépticamente sobre el medio KB, extendiéndolo sobre el medio a través de una varilla de vidrio, dejar en absorción y secado por 24 horas y dividiendo la placa en cuatro (C4) cuadrantes, se sembró en cada cuadrante una especie de bacteria con una como testigo sin inocular, se incubo a temperatura ambiente y se observo a las 24, 48 y 72 horas el crecimiento o inhibición.

## **Cualificación de la actividad microbiana**

La cualificación de la actividad de la bacteria *B. licheniformis* se midió por observación de acuerdo a la capacidad de inhibir (halo de inhibición) a las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas sp.*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Erwinia amylovora*, durante el experimento se probaron diferentes dosis para corroborar la actividad microbiana de la bacteria, así como también de *Lactobacillus* spp.

## **Caracterización e identificación de *Bacillus* spp.**

La cepa de *B. licheniformis* fue identificada a nivel de especie mediante pruebas morfológicas y bioquímicas citados por los manuales incluyen:

Tinción de Gram (Prescott *et al.*, 2002), Tinción de flagelos (Heimbrook *et al.*, 1989), Tinción de esporas (Gerard *et al.*, 2007), catalasa (Cowan & Steel's, 1993), oxidasa (Kovacs, 1956), rya, crecimiento en dextrosa Sabouraud, reducción de nitratos (NO<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub>) (Stanier *et al.*, 1966), hidrolisis de almidón (Cowan & Steel's, 1993), oxido/fermentación (Hugh and Leifson, 1953), indol (Tryptofano 0.01%), crecimiento en pH 5.7, crecimiento en cloruro de sodio al 2%, 5% y al 7%, ácido xilosa, citrato (Simmons), hidrolisis de esculina (Cowan & Steel's, 1993), crecimiento a temperaturas de 45°C, 50°C y 55°C (Schaad *et al.*, 2001 y Lelliott & Stead, 1987).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Recolección de muestras para el aislamiento de la bacteria fitopatógena

Se detectó la presencia de *Xanthomonas* sp., en el cultivo del tomate en una parcela experimental del campo en el Bajío de la Universidad. Las plantas presentaron síntomas: de hojas con lesiones oscuras pequeñas con halo clorótico, causan en los frutos manchas negras, pequeñas, acuosas, con superficie áspera y escamosa (Productores de Hortalizas, 2006), como en las figuras 1 a – 1 b.



Figura 1. Plantas del cultivo de tomate manifestando los síntomas de la mancha bacteriana., a) hoja clorótica, b) planta con el síntoma.

### Aislamiento de *B. licheniformis*

A partir de una placa de cultivo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se recuperó y purifico un bacilo esporulado antagónico (Fig. 2 a ) el cual fue purificado por resiembra por estría en el medio de cultivo KB, tal y como se observa en la figura 2 b.

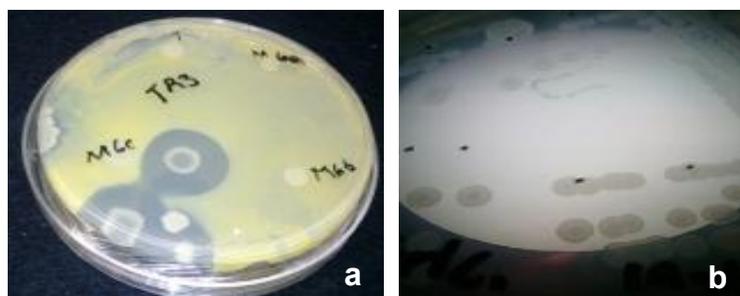


Figura 2. Placas con medio de cultivo King B para el cultivo de la bacteria *B. licheniformis*., a) *B. licheniformis* como contaminante en el tamiz de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*., b) *B. licheniformis*.

## Purificación de bacterias fitopatógenas

Las bacterias fitopatógenas fueron purificadas para su evaluación en medio de cultivo King B., en la figura 3 se muestran placas puras de; *Xanthomonas* sp, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Erwinia amylovora*.

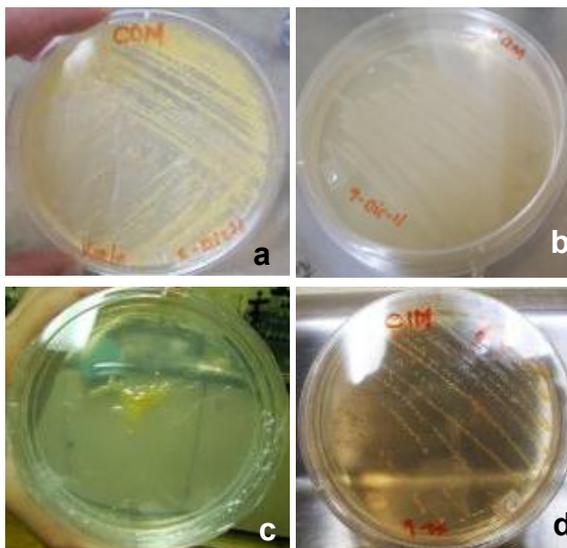


Figura 3. Placas con medio de cultivo King B para el cultivo de bacterias fitopatógenas., a) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*., b) *Erwinia amylovora*, c) aislamiento de *Xanthomonas* sp., d) *Xanthomonas* sp.

## Evaluación de la actividad de *Lactobacillus* spp., en bacterias fitopatógenas

Discos de papel filtro Whatman 1 impregnados y secados con el sobrenadante (licor) libre de células de *Lactobacillus* spp., mostraron actividad para inhibir *Xanthomonas* sp., (Fig. 4. a) en los bioensayos *in vitro* en placas petri confrontando los discos impregnado con el preparado en la placa de crecimiento de la bacteria fitopatógena. Sin embargo este mismo preparado no mostro actividad al confrontarlo contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Fig. 4. b) en un idéntico procedimiento. La observación del bioensayo permitió apreciar un halo de inhibición para *Xanthomonas* de 18 mm, lo cual muestra un alto grado de inhibición considerando que el preparado tipo formulación se realizó con base en mezcla de sobrenadantes de fermentación de crecimiento de la bacteria antagonica, lo que muestra buenas perspectivas para su empleo (Figura 3).

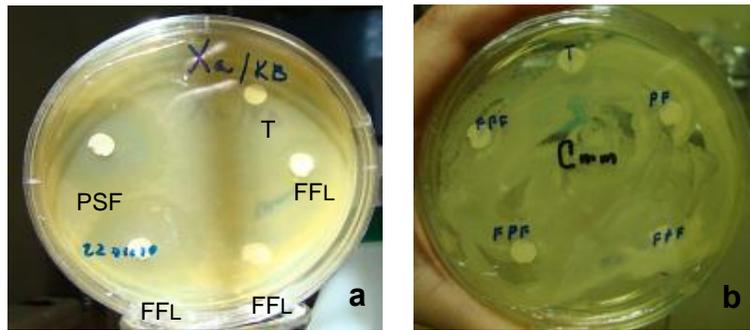


Figura 4. Evaluación sobrenadante (licor) libre de células de *Lactobacillus* spp., impregnadas en discos de papel filtro sobre bacterias fitopatógenas., a) *Xanthomonas* sp., y b) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Nótese el halo de inhibición en la figura derecha sobre *Xanthomonas* sp.

#### Actividad antagonista de *Bacillus licheniformis*

El sobrenadante (licor) libre de células cultivado por 24 horas inhibió el crecimiento de la bacteria *Erwinia amylovora* (Fig. 5 a), así como también *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Fig. 5 b), en donde la actividad microbiana del sobrenadante (licor) mostró inhibición en menor proporción que a *Xanthomonas* sp., (Fig. 5 c).

El sobrenadante (licor) de 48 horas de crecimiento, obtenido del cultivo de esta bacteria no mostró actividad en *Erwinia amylovora* (Fig. 6 d), mientras que para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Fig. 6 e), la actividad inhibitoria se vio incrementada fuertemente (99%), igualmente de efectiva que para *Xanthomonas* sp., (Fig. 6 f). Estos datos de inhibición permanecieron constantes al probar el licor de fermentación del aislado de *B. licheniformis* cultivado por 72 horas., es decir se observo que el licor no mostró actividad para *Erwinia amylovora* (Fig. 7 g) pero es eficiente para la inhibición de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Fig. 7 h) y *Xanthomonas* sp., (Fig. 7 i).



Figura 5. Actividad microbiana de *B. licheniformis* cultivado por 24 horas en caldo nutritivo contra las bacterias fitopatógenas., a) *Erwinia amylovora*, b) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y c) *Xanthomonas* sp.



Figura 6. Actividad microbiana de *B. licheniformis* cultivado por 48 horas en caldo nutritivo contra las bacterias fitopatógenas., d) *Erwinia amylovora*, e) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y f) *Xanthomonas* sp.



Figura 7. Actividad microbiana de *B. licheniformis* cultivado por 72 horas en caldo nutritivo contra las bacterias fitopatógenas., g) *Erwinia amylovora*, h) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, i) *Xanthomonas* sp.

Al diluir el sobrenadante (licor) libre de células y determinar su grado de actividad se encontró que este disminuyó la densidad de crecimiento de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* al diluir 1:4 (Fig. c) y 1:10 (Fig. 8 d) veces el licor o sobrenadante de 48 horas de crecimiento de *B. licheniformis* en comparación con el testigo (Fig. 8 a).

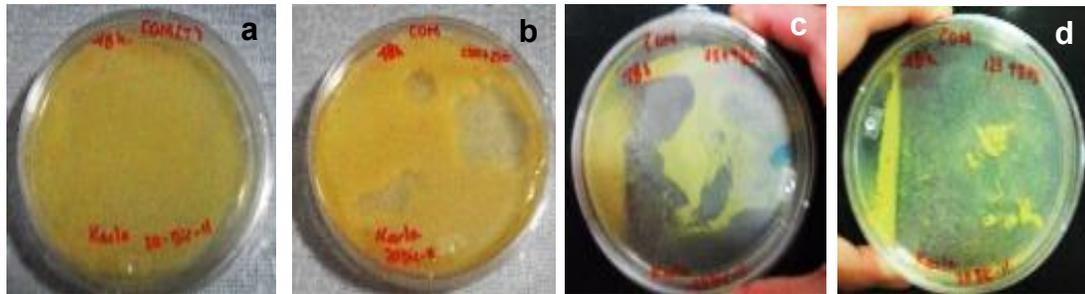


Figura 8. Bioensayos de actividad de *B. licheniformis* cultivado por 48 h contra la *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*., a) Testigo absoluto de Cmm, b) dilución 1:2, c) dilución 1:4, d) dilución 1:10.

Para la bacteria *Xanthomonas* sp., la actividad microbiana de *B. licheniformis* (crecimiento 48 horas) fue muy similar a la obtenida con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, ya que el licor de fermentación mostro disminución del crecimiento de *Xanthomonas* sp., cuando este se aplicó en dilución 1:4 (Fig. g) y 1:10 (Fig. h) en las placas de cultivo, no obteniéndose inhibición alguna en las diluciones posteriores (Fig. 9).

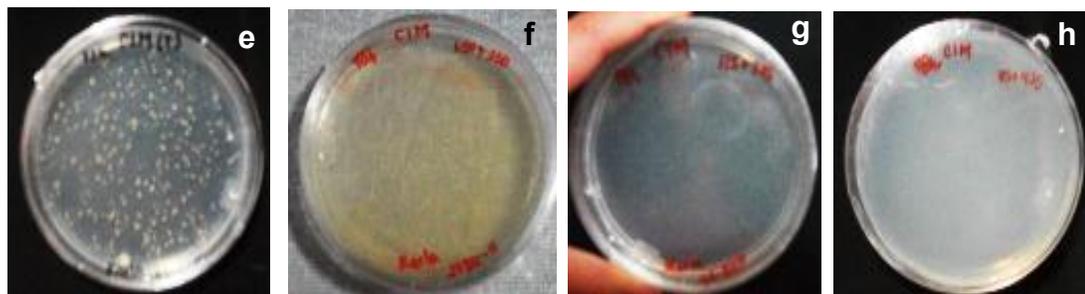


Figura 9. Bioensayo de actividad *B. licheniformis* cultivado por 48 horas sobre *Xanthomonas* sp., e) Testigo absoluto de Xa., f) dilución 1:2, g) dilución 1:4, h) dilución 1:10.

El nivel de actividad inhibitoria en los bioensayos de *B. licheniformis* con 72 horas de incubación mostró que el licor o sobrenadante no tubo actividad microbiana sobre las bacterias fitopatógenas que en todas las diluciones efectuadas tanto para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* como para *Xanthomonas* sp., tal y como se muestra en la figura 10.

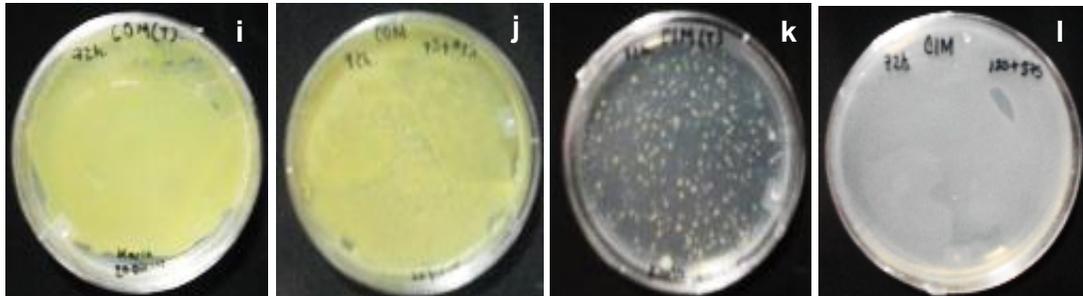


Figura 10. Muestra de actividad *B. licheniformis* cultivado por 72 horas sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas* sp., i) Testigo absoluto de Cmm, j) dilución 1:10, y *Xanthomonas* sp., k) Testigo absoluto de Xa, l) dilución 1:4.

### **Evaluación del sobrenadante de *B. licheniformis* en placa**

El sobrenadante (licor) libre de células *B. licheniformis* fue espatulado con una varilla de vidrio en placa conteniendo medio KB, posteriormente una vez seco se resembró por estría en cada cuadrante, cada bacteria fitopatógena, dejando un cuadrante sin sembrar como testigo, así se apreció claramente el efecto inhibitorio de *B. licheniformis* (licor), tanto a las 24 horas de crecimiento como a las 48 h y 72 h para inhibir a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas* sp., comparativamente contra *Erwinia amylovora* donde el efecto inhibitorio del antagonista *B. licheniformis* fue nulo (figura 11).

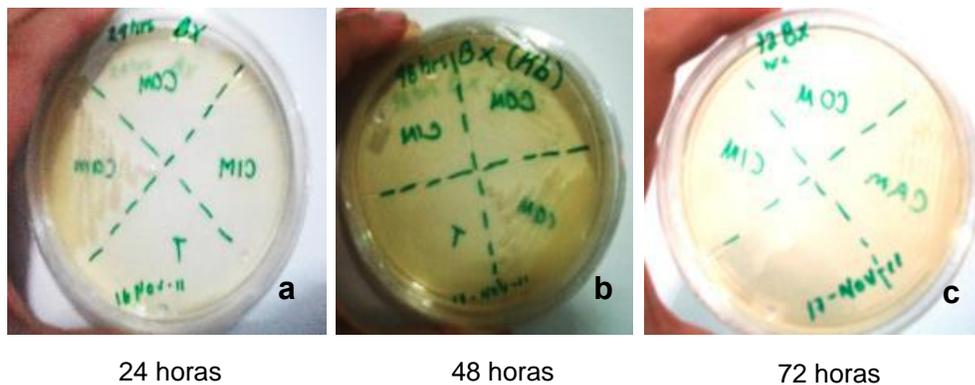


Figura 11. Bioensayo de actividad de *B. licheniformis* contra las bacterias fitopatógenas., a) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (COM), *Xanthomonas* sp. (CIM), *Erwinia amylovora* (CAM), b) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (COM), *Xanthomonas* sp., (CIM) *Erwinia amylovora* (CAM), c) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (COM), *Xanthomonas* sp. (CIM), *Erwinia amylovora* (CAM).

Una variante del procedimiento de ensayo de actividad fue mezclar el medio de cultivo KB antes de solidificar con el licor libre de células de *B. licheniformis* para comprobar el efecto inhibitorio que esta bacteria posee sobre las bacterias fitopatógenas tal y como se observa en la figura 12, donde se pudo comprobar de manera fehaciente la inhibición de *B. licheniformis* para *Xanthomonas* sp., y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aunque la inhibición fue provocada por la bacteria que se desarrollo en el medio y no por el sobrenadante el cual al parecer se inactivo con la temperatura del agar del medio KB, antes de solidificarse y ser mezclado el sobrenadante de *B. licheniformis*.

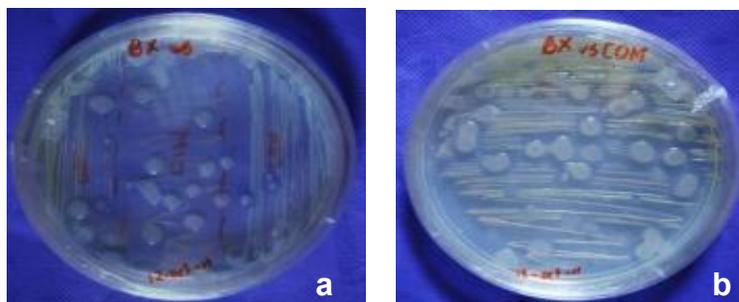


Figura 12. Bioensayo de la actividad de *B. licheniformis* en agar placas de cultivo contra las bacterias fitopatógenas., a) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (COM), *Xanthomonas* sp. (CIM), *Erwinia amylovora* (CAM), b) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (COM).

Las pruebas obtenidas mostraron que la bacteria benéfica *B. licheniformis* tubo actividad microbiana contra las bacterias fitopatógenas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas* sp., durante la 24, 48 y 72 horas de cultivo a una dosis de 500 µl del sobrenadante (licor) libre de células, pero esta actividad se redujo o fue nula para la bacteria *Erwinia amylovora* durante las 48 y 72 horas del ensayo. Al realizar diluciones de 1:2, 1:4 y 1:10, del licor de cultivo de *B. licheniformis* se observó que estos no disminuyeron el crecimiento total de las bacterias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas* sp., durante las 48 horas de incubación, por consiguiente ninguna de las bacterias fue inhibida lo cual indica que las diluciones no tuvieron actividad microbiana, por lo que la eficiencia del licor se pierde al diluirlo.

*B. licheniformis* es reconocida al igual que otras especies más de *Bacillus* como una bacteria de interés biotecnológico ya que a partir de estas especies se obtienen antibióticos como la bacitracina (Vivas *et al.*, 2008), que tiene propiedad inhibitoria para algunas bacterias como estafilococos (incluyendo algunos resistentes a la penicilina), estreptococos, cocos anaerobios, corinebacterias, clostridios y algunas especies gram negativas como *Neisseria* y *Haemophilus* (Johnson *et al.*, 1945).

En otros trabajos el género *Bacillus* a sido utilizado para combatir hongos fitopatógenos tales como *Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani* Kühn. El efecto antifúngico de los metabolitos producidos por la mayoría de las cepas de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus licheniformis* inhibieron en más de 50% el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos (Pozo *et al.*, 2007). También se han probado formulaciones de la cepa *B. licheniformis* sobre los frutos del mango para evitar que los hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botryosphaeria* spp, causen la pudrición del fruto y este no pueda ser consumido (Govender and Korsten, 2006). *B. licheniformis* también ha sido probada contra el hongo *Botrytis cinérea* que afecta al cultivo del tomate, estudiando la actividad de control biológico de esta cepa y probándola también en laboratorio en el medio de cultivo Biji compuesto de soja cuajada de residuos desecados, permite crecimiento bacteriano hasta  $4 \times 10^{11}$  ufc/ml

después de 72 horas de fermentación en cultivo líquido, la elaboración de esta formulación mejora la actividad biológica de la bacteria antagonista *B. licheniformis* para la estabilización fungicida (Lee *et al.*, 2006). Este trabajo con una cepa *B. licheniformis* muestra que también el género *Bacillus* tiene capacidad para inhibir bacterias fitopatógenas, por lo que pudieran ser útiles para el control biológico de fitopatógenos en general en plantas.

### **Caracterización morfológica de *B. licheniformis***

Observaciones microscópicas de frotis de cultivo del aislado antagónico mostraron que este es una bacteria de forma bacilo en su fase temprana de desarrollo (48 h- 72 h), que después de 120 horas de incubación a 30 °C genera una espora central y que produce colonias con bordes lisos de color clara grisáceo, en forma de gotas, después de 96 horas de crecimiento en medio de cultivo King B (KB), mientras que en el medio líquido no genera película sobre la superficie.

Pruebas de tinción diferencial de Gram mostraron que a las células jóvenes son Gram (+) (Fig. 13 a), mientras que la tinción con verde malaquita en calor de frotis de 72 horas de cultivo mostraron, de manera fehaciente y visual al microscopio la espora de esta bacteria (Fig. 13 c). La reacción de Gram en *Bacillus* (Fig. 13 c) puede variar con la edad del medio de cultivo, cepa bacteria, y los colorantes utilizados en la tinción. Por lo que es muy importante utilizar células de la fase exponencial de crecimiento para la tinción de Gram. En pruebas de 163 tinciones del grupo II de *Bacillus*, se demostró que el 46% son Gram-variables después de 24 horas de incubación y el 20 % son Gram-negativas después de 48 horas (Shaad *et al.*, 2001). La bacteria *B. licheniformis* también presenta flagelos, según las observaciones hechas en el microscopio (Fig. 13 b).

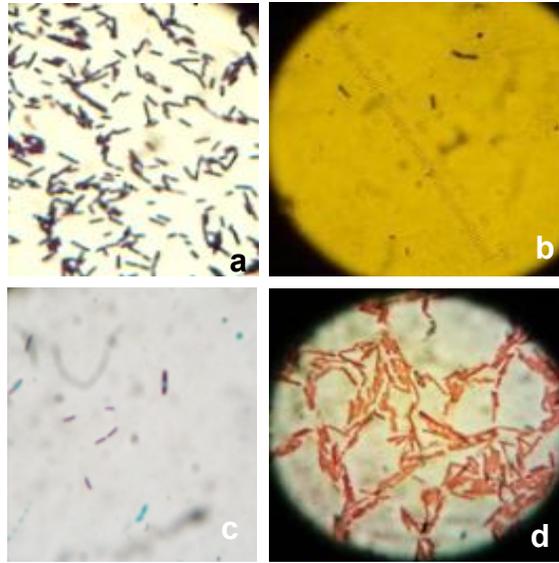


Figura 13. Tinciones diferenciales de *B. licheniformis*., a) Tinción de Gram, b) Tinción de flagelos, c y d) Tinción de esporas.

*B. licheniformis* en condiciones por arriba de la temperatura óptima de crecimiento de 37 °C, mostró crecimiento a temperatura de 45 °C (Fig. 14 e) y 50 °C (Fig. 14 f), y mientras que a los 55 °C (Fig. 14 g), no se apreció desarrollo colonial.

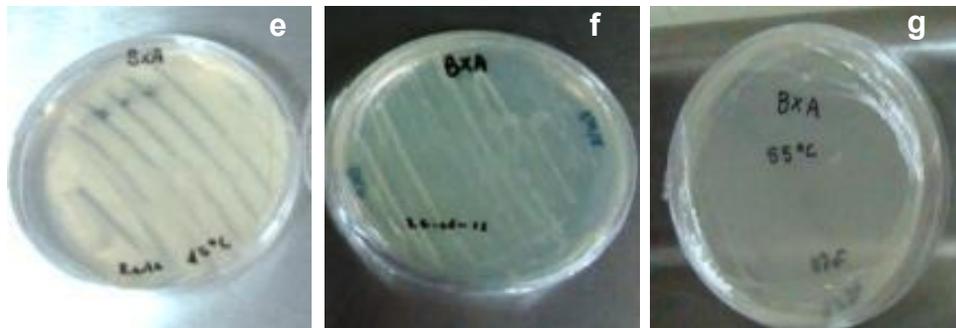


Figura 14. Crecimiento de la bacteria *B. licheniformis* a diferentes temperaturas de incubación., e) 45°C, f) 50°C, g) 55°C.

## Fisiología de la bacteria *B. licheniformis*

En pruebas de desarrollo en caldo nutritivo con NaCl al 2 % (Fig. 15 d) y 5%, se obtuvieron resultados positivos (Fig. 15 e) y en 7% (Fig. 15 f) la bacteria no creció o desarrollo crecimiento. En la prueba de Oxido/ Fermentación de carbohidratos (Fig. 15 g) fue positiva por la síntesis de ácido carbónico, lo cual hace que el medio de cultivo se acidifique y el indicador de pH ácido base (azul de bromothymol) se torne a color amarillo, esto indica fermentación. Las bacterias son especialmente susceptibles por que son unicelulares y su temperatura varía con la ambiental. Qué se observo crecimiento en medio dextrosa Sabouraud (SDA) (Fig. 15 h).

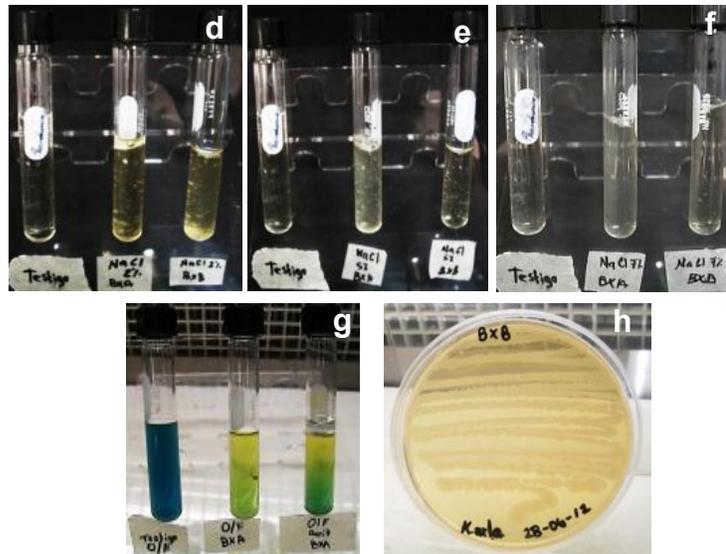


Figura 15. Pruebas fisiológicas de *B. licheniformis*., d) NaCl 2%, e) NaCl 5%, f) NaCl al 7%, g) Oxido/Fermentación, h) Crecimiento en SDA.

## Caracterización bioquímica de *B. licheniformis*

La prueba de utilización xilosa como fuente únicamente de carbono (Fig. 16 a), dio un resultado positivo, así como el crecimiento a pH 5.7 (Fig. 16 b). También positivo, lo cual indica que la bacteria es tolerante, por el contrario en el medio de citrato de Simmon (Fig. 16 c) como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento, no se detectó crecimiento, lo que indica un resultado negativo, este resultado puede variar y ser positivo pero ello no afecta en cuanto a caracterización (Vivas *et al.*, 2008). En la prueba de oxidasa se detectó la presencia de citocromo “c” oxidasa, que es capaz de reducir el O<sub>2</sub> con aceptores inorgánicos de electrones, en

este caso la prueba indico ser positiva para la bacteria. La prueba de catalasa para convertir el peróxido de hidrogeno en agua y O<sub>2</sub>, mostró un burbujeo en la muestra lo cual indico catalasa positiva, la prueba de Ryu fue negativo (no produjo el halo mucoide). Con estas pruebas la bacteria mostró ser aerobia facultativa y por sus características morfológicas y bioquímicas indican que es un *Bacillus* sp., otras pruebas como indol, que muestra la capacidad de un microorganismo para transformar el triptófano dieron un resultado positivo (Fig. 16 d). En la prueba de reducción de Nitratos (NO<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub>) (Fig. 16 e) fue positiva también la prueba de hidrolisis de almidón para detectar amilasas, donde se observa una clara capacidad de hidrolisis de este sustrato por el aislado bacteriano (Fig. 16 f).

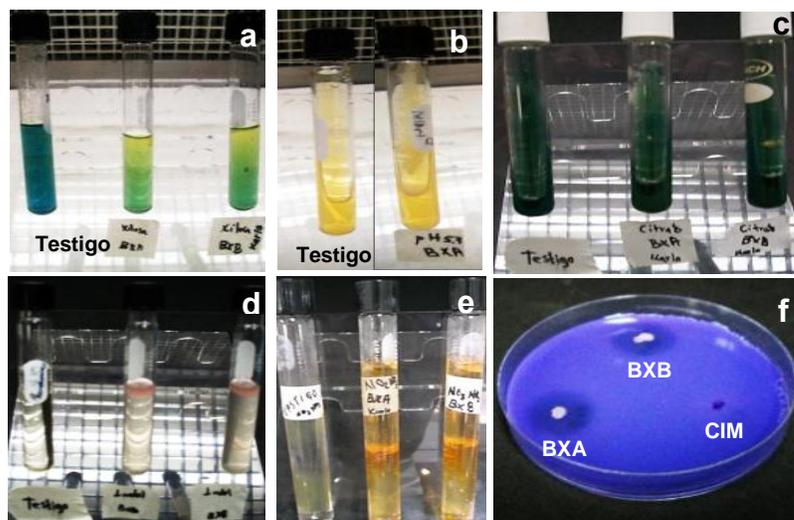


Figura 16. Pruebas bioquímicas para la identificación de *B. licheniformis* (BXB), a) Crecimiento en xilosa, b) pH 5.7, c) Crecimiento en citrato, d) indol, e) reducción de Nitratos (NO<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub>), f) hidrolisis de almidón.

Basada en las características morfológicas (bacilo esporulado gram +) y fisiológicas (crecimiento en caldo nutritivo con NaCl al 2% y 5%), así como crecimiento y desarrollo a 45°C, 50°C y 55 °C, además de diversas pruebas bioquímicas incluidas en la tabla 3, mostraron que esta bacteria antagonista es *B. licheniformis* según Shaad *et al.*, (2001), Lelliot *et al.*, (1987) y Vivas *et al.*, (2008). Datos referentes a sus propiedades de acción antagonista contra fitopatógenas, además de referencias taxonómicas (Bergey, 1987) otros trabajos con los resultados obtenidos de la cepa BXB pudieron corroborar que el aislado utilizado y obtenido como contaminante de placa de cultivo es *Bacillus licheniformis*.

Tabla 3. Análisis comparativo de las pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas del aislado BXB, *B. licheniformis* y *B. subtilis*.

<b>PRUEBAS</b>	<b>Cepa BXB</b>	<b><i>B. licheniformis</i></b>	<b><i>B. subtilis</i></b>
<b>Tinción Gram</b>	+	+	+
<b>Prueba de motilidad</b>	+	+	?
<b>Espora central</b>	+	+	+
<b>Temperatura</b>			
45°C	+	+	+
50°C	+	+	+
55°C	-	+	+
<b>Oxidasa</b>	+	+	?
<b>Ryu</b>	-	?	?
<b>Catalasa</b>	+	?	+
<b>pH 5.7</b>	+	+	+
<b>Xilosa</b>	+	?	?
<b>Oxido/Fermentación</b>	+	+	-
<b>NaCl 2%</b>	+	+	?
<b>NaCl 5%</b>	+	+	?
<b>NaCl 7%</b>	-	+	?
<b>Medio sabouraud</b>	+	+	?
<b>Hidrolisis de Almidón</b>	+	+	?
<b>Indol</b>	+	?	?
<b>Medio Citrato</b>	-	+	+
<b>Nitratos a Nitritos</b>	+	+	+

Pruebas positivas (+), pruebas (-), No reportado (?).

## CONCLUSIONES

La bacteria *B. licheniformis* utilizada en este trabajo fue capaz de inhibir a las bacterias fitopatógenas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas* sp., a través de diferentes ensayos directos utilizados en laboratorio.

De acuerdo a los análisis de caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica y en comparación a los trabajos encontrados como el de Vivas *et al.*, 2008, confirma que la cepa utilizada es la bacteria *B. licheniformis*.

El licor o sobrenadante de fermentación *B. licheniformis* y *Lactobacillus* spp., pueden ser utilizados como una fuente potencial de metabolitos inhibitorios de bacterias fitopatógenas.

Se aisló y purifico una bacteria contaminante inhibidora de bacterias fitopatógenas que se identificó de acuerdo a sus características morfológicas y bioquímicas como *Bacillus licheniformis*.

Los sobrenadantes de crecimiento de *Lactobacillus* spp., y de *B. licheniformis* mostraron capacidad para inhibir a bacterias fitopatógenas a través de distintos procedimientos de observación en placas de cultivo.

El sobrenadante de *Lactobacillus* spp., inhibió el crecimiento de *Xanthomonas* sp., mientras que *B. licheniformis* inhibe el desarrollo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas* sp. Ninguna de las dos cepas inhibió el crecimiento de *Erwinia amylovora*.

## LITERATURA CITADA

- Agrios G. N. 2008. Fitopatología. Ed. Limusa. 2ª Edición. México. pp. 532-568.
- Ahmed, S., Pérez, C., Egea, C., y Candela, M.E. 1999. Evaluation of the capacity of *Trichoderma harzianum* in controlling rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Journal of Plant Pathology*. 48: 58-65.
- Alvarado, R. C., y Cándida Gloria, D. R. 2009. Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera. *Revista Salud pública y nutrición*. 10. 131-139.
- Aspeytia, S. D., Borrego, E. F., Zamora, V. M., V., Murillo, S. M., Benavides M. A., y Valentín R. T. 2010. Efectos genéticos y heterosis de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en campo e invernadero para rendimiento y calidad. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*. 1: 455-467.
- Cavallini, Arauz, L. F. 1998. Fitopatología un enfoque agroecológico. Ed. Universidad de Costa Rica. 1ª Edición. San José, Costa Rica. p. 93.
- Cerrato, F. R., Alarcón, A. 2007. "Microbiología Agrícola" hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta- microorganismo. Ed. Trillas. 2ª Edición. México. pp. 348-355.
- Cowana, F. L. 1974. Cowana and seetl's manual for the identification of medical bacteria. 2ª Edition. S. T. Cowana, Ed. Cambridge University Press, Great Britain.
- De la Garza Gonzales J. L. 1996. Fitopatología general. Imprenta U. A. N. L. 5ª Edición. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. p. 38.
- Fasio Carillo J. A., Bautista, S. L., Estrada G. R., Molar A. R., y Isidro Z. M. 2001. Razas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye., presentes en el estado de Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19: 248-250.
- Fernández, O., y Larrea, V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Avances de fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos. Costa Rica. 62: 96-100.
- Ferre, R., Badosa, E., Feliu, L., Planas, M., Montesinos, E., y Eduard, B. 2006. Inhibition of Plant-pathogenic bacteria by short synthetic cecropin a-melittin hybrid peptides. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 72: 3302–3308.
- Flores, B. J., Rueda P. E., Acedo, F. E., Ponce, F., J., Cruz, M., Grimaldo, J. O., y Adrián, G. O. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Sociedad Mexicana de Fitopatología*. 32: 319-326.
- Gent, H. D., Lang, J. M., and Schwartz, H. F. 2005. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onions. *Journal of Plant Disease*. 89: 558-564.

- Gerard, J. T., Berdell R. Funke y Christine L. Case. 2007. Introducción a la microbiología. Ed. Medica panamericana. 9ª Edición. pp. 81, 298.
- Govender, V., y Korsten, L. 2006. Evaluation of different formulations of *Bacillus licheniformis* in mango pack house trials. *Journal of Biological Control*. 37: 237-242.
- Heimbrook ME, Wang WLL & Campbell G (1989). Staining bacterial flagella easily. *Journal of Clin Microbiol* 27: 2612-2615.
- Holger, J., Bahro, R., Burger A., Ahlemeyer, J., y Rudolf Eichenlaub. 1999. Interaction between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Journal of Environmental Microbiology*. 1: 113-118.
- Hugh, R., and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative rods. *Journal of Bacteriol*. 66:24–26.
- Infante D., Martínez, B., González, N., y Yusimy Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24: 2224-4697.
- Instituto nacional de investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2004. Enfermedades bacterianas del jitomate de Aguascalientes y Zacatecas. Fundación PRODUCE.
- [http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Tomato\\_Spanish.pdf](http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Tomato_Spanish.pdf)
- Izquierdo, C. S., Ramírez, V. P., Bolaños, T. B., Ramírez, R. I., García, E. R., Sandoval I. J., y Fernando, C. G. 2001. Producción masiva de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith)Dye. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 35: 575-581.
- Janisiewicz, W., y L., Korsten. 2002. “Biological control of postharvest diseases of fruits. *Journal of Phytopathol*. 40: 411-441.
- Johnson, B., Anker, H., Meloney, F. 1945. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science*. 102: 376–377.
- Labarrios, Ayala L. A., Herrera, R. R., y Cristóbal Noé A. G. 2004. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Shutster, Hoff, Mendel y Lazar) Vidaver y Mendel, usando la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22: 239-245.
- Lee, P. J., Woo L. S., Sung K. C., Hee S. J., Hee J., Youll L. J., Ju K. H., Je J. S., y Byung J. M. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Journal of Biological Control*. 37: 329–337.
- Lelliot, R. A., and De Stead. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plant. Blackwell Scinetific Publication. 1ª edición. Oxford, U. S. A. pp; 156, 160, 169, 170, 171, 172, 185, 186, 191, 192, 193, 194, 195, 196.

- Llácer, G., López M.M., Trapero A., y Bello A. 1996. Patología vegetal. Ed. Mundi-Prensa. 2ª Edición. Barcelona, España. pp. 491, 534, 538.
- López, M. J., Ocho, Z. A., Santoyo, P. G., Anaya, L. J. Medina, M. E., Martínez, T. M., y Pedro, D. L. 2008. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencia Farmacéuticas*. 39: 49-57.
- Luna, R. I., Carvajal, M., Carrillo, C. G., y Carlos F. 2007. Inhibitory compound of the soil bacteria *Pseudomonas fluorescens* against the fungus *Aspergillus flavus* L. *Revista Mexicana de Microbiología*. 24: 19-31.
- Luo, L. X., Walter, C., Boklan, H., Liu, X., L. and Li, J., Q. 2007. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and real-time PCR assay. *Journal of Plant Pathology*. 135:1365-30259.
- Nalimova, M. S. y Armando, G. S. 2007. El servicio de diagnóstico de las bacterias fitopatógenas en cuba: desarrollo y alcances. *Revista de Fitosanidad*. 13: 5-10.
- Noja, I. A, y Luis, M. T. 2010. Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Revista Salus*. p. 18.
- Nuez, F., Rodríguez del R. A., Tello J., Cuartero J., Segura B. 2001. El cultivo del tomate. Ed. Mundi – Prensa. 1ª Edición. México. pp. 539- 446.
- Ordax, Ibáñez, Mónica. 2008. Supervivencia de *Erwinia amylovora* en condiciones de estrés: influencia de la presencia de cobre y la limitación de nutrientes. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. p. 115.
- Patiño, C. Diana. 2003. ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?. *Revista Umbral Científico*. 3: 48 – 56.
- Pozo, R. Y., Vaillant, F. D., Casadesús, R. L., García, P. E., y Victoria P. R. 2007. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. 2: 35-40.
- Prescott, M. Lansing, John P. Harley y Kein A. Donald. 2002. *Microbiología*. Ed. Mc Graw-Hill. 5ª edición. Madrid, España. pp; 72, 73, 132, 133, 567, 571, 902, 903, 904, 905.
- Productores de hortalizas (P.H.). 2006. *Plagas y enfermedades del tomate (Guía de identificación y manejo)*. Miester media Worldwide.
- Prudencio, Sains, J. M., Navarrete, M. R., Navarrete, M. J., y Jorge Alberto A. G. 2008. Dinámica de los tizones común y de halo del frijol en el Valle de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 34: 0568-2517.
- Ramírez, L., M. R., Jacobo, C. J. L., Ávila M. R., Parra, Q., A., y María, Z. G. 2009. Incidencia de inóculo y variables climáticas como herramientas en la toma de

- decisiones del manejo del tizón de fuego [*Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.*,] durante la floración del manzano [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf.]. Revista Mexicana de Fitopatología. 27: 0185-3309.
- Reinoso, P. Y., L. Casadesús Romero, A. García Suárez, J. Gutiérrez Pérez y V. P. Álvarez-Rivera. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias de género *Bacillus* antagonistas de *Petrobacterium caratovorum*. Revista de Fitosanidad. 2: 187-189.
- Rivera, Coto, G. 2006. Conceptos introductorios a la fitopatología. Ed. Euned. 1ª Edición. Costa Rica. p. 80.
- Rodríguez, R., J.M. Tavares Rodríguez, J. A. y Medina S. Juan. 2001. Cultivo moderno del tomate. Ed. Mundi-Prensa. 2ª Edición. D. F. México. pp. 139-142.
- Rosales, A. S., y J. R. Nápoles. 1999. Hortalizas plagas y enfermedades. Ed. Trillas. 1ª Edición. México. pp. 15-18.
- Schaad, N. W., J. B., Jones and W., Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic Bacteria. 3ª Edición. Ed. APS Press. For The bacteriologia committee of the american phytopathological society. U. S. A. pp. 250-260.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2012. Avances de siembra y cosecha (SIAP).  
[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=348](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=348)
- Simmons, J. S. 1926. A culture medium for differentiation organisms of typhoid-colon aeorgenes groups and for isolation of certain fungi. Journal of Infected Disease. 39:209-214.
- Staley, T. J., Boone, R. D., Garrity, G. M., De, Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, A. F., Krieg, N. R. y Stanley T. Williams. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2ª Edition. Ed. Springer. U.S.A. Michigan. pp. 63, 587.
- Tejada, Gómez, Yelaine. 2006. Caracterización de *Ralstonia solanacearum* a través del estudio de su diversidad genética. Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.10: 299-303.
- Vidal, Q. L. R. 2005. Fundamentos de análisis microbiológico de alimentos. 2ª edición. Ed. AGT. México, D.F. p. 198.
- Vivas, J. M., M. S. Martínez Benítez, F. García, G. Muñoz y R. Salgado Brito. 2008. Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafinas. Revista Ciencia y Tecnología. 7: 51-60.

## APÉNDICE DE MEDIO DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS

### Medio King B

Caseína hidrolizada	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
Mg SO <sub>4</sub>	1.5 g
Glicerol	15 ml
Agar bacteriológico	19 g
Agua destilada	1 L

Nota: en este caso se utilizó la caseína hidrolizada ya que las bacterias crecieron mejor en el medio de cultivo en vez de la peptona de carne.

### Tinción de Flagelos (Heimbrook *et al.*, 1989)

Sobre un frotis de cultivo se aplica:

Mordente de flagelos ---- 5 minutos.

Lavar con agua corriente.

Cristal violeta-----2 minutos.

Lavar y secar.

### Tinción de Esporas (Gerard *et al.*, 2007)

Frotis de cultivo se tiñe con:

Verde malaquita-----5 minutos. Calentamiento a vapor.

Lavar con agua corriente.

Safranina-----2 minutos.

Lavar y secar.

### **Prueba de Catalasa (Cowan & Steel's, 1993)**

Se coloca una gota de Peróxido de hidrogeno ( $H_2 O_2$ ) sobre una muestra de cultivo en tubo o porta objetos.

### **Prueba de Ryu**

Sobre una muestra de cultivo de bacteria o porta objetos se coloca una gota de Hidróxido de potasio (KOH) al 3%.

### **Prueba de Oxidasa (Kovacs, 1956)**

Sobre una tira de papel filtro que contiene el reactivo de Kovac (1956), se observa la reacción.

### **Medio de Nitrato ( $NO_3$ a $NO_2$ ) (Stanier *et al.*, 1966)**

Se ajusta el PH de 7-7.2

KNO <sub>3</sub>	1.0 g
Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Agar bacteriológico	3.0 g
No. 3	
Agua destilada	1 L

### **Medio de Hidrolisis de Almidón (Cowan & Steel's, 1993)**

#### **Medio**

Agar nutritivo	28.0 g
Agua destilada	1 L
Almidón soluble	2.0 g

## **Medio Oxido/Fermentación (Hugh and Leifson, 1953)**

### Base

Peptona	2.0 g
Na Cl	5.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g
Agar bacteriológico No. 3	3.0 g
Bromothymol azul	0.03 g (15 ml sw 0.2 % (solución acuosa))
Agua destilada	1 L

Ajustar el pH 7.1.

### **Prueba de Indol**

Solución acuosa de triptona plus 0.01%

### **Reactivo de Kovac**

p- dimethylaminobenzaldehyde	5.0 g
Alcohol amílico	75.0 ml
Conc. HCl	25.0 ml

### **Crecimiento en pH 5.7**

Caseína hidrolizada	10 g
Extracto de levadura	5.0 g
Dextrosa (50% solución esterilizada)	10.0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0 g
H <sub>2</sub> O	1 L

### **Crecimiento en Na Cl al 2%**

Caldo nutritivo 0.8 g

NaCl 2%

También se utilizó Cloruro de sodio al 5% y 7%.

### **Producción de Ácido Xilosa**

#### **Agar Citrato de Simmon**

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g

NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g

Citrato de sodio 2.0 g

NaCl 5.0 g

Bromthymol 80.0 mg

azul

Agar 15.0 g

Ajustar el pH 6.8-6.9.

#### **Hidrolisis de Esculina (Cowan & Steel's, 1993)**

Peptona (Oxoid L37) 10.0 g

Esculina 1.0 g

Escalas de citrato 0.5 g

férrico

Agar 12 g

Agua destilada 1 L