

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**DESARROLLO DE UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DE
EXTRACTOS BACTERIANOS PARA EL CONTROL DE BACTERIAS
FITOPATÓGENAS.**

POR:

VALENTINA RAMOS PERFECTO

T E S I S

**Presentada como requisito parcial para
obtener el título de:**

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Febrero de 2011

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas en el proyecto “**Selección y desarrollo de antagonistas microbianos para control de bacterias fitopatógenas foliares en cultivos hortícolas**” con Clave 137776, elaborado en el programa de cooperación entre la empresa GREENCORP BIORGANIKS DE MEXICO, S.A. de C.V., y la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO.

Los evaluadores de esta investigación fueron los siguientes:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Asesor Principal (UAAAN)

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó
Vocal I (UAAAN)

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez
Vocal II (UAAAN)

M.C. Catalina Chávez Betancourt
Vocal III (GreenCorp Biorganiks de México S.A. de C.V)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

"ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**DESARROLLO DE UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DE
EXTRACTOS BACTERIANOS PARA EL CONTROL DE BACTERIAS
FITOPATÓGENAS.**

TESIS:

Que se somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito
parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presentado por:

VALENTINA RAMOS PERFECTO

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:



Dr. Mario A. Cruz Hernández
ASESOR PRINCIPAL



Dr. Antonio F. Aguilera Carbó
VOCAL I



Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez
VOCAL II



M.C. Catalina Chávez Betancourt
VOCAL III



DR. RAMIRO LOPEZ TRUJILLO
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Febrero de 2011

AGRADECIMIENTOS

A mí "Alma Mater" por brindarme las herramientas necesarias y permitirme formarme como profesionista.

Al Dr. Mario A. Cruz Hernández por su apoyo, disposición, paciencia y consejos brindados en la realización de este trabajo

A la M.C. Catalina Chávez Betancourt por la oportunidad de haberme integrado a su equipo de trabajo y por la dirección del mismo.

Al Dr. Antonio Aguilera Carbó por su disponibilidad y orientación brindada, por ser parte de mi formación como profesionista.

A la Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez por su disposición, ayuda y colaboración en este trabajo.

A mis Profesores del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos: M.C. Xochitl R. CH., Q.F.B. Oscar Noé Rebollosa P., Lic. Laura O. F. L., Dr. Antonio A. C., Dra. Ana Verónica CH. R., M.C. María H. G., Dra. D. Gabriela M. V., Dr. Heliodoro G. T., Dra. M. Lourdes M. C. gracias por compartir sus conocimientos para mi desarrollo profesional.

A Diana Llera, Diana Morales, Marcela, Edgar por sus consejos, apoyo, compañía, confianza y tiempo que me brindaron durante la etapa de laboratorio. Pero sobre todo por su amistad, gracias.

DEDICATORIAS

A Dios por haberme dado la vida, por haberme dado fortaleza, salud, coraje y por no dejarme sola en los momentos difíciles, por acompañarme y haberme permitido llegar a esta etapa.

A mis padres: Gregorio Ramos Pineda y Petra Perfecto Sánchez por su amor, cariño, comprensión, confianza y consejos que me han brindado. Gracias a su apoyo incondicional. Este logro es para ustedes.

A mis hermanos: Francisco, José Luis, Natividad, Mari, Isabel, Angelina, Humberto, Gregorio, Rigoberto, Anayeli, Luis Enrique, gracias por todo el apoyo durante esta etapa, por sus consejos, buenos deseos, por estar siempre dispuestos a apoyarme porque sin su ayuda no hubiera podido realizar esta meta, este logro también es para ustedes.

A mi novio: Emanuel Mora Castañeda por todo el cariño y apoyo brindado, y porque sé que siempre puedo contar contigo gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESÚMEN	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVOS.....	3
1.1.1. Objetivo general	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
1.2. HIPÓTESIS.....	4
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1. BACTERIAS FITOPATÓGENAS	7
2.1.1. <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>Flaccumfaciens</i>	7
2.1.2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i>	8
2.1.3. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Phaseoli</i>	8
2.1.4. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	9
2.2. INTERACCIONES HOSPEDERO-PATÓGENO (VÍAS DE INFECCIÓN)	10
2.3. SINTOMATOLOGÍA.....	10
2.4. DIAGNÓSTICO.....	11
2.5. CONTROL BIOLÓGICO	11
2.6. ANTAGONISTAS.....	12
2.7. BIOFERTILIZANTES	13
2.8. ANTECEDENTES DE APLICACIONES DE MICROORGANISMOS ANTAGÓNICOS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16

3.1.	OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	16
3.2.	REACTIVACIÓN DE CEPAS ANTAGÓNICAS.....	16
3.3.	PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO NUTRITIVO.....	17
3.3.1.	Medio Sólido.....	17
3.3.2.	Medio Líquido.....	17
3.4.	PREPARACIÓN DEL MEDIO MRS.	18
3.4.1.	Medio Sólido.....	18
3.4.2.	Medio Líquido.....	18
3.5.	INCUBACIÓN EN ANAEROBIÓISIS.....	19
3.5.1.	Medio Sólido.....	19
3.5.2.	Medio Líquido.....	19
3.6.	PROPAGACIÓN DE BACTERIAS ANTAGÓNICAS.	19
3.7.	OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA.	20
3.8.	REACTIVACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS.....	21
3.9.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC) DE <i>PSEUDOMONAS, ENTEROCOCCUS Y LACTOBACILLUS</i>	21
3.10.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC) Y CONCENTRADO CELULAR (CC) DE <i>PSEUDOMONAS, ENTEROCOCCUS Y LACTOBACILLUS</i>	22
3.11.	COMBINACIONES DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC) Y CONCENTRADO CELULAR (CC) DE <i>PSEUDOMONAS, ENTEROCOCCUS</i> Y <i>LACTOBACILLUS</i>	22
3.12.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS BACTERIAS FITOPATOGENAS.....	23
3.13.	FORMULACIONES DE BACTERIAS.	23
3.13.1.	Formulación 1 y 2 (21 mL)	23
3.14.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LAS FORMULACIONES.....	24
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	25

4.1. REACTIVACIÓN DE CEPAS ANTAGÓNICAS	25
4.1.1. <i>Pseudomonas</i>	25
4.1.2. <i>Enterococcus</i>	26
4.1.3. <i>Lactobacillus</i>	27
4.2. PROPAGACIÓN DE BACTERIAS ANTAGÓNICAS	28
4.3. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS FITOPATOGENAS.....	28
4.3.1. <i>Erwinia carotovora subsp. Carotovora</i>	29
4.3.2. <i>Xanthomona axonopodis subsp. Phaseoli</i>	29
4.3.3. <i>Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis</i>	30
4.3.4. <i>Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens</i>	31
4.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC) DE <i>PSEUDOMONAS</i> , <i>ENTEROCOCCUS</i> Y <i>LACTOBACILLUS</i>	32
4.5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DEL CONCENTRADO CELULAR (CC) DE <i>PSEUDOMONAS</i> Y <i>ENTEROCOCCUS</i>	35
4.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS.....	37
4.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LAS FORMULACIONES.....	38
5. CONCLUSIONES	40
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Claves de las bacterias antagonistas analizadas.	16
Cuadro 2: Componentes utilizados para elaboración del medio MRS.	18
Cuadro 3. Bacterias fitopatógenas utilizadas en el estudio	21
Cuadro 4. Tratamientos obtenidos de los extractos libres de células.	22
Cuadro 5. Tratamientos obtenidos del concentrado celular.	23
Cuadro 6. Formulaciones (21 mL).....	23
Cuadro 7. Evaluación microscópica y macroscópica de <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterococcus</i> y <i>Lactobacillus</i>	28
Cuadro 8. Evaluación microscópica, macroscópica y daños ocasionados por bacterias fitopatógenas.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Técnica de tinción de Gram.	20
Figura 2. Crecimiento en placas con agar nutritivo de las cepas de <i>Pseudomonas</i> . A) M6a, B) M6b, C) M6c, D) M1f	26
Figura 3. Crecimiento en placas con agar MRS de las cepas de <i>Enterococcus</i> . A) MII-2, B) MIII-2, C) MIV-2, D) MIV-4	26
Figura 4. Crecimiento en placas con agar MRS de las cepas de <i>Lactobacillus</i> . A) 1a, B) 4b	27
Figura 5. Fotografía de cepas inoculadas: 1) <i>Enterococcus</i> , 2) <i>Lactobacillus</i> , 3) <i>Pseudomonas</i>	28
Figura 6. Colonias de <i>E. carotovora</i> en agar nutritivo.	29
Figura 7. Colonias de <i>X. axonopodis</i> en agar nutritivo.	30
Figura 8. Colonias de <i>C. michiganensis</i> en agar nutritivo.	31
Figura 9. Colonias de <i>C. flaccumfaciens</i> en agar nutritivo.	31
Figura 10. Promedio de halo de inhibición del extracto libre de células de las cepas de <i>Enterococcus</i> contra bacterias fitopatógenas.	33
Figura 11. Halos de inhibición del extracto libre de células de las cepas de <i>Enterococcus</i> contra <i>Xanthomona axonopodis</i> y <i>Erwinia carotovora</i>	33
Figura 12. Promedio de halo de inhibición del extracto libre de células de las cepas de <i>Lactobacillus</i> contra bacterias fitopatógenas.	34
Figura 13. Halos de inhibición del extracto libre de células de la cepa 1a contra: A) <i>Erwinia carotovora</i> , B) <i>Xanthomona axonopodis</i> y C) <i>Clavibacter michiganensis</i>	34
Figura 14. Promedio de halo de inhibición del concentrado celular de las cepas de <i>Pseudomonas</i> contra bacterias fitopatógenas.	36
Figura 15. Halos de inhibición del concentrado celular de la cepa M6a contra: A) <i>X. axonopodis</i> , B) <i>C. flaccumfaciens</i>	36
Figura 16. Promedio de halo de inhibición del concentrado celular de las cepas de <i>Enterococcus</i> contra bacterias fitopatógenas.	37

Figura 17. Halos de inhibición del concentrado celular de la cepa MII-2 contra: A) <i>E. carotovora</i> , B) <i>X. axonopodis</i> , B) <i>C. michiganensis</i>	37
Figura 18. Promedio de halo de inhibición de los tratamientos contra bacterias fitopatógenas.....	38
Figura 19. Promedio de halo de inhibición de las formulaciones contra bacterias fitopatógenas.....	39
Figura 20. Halos de inhibición de la formulación a base de ELC contra: A) <i>E.</i> <i>carotovora</i> , B) <i>X. axonopodis</i> , B) <i>C. michiganensis</i>	39

RESÚMEN

Los microorganismos que causan diversos tipos de daños a las plantas son denominados fitopatógenos, causando enfermedades y por ende pérdidas en cultivos agrícolas. Causan daños tales como putrefacción, deformaciones, manchas en hojas y tubérculos, necrosis, muerte de las plantas, etc. En México, las pérdidas en los cultivos debido a bacterias y hongos fitopatógenos varían entre un 20 y un 100 %, y se calcula que en el mundo se pierden alrededor de un 10 % de la producción de alimento por las enfermedades de los cultivos agrícolas. El control biológico, representa una estrategia innovadora para el manejo de enfermedades de plantas de importancia agrícola. El propósito del presente trabajo de investigación fue realizar formulaciones a base de extractos bacterianos, utilizando 4 cepas del género *Pseudomonas*, 2 cepas de *Lactobacillus* y 4 cepas de *Enterococcus* y evaluarlos contra bacterias fitopatógenas del tipo *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Curtobacteria* y *Clavibacter*. Primero se reactivaron las cepas a utilizar, se procedió a obtener el Extracto Libre de Células (ELC) de las cepas de *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*, se utilizó el ELC y Concentrado Celular (CC), se identificaron las cepas con mayor promedio de halo de inhibición sobre las bacterias fitopatógenas, se procedió a realizar combinaciones, se identificaron las mejores combinaciones y se diseñaron formulaciones, en cada estudio se realizaron pruebas de antagonismo. Se obtuvo que las dos cepas utilizadas de *Lactobacillus* fueron capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias fitopatógenas del tipo *E.carotovora*, *X. axonopodis* y *C. michiganensis* evaluándose únicamente en ELC. El tratamiento 3 (3:1); 0.75 mL (1a): 0.25 mL (MII -2) a base de ELC inhibió a las bacterias fitopatógenas *E.carotovora* con un halo de 3.13 mm, *X. axonopodis* con un halo de 3.81 mm y *C. michiganensis* con un halo de 3.94 mm y se obtuvo una formulación a base de ELC; 15 mL (1a) 5 mL (MII-2), la cual inhibió a las bacterias fitopatógenas *E.carotovora* con un halo de 2.56 mm, *X. axonopodis* con un halo de 3.25 mm y *C. michiganensis* con un halo de 2.38 mm.

Palabras Clave: bacterias antagonistas, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, inhibición, bacterias fitopatógenas.

1. INTRODUCCIÓN

El continuo crecimiento de la población humana requiere la búsqueda de nuevos caminos para incrementar la producción de alimentos. Una forma de conseguir este objetivo es la reducción de las pérdidas en cultivos agrícolas provocadas por varios factores entre los que se encuentran el clima, la temperatura, la humedad, el tipo de suelo, pero uno de los factores más importantes es el deterioro de vegetales, el cual es causado por una variedad de microorganismos ocasionando daños como podredumbres, manchas foliares, degradación de la pared celular, deformaciones, necrosis, etc. (Quiroz, 2010). Las bacterias como patógenos vegetales pueden causar enfermedades graves y son económicamente dañinas, ocasionando desde manchas, mosaicos o pústulas en hojas y frutos, o podredumbres malolientes de tubérculos hasta la muerte de las plantas. Algunas causan una distorsión de las hojas y tallos relacionada con hormonas, llamada fasciación, o agalla de corona, una proliferación de células vegetales produciendo un abultamiento en el cuello de las plantas y sus raíces (Vidaver, Lambrecht 2004).

En México, las pérdidas en los cultivos debido a bacterias y hongos fitopatógenos varían entre un 20 y un 100 %, y se calcula que en el mundo se pierden alrededor de un 10 % de la producción de alimento por las enfermedades de los cultivos agrícolas (Cruz, 2010).

La agricultura convencional requiere del uso de gran cantidad de agroquímicos y algunos causan daño al ecosistema ya que son de elevada toxicidad, por eso es necesario introducir criterios de sustentabilidad en las prácticas agrícolas (disminuir impactos en el medio ambiente). Debido a ello se derivó una investigación científica basada en la ecología- orientada a conocer mejor, por una parte, nuestros agrosistemas y, por otra, a aumentar la eficacia de métodos de control distintos al uso de plaguicidas (Alomar *et al.*, 2005).

Por lo tanto se ha considerado la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control de enfermedades, y una solución que se plantea es el uso de microorganismos antagonistas de las bacterias fitopatógenas, que tengan la capacidad de disminuir daños ocasionados por fitopatógenos, pero sin producir

efectos adversos a las plantas y a los humanos. El control biológico, representa una estrategia innovadora para el manejo de enfermedades de plantas de importancia agrícola, que se basa en la capacidad de un organismo para inhibir el crecimiento o destruir a un fitopatógeno (Quiroz *et al.*, 2008).

El presente trabajo evaluó el grado de antagonismo de diferentes cepas de: *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*, sobre bacterias fitopatógenas del tipo *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Xap), *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Cmm), *Erwinia carotovora* spp. *carotovora* (Ecc) y *Curtobacteria flacumfasciens* pv. *flacumfasciens* (Cff) en condiciones *in vitro*.

De cada grupo de microorganismos antagonistas utilizados se manejaron cepas diferentes. Por parte de *Pseudomonas* están las cepas M6a, M6b, M6c, M1f; de los *Enterococcus* son MII -2, MIII -2, MIV -2, MIV -4 y por parte de los *Lactobacillus* están 1a, 4b.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Realizar formulaciones a base de extractos de bacterias benéficas de los géneros de *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* para la producción de bioinsumos que permitan el control de bacterias fitopatógenas en cultivos de importancia hortícola.

1.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar cepas del género *Pseudomonas*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* como inhibidores del desarrollo de bacterias fitopatógenas del tipo *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Curtobacterium* y *Clavibacter*.
- Desarrollar y diseñar formulaciones a partir de mezclas de bacterias antagonistas con potencial para el control específico de las principales bacterias fitopatógenas.
- Evaluación *In vitro* de la efectividad biológica de las formulaciones propuestas contra bacterias fitopatógenas.

1.2. HIPÓTESIS

Los extractos bacterianos de las cepas de *Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus*. Pueden ser utilizados para el diseño de formulaciones eficaces contra bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*.

1.3. JUSTIFICACIÓN

La necesidad de insumos orgánicos para el sector agrícola es un tema que hoy por hoy está teniendo una gran demanda, ya que los mismos vienen a sustituir los productos químicos actualmente empleados. Además de que es importante y necesario reducir las pérdidas en los cultivos agrícolas provocados por insectos, bacterias y hongos patógenos de vegetales.

En la mayoría de los casos las pérdidas de cosechas son causadas principalmente por bacterias fitopatógenas y esto implica pérdidas en el rendimiento e incluso en la comercialización. En México las pérdidas varían entre un 20 y un 100 %, y se calcula que en el mundo se pierden alrededor de un 10 % de la producción. Los principales síntomas producidos en las plantas son agallas, marchitamientos, secreciones, pudriciones suaves o blandas, pudriciones secas, chancros, quemazones, manchas de las hojas, frutos y tallos, roñas, etc.

Una de las herramientas que actualmente están teniendo un crecimiento acelerado es la biotecnología; la cual permite desarrollar procesos y productos para el control de bacterias y hongos fitopatógenos de follaje que producen síntomas que van desde manchas foliares hasta plantas cloróticas, provocando pérdidas que pueden alcanzar desde el 20 % hasta 100 % de cultivos: tales son los casos de patógenos foliares bacterianos como *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinias*, así como los procariontes de suelo del tipo *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Corynebacterium* y *Ralstonia*, causantes de necrosis de tallos, raíces, pudriciones y metástasis cancerígeno de tallo y raíz y además, aquellos causantes de daños vasculares como *Clavibacter michiganensis*, bacteria que causa serios estragos en la producción de tomate para exportación.

Erwinia carotovora causa daños estimados entre 10 y 60 % en frutos de chile. Las plantas se enferman aproximadamente a los 40 días de su plantación (Osorio *et al.*, 2011), es uno de los patógenos de plantas de mayor importancia económica, especialmente en cosechas recolectadas, causa una podredumbre blanda de los tejidos vegetales. Las pérdidas anuales se estiman en 50-100

millones de dólares. La patogeneidad parece depender en gran parte de la producción en grandes cantidades del enzima péctico endopoligalacturonato transeliminasa (PGTE).

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* provoca en la producción de frijol la bacteriosis o tizón común del frijol y el daño puede ser severo, con pérdidas mayores a 45 % de la producción de grano.

El control biológico posee muchas ventajas, como: (1) Poco o ningún efecto nocivo colateral; (2) casos raros de resistencia; (3) control de largo plazo; (4) elimina por completo o sustancialmente el uso de insecticidas; (5) relación beneficio/costo muy favorable; (6) evita plagas secundarias; (7) no provoca intoxicaciones; y (8) se puede usar como parte del Manejo Integrado de Plagas (MIP).

El propósito del presente trabajo de investigación es realizar formulaciones a base de extractos bacterianos (*Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*) y evaluarlos contra bacterias fitopatógenas del tipo *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Curtobacterium* y *Clavibacter*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Las enfermedades en las plantas han llegado a ser de gran importancia en la agricultura por las grandes pérdidas que ocasionan al disminuir, tanto la cantidad como calidad del producto cosechado, y por ende su valor comercial (Toledo, 2004).

Actualmente la tendencia mundial es hacia la disminución del uso de plaguicidas químicos, en el control de plagas y enfermedades que atacan los cultivos agrícolas; por lo que se buscan métodos alternativos, entre los que se encuentran los biológicos, con el empleo de microorganismos y/o sus metabolitos para el tratamiento de enfermedades provocadas por fitopatógenos, con vistas a la protección ambiental y aumentar la productividad en la agricultura (Frías *et al.*, 2001).

Las enfermedades bacterianas de las plantas comúnmente son muy difíciles de controlar. Con frecuencia, se requiere de una combinación de varios métodos de control para combatirlas (Agrios, 1996).

2.1. BACTERIAS FITOPATÓGENAS

2.1.1. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*

Sinónimos: *Corynebacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens*, *Corynebacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Corynebacterium flaccumfaciens*. **Taxonomía:** "Actinobacteria"; Actinobacteria; Actinomycetales; Microbacteriaceae. **Descripción:** Bacteria pleomórfica, Gram-positiva, no motil. No produce esporas. Estrictamente aeróbica y quimio-organoheterotrofa. De crecimiento lento en medios de cultivo.

Esta bacteria provoca la marchitez bacteriana de la judía, además de que es huésped en otras especies de leguminosas. Sus síntomas son marchitez de plántulas con coloración rojiza del tallo. En planta, lesiones rojizas en los nudos del tallo y marchitez generalizada, hojas de color pardo. Manchas hidrópicas en fruto y coloraciones anormales en semillas. **Transmisión:** Semilla, restos vegetales, técnicas culturales y nemátodos. **Distribución geográfica:** Australia

y algunos países de África, América del Norte y Europa. En España, se ha citado en Almería (Melgarejo *et al.*, 2008).

2.1.2. *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis*

Sinónimos: *Corynebacterium michiganense*, *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*. **Taxonomía:** "Actinobacteria"; Actinobacteria; Actinomycetales; Microbacteriaceae. **Descripción:** Bacteria pleomórfica, Gram-positiva, no mótil. No esporulada. Estrictamente aeróbica y quimio-organoheterótrofa. Contiene ácido 2, 4 diaminobutírico en su pared y forma colonias amarillas en medios de cultivo con glucosa (Melgarejo *et al.*, 2008).

Es el agente responsable del cancro bacteriano del tomate (*Lycopersicon esculentum*), enfermedad sistémica que produce marchitez vascular, chancros en tallo, manchas oscuras y quemaduras marginales en hojas, manchas en frutos en forma de ojo de pájaro y muerte de las plantas (Melgarejo *et al.*, 2008). Es la principal bacteriosis a nivel mundial de este cultivo (Milagros *et al.*, 2009). Además de causar esta misma enfermedad en pimientos. En papas causa necrosis o podredumbres anular bacteriana, así como el trigo, maíz y alfalfa. Si la bacteria no encuentra hospedadores, sobrevive poco tiempo en el suelo y es de lento crecimiento (Quiroz, 2010).

2.1.3. *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*

Sinónimos: *Xanthomonas phaseoli*, *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Taxonomía:** "Proteobacteria"; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae. **Descripción:** Bacteria con forma bacilar, Gram-negativa, mótil, con un flagelo polar. No esporulada. Estrictamente aeróbica y quimio-organoheterótrofa. Produce pigmento amarillo característico (xanthomonadina) y polisacárido extracelular. Algunas cepas producen pigmentos pardos, tipo melanina, en medios de cultivo con tirosina y se han agrupado en la var. *fuscans*, que presenta también diferencias genéticas (Melgarejo *et al.*, 2008).

Esta bacteria es la causante de la quemadura bacteriana o tabaquera de la judía.

Sintomatología: se caracteriza por inducir una amplia combinación de síntomas: manchas angulares en las hojas, añublo (quemazón), marchitamiento, exudados en el tallo, lesiones en el tallo y muerte. Las manchas en las hojas aparecen como áreas angulares húmedas, claramente distinguibles en la cara inferior de las hojas. El añublo o quemazón de la hoja puede deberse a una toxina (ácido 3-metiltiopropionico) producido por *Xanthomonas* (Ramírez *et al.*, 2001).

2.1.4. *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*

Sinónimos: *Erwinia carotovora*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Taxonomía:** "Proteobacteria"; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae (Melgarejo, *et al* 2008). **Descripción:** Esta bacteria pertenece a la familia enterobacteriaceae, son bastones rectos, con dimensiones de 0.5 a 1.0 por 1.0 a 3.0 micras, Gram (-) y se desplazan por medio de flagelos peritricos, anaeróbica facultativa. No forma esporas. Utiliza una gama moderadamente amplia de fuentes de carbono y energía. Las colonias son de color blanco, variando a un tono amarillento, circulares, convexas, su consistencia varía de húmeda a mucosa, el diámetro oscila entre 2 a 5 mm (Cortés *et al.*, 2008).

Se caracteriza por ser una bacteria oportunista, es decir, una infección latente y puede convertirse en activa cuando la planta se estresa bajo condiciones de temperatura y humedad (Nissen, 2008). Esta bacteria es la causante de la Podredumbre blanda, necrosis vascular y marchitez de la patata (Ventura, 2007) y es huésped en alcachofa, apio, cebolla, coliflor, haba y otras especies hortícolas y ornamentales. **Sintomatología:** Los síntomas ocurren en cualquier estado de desarrollo de la planta. Los tallos de las plantas infectados muestran una pudrición de color negro, el cual, generalmente empieza con la pudrición del tubérculo-semilla y se extiende hacia arriba en el tallo. Las plantas afectadas detienen su desarrollo y son de crecimiento erecto y envarado. El follaje se vuelve clorótico, los folíolos tienden a envolverse hacia arriba, luego se marchita y muere. El tejido del tubérculo afectado por pudrición blanda es

húmedo, de color crema o canela y de consistencia blanda, fácilmente separable del tejido sano, y a medida que avanza el daño adquiere un olor desagradable, debido a la presencia de organismos secundarios (Acuna *et al.*, 2010). Pueden aparecer también podredumbres en conservación. **Transmisión:** Tubérculo madre en patata, lluvia, viento, agua, técnicas culturales y material vegetal. **Distribución geográfica:** Mundial. En España, identificada en las zonas de cultivo de la patata y esporádicamente en otros cultivos (Melgarejo *et al.*, 2008).

2.2. INTERACCIONES HOSPEDERO-PATÓGENO (VÍAS DE INFECCIÓN)

Las bacterias penetran a las plantas generalmente a través de heridas. En muchas de las infecciones de hojas y frutos, se introducen a través de aberturas naturales (estomas), desde donde encuentran acceso a los espacios intercelulares. Desde ahí, reducen en gran parte la resistencia de las células, por asfixia y envejecimiento. También pueden introducirse en las plantas por los hidatodos u órganos excretores de agua. Las lenticelas son también aberturas sin protección, que a veces brindan a las bacterias una vía de entrada para su infección, además también pueden ser introducidas por insectos (Toledo, 2004).

Las condiciones de nutrición de las plantas pueden favorecer la multiplicación en diferentes partes de la planta, por ejemplo, flores o raíces. El inóculo llevado por la lluvia que es arrastrada por el viento puede ser muy efectivo. En inoculaciones artificiales, las bacterias suelen introducirse en las plantas por heridas, aerosoles aplicados con presión para imitar las lluvias llevadas por el viento, infiltración por vacío, o por inmersión de las semillas en el inóculo (Vidaver & Lambrecht, 2004).

2.3. SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas más comunes son las manchas en hojas o frutos, tizones o muerte de tejidos en hojas, tallos o troncos de árboles, y podredumbres de

raíces o tubérculos o cualquier otra parte de la planta. También pueden ocurrir marchitamientos debido al taponamiento del tejido vascular. Los síntomas pueden variar con el fotoperiodo, variedad vegetal, temperatura y humedad, y la dosis de infección. En algunos casos, los síntomas pueden desaparecer o volverse poco importantes al continuar el crecimiento de la planta (Vidaver & Lambrecht, 2004).

2.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de las enfermedades causadas por bacterias no fastidiosas se basa en la presencia de síntomas característicos, el aislamiento del presunto agente infeccioso, y de pruebas fisiológicas y/o moleculares. En plantas muy infectadas, las poblaciones bacterianas en hojas o lesiones pueden alcanzar las 10^8 ó 10^9 UFC/gramo de tejido vegetal, y hasta pueden verse salir de hojas y tallos (Vidaver & Lambrecht, 2004).

2.5. CONTROL BIOLÓGICO

Los métodos de control biológico son utilizados para proteger directamente a las plantas de los patógenos a través de la acción de microorganismos antagonistas en el sitio de infección (Toledo, 2004). Con el empleo de la lucha o control biológico se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales (Badii y Abreu, 2006).

El concepto de control biológico abarca tanto el papel jugado por los insectos auxiliares autóctonos de la zona, que ejercen en numerosos casos un importante control sobre los insectos plagas presentes en los cultivos, como la suelta de insectos útiles que se han criado artificialmente sobre un sustrato alimenticio igual o distinto al que posee en el campo. Este trabajo de regulación de las plagas puede ser llevado a cabo, además de por los insectos predadores y parasitoides, por microorganismos patógenos, por lo que de este modo llegamos a una definición, comúnmente aceptada que (De Bach, 1964) define el control biológico como “la acción de parásitos, predadores o patógenos para

mantener la densidad de la población de un organismo plaga a un promedio menor del que ocurriría en su ausencia”.

En los medios de control biológico se pueden mencionar: 1) Parasitoides: que son individuos que se alimentan de un huésped de la misma clase taxonómica siendo su fase activa el estado larval, y pueden atacar huevos (*Trichogramma* y *Telenomus*) larvas (*Cotesia flavipes*) o pupas (*Spalangia cameroni*); 2) Depredadores: insectos polívoros que se alimentan de diferentes estados biológicos de sus presas que generalmente son otros insectos (*Polistes erythrocephalus* y *Chrysoperla carnea*); 3) Entomopatógenos: microorganismos que enferman al insecto causándole la muerte y pueden estar formados por hongos (*Bauveria bassiana*), virus (*Baculovirus*) o bacterias (*Bacillus thuringiensis*); 4) Hongos antagonistas o micopatógenos: son reguladores naturales que impiden el desarrollo de ciertos hongos o nemátodos (*Trichoderma*); y, 5) Bacterias antagonistas (Chirinos *et al.*, 2006).

2.6. ANTAGONISTAS

Se ha señalado que los antagonistas microbianos no poseen un único modo de acción, y no es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los fitopatógenos. Los mecanismos por los que los microorganismos antagónicos afectan a las poblaciones de patógenos no siempre son claros, pero en lo general se les atribuyen los siguientes efectos: parasitismo directo y muerte del patógeno; competencia con el patógeno por el alimento; efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista y efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles como el etileno, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista (Agrios, 1996).

El uso de *Pseudomonas fluorescens* como agente de biocontrol se debe a que estas producen una gran variedad de antibióticos y sideróforos (piocianina, pirrolnitrina y derivados de indol) que pueden inhibir bacterias y hongos fitopatógenos *in vitro*. No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre *Pseudomonas* y los fitopatógenos. Los

mecanismos propuestos son: i) la producción de sideróforos que, al secuestrar el hierro, quedaría no disponible para los fitopatógenos; ii) la producción de distintos antibióticos, como el 2,4-diacetilfluoroglucinol, la pyoluteorina, la pyrrolnitrina y el ácido fenazin-1-carboxílico que son capaces de suprimir el crecimiento de hongos patógenos en cultivos agrícolas. Ambos mecanismos también incrementan la capacidad de *Pseudomonas* para competir exitosamente en la rizósfera (Valencia *et al.*, 2005).

Dentro del género *Enterococcus* existen numerosos estudios que demuestran la producción de bacteriocinas (también denominadas enterocinas). Diversos estudios recientes sugieren que determinadas cepas de enterococos productoras de bacteriocinas podrían ser de gran utilidad en el control de microorganismos patógenos en alimentos, tales como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Moragues *et al.*, 2003).

Muchos de los microorganismos antagónicos existen naturalmente en los suelos de los campos de cultivo y ejercen cierto grado de control biológico sobre uno o muchos fitopatógenos, a pesar de las actividades humanas. Sin embargo, el hombre ha hecho intentos por aumentar la efectividad de los microorganismos antagónicos introduciendo poblaciones nuevas y más prolíficas (Toledo, 2004).

2.7. BIOFERTILIZANTES

Los biofertilizantes son recomendados en la agenda 21 como resultado de la llamada cumbre de la tierra, firmada en Rio de Janeiro en 1992. Son considerados biotecnologías “apropiables”, que es un término creado para las herramientas biotecnológicas que contribuyen al desarrollo sostenible de un país y que proveen beneficios tangibles a los destinatarios y, además, por ser ambientalmente seguras y socioeconómica y culturalmente aceptables (Aguirre *et al.*, 2009).

Los biofertilizantes tienen un costo para el consumidor final, para el productor, de sólo 10 % del costo de la fertilización química. Es decir, si para fertilizar una

hectárea de maíz se tienen un costo de 3 mil pesos, el costo del biofertilizante es inferior a 300 pesos. Otra parte importante en el uso del biofertilizante es el poco volumen que representa su aplicación; mientras que en el caso del químico se está haciendo referencia a cientos de kilos por hectárea, aquí se aplica apenas 1.5 kilos por hectárea, con el consecuente ahorro en fletes, maniobras y aplicación (Morales, 2010).

Los biofertilizantes o abonos biológicos están basados en microorganismos que promueven y benefician la nutrición y el crecimiento de las plantas. Se trata de microorganismos del suelo generalmente hongos y bacterias, que se asocian de manera natural a las raíces de las plantas de una forma más o menos íntima. Los microorganismos promotores del crecimiento y nutrición vegetal facilitan de manera directa o indirecta, la disponibilidad de determinados nutrientes para las plantas, tales como el nitrógeno, el fósforo o el agua, aunque también los hay que producen sustancias (fitohormonas) promotoras del crecimiento vegetal (Chirinos *et al.*, 2006). Su uso constituye una forma de aumentar la productividad de los cultivos, reduciendo al mismo tiempo los efectos perversos de la fertilización química sobre el medio ambiente y la salud.

Además de las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y los hongos micorrizicos que transportan P, otros nutrimentos y agua, también se utilizan como biofertilizantes los microorganismos *Azotobacter*, *Anabaena*, *Frankia*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, entre otros (Aguirre-Medina *et al.*, 2009). Los efectos positivos que ejercen las *Pseudomonas* en las plantas radican en que producen y segregan reguladores del crecimiento de plantas como auxinas, giberelinas y citoquininas mejorando procesos como germinación de semillas, nutrición mineral, desarrollo de raíces, empleo del agua, entre otros (Santillana, 2006).

2.8. ANTECEDENTES DE APLICACIONES DE MICROORGANISMOS ANTAGÓNICOS.

Los mecanismos por los cuales los antagonistas limitan o impiden el crecimiento de los fitopatógenos son por medio de antibiosis, competencia, por espacio o por nutrimentos, interacciones directas con el patógeno e inducción

de resistencia (Quiroz, 2010) y efectos tóxicos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista y efectos tóxicos indirectos por la actividad metabólica del organismo antagonista (Agrios, 1996).

Las bacterias del grupo *Pseudomonas fluorescens* son consideradas eficaces para controlar las enfermedades foliares y radicales. Su eficacia ha sido señalada por Kim *et al.* (1997), quienes encontraron mayor emergencia y control de patógenos del trigo cuando utilizaron este género. Quiroz (2010) realizó pruebas in vitro con cepas de *P. fluorescens* mostrando la capacidad de algunas cepas de inhibir el crecimiento de bacterias fitopatógenas. Trujillo *et al.* (2007) determinaron la potencialidad de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* como antagonistas de los patógenos fúngicos en cultivos de arroz y maíz *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Curvularia* sp. y *Fusarium* sp.

La actividad antimicrobiana de las bacterias del ácido láctico ha sido atribuida a varios factores, incluyendo entre ellos a la producción de bacteriocinas y sustancias tipo bacteriocinas. Entre estas bacterias, los *Enterococcus* son capaces de producir sustancias con actividad antimicrobiana, Moragues *et al.* (2003) caracterizaron sobrenadantes antibacterianos obtenidos de tres cepas de *enterococos* y comprobaron que ejercen actividad inhibitoria sobre cepas de especies bacterianas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. subtilis*) y Gram-negativas (*Pseudomonas* sp. y *Vibrio cholerae*).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.

Para el desarrollo de este trabajo de investigación fueron seleccionadas 10 cepas de bacterias identificadas como antagonistas y 4 cepas identificadas como bacterias fitopatógenas. Las cepas utilizadas pertenecen a la colección de microorganismos de la empresa Greencorp Biorganiks de México S.A de C.V. Los microorganismos fueron proporcionados para la reactivación en cajas Petri para medio sólido y en matraces con caldo en medio líquido, con medio nutritivo y medio MRS para cada grupo de bacterias.

3.2. REACTIVACIÓN DE CEPAS ANTAGÓNICAS.

De las 10 cepas seleccionadas 4 pertenecen al género de *Pseudomonas*, 4 al género de *Enterococcus* y 2 son *Lactobacillus*, cada microorganismo fue identificado con una clave como se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Claves de las bacterias antagonistas analizadas.

<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
M6a	MII -2	1a
M6b	MIII -2	4a
M6c	MVI -2	
M1f	MVI -4	

Para la reactivación de las cepas de *Pseudomonas*, se tomó una muestra, con un asa bacteriológica, directamente del matraz y se sembraron por el método de estría por agotamiento en cajas petri que contenían agar nutritivo (AN). En el caso de las cepas de *Enterococcus* se sembraron en cajas con agar MRS. Las cajas se incubaron a 30°C durante 24 horas para estos dos géneros. Mientras que para la reactivación de los *Lactobacillus*, se sembraron en cajas con agar MRS, y se incubaron a 30°C durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis.

3.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO NUTRITIVO.

3.3.1. Medio Sólido

Se prepararon cajas petri con agar nutritivo, agregando 13.8 g de agar en 600 mL de agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer con capacidad de 1000 mL, disolviendo en una parrilla con una temperatura de 200°C hasta observar coloración cristalina, posteriormente se esterilizó el medio en un autoclave a 121°C y 15Lb de presión durante 15 minutos.

El medio esterilizado fue vaciado en cajas petri de plástico estériles de aproximadamente 8cm de diámetro, esto se realizó dentro de una campana de flujo laminar y con previa desinfección del área de trabajo. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente, etiquetándolo y guardándolo para su posterior uso.

3.3.2. Medio Líquido

Se prepararon matraces Erlenmeyer con 100 mL de caldo nutritivo, para lo cual se pesaron 0.8 g del medio para cada matraz y se disolvió en 100 mL de agua destilada colocando en una parrilla con una temperatura de 200°C hasta observar coloración cristalina y sin presencia de grumos. Los matraces con el medio fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15Lb de presión.

Una vez estériles, el caldo nutritivo se dejó enfriar y con el empleo de una micropipeta (200-1000µL) con puntillas estériles se inocularon 3 mL de cada cepa en cada matraz.

3.4. PREPARACIÓN DEL MEDIO MRS.

3.4.1. Medio Sólido

De la misma manera que se prepararon las cajas petri con agar nutritivo, se prepararon cajas petri con agar MRS, agregando la cantidad necesaria de cada componente para 600 mL de agua destilada.

Cuadro 2: Componentes utilizados para elaboración del medio MRS.

Compuesto	g/L
Peptona de caseína	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	5 g
D (+) glucosa	20 g
Fosfato dipotásico	2 g
Sodium Citrate, Dihydrate Granular	2 g
Agar bacteriológico	12 g
Acetato de sodio	5 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Sulfato manganoso	0.05 g

3.4.2. Medio Líquido

Se prepararon matraces Erlenmeyer con 100 mL de caldo MRS, para lo cual se pesó cada componente a utilizar (Cuadro 2) para cada matraz y se disolvió en 100 mL de agua destilada colocando en una parrilla con una temperatura de 200°C hasta observar coloración cristalina y sin presencia de grumos. Los matraces con el medio fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15Lb de presión.

Para el caso de frascos especiales para condiciones de anaerobiosis con caldo MRS. Se preparó un matraz Erlenmeyer con 400 mL de caldo MRS, para lo cual se pesó cada componente a utilizar (Cuadro 2) y se disolvió en 400 mL de agua destilada colocando en una parrilla con una temperatura de 200°C hasta observar coloración cristalina y sin presencia de grumos. Se dejó enfriar el

medio y se colocaron 100 ML en cada frasco. Posteriormente, se esterilizaron los frascos que contenían el medio en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15Lb de presión.

3.5. INCUBACIÓN EN ANAEROBIÓISIS.

3.5.1. Medio Sólido

Para favorecer el crecimiento de los microorganismos, se utilizó un bote de vidrio con tapa de rosca, dentro del cual se colocaron las cajas petri ya sembradas, se colocó cinta alrededor de la tapa la cual tenía dos orificios en uno se le inyectó el nitrógeno por 3 minutos y en el otro salía el oxígeno y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Obteniendo así las condiciones para el crecimiento de *Lactobacillus*.

3.5.2. Medio Líquido

Los frascos utilizados para crecimiento de *Lactobacillus* en medio líquido eran de vidrio con tapa de rosca la cual tenía dos orificios, se colocó cinta alrededor de la tapa cada frasco, se le inyectó nitrógeno por 3 min en un orificio y por el otro orificio salía el oxígeno que era desplazado y se incubaron por 24 horas a 30°C.

3.6. PROPAGACIÓN DE BACTERIAS ANTAGÓNICAS.

De cada cepa de *Pseudomonas* se tomó una asada y se inocularon en matraces de 500 mL que contenía 100 mL de caldo nutritivo. Para el caso de los *Enterococcus*, se inocularon en caldo MRS. Ambos matraces se incubaron a 37°C con una agitación de 180 RPM durante 24 horas.

Se tomó una asada de cada cepa de *Lactobacillus* y se inoculó en 100 mL de caldo MRS, se incubaron a 30°C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis.

De las bacterias inoculadas anteriormente se tomaron 3 mL de cada una y se inocularon en matraces de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo, para el caso de los *Lactobacillus* estos fueron inoculados en frascos de anaerobiosis

con 100 mL de medio. Estos reactores fueron incubados durante 16 horas a 30°C y agitación de 180 rpm para las cepas de *Pseudomonas* y *Enterococcus*.

3.7. OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA.

A las cepas de cada grupo de bacterias se les realizó una tinción de Gram para observar su morfología microscópica. La cual se llevó a cabo de la siguiente manera: se tomó una asada del cultivo puro, se colocó en un portaobjetos y se fijó la muestra con calor; Una vez fijada y seca la muestra, se cubrió por completo la superficie, donde se encontraba la muestra, con cristal violeta dejándolo reaccionar por 60 segundos y se enjuagó suavemente al chorro del agua; se cubrió de nuevo la superficie con una solución de yodo (lugol) y se dejó reaccionar por 1 minuto; se enjuagó suavemente y se decoloró con alcohol-acetona dejándolo reaccionar por 30 segundos para después enjuagarse de inmediato. Finalmente se cubrió la superficie de la preparación con una solución de safranina y se dejó actuar por 1 minuto para finalmente enjuagar con agua destilada (Fig. 1). Se dejó secar la preparación por completo para después observar los microorganismos teñidos empleando un microscopio óptico a 100X con aceite de inmersión.

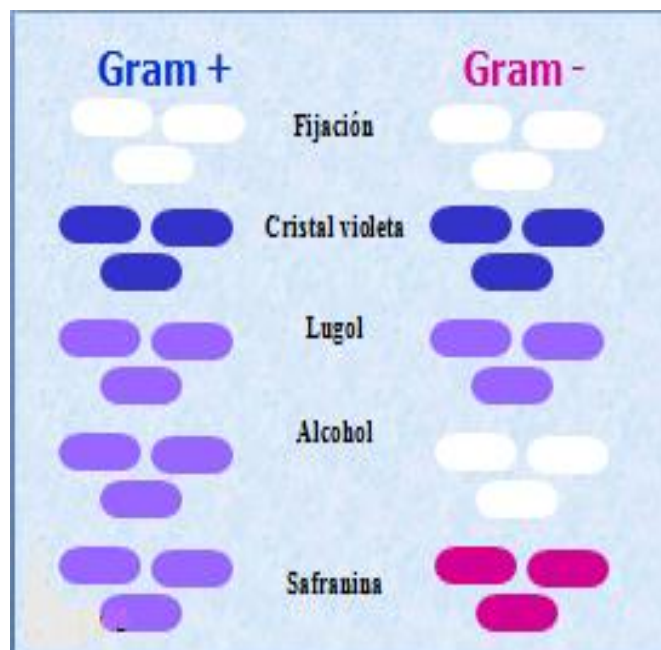


Figura 1. Técnica de tinción de Gram.

3.8. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS.

Las bacterias fitopatógenas *Erwinia carotovora subsp. Carotovora*, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Xanthomonas axonopodis subsp. Phaseoli* y *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* fueron sembradas por el método de estría por agotamiento en cajas con agar nutritivo, y se incubaron a 30°C por un periodo de 24-48 horas hasta observar crecimiento sobre el medio. Posteriormente cada bacteria se inoculó en un matraz de 500 mL que contenían 100 mL de caldo nutritivo se incubaron con agitación de 180 rpm a tiempo y temperatura óptimas para cada una de las bacterias.

Cuadro 3. Bacterias fitopatógenas utilizadas en el estudio

Bacteria	Clave de identificación
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>	Ecc
<i>Xanthomona axonopodis subsp. phaseoli</i>	Xap
<i>Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens</i>	Cff
<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>	Cmm

3.9. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC) DE PSEUDOMONAS, ENTEROCOCCUS Y LACTOBACILLUS.

En tubos cónicos con capacidad de 50 ml se colocaron las muestras inoculadas de 16 horas y se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 minutos, con una temperatura de 5°C; se separó el botón celular del sobrenadante para realizar diferentes pruebas.

3.10. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC) Y CONCENTRADO CELULAR (CC) DE *PSEUDOMONAS*, *ENTEROCOCCUS* Y *LACTOBACILLUS*.

En cajas de agar nutritivo se sembraron las bacterias fitopatógenas, por estría, distribuyéndolas por toda la placa. Después se procedió a hacerle 4 pozos a la caja con agar, los cuales se realizaron con un sacabocados de 5 mm de diámetro y cada orificio fue llenado con el extracto libre de células de las bacterias antagonistas. Las cajas se colocaron en incubación a una temperatura de 30°C y en un periodo de 24-48 horas, posteriormente se midieron los halos de inhibición en mm.

Para la determinación de la capacidad inhibitoria del concentrado celular (CC) se siguió el mismo procedimiento y los orificios fueron llenados con el concentrado celular de las bacterias antagonistas inoculadas a 24 horas.

3.11. COMBINACIONES DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC) Y CONCENTRADO CELULAR (CC) DE *PSEUDOMONAS*, *ENTEROCOCCUS* Y *LACTOBACILLUS*.

Se realizaron combinaciones entre los extractos libres de células y entre el concentrado celular de las bacterias antagonistas que presentaron halo de inhibición mayor. De los cuales se obtuvieron seis tratamientos o combinaciones.

Cuadro 4. Tratamientos obtenidos de los extractos libres de células.

Tratamiento	Combinación de cepas
1 (1:1)	0.5 mL (1a): 0.5 mL (MII -2)
2 (1:3)	0.25 mL (1a): 0.75 mL (MII -2)
3 (3:1)	0.75 mL (1a): 0.25 mL (MII -2)

Cuadro 5. Tratamientos obtenidos del concentrado celular.

Tratamiento	Combinación de cepas
4 (1:1)	0.5 mL (M6a): 0.5 mL(MII -2)
5 (1:3)	0.25 mL (M6a): 0.75 mL (MII -2)
6 (3:1)	0.75 mL (M6a): 0.25 mL (MII -2)

3.12. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS BACTERIAS FITOPATOGENAS.

Las bacterias fitopatógenas se sembraron en agar nutritivo por el método de estría, distribuyéndolas por toda la caja. Después se procedió a hacerle 4 pozos a cada caja, realizados con un sacabocados de 5 mm de diámetro, se llenaron los orificios con cada uno de los tratamientos obtenidos anteriormente. Se colocaron en incubación a una temperatura de 30°C y en un periodo de 24-48 horas, posteriormente se midieron los halos de inhibición en mm.

3.13. FORMULACIONES DE BACTERIAS.

De acuerdo a los resultados obtenidos con las pruebas de inhibición de los tratamientos, se procedió a realizar formulaciones a partir del tratamiento que presentó un halo de inhibición mayor sobre las bacterias fitopatógenas.

Se obtuvieron 2 formulaciones, una a partir del extracto libre de células (T3) y la otra a partir del concentrado celular (T5).

3.13.1. Formulación 1 y 2 (21 mL)

Cuadro 6. Formulaciones (21 mL).

Formulación 1 ELC	Formulación 2 CC
15 ml (1a)	15 ml (MII-2)
5 ml (MII-2)	5 ml (M6a)
Goma Xantana 0.15 g (disuelta en 1 mL de alcohol)	

3.14. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LAS FORMULACIONES.

En cajas de agar nutritivo se sembraron las bacterias fitopatogenas, se tomaron 100 µl de muestra de cada matraz que contenían a las bacterias fitopatógenas y se inocularon en cajas petri con agar nutritivo, se realizó un barrido de bacterias, distribuyéndolas por toda la placa. Después se procedió a hacerle 4 pozos a la caja con agar, los cuales se realizaron con un sacabocados de 5 mm de diámetro y cada orificio fue llenado con las formulaciones de ELC y CC obtenidas. Las cajas se colocaron en incubación a una temperatura de 30°C y en un periodo de 24-48 horas, posteriormente se midieron los halos de inhibición en mm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. REACTIVACIÓN DE CEPAS ANTAGÓNICAS

Para poder realizar las pruebas de antagonismo con cada una de las cepas de los diferentes grupos de bacterias se tuvo que reactivar cada una de las cepas, esto se hizo sembrando en cajas petri por el método de estría por agotamiento.

4.1.1. *Pseudomonas*

La evaluación macroscópica de las cepas de *Pseudomonas* indica que es una colonia color amarillo-cremoso de forma irregular, con una consistencia suave así como un aspecto húmedo presentando bordes ondulados (Fig. 2). La descripción anterior concuerda con lo mencionado por Vázquez (2011).

En cuanto a la evaluación microscópica se observó que son bacilos Gram (-), cortos y delgados estos resultados concuerdan con lo reportado por Quiroz (2010).

Las cepas A, B y C son idénticas entre si y de acuerdo a la descripción anterior, pero la cepa D difiere a las anteriores ya que las colonias no presentan aspecto húmedo además del color blanco. Las cepas de *Pseudomonas* tienen la capacidad de producir metabolitos de naturaleza antibiótica como 2,4 dimethylphloroglucionol y pirrolnitrina, diferentes tipos de sideróforos, además, de que ayudan a las plantas en la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas y etileno) mismos que podemos utilizar en el antagonismo microbiano y en la resistencia sistémica inducida (RSI) en diferentes sistemas planta-patógeno.

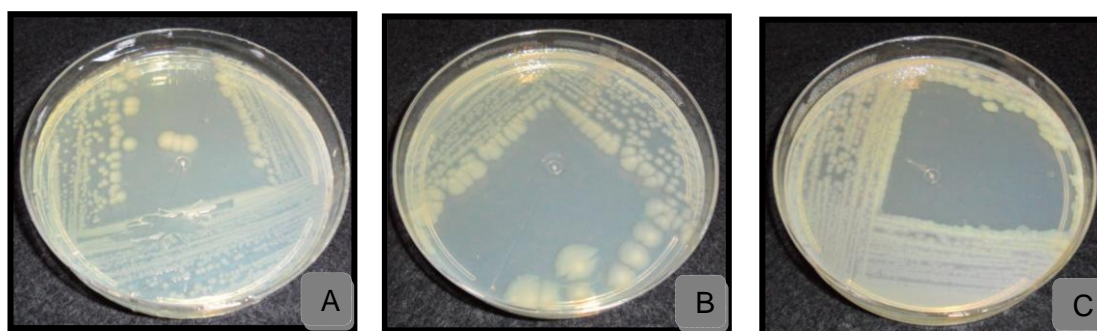




Figura 2. Crecimiento en placas con agar nutritivo de las cepas de *Pseudomonas*. A) M6a, B) M6b, C) M6c, D) M1f

4.1.2. *Enterococcus*

Para las cepas de *Enterococcus* las colonias presentaron un color blanco-cremoso, de forma circular y ovoide, con bordes enteros, elevación convexa y un aspecto húmedo (Fig. 3).

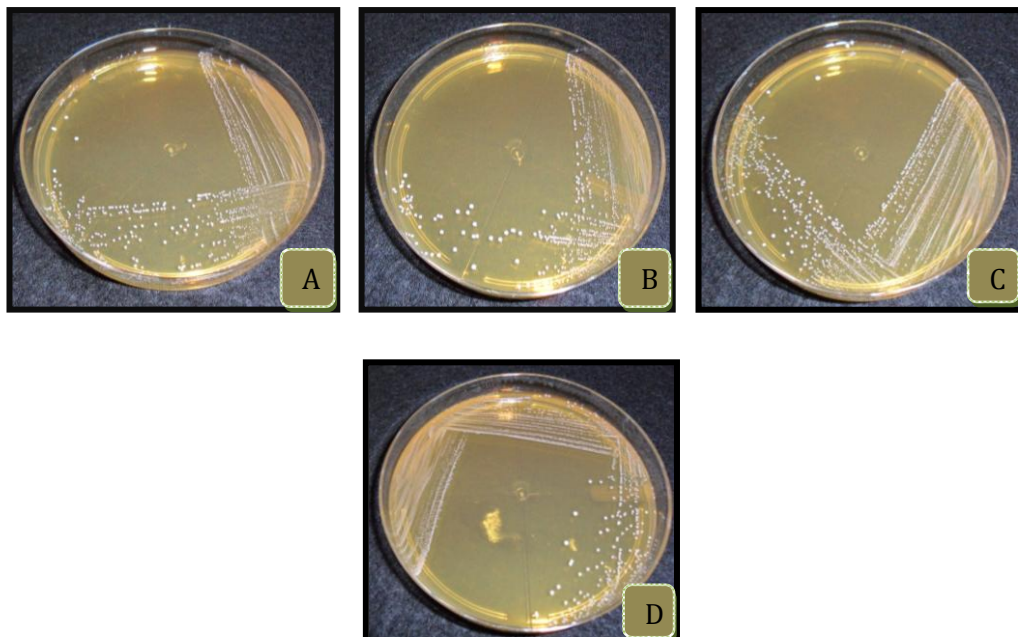


Figura 3. Crecimiento en placas con agar MRS de las cepas de *Enterococcus*. A) MII-2, B) MIII-2, C) MIV-2, D) MIV-4

Mediante la técnica de tinción de Gram se observaron cocos Gram (+), agrupados en diplococos y otros solos.

Las cuatro cepas crecieron de forma similar, con colonias pequeñas. No hubo diferencia alguna en cuanto a morfología macroscópica y microscópica. Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen la capacidad de producir biocompuestos que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, sustancias de bajo peso molecular, bacteriocinas (Botina *et al.*, 2008), y sustancias tipo bacteriocinas. Entre estas bacterias, los *Enterococcus* son capaces de producir sustancias con actividad antimicrobiana, algunas de las cuales poseen un amplio espectro inhibitorio (Moragues *et al.*, 2003).

4.1.3. *Lactobacillus*

Para las cepas de *Lactobacillus* las colonias presentaron un color blanco-cremoso, algunas con forma irregular y forma circular, con bordes ondulados y un aspecto húmedo (Fig. 4).

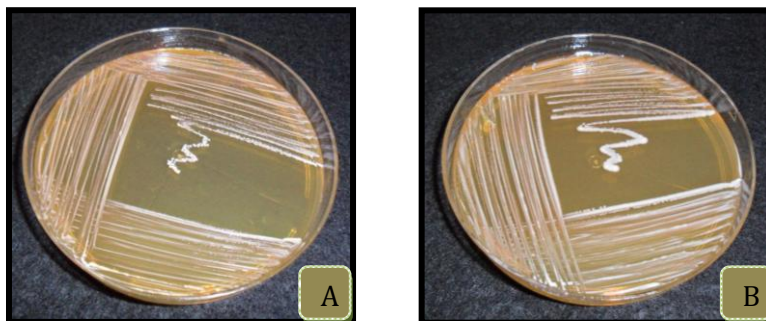


Figura 4. Crecimiento en placas con agar MRS de las cepas de *Lactobacillus*.
A) 1a, B) 4b

Mediante la técnica de tinción de Gram se observaron bacilos cortos y delgados, Gram (+), algunos agrupados en diplobacilos, ordenados en pares y otros solos.

Cuadro 7. Evaluación microscópica y macroscópica de *Pseudomonas*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*.

	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Evaluación microscópica	Bacilos Gram (-), cortos y delgados	Cocos Gram (+), agrupados en diplococos y otros solos.	Bacilos Gram (+) cortos y delgados, algunos agrupados en diplobacilos, ordenados en pares y otros solos.
Evaluación macroscópica	Colonias color amarillo-cremoso, forma irregular, consistencia suave, aspecto húmedo, bordes ondulados	Colonias color blanco-cremoso, forma circular y ovoide, bordes enteros, elevación convexa, aspecto húmedo.	Colonias color blanco-cremoso, forma irregular y circular, bordes ondulados y aspecto húmedo

4.2. PROPAGACIÓN DE BACTERIAS ANTAGÓNICAS

De las cajas sembradas anteriormente se tomó una asada de cada cepa para inocularla en 100 mL de caldo selectivo para cada uno de los diferentes grupos de bacterias, y se incubaron a 24 y 16 horas (Figura 5).

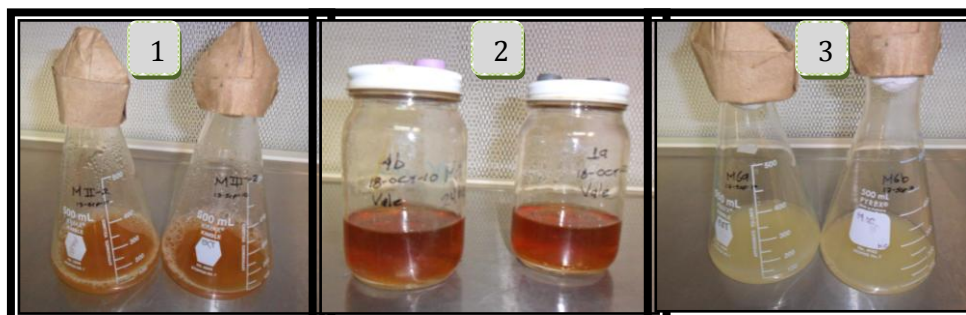


Figura 5. Fotografía de cepas inoculadas: 1) *Enterococcus*, 2) *Lactobacillus*, 3) *Pseudomonas*.

4.3. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS FITOPATOGENAS

Las bacterias fitopatógenas utilizadas para las pruebas de antagonismos fueron reactivadas sembrándolas en cajas con agar nutritivo, por el método de estría por agotamiento.

4.3.1. *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*

La evaluación macroscópica de la bacteria *E. carotovora* indica que las colonias son de forma circular, bordes enteros, con elevación convexa, de color blanquecino a crema brillantes, presentando una consistencia mucóide (gel), así como un aspecto húmedo (Fig. 6). Esta descripción se asemeja con la mencionada por Nissen (2008).

Esta bacteria se encuentra tanto en zonas templadas como en las de clima tropical y ocasiona la pudrición blanda, necrosis vascular y marchitez en la papa (Ventura, 2007). Los síntomas se presentan en cualquier estado de desarrollo de la planta. El tejido del tubérculo afectado por pudrición blanda es húmedo, de color crema o canela y de consistencia blanda, fácilmente separable del tejido sano, y a medida que avanza el daño adquiere un olor desagradable, debido a la presencia de organismos secundarios (Acuna *et al.*, 2010).



Figura 6. Colonias de *E. carotovora* en agar nutritivo.

En cuanto a la evaluación microscópica se observó que son bacilos Gram (-), largos y delgados (Nissen, 2008).

4.3.2. *Xanthomonas axonopodis* subsp. *Phaseoli*

Las colonias de *X. axonopodis* son de color amarillo, brillantes, aspecto húmedo, forma irregular, con bordes enteros, elevación convexa y presenta una consistencia de gel (Fig. 7). Su morfología microscópica indica que son cocos Gram (-).

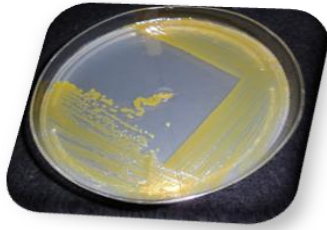


Figura 7. Colonias de *X. axonopodis* en agar nutritivo.

Esta bacteria es la causante de la bacteriosis del frijol, es una enfermedad bacteriana de mayor impacto en este cultivo. Induce una amplia combinación de síntomas: manchas angulares en las hojas, añublo (quemazón), marchitamiento, exudados en el tallo, lesiones en el tallo y muerte (Ramírez *et al.*, 2001). También es la causante de la quema bacteriana o tabaquera de la judía (Melgarejo *et al.*, 2008).

4.3.3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*

La evaluación macroscópica de la bacteria *C. michiganensis* indica que son colonias color amarillo, brillante, de forma irregular, presenta bordes enteros, con una consistencia suave así como un aspecto húmedo (Fig. 8). Su morfología microscópica indica que son bacilos Gram (+).

Esta bacteria produce el chancro bacteriano atacando a tomate y pimiento, los síntomas varían mucho. Sobre tallos, brotes y pedúnculos surgen manchas alargadas, que acaban por romperse, saliendo por ellas un exudado bacteriano. En frutos de tomate y pimientos pueden presentarse pequeñas manchas (“ojo”). En pimientos, se producen manchas cloróticas en las hojas que dan lugar a pequeñas pústulas con el centro marrón. Suele haber defoliaciones. En papas causa necrosis o podredumbres anular bacteriana, así como el trigo, maíz y alfalfa (Quiroz, 2010).



Figura 8. Colonias de *C. michiganensis* en agar nutritivo.

4.3.4. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Las colonias de *C. flaccumfaciens* son de forma circular, de color amarillo a anaranjado, presentan bordes enteros, elevación plana o ligeramente convexas, tienen aspecto húmedo, semiopacas (fig. 9). Su morfología microscópica indica que es Gram (+).

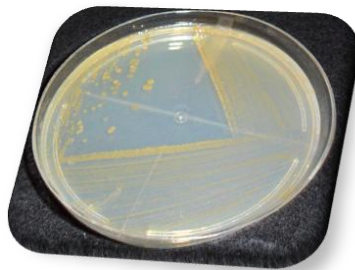


Figura 9. Colonias de *C. flaccumfaciens* en agar nutritivo.

Es una bacteria de crecimiento lento que en medio con dextrosa produce un crecimiento color crema o amarillo mantequilla; causa marchitez transmitida por semilla, de importancia económica sobre soja (Smith *et al.*, 1988), provoca la marchitez bacteriana de la judía, además de que es huésped en otras especies de leguminosas (Melgarejo *et al.*, 2008). Las plantas afectadas se enanizan y las hojas se marchitan; la marchitez puede aparecer en plantas de todas las edades, desde plántula a madurez (Smith *et al.*, 1988).

Cuadro 8. Evaluación microscópica, macroscópica y daños ocasionados por bacterias fitopatógenas.

Bacteria	Evaluación microscópica	Evaluación macroscópica	Daños que ocasiona
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Carotovora</i>	Bacilos Gram (-), largos y delgados	Colonias color blanquecino a crema brillantes, forma circular, bordes enteros, elevación convexa, consistencia mucoide (gel), aspecto húmedo	Putridión blanda, necrosis vascular y marchitez en la papa.
<i>Xanthomona axonopodis</i> subsp. <i>phaseoli</i>	Cocos Gram (-)	Colonias color amarillo, brillantes, forma irregular, bordes enteros, elevación convexa, aspecto húmedo y consistencia de gel.	Bacteriosis del frijol, quema bacteriana o tabaquera de la judía.
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i>	Bacilos Gram (+)	Colonias color amarillo, brillante, forma irregular, bordes enteros, consistencia suave, aspecto húmedo.	Chancro bacteriano atacando a tomate y pimiento
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Gram (+)	Colonias color amarillo a anaranjado, forma circular, bordes enteros, elevación plana o ligeramente convexas, aspecto húmedo, semiopacas.	Marchitez transmitida por semilla sobre soja, marchitez bacteriana de la judía.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS (ELC) DE *PSEUDOMONAS*, *ENTEROCOCCUS* Y *LACTOBACILLUS*.

Se ha señalado que los antagonistas microbianos no poseen un único modo de acción, y no es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los fitopatógenos.

En las pruebas de determinación de la capacidad inhibitoria del extracto libre de células de *Pseudomonas* contra *C.michiganensis*, *E. carotovora*, *X. axonopodis* y *C. flaccumfaciens* no se presentó efecto alguno, esto puede deberse a que el mecanismo de acción para inhibir a las bacterias fitopatógenas no es por medio de los metabolitos producidos por la célula. Es por eso que no se muestra ninguna gráfica. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Quiroz (2010), quien al realizar pruebas *in vitro* utilizando extracto libre de células de cepas de *Pseudomonas* para inhibir bacterias

fitopatógenas sus resultados fueron negativos, ya que éste no es el modo de acción de las *Pseudomonas*.

Para el caso de las pruebas de inhibición realizadas con los *Enterococcus* sólo la cepa MII-2 tubo poder de inhibición, la cual ejerció sobre dos bacterias fitopatógenas *E.carotovora* y *X. axonopodis* (Figuras 10 y 11).

Moragues *et al.* (2003) caracterizaron sobrenadantes antibacterianos obtenidos de tres cepas de *Enterococcus* y comprobaron que ejercen actividad inhibitoria sobre cepas de especies bacterianas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. subtilis*) y Gram-negativas (*Pseudomonas sp.* y *Vibrio cholerae* 01).

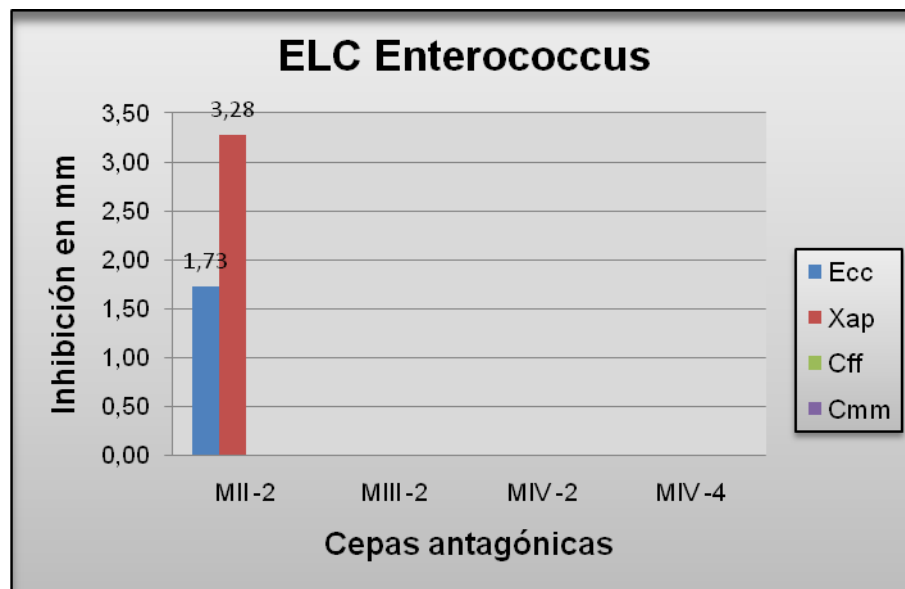


Figura 10. Promedio de halo de inhibición del extracto libre de células de las cepas de *Enterococcus* contra bacterias fitopatógenas.

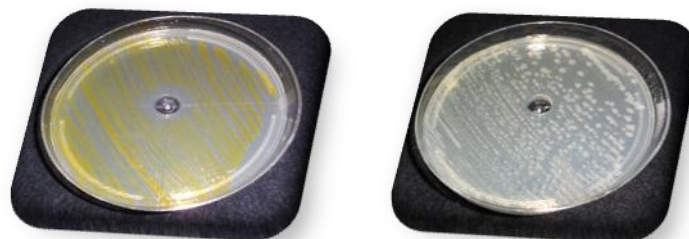


Figura 11. Halos de inhibición del extracto libre de células de las cepas de *Enterococcus* contra *Xanthomonas axonopodis* y *Erwinia carotovora*.

En las pruebas de inhibición realizadas con los *Lactobacillus* las dos cepas utilizadas tuvieron poder de inhibición sobre tres bacterias fitopatógenas las cuales fueron: *E. carotovora*, *X. axonopodis* y *C. michiganensis*. La cepa 1a fue la que tuvo mayor halo de inhibición en promedio con respecto a la cepa 4b (Figuras 12 y 13).

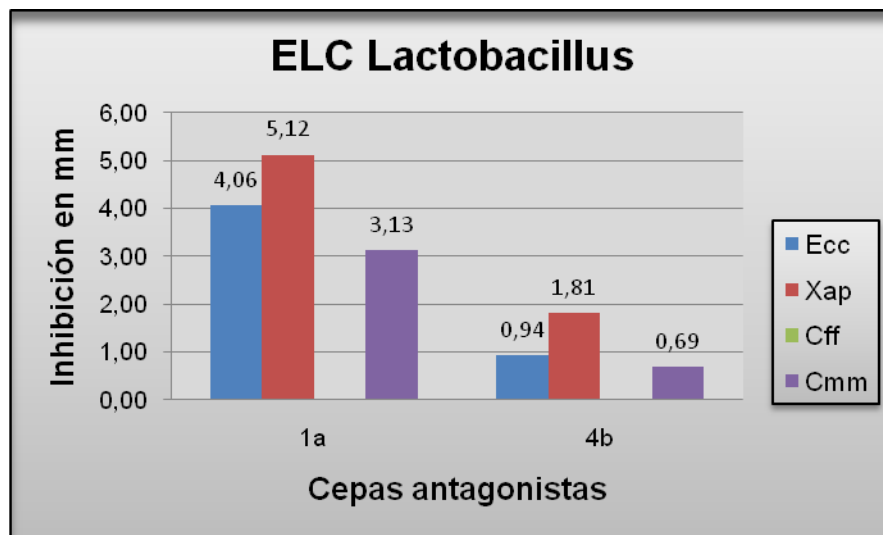


Figura 12. Promedio de halo de inhibición del extracto libre de células de las cepas de *Lactobacillus* contra bacterias fitopatógenas.

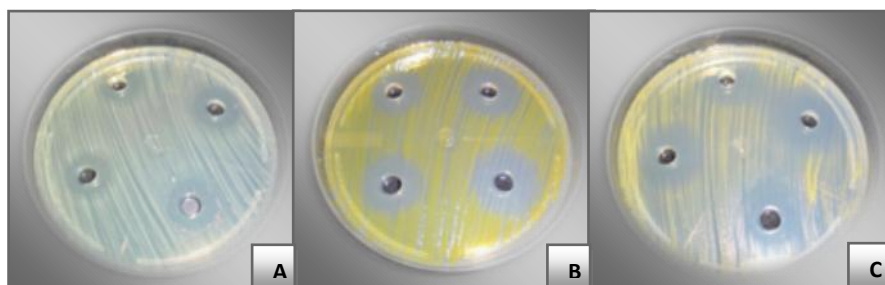


Figura 13. Halos de inhibición del extracto libre de células de la cepa 1a contra: A) *Erwinia carotovora*, B) *Xanthomonas axonopodis* y C) *Clavibacter michiganensis*.

4.5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DEL CONCENTRADO CELULAR (CC) DE *PSEUDOMONAS* Y *ENTEROCOCCUS*.

Las cepas de *Pseudomonas* utilizadas en las pruebas de inhibición nos dieron como resultado que sólo dos cepas actuaron inhibiendo a algunas bacterias fitopatógenas (Figuras 14 y 15), la cepa M6a inhibió a *X. axonopodis*, *C. flaccumfaciens* y *C. michiganensis* y la cepa M1f solo inhibió a la bacteria fitopatógena *X. axonopodis*. Las demás cepas no inhibieron a ninguna bacteria fitopatógena.

Quiroz (2010), demostró que 3 cepas diferentes de *Pseudomonas* inhibían bacterias fitopatógenas (*C. michiganensis*, *E. carotovora*, *X. axonopodis*).

Trujillo *et al.* (2007) probaron que cepas de *Pseudomonas* ejercen efecto antagónico e inhibitorio ante los hongos de cultivos de arroz *Fusarium* sp. y *Curvularia* sp., también en los hongos de cultivos de maíz *F. oxysporum* y *A. alternata*. La forma de inhibición es mediante la interacción directa con el patógeno e inducción de resistencia para este tipo de bacterias y hongos.

Es de enfatizar que aunque no se tienen muchos estudios del efecto de *Pseudomonas* sobre bacterias fitopatógenas (*E. carotovora*, *X. axonopodis*, *C. flaccumfaciens* y *C. michiganensis*), Osorio *et al.* (2009) reportaron que se presentó inhibición del crecimiento de las bacterias *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y *Pseudomonas cichorii* con extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.), nuez (*Carya illinoensis*) y granada (*Púnica granatum*) a diferentes concentraciones. El mayor efecto inhibitorio se observó con el extracto de hojas de gobernadora (0.77 ppm), seguida del extracto de nuez (0.20 ppm) y por último el extracto de granada (0.21 ppm).

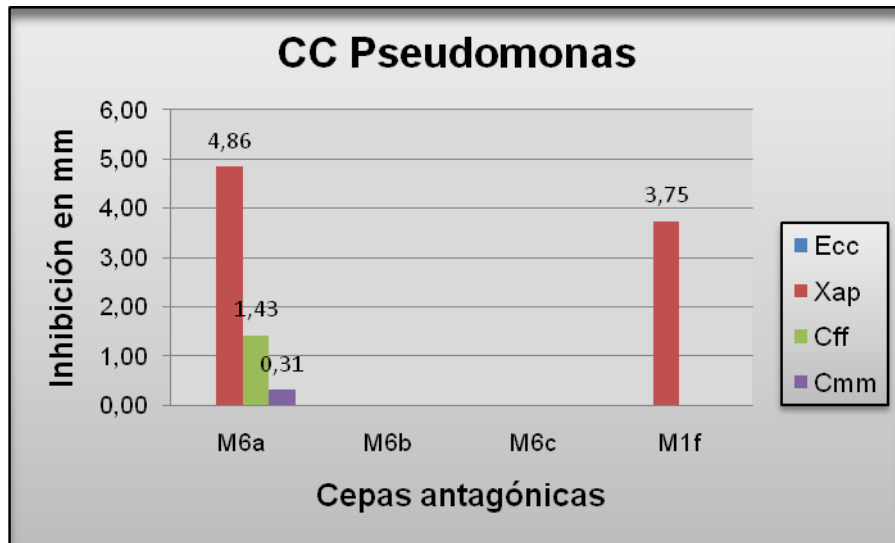


Figura 14. Promedio de halo de inhibición del concentrado celular de las cepas de *Pseudomonas* contra bacterias fitopatógenas.

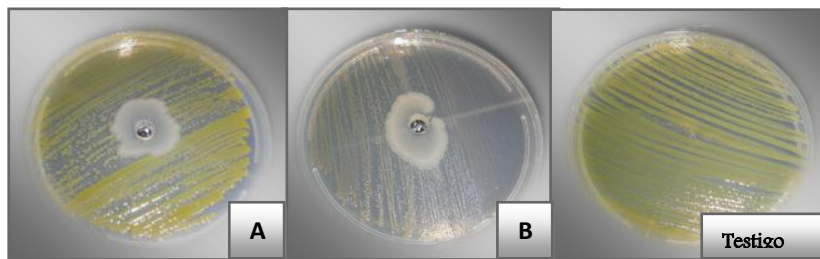


Figura 15. Halos de inhibición del concentrado celular de la cepa M6a contra: A) *X. axonopodis*, B) *C. flaccumfaciens*.

En la pruebas de inhibición realizadas con las cepas del concentrado celular de los *Enterococcus* indican que las cuatro cepas utilizadas ejercieron poder de inhibición sobre la bacteria fitopatógena *X. axonopodis*, además, solo las cepas MII-2 y MIII-2 inhibieron a *E. carotovora* y *C. michiganensis*. Y la bacteria *C. flaccumfaciens* no fue inhibida por ninguna de las cuatro cepas de *Enterococcus*.

La cepa MII-2 fue la que tuvo el promedio de halo de inhibición mayor sobre las bacterias fitopatógenas que inhibió de entre las demás cepas (Fig. 16).

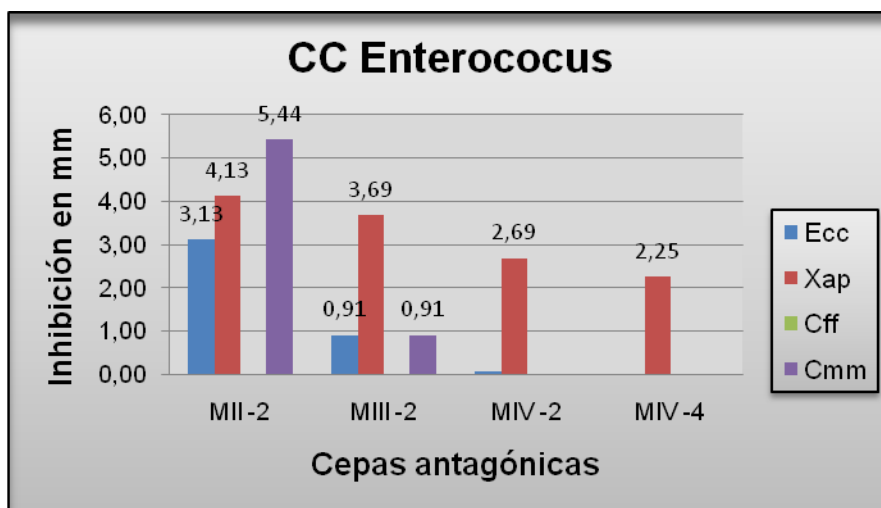


Figura 16. Promedio de halo de inhibición del concentrado celular de las cepas de *Enterococcus* contra bacterias fitopatógenas.

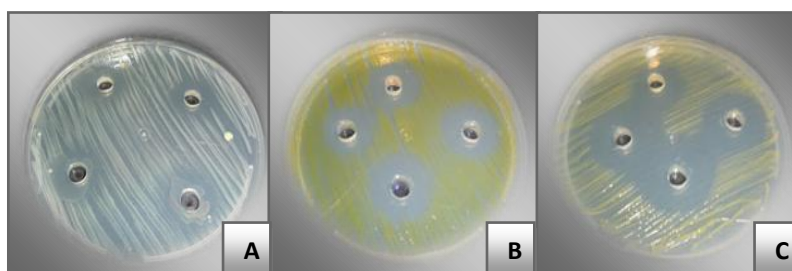


Figura 17. Halos de inhibición del concentrado celular de la cepa MII-2 contra: A) *E. carotovora*, B) *X. axonopodis*, C) *C. michiganensis*.

4.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de inhibición realizadas con el concentrado celular y el extracto libre de células sobre las bacterias fitopatógenas, se obtuvieron 6 combinaciones, a los que se les llamó tratamientos. De entre los cuales los tratamientos 1, 2 y 3 eran a base de extracto libre de células y los tratamientos 4, 5 y 6 a base de concentrado celular.

Los tratamientos 3 y 5 fueron los que inhibieron mas bacterias fitopatógenas las cuales fueron: *E. carotovora*, *X. axonopodis* y *C. michiganensis* (fig. 18).

Además, de que tuvieron el mayor promedio de inhibición de entre los demás tratamientos.

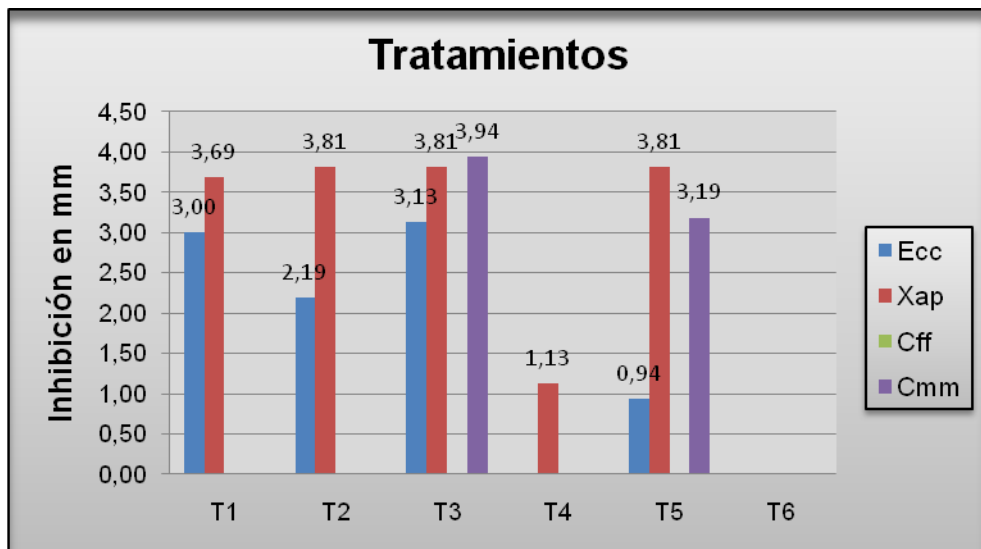


Figura 18. Promedio de halo de inhibición de los tratamientos contra bacterias fitopatógenas.

4.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LAS FORMULACIONES.

Con base a los resultados obtenidos anteriormente se procedió a obtener dos formulaciones una a base de extracto libre de células (ELC) y la otra a base de concentrado celular (CC)

En las pruebas de inhibición realizadas con las 2 formulaciones nos indica que la formulación a base de ELC inhibió a *E. carotovora*, *X. axonopodis* y *C. michiganensis* mientras que la formulación a base de CC solo inhibió a *E. carotovora* y *X. axonopodis*.

De manera que la formulación seleccionada como mejor fue la de ELC. Ya que logró inhibir a 3 bacterias fitopatógenas y además tuvo mayor promedio de halo de inhibición.

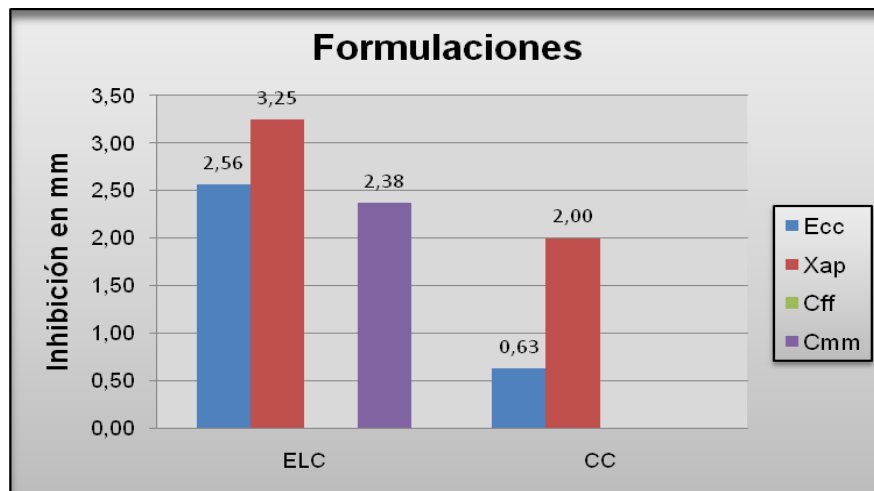


Figura 19. Promedio de halo de inhibición de las formulaciones contra bacterias fitopatógenas.

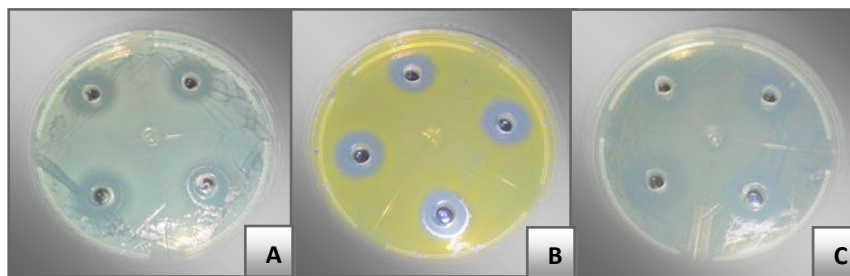


Figura 20. Halos de inhibición de la formulación a base de ELC contra: A) *E. carotovora*, B) *X. axonopodis*, C) *C. michiganensis*.

5. CONCLUSIONES

Las dos cepas utilizadas de *Lactobacillus* fueron capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias fitopatógenas del tipo *E.carotovora*, *X. axonopodis* y *C. michiganensis* evaluándose únicamente en extractos libres de células.

El tratamiento 3 (3:1); 0.75 mL (1a): 0.25 mL (MII -2) a base de extracto libre de células inhibió a las bacterias fitopatógenas *E.carotovora* con un halo de 3.13 mm, *X. axonopodis* con un halo de 3.81 mm y *C. michiganensis* con un halo de 3.94 mm.

Se obtuvo una formulación a base de extracto libre de células; 15 mL (1a) 5 mL (MII-2), la cual inhibió a las bacterias fitopatógenas *E.carotovora* con un halo de 2.56 mm, *X. axonopodis* con un halo de 3.25 mm y *C. michiganensis* con un halo de 2.38 mm.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acuna B.I., Paola Riffo F. (2010). Pie Negro y Potencial de Infección Latente (*Erwinia spp*) en el Cultivo de la Papa en la Decima Región. Instituto de investigaciones Agropecuarias-Centro regional de Investigación Remehue. Boletín Técnico N° 184.
- Agrios, C. 1996. Fitopatología. Editorial Limusa. 838 p.
- Aguirre-Medina. J. F., Irizar-Garza, M.B., Duran-Prado, A.Grajeda-Cabrera, O.A., Peña-del Rio, M.A., Loredó-Osti, C, y Gutiérrez-Baeza, A. (2009). Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. 86 p.
- Alomar Oscar, Albajes Ramón (2005). Control Biológico de Plagas: Biodiversidad Funcional y Gestión del Agroecosistema. Biojournal.net, 1.
- Badii, M. H. y J. L. Abreu (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas. Daena: International Journal of Good Conscience. 1(1): 82-89. ISSN 1870-557X.
- Botina A., B., Zimmermann, B., & Vanegas L., M. (2008). Caracterización Preliminar de Compuestos Antilisteriales Producidos por Bacterias Ácido Lácticas Nativas. *Revista MVZ Córdoba*, 13 (3), 1476-1485.
- Chirinos J., Leal A., Montilla J., (2006). Uso de Insumos Biológicos como Alternativa para la Agricultura Sostenible en la Zona Sur del Estado Anzoátegui. Revista digital CENIAP.11p.
- Collins & Jones (2010). Hojas de Datos Sobre Organismos Cuarentenarios para los Países Miembros del COSAVE. *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens*. Disponible en http://www.cosave.org/admin/files/bc499d4d93305fa_4.pdf (15 de diciembre de 2010).
- Cortés-Genchi P., Maruris-Reducindo M., Gómez-Ruiz V. (2008). Diagnostico de Fitopatogenos de la Col Brassica Oleracea L. en Cultivos del Valle de Tixtla, Guerrero, México. Laboratorio de Fitopatología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.
- Frías Alina, Villa Pilar María, Torres Esmérida (2001). Metabolitos Antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS: Influencia de la Fuente de Carbono en la Síntesis. Artículo "Bio Tecnología" Vol. 10 No. 1: 42-49

- Kim DS., Cook RJ., Weller DM. (1997). *Bacillus* sp. L324-92. For biological control of three root disease of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* (87):551-558
- Luna-Rodríguez M., Toledo G. A., Iglesias-Andreu L. G. (2009). Identificación de Enterobacterias Causantes de Pudriciones Blandas en *Cucurbita pepo* L. en Veracruz, México. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA* 27 (1), 64-68.
- Macek, K y McAllister (1970). Effects of pesticides on nine fish species. *Trans. Am. Fish Soc.* 99, 20
- Martínez-Carrillo J.L. (1998). Generalidades de las mosquitas blancas. En: Inifap (Ed.) *Temas selectos para el manejo integrado de la mosquita blanca*. Memoria científica No. 6. INIFAP. Campo Exp. Valle del Yaqui. p. 27-30
- Melgarejo Nárdiz P., García-Jiménez J., Jordá Gutiérrez M. C., López González M.M., Andrés Yebes M. F., Durán-Vila N. (2004-2008). *Patógenos de Plantas Descritos en España*. Editorial Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Segunda Edición. 262-
- Milagros L. M. (2009). Especial Grupo de Microbiología de Plantas, Bacterias Fitopatogenas: ¿Es posible su prevención? IVIA-Laboratorio de Bacteriología. "Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias".
- Moragues L.G., Rozeck C.B, Simonetta A.C. (2003). Caracterización Preliminar de Sustancias Tipo Bacteriocinas Producidas por Cepas de Enterococos. *Revista Argentina de Lactología - N°22; 21-32*
- Morales Ibarra Marcel (2010). Análisis. Los Biofertilizantes. Una Alternativa Productiva, Económica y Sustentable. Disponible http://www.pa.gob.mx/publica/rev_36/Marcel%20Morales%20Ibarra.pdf (30 de noviembre de 2010).
- Nissen M.J., Carrión S., Ciampi P., Costa M., Fuentes R.P., Schobitz T.R. (2008). Biocontrol de *Erwinia carotovora* EN CALA (*Zantedeschia* sp.). Instituto de Ingeniería Agraria y Suelos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile. *AGRO SUR* 36(2): 59-70
- Olalde V. / Aguilera L. (1998). Microorganismos y Biodiversidad. *Terra Latinoamericana*, 16 (3) 289-292. ISSN 0187-5779. México.
- Osorio-Hernández E., Ventura-Sobrevilla Janeth M, Flores-Dávila M., Lara Faustino, Rodríguez-Herrera Raúl, Hernández-Castillo F. D. y N. Aguilar Cristóbal (2009). Efectividad Biológica de Extractos Polifenólicos Contra Bacterias Fitopatógenas. *Revista de Divulgación Científica* (Citado 22 de enero de 2011), Disponible en <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx.pdf>

- OTRI (2010). Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación, Disponible <http://www.ua.es/otri/es/areas/ttot/ttototac.htm> (11 de noviembre de 2010)
- Porcuna J.L., Boix I., Ocon C., jimenez A. (2010). Revista Online. Control biológico de plagas mediante el manejo de insectos útiles: los insectarios de la CAPA. <http://www22.sede.embrapa.br/snt/piue/Controle%20Biologico.pdf>
- Quiroz S. V., Ferrera R. C., Alarcón A., Lara H. M. (2008). Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia Hongos Filamentosos que Afectan al cultivo del Ajo. Revista Mexicana de Micología, Junio, Volumen 026, Sociedad Mexicana de Micología, Xalapa, México. pp 27-34
- Ramírez P. V., Castillo G.F., Cruz I.S., Tlalpal B.B., Ramírez R.I., García E.R., Sandoval I.J., (2001). Producción Masiva de *Xanthomonas Axonopodis* PV. Phaseoli. Agrociencia, Septiembre-Octubre. Colegio de Postgraduados: 35 (005), 575-581.
- Santillana Villanueva N.1 (2006). Producción de Biofertilizantes Utilizando *Pseudomonas* sp. Ecología Aplicada, 5(1,2) 87-91. ISSN 1726-2216
- Smith I.M., Dunez J., Lelliott R.A., Phillips D.H., Archer S.A. (1988). Manual de Enfermedades de las Plantas. Ediciones Mundi-Prensa. Pp.216-229
- Toledo Ramírez D. B. (2004). Evaluación *in vitro* del efecto de cepas nativas de la bacteria *Bacillus* sp. En el Biocontrol de la bacteria *Erwinia carotovora*. Memoria de Titulo. Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía.
- Torres LA., Wong W., Miguel A., Fernandez A., Amat Z. (2001). Actividad antagonica de especies de *Bacillus spp* contra *Rizhoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Revista Fitosanitaria Aceptado para publicación.
- Trujillo I, Díaz A., Hernández Annia y Heydrich Mayra, (2007). Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. Rev. Protección veg. Vol. 22 no. 1: 41-46
- VALENCIA-CANTERO, Eduardo; VILLEGAS-MORENO, Javier; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, Juan Manuel; PEÑA-CABRIALES, Juan José y FARÍAS-RODRÍGUEZ, Rodolfo (2005). Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* Zum80 incapaces de producir sideróforos. TERRA LATINOAMERICANA [en línea], vol. 23 [citado 2011-01-21]. Disponible en Internet: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57323111>. ISSN 0187-5779.

- Vázquez Zabala Liliana Gpe. (2011). Microbiología, Pseudomonas. Disponible <http://www.itescham.com/Syllabus/Doctos/r1985.PDF> (Citado 14 de enero de 2011).
- Ventura P. M. Gabriela (2007). Identificación de Bacterias Fitopatógenas en Cultivos de Papaya (*carica papaya*) en las Fincas el Pantanal y el Subín, Ubicadas en el Departamento de el Petén, Guatemala. Informe de tesis. Universidad de san Carlos de guatemala facultad de ciencias químicas y farmacia.
- Vidaver, A.K. and P.A. Lambrecht 2004. Las Bacterias como Patógenos Vegetales. Trans. Ana María Romero. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0601-01
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/BacteriaEspanol.aspx>