

87  
zej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“CONTROL BIOLÓGICO DE *Monilinia fructicola*  
CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN CAFE, POR MEDIO DE  
*Bacillus*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L Ó G O

P R E S E N T A

**JOSEFA LAGUNAS LAGUNAS**



MEXICO, D. F.

1994

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNION ESCOLAR

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
División de Estudios  
Profesionales  
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo  
revisado el trabajo de tesis que realizó LA pasante JOSEFA  
LAGUNAS LAGUNAS

con número de cuenta 8652335-0 con el título: "CONTROL  
BIOLOGICO DE Monilinia fructicola CAUSANTE DE LA PUDRICION CAFE,

POR MEDIO DE Bacillus"

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-  
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -  
BIOLOGO -

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

FIRMA

DOCTOR JAVIER ANTONIO TARQADA RAMIREZ

Director de Tesis

BIOLOGO ABEL MARTINEZ OCAMPO

Q.B.P. TERESA GUZMAN LEGORRETA

DOCTOR JORGE RAMIREZ GONZALEZ

Suplente

BIOLOGO CARLOS ALBERTO CASTILLO POMPEYO

Suplente

Ciudad Universitaria, D.F., a 26 de ABRIL

de 199 4

## **AGRADECIMIENTOS**

*Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Depto. de Microbiología del IPN, bajo la dirección de la Q.B.P. Teresa Guzmán Legorreta a quien agradezco por su dirección y por permitirme la utilización de las instalaciones. Parte sustancial del trabajo de experimentación se realizó en el Instituto de Química de la UNAM, contando con la valiosa asesoría del Dr. Javier Taboada.*

*Por lo anterior, ahogo patente mi agradecimiento al IPN, y particularmente a la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de realizar un sueño.*

**A mi sinodales**

*Biol. Abel Martínez, Dr. Jorge González, Biol. Carlos C. Pompeyo, por su valiosa cooperación en la revisión del escrito y sus atinadas sugerencias para mejorar este trabajo.*

**Al Prof. José Luis Cortés**

*Por su amistad y consejos para la realización este trabajo.*

**Al Dr. Roberto Guadarrama y a los miembros del Instituto para la Planeación del Desarrollo, por su apoyo.**

*El concluir el trabajo de tesis, representa tan sólo una parte de un proyecto de vida, una meta fijada desde que hace muchos años, por eso hoy quiero agradecer a mucha gente que ha contribuido a mi formación como persona y profesionista.*

**A Juan Lagunas Palomino (Mi Padre)**

*Por su fortaleza, su espíritu aventurero que me heredo.*

**A Ma. Concepción Lagunas Ramos (Mi Madre)**

*Por su constancia y su tenacidad que siempre la ha caracterizado.*

**Angelina, María, Martha, Evelia, Francisca y Nena (Mis Hermanas)**

*Por que siempre estemos unidas, por su apoyo moral y económico que siempre me brindaron, por ser mis hermanas y amigas.*

**A Miguel, Juan, Guillermo, Jorge, Leoncio y Vicente (Mis Hermanos)**

*Por el apoyo que siempre me brindaron, por ser un ejemplo a seguir, por su cariño.*

**A toda mi familia**

*Por permanecer unidos a pesar de las adversidades que hemos sufrido.*

**Abel**

*Por reconoceme y ayudarme a conocerme, por su amistad, por compartir sueños y bellos momentos, por su incondicional ayuda en la corrección de la redacción de este trabajo.*

***A mis amigos Carlos, Isabel, Leonardo, Jesús, Jorge, Pilar, Piña, Roberto, Verónica.***

*Por ofrecerme su amistad, por crecer juntos, por haber compartido diferentes etapas de mi vida.*

***A mis profesores, Dolores Arévalo "Lolita", Yolanda Robles, Ramón Lerma, Maximiliano Valencia, Javier Osante, Alberto Siciliano, Arturo Piña.***

*Por contribuir a mi formación profesional*

***Sanín***

*Por la corrección de estilo de este trabajo y por ser mi cuñado.*

***A los negros***

*Por haber compartido diez años de amistad.*

***A mis compañeros de la Facultad de Ciencias.***

***A la Coordinación de Laboratorios de la Facultad de Ciencias, UNAM.***

***En conclusión, a toda mi familia, amigos, profesores, conocidos y otros que se me escapan, por que gracias a ellos soy***

***Josefa (Xoloche)***

## CONTROL BIOLÓGICO DE Monilinia fructicola POR MEDIO DE Bacillus.

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
1.1	Antecedentes de la producción de durazno en México	3
1.2	Importancia de la pudrición café del durazno y otras enfermedades	5
1.3	El género <u>Monilinia</u> como patógeno causante de la pudrición café y ciclo de vida de <u>Monilinia fructicola</u>	8
1.4	Control de la enfermedad	9
	a) Físico	9
	b) Químico	9
	c) Biológico	12
1.5	Función de los antibióticos	15
1.6	<u>Bacillus</u> como productores de antibióticos	17
<b>II</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
2.1	Objetivo general	19
2.5	Objetivos particulares	19
<b>III</b>	<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>20</b>
3.1	Aislamiento, purificación e identificación de la cepa ( <u>Monilinia fructicola</u> )	20
3.2	Aislamiento y purificación de bacterias antagonicas	20
3.3	Pruebas de actividad antagonica de las bacterias Gram positivas contra <u>Monilinia fructicola</u>	22
3.4	Identificación de las especies de <u>Bacillus</u> que presentan antagonismo	22

3.5	<i>Producción y obtención del extracto de especies que presenten mayor halo de inhibición</i>	32
3.6	<i>Valoración del extracto crudo contra <u>Monillinia fructicola</u></i>	33
3.7	<i>Análisis estadístico</i>	36
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS</b>	41
4.1	<i>Aislamiento y purificación de <u>Monillinia fructicola</u></i>	41
4.2	<i>Aislamiento y purificación de bacterias</i>	41
4.3	<i>Identificación de las especies que presentan antagonismo</i>	41
4.4	<i>Producción y obtención del extracto crudo de B. licheniformis (B2) y B. licheniformis (ATCC9980)</i>	41
4.5	<i>Valoración del extracto crudo contra <u>Monillinia fructicola</u></i>	42
4.6	<i>Análisis de resultados</i>	50
<b>V</b>	<b>DISCUSION</b>	58
<b>VI</b>	<b>CONCLUSION</b>	65
<b>VII</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	66
<b>ANEXO 1.1</b>		77
<b>ANEXO 1.2</b>		81
<b>ANEXO 1.3</b>		83
<b>ANEXO 1.4</b>		85
<b>ANEXO 1.5</b>		88
<b>ANEXO 2</b>		90

## CONTROL BIOLÓGICO DE Monilinia POR MEDIO DE Bacillus.

### I. INTRODUCCION

#### 1.1 Antecedentes de producción de durazno en México

El durazno (*Prunus persica*, Batsch) se consideraba originario de Persia, de donde deriva su nombre, pero investigaciones recientes parecen indicar que es originario de China. A partir de la Edad Media el durazno fue introducido en Europa durante las Cruzadas, desde entonces este fruto se cultivó en el viejo Continente (SARH-INIA, 1982).

El durazno fue introducido a México por los españoles en el siglo XVI. Gonzalo Fernández de Oviedo, en su *Historia General y Natural de Indias*, menciona que introdujo de Toledo, España, semillas de durazno y melocotón, sembrándolas en México y otros países templados y cálidos de América (Comisión Nacional de Fruticultura, 1991).

Actualmente es uno de los cultivos más difundidos en todos los climas templados de la tierra ya que sus frutos además de tener un alto valor nutritivo, son frutos succulentos al paladar. Los frutos se consumen en estado fresco o seco; sirven para la preparación de mermeladas, jaleas, gelatinas y conservas, aunque también pueden ser utilizadas para preparar jarabes o como saborizantes (Comisión Nacional de Fruticultura, 1991).

El contenido de azúcares del fruto es menor al 9%, pero contiene una gran cantidad de sales minerales, así como vitaminas, principalmente A y B (Tabla 1.1).

Son numerosas las variedades del durazno, se cuantifican más de 200, y su clasificación se hace, principalmente, en base a la forma del fruto, color, su mayor o menor pubescencia, adherencia al hueso y su forma, además de ciertas características del árbol como son forma, longitud y color de las hojas, y la forma de las flores; las principales variedades de durazno son *Prunus persica* *compresa*, *Prunus persica* *nubifera*, y algunas razas como Raza del Sur de China (Grupo Honey), Raza del Norte de China, Raza Persa (SARH, 1993).

En México este fruto se cultiva en 26 estados, en las regiones templadas. Los estados más importantes en cuanto a producción son Chihuahua, Michoacán, Zacatecas, México, Puebla, Sonora, Aguascalientes, Durango, Chiapas, Guanajuato, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Tlaxcala, Veracruz y entre otros (Tabla 1.2).

TABLA 1.1

VALOR NUTRITIVO DEL DURAZNO BLANCO Y AMARILLO EN 100 gr DE PESO NETO.

CONTENIDO	DURAZNO	
	BLANCO	AMARILLO
PORCION COMESTIBLE	0.88	0.88
ENERGIA (Kcal)	56.0	46.0
PROTEINAS (gr)	1.20	0.90
GRASAS (gr)	0.20	0.10
CARBOHIDRATOS (gr)	14.0	11.7
CALCIO (gr)	23.0	16.0
HIERRO (Mg.)	2.10	2.10
TIAMINA (mg)	0.05	0.02
RIBOFLAVINA (mg)	0.05	0.04
NIACINA (mg)	0.70	0.60
AC. ASCORBICO (mg)	26.0	19.0
RETINOL (Microgramos eq.)	3.00	22.0

Fuente: Valor Nutritivo de los Alimentos, 1987.

TABLA 1.2

PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE DURAZNO

ESTADO	MUNICIPIO
CHIHUAHUA	CASA GRANDES, NUEVO CASAS GRANDES, BUENA VENTURA, BACHINIVA, CHIHUAHUA Y ALDAMA.
MICHOACÁN	ZITAUARO, PATZCUARO, TACAMBARO Y TLALPUJANIA.
ZACATECAS	JEREZ, NOCHISTLAN DE MEJIA, OJO CALIENTE, LUIS MORA, GRAL. ENRIQUE ESTRADA Y CALERA.
MEXICO	COMTEPEC MARINAS, VILLA GUERRERO, VALLE DE BRAVO, TENANCIINGO Y EL ORO.
SONORA	ALAMOS, BACDACHI, HUACHINERA, OMAVAS Y BAVISPE.
PUEBLA	ZACATLAN, TEZIUTLAN, HUEJOTZICO, TETELA DE OCAÑO Y ZACAGOXTLA.
AGUASCALIENTES	JESUS MARIA, RINCON DE RONDOS, PABELLON, AGUASCALIENTES, ASIENTOS Y TEPEZALAPA.

Fuente: Información Básica Sistema-Producción Durazno, SARH, 1993.

De los estados productores Chihuahua es el que presenta mayor producción para 1991 con el 18.57 %; le siguen Michoacán con 17.74 %; Zacatecas con 16.87 %; Edo. de México con 8.87 %; Sonora con 6.37%; Puebla con 5.02% y Aguascalientes con 4.79% (Figura 1-1).

A nivel nacional la producción de durazno se ha mantenido a lo largo de la década de 1980-1991 entre 202,9437 toneladas (producción de 1988) y 132,234 toneladas en 1991, con un valor de 264,892.085 de nuevos pesos, cabe mencionar que en este año se registró la más baja producción de la década (INEGI, 1992; Fig. 1-2).

Las causas de esta baja producción estriban en varios factores que van desde el entorno económico, con el aumento en las importaciones por nuestro país; la baja en las exportaciones debido a las barreras fitosanitarias; problemas en el campo, inviernos inestables, plantaciones no homogéneas con maduración del fruto desigual, problemas de comercialización, mal manejo en postcosecha, además de que un alto porcentaje de las pérdidas se debe a plagas y enfermedades, que además de afectar la producción, aumentan los costos de producción. Lo que ha generado que muchos productores, cambien a otros cultivos o actividades (SARH-INIA, 1982).

## 1.2 Importancia de la pudrición café y otras enfermedades en la producción de durazno.

Las principales enfermedades que atacan al durazno son la Verrucosis (*Taphrina deformans*); Chahubdie (*Tranzchella punctata*); Roya (*Cletoresporium carpophilum*), Cenicilla u oidium (*Sphaerolecta pannosa*); Tizón bacteriano (*Xanthomonas pruni*); Cáncer de ramas y corteza (*Cytospora* sp., *Cambiosistis* sp.) y la Pudrición café (*Monillinia fructicola*).

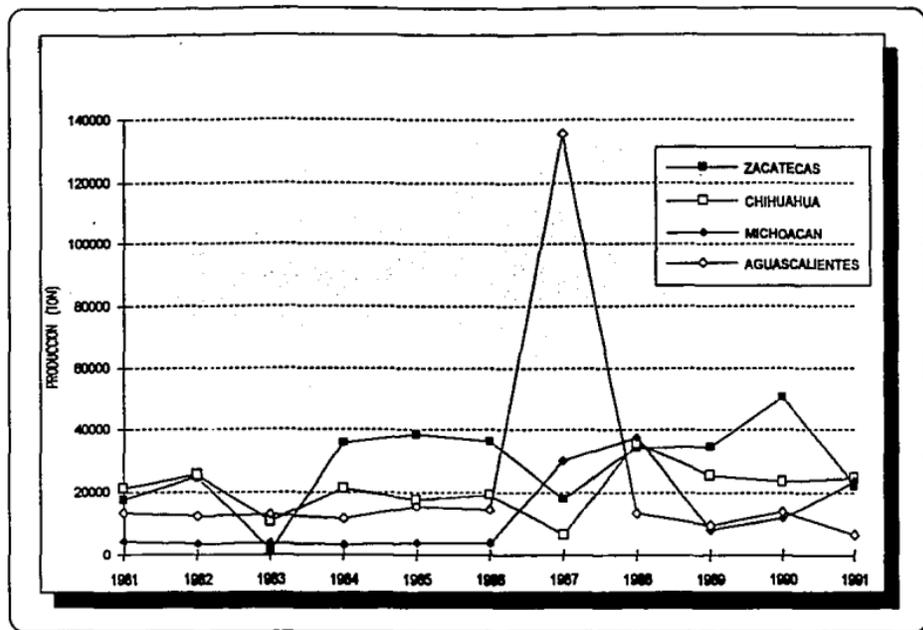
La pudrición café se presenta en todas las regiones del mundo donde se cultivan frutos drupáceos como duraznos, ciruelas, almendras, manzanas, peras y cerezas (Northover y Biggs, 1990), ocasionando daños considerables, con pérdidas hasta del 75% de la producción (Agris, 1985).

La incidencia de la pudrición café varía de acuerdo a los diferentes estadios de desarrollo de la fruta, los niveles de la enfermedad dependen de los cambios en las estaciones, además de las condiciones ambientales.

Los síntomas de esta enfermedad aparecen sobre las inflorescencias y frutos. En los pétalos, estambre o pistilos se observan manchas pardas que se extienden rápidamente envolviendo a toda la flor y a su pedúnculo. Estos órganos se arrugan y secan, quedando una masa putrefacta. Los síntomas en los frutos, aparecen cuando estos se aproximan a su madurez. En ellos aparecen pequeñas manchas circulares de color café, las cuales se extienden con gran rapidez en todas direcciones y se cubren rápidamente con ramilletes de color cenizo, los cuales brotan a través de la cáscara del fruto y se esparcen en anillos concéntricos (Agris, 1985).

FIGURA 1-1

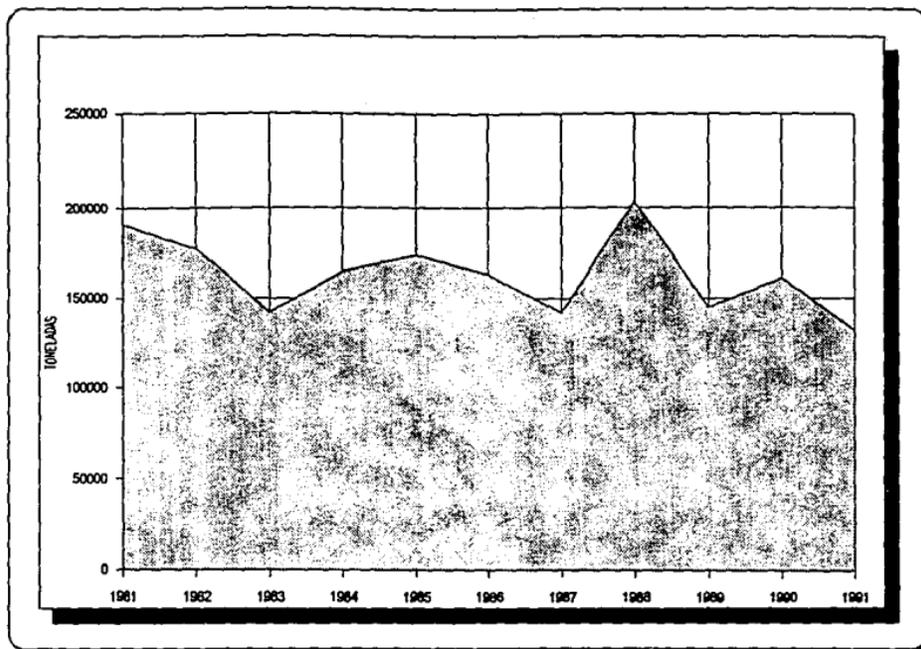
PRINCIPALES ENTIDADES PRODUCTORAS DE DURAZNO  
SERIE HISTORICA



FUENTE: EL SECTOR ALIMENTARIO EN MEXICO, 1992.

FIGURA I-2

COMPORTAMIENTO HISTORICO DE LA PRODUCCION DE DURAZNO 1981-1991



FUENTE: INFORMACION BASICA SISTEMA-PRODUCTO DURAZNO, SARH, 1993.

### 1.3 El género Monillinia como patógeno causante de la pudrición café (ciclo de vida)

La pudrición café es causada por dos hongos Monillinia fructicola y Monillinia laxa. Esta enfermedad varía dependiendo del hospedero específico: Monillinia fructicola es el principal organismo que causa el tizón en la flor y frutos de nectarinas, duraznos, ciruela y de almendras; Monillinia laxa es uno de los principales patógenos que causan la marchitez de la flor de almendras, ciruela y en los frutos de albaricoques (Ogama, et al., 1980).

El ciclo de vida de Monillinia fructicola se manifiesta en dos fases, la fase asexual que es corta y la fase sexual, más compleja y con un período de duración más amplio (figura 1-3).

La infección se lleva a cabo en primavera por ascosporas o por conidios, los que al germinar invaden el tallo, hojas, botones florales y causan su marchitamiento. El micelio crece y alcanza un estado en el cual produce conidióforos largos y ramificados, que rápidamente se rompen en conidios ovales. Este hongo pertenece al género Monillia de los deuteromycetes (fase imperfecta de Monillinia fructicola). Los conidios se desprenden fácilmente y son diseminados por el viento, si alcanzan a un hospedante susceptible, el conidio germina (tubo germinal) e invade el tejido propagando la enfermedad. Nuevos conidios maduran a los pocos días, repitiéndose el ciclo asexual del hongo, en una sola estación se forman varias generaciones de conidios (Alexopoulos y Mims, 1979).

Los frutos son atacados por conidios cuando llegan a la madurez, a través de las bases de los tricomas del fruto, las picaduras de los insectos y otras heridas, formándose manchas morenas y blandas. El micelio se desarrolla, segregando una enzima que disuelve la laminilla media de las células del fruto de modo que los tejidos se deshacen. El micelio invade todo el fruto y este se arruga, se seca, endurece y momifica (Alexopoulos y Mims, 1979).

Cuando los frutos aún no están maduros, son resistentes a la enfermedad, sin embargo la infección está latente o incipiente (Zehr, 1982).

Los frutos se pueden momificar en la planta o pueden caer y permanecer en el suelo durante el invierno. Los frutos momificados que han quedado adheridos a las ramas constituyen en primavera, una fuente de infección (el micelio produce conidios cuando la temperatura ambiental aumenta).

Los frutos que se encuentran en el suelo se entierran parcialmente y después de 2 o 3 años el hongo produce apotecios, los que se obtienen por fecundación de espermactos con ascogonios, aunque esto no se ha observado con precisión (Herrera y Ulloa, 1990).

En la superficie de los frutos momificados aparecen numerosos y pequeños apotecios, con ascas que producen ascosporas que se escapan de manera explosiva, dando el aspecto de polvo en forma de

nubes. El viento es uno de los principales agentes de diseminación a nuevas plantas (Figura 1.3; Ogawa, et al., 1980).

#### 1.4 Control de la enfermedad.

##### a) Control físico

Uno de los primeros controles de la pudrición café es el físico o por prácticas culturales, el cual consiste en realizar las plantaciones de los árboles a una distancia aceptable para disminuir la probabilidad de que el patógeno se transmita con éxito de plantas infectadas a otras no infectadas. Cuando una población de duraznos es muy densa la probabilidad de contaminación es también alta (Atlas, 1990).

Para evitar contaminaciones posteriores, se cortan las ramas que portan las inflorescencias infectadas y los frutos momificados, retirándose del campo agrícola, para de esta forma eliminar cualquier fuente de contaminación como son las esporas y el micelio invernante que son fuente de infección para la siguiente estación (Agris, 1985).

Sin embargo la producción a gran escala de cosechas, no permite que se utilicen métodos físicos, ya que representa un aumento en los costos de producción por mano de obra. Este costo cada vez más alto y la mayor incidencia de patógenos en los monocultivos, han promovido un mayor uso del control químico (Atlas, 1990).

##### b) Control químico

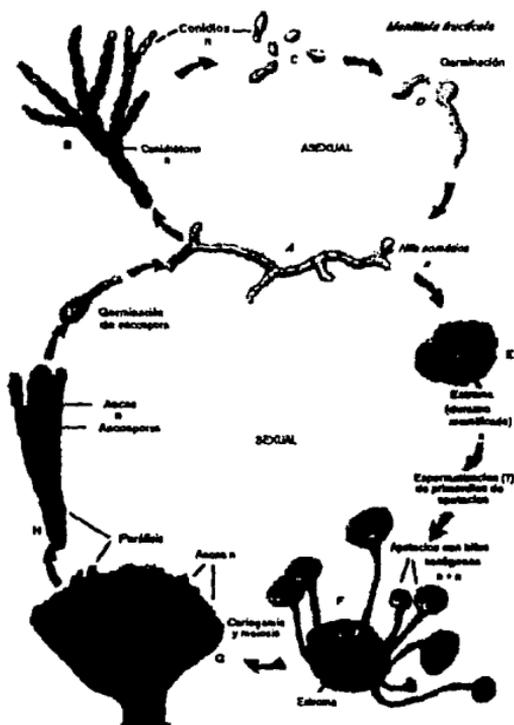
Una de las formas de control de la pudrición café es aplicando fungicidas como captán, dione, azufre, thiram y benzimidazoles, en el momento en que el árbol presenta inflorescencias con el tizón (Tabla 1.3; Ogawa, et al., 1980; Pusey y Wilson, 1984; Vapiner y Deverall, 1984).

Para controlar la enfermedad en los frutos se utiliza captán, thiram, azufre humectable o polvos de azufre, aplicándose sobre los árboles unas semanas antes de la cosecha (Zehr, 1982).

Para el control de la enfermedad en postcosecha se utiliza benomil en solución, los frutos son sumergidos en ella antes de ser almacenados o también se hidrogenfrían antes de refrigerarlos a una temperatura que oscila entre 0-3°C. Otro método utilizado es espolvorear con fungicidas los recipientes donde se empacan los frutos (Agris, 1985; Zehr, 1982; Ogawa, et al., 1980; Tabla 1-3).

FIGURA I- 3

CICLO DE VIDA DE *Monilinia fructicola*



Recientemente se ha utilizado Benomilo-DCNA mezclado con etanol al 70%, el cual disminuye la incidencia de la pudrición café en postcosecha (Falclano et al., 1992).

TABLA 1.3

FUNGICIDAS UTILIZADOS PARA *Monilinia fructicola*

FUNGICIDA	FORMULACION	DOSIS/100LT DE AGUA	LIMITE MAXIMO DE RESIDUOS (PPM)	INTERVALOS DE SEGURIDAD (DIAS)
BENOMILO	PH 50	60-90 g.	15.0	Sin límite
CAPTAFOL	PH 50	2.0-4.0 g.	2.0	1
CAPTAN	SUSP 30	300-500 cc	50.0	Sin límite
CARBENDAZIM	PH 50	50-70 g	15.0	Sin límite
OXICLOURO DE COBRE	PH 85	300-400 g	Exento	Sin límite
ZINEB	PH 50	120-180 g	2.0	1

PH= Polvo humectable; cc: centímetros cúbicos; g: gramos; susp.: suspensión; PPM: partes por millón.  
FUENTE: Manual de Agroquímicos, 1988, SARH.

El uso de nuevos pesticidas para la agricultura se ha incrementado, en 1948, sólo había tres pesticidas para uso agrícola, pero en 1975, se registraron en E.U.A. 1170 plaguicidas, 425 herbicidas, 410 fungicidas y 325 insecticidas y se produjeron 725 millones de kilogramos de plaguicidas orgánicos sintéticos (Atlas, 1990).

En términos de eficacia, economía y control de calidad, los plaguicidas han representado un logro incalculable para aumentar la producción de los cultivos, pero el uso que en ocasiones es desmedido provoca alteraciones de diversa índole en el agua, el suelo y el aire, dañando a la fauna y flora, además contaminando los alimentos (Cook, 1985).

Los plaguicidas exhiben vastas diferencias en cuanto a su tiempo de permanencia en el medio ambiente, y algunos de ellos persisten indefinidamente. Se han detectado insecticidas con hidrocarburos clorados en regiones de la remota Antártida, a miles de kilómetros de distancia del sitio más cercano de su posible aplicación (Restrepo, 1988).

En México se han realizado estudios sobre el contenido de plaguicidas en alimentos. En pescados de agua dulce se han encontrado en concentraciones de hasta cien veces más altas que las consideradas como máximas aceptables. En varias regiones del país, la leche de vaca y sus derivados exceden las tolerancias internacionales en cuanto a contaminados de agentes agroquímicos, en tanto que la leche materna contiene hasta diez clases de contaminantes, entre ellos, DDT, DDE, epóxido de heptacloro, dieldrín, BHC, algunos de los cuales colocan a México en el primer sitio en el mundo debido a las altas concentraciones presentadas (Restrepo, 1988).

El desarrollo de resistencia o tolerancia de los patógenos ha ocasionado un aumento en las dosis de los pesticidas para combatirlos, con el consecuente riesgo innecesario de intoxicación humana, ya que la presencia de residuos químicos en alimentos, así como su presencia indefinida en el ambiente, limitan la utilización en este tipo de control en cultivos (Norman, 1988; Chalutz and Wilson, 1990).

Recientemente se ha encontrado que *Monilinia fructicola* ha adquirido resistencia a los fungicidas utilizados para su control (Katan y Shabl, 1981; Shabl and Ogawa, 1981; Zehr, 1982), en especial a los benzimidazoles. En 1975 fue descubierta y reportada la resistencia en Australia (Whan, 1976), Michigan (Jones and Ehret, 1976), en New York (Szkolnik and Gilpatrick, 1977) y en Sur de California (Ogawa and Manji, 1981).

En el Sur de Carolina se probaron diferentes combinaciones de fungicidas con benzimidazoles (tiofanato de metil, captán, sulfuro) en donde *Monilinia* muestra cierta resistencia (Zehr, 1982). Otros fungicidas adicionales a los benzimidazoles se han utilizado con igual o mayor eficacia para controlar la pudrición café. Recientemente se empezó a utilizar la triforina que presenta el mismo problema que los benzimidazoles en cuanto a la resistencia, lo que ha generado la necesidad de desarrollar otras estrategias para el control del patógeno.

El control biológico puede ser una alternativa al control químico para combatir a *Monilinia* (Pusey and Wilson, 1984; McKeen et. al, 1986).

#### c) Control biológico

Baker y Cook (1983) definen el control biológico de fitopatógenos, en un sentido amplio, incluyendo el uso de algunos organismos para el control de otros microorganismos.

El control biológico incluye la producción de meristemas por cultivo de tejidos de plantas, libres de virus, para la erradicación de las enfermedades de plantas y desarrollando plantaciones de variedades resistentes al patógeno (siendo éste uno de los controles más efectivos). Esta definición incluye también el uso de plantas superiores y microorganismos no patógenos. El concepto es amplio, y generalmente es aceptado por los fitopatólogos, aunque algunos autores cuestionan que el concepto sea tan amplio (Cook y Baker, 1983; Cook, 1985).

Sin embargo Cook (1985) propone ampliar el concepto, para mejorar en el futuro el control biológico; un ejemplo es incluir genes reguladores para la producción de sustancias inhibitorias de fitopatógenos en las plantas. En la naturaleza existen enemigos naturales de microorganismos patógenos, que son utilizados para el control biológico. En el suelo existen gran cantidad de microorganismos saprofitos (hongos, bacterias y actinomicetos) que producen sustancias tóxicas, que permiten ser usados para el control biológico (Ortiz y Ortiz, 1984).

El fenómeno de la fungistasis del suelo -que, algunos creen, se debe a actividades microbianas- es muy usual. Algunas especies producen sustancias antifúngicas y se ha demostrado que la adición de *Bacillus* y *Streptomyces* al suelo sirve para controlar la enfermedad producida por *Rhizoctonia solani* en calabazas, guisantes, lechugas, etc. (Atlas, 1990).

La adición de microorganismos antagonistas en el suelo, antes de la plantación, permite combatir algunos patógenos de plantas. Un ejemplo de ello es la adición de *Coniothyrium minitans*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Trichoderma* spp. (Cook, 1985).

Varias bacterias se usan con frecuencia como insecticidas o fungicidas. Estas bacterias son esporuladas del género *Bacillus* y *Clostridium* y las especies no esporuladas de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia* y *Xenorhabdus* (Atlas, 1990).

Di Pietro et al. (1992) reportan la producción de dos metabolitos con actividad antifúngica contra *Pythium ultimum* (Patógeno que provoca la pudrición de semillas y raíces), aislados de cultivos líquidos de *Chestonium globosum*.

Melgarejo et al. (1985) obtienen y aíslan *B. frequentans* un organismo que forma parte de la microfiora del durazno, en los vástagos y en las flores. Este microorganismo presentó antagonismo contra *Monillinia laxa* en el laboratorio y en campo (Melgarejo et al., 1986). *B. frequentans* produjo dos antibióticos llamados A y B que muestran actividad contra *Monillinia laxa*, en la germinación de las esporas y en el crecimiento de los tubos de germinación (De Cal et al., 1988).

De las bacterias plaguicidas potenciales, *Bacillus thuringiensis* es el más extensamente explotado en el control de poblaciones infestadas de insectos, aunque existen otras especies como *B. pectinae*, *B. sphaericus*, *B. mortalis* y *B. cereus* que también son utilizadas (Galén-Wong y Rodríguez, 1980).

Vapinder y Deverell (1984) reportaron actividad antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra *Penicillium digitatum*. Posteriormente probaron una suspensión de células de *Bacillus subtilis* en la fruta, observando que se presentaba una disminución del crecimiento de los patógenos *Alternaria citri* y *Geotrichum candidum*. El extracto crudo del cultivo con *Bacillus subtilis* mostró antagonismo para *A. citri* y *G. candidum* in vitro y in vivo.

El extracto crudo de *B. subtilis* demostró efectividad contra *Uromyces phaseoli* (Reben) Wint., agente del la roya del frijol; *Nectria galligena* (Bres.), que causa el cáncer de la manzana (Swinburne, et al., 1975); *Alternaria solani* que provoca el tizón temprano de la papa (Vasudeva, et al., 1984); *Macrophomina phaseolina* y *Botryditodea solani-tuberosi* agentes causantes del tizón de la papa (Thirumalachar y O'Brien, 1977).

Bacillus subtilis inhibe también el crecimiento de 10 patógenos de los cítricos y de otras frutas (Pusey y Wilson, 1984; Pusey et al., 1986; Ulkhede y Sholberg, 1986; Wilson y Pusey, 1985), en estudios más recientes se ha utilizado para enfermedades de postcosecha de cítricos (Vepinder y Deverrall, 1984).

Pusey y Wilson (1984) reportan que B. thuringiensis reduce la infección de Monilinia fructicola en ciruela, mientras que Bacillus subtilis es eficaz en duraznos, nectarinas y ciruelas. Los metabolitos secundarios de B. subtilis (Cohen), demuestran actividad inhibitoria para varios hongos fitopatógenos (Asante y Neal, 1964; Babad, et al., 1952; Buranchik, et al., 1964; Johnson y Burdon, 1946; Landy et al., 1948).

Mitchener y Snell (1949) reportan dos antibióticos, Taxdmycin y Mycosubtilin producidos por B. subtilis, que son activos *in vitro* frente a Monilinia fructicola. Tienen un espectro amplio de inhibición ante agentes fungales en bajas concentraciones *in vitro* contra M. fructicola (Stessel et al., 1953; Walton y Woodruff, 1949).

McKeen, et al. (1966), separaron la fracción biológica activa del extracto crudo de B-3 un tipo de Bacillus subtilis, y encontraron que la fracción activa contra Monilinia fructicola contiene un antibiótico llamado Nihhydrin, y es antagonico a 15 especies fungales.

Jenkins (1968) reporta especies de Bacillus (B. cereus) antagonicas a M. fructicola sobre todo en los condios en el campo. Este Bacillus aparentemente reduce el desarrollo de la pudrición caté cuando se aplica en la superficie de la fruta madura en el laboratorio.

Recientemente se ha encontrado que B. cereus produce un antibiótico llamado Clepentacin que ataca al hongo Candida albicans A9540 y a Cryptococcus neoformans IAM4514, su estructura está determinada como (1R,2S)-2-Aminociclopentano-1-Acido Carboxido (Konish, et al., 1989).

Besson et al. (1976) describen turin A, un polipéptido cíclico antifungal que es producido por diversos tipos de Bacillus subtilis.

Asante y Neal (1964) reportan que los ácidos producidos por bacterias del género Bacillus son de bajo peso molecular, los ácidos identificados son acético, isobutírico y alfa metil butírico.

En síntesis, diversos autores proponen el empleo de productos derivados del metabolismo secundario de microorganismos, para el control de enfermedades de las plantas, que pueden ser desde extractos crudos o antibióticos aislados y purificados.

## 1.5 Función de los antibióticos y utilización en el control biológico.

*El significado biológico de los antibióticos ha estado sujeto a una considerable especulación y discusión. Sin embargo, aún hoy en día no se comprende totalmente el papel que juegan en la naturaleza.*

*Entre las distintas funciones propuestas para los antibióticos están el considerarlos como reliquias evolutivas (Eigen y Winkler, 1975; Zahner, 1978, 1979); productos de desecho del metabolismo (Luckner y Nover, 1972); bloqueadores de mecanismos de regulación (Demian, 1968); productos del metabolismo como consecuencia de una limitación de nutrientes (Tempest y Neijssel, 1975; Neijssel and Tempest, 1975, 1979); productos relacionados con la diferenciación celular (Luckner and Nover, 1977; Berry, 1975; Bu'lock, 1975); actividad reguladora en las moléculas e incrementar la flexibilidad para la adaptación a los cambios del ambiente (Haavik, 1979); como auxiliares en el mantenimiento de los mecanismos esenciales para llevar a cabo la multiplicación celular (Bu'lock, 1961); auxiliares en el control de la proliferación de organismos competidores (Krasillnikov, 1954; Brian, 1957); inciden en la formación de la espora, que es el último ejemplo de la adaptación de la bacteria para su conservación o supervivencia (Bernikohr and Novell, 1963; Nover and Luckner, 1974; Errington, 1993); en el control de la esporulación (Hodgson, 1970; Martin and Demian, 1980); productos derivados de la degradación de macromoléculas celulares (Romero, 1966).*

*Una idea que ha sido considerada es que la función de los antibióticos es matar o inhibir el crecimiento de otros organismos en la naturaleza, esto les confiere ventajas competitivas a las especies productoras (Gottlieb 1976; Demian 1984).*

*Muchos de los antibióticos son producidos por microorganismos saprofitos del suelo, y de hecho una alta proporción de microorganismos aislados del suelo a partir de fragmentos de materia orgánica, en donde la competencia entre los habitantes del suelo es muy intensa, son productores de antibióticos (Ortiz y Ortiz, 1984).*

*La producción de algunos antibióticos ha sido demostrada en suelo estéril suplementado con materia orgánica e inoculado con una cepa productora. Sin embargo, muchos de los microorganismos que crecen en el suelo estéril suplementado con materia orgánica, son incapaces de producir antibióticos en cantidades detectables en ausencia de materia orgánica. Solamente se han descrito unos cuantos casos positivos en los cuales los antibióticos estaban presentes en pequeñas cantidades (Demian, 1984).*

*Además, una función postulada para los antibióticos, que recientemente ha adquirido una gran atención, es que los antibióticos son compuestos que participan en la diferenciación celular, esto es, la transición de células vegetativas a esporas. Muchos de estos compuestos son elaborados por microorganismos capaces de esporular, principalmente *Bacillus*, *Streptomyces* y hongos filamentosos (Katz y Demian, 1977).*

Algunos autores sugieren que los antibióticos pueden ser usados por los organismos en distintas formas durante la esporulación para modificar su membrana celular, un ejemplo son los antibióticos peptídicos producidos por *Bacillus*, que pueden actuar como detergentes que disgregan los componentes de la estructura de la cubierta de las esporas o como portadores de iones que modifican las propiedades de permeabilidad (Sarkar y Paulus, 1972). Aunque muchas observaciones establecen que existe una estrecha relación entre la formación de los antibióticos y la esporulación, de ninguna manera prueban que los antibióticos sean necesarios para la esporulación. La evidencia en contra de lo anterior, es que existen mutantes que son incapaces de formar antibiótico pero que aún conservan la capacidad de esporular (Demian y Piret, 1981).

Estos mutantes han sido obtenidos de bacterias, actinomicetos y hongos productores de gramicidina S, gramicidina lineal, tirocidina, micobacilina, bacitracina, metilenomicina A y patulina (Demian, 1984).

Está claro que no todos los antibióticos tienen que estar relacionados con la esporulación; pero es altamente probable que todos los antibióticos tengan una función en la supervivencia o en la diferenciación del organismo productor, ya que es inconcebible que la secuencia de reacciones multienzimáticas de la biosíntesis de antibióticos haya sido retenida sin ningún efecto beneficioso para la supervivencia (Lorenzo y Aguilera, 1984).

En el género *Bacillus*, la producción de antibióticos peptídicos tiene lugar de forma temprana en el proceso de esporulación. La biosíntesis de estos compuestos implica un nuevo mecanismo de ensamblado, en el que la secuencia de aminoácidos está determinada por una enzima; no participan en él ni los ARNt ni los ribosomas. El papel de estos compuestos en la esporulación es desconocido, pero se ha sugerido que pueden controlar varios estadios del proceso de diferenciación (Stanley y Adalberg, 1986).

El modo de acción de los fungicidas ha sido dilucidado únicamente en algunos casos específicos. El mayor problema o dificultad es que los resultados provienen de experimentos *in vitro*, y no en suelos (Hornby, 1983).

Los antibióticos interfieren con el desarrollo y el metabolismo de los microorganismos patógenos. Según Waksman, pueden actuar por diferentes vías:

- Sustituyendo a un elemento nutritivo esencial.
- Interfiriendo con la utilización de las vitaminas
- Modificando el metabolismo intermediario de la célula -combinándose con el sustrato o uno de sus constituyentes, el cual se vuelve inactivo para la utilización del patógeno.
- Cumpliendo con una enzima requerida por el patógeno.
- Interfiriendo con el mecanismo respiratorio, especialmente con el sistema hidrogenasa

- Inhibiendo directamente la oxidación celular
- Actuando como sistema enzimático y produciendo en el medio productos de oxidación, tales como peróxidos, dañinos para la células.
- Favoreciendo ciertos mecanismos líticos en la célula
- Afectando la tensión superficial de las bacterias, actuando como detergente (Bryan, 1971).

Barberá (1989) reporta la forma de actuar de algunos antibióticos, como son la Blastocidina, que inhibe la respiración del hongo interfiriendo la síntesis proteica y evitando la incorporación del ácido glutámico en la proteína; las Polioxina tiene una acción inhibitoria de la síntesis de quitina en los hongos y la Validamicina actúa sobre la biosíntesis del mesoinositol, inhibiéndola.

## 1.6 Los Bacillus como productores de antibióticos

Casi todas las especies de Bacillus son saprobios, ampliamente distribuidos en la naturaleza, particularmente en el suelo, en polvo, agua y en materiales de origen animal y vegetal. La distribución está relacionada con la sobrevivencia que le confieren las esporas que son resistentes a las condiciones adversas. El amplio rango de características fisiológicas que exhiben dentro de este género es reflejado en la gran diversidad de especies, muchas de ellas capaces de inhibir o matar a otros organismos (Bolows, A. 1991).

La mayoría de las especies de Bacillus aparentemente tienen una patogenicidad baja o no tienen un potencial patógeno y rara vez están asociados con enfermedades humanas o en animales. Las excepciones son B. anthracis, el agente del carbunco o antraxosis, enfermedad de hombres y animales (Burdon y Williams, 1982), y especies como B. cereus, que recientemente se ha encontrado como contaminante de alimentos provocando intoxicaciones y en infecciones humanas y animales. A B. cereus se le asocia con infecciones de inmunocompresión o en personas débiles (v.gr. alcohólicos, diabéticos y drogadictos), en infecciones mezcladas como vector secundario (Bolows, 1991).

En 1939, Dubos aisló de una especie común, formadora de esporas (Bacillus brevis), productora de un agente antibiótico que llamó tirotricina. Más tarde, se encontró que estaba formado por dos sustancias, la gramicidina y la tirocidina. La intensa actividad bacteriostática de estos productos atrajo la atención de muchos y estimuló el interés por los agentes antibióticos en general (Burdon y Williams, 1982).

Varias especies son de importancia clínica con otras capacidades como es el ensayo o prueba de antibiótico (B. pumilus, B. cereus y B. stearothermophilus), otros ensayos de compuestos orgánicos, como la aflatoxina (B. megaterium ATCC 25848), ácido fólico (B. coagulans ATCC 12245), y hexaclorofeno (B. subtilis ATCC 6533), y pruebas para monitorear la eficacia del calor, químico y/o radiación, en procesos de esterilización y/o fumigación para la preservación de productos farmacéuticos y alimentos (B. stearothermophilus y B. subtilis variedad quibellii NCTC 10073) (Bolows, 1991).

Cinco especies de *Bacillus*, *B. thuringiensis*, *B. pectinifera*, *B. sphaericus*, *B. larvae* y *B. lentimorbus* y *B. mortalis* son patógenos a insectos, la primera especie es usada comercialmente como insecticida para el control de plagas que destruyen las cosechas (Bolows, 1991; Galan-Wong y Rodríguez, 1999). *B. laterosporus* BM1156-14F1 produce un antibiótico llamado Leuhistin, que produce la inhibición de la aminopeptidasa M (AP-M) en algunos microorganismos (Aoyagi et al., 1991). Algunas especies producen antibióticos como bacitracina (*B. subtilis* y *B. licheniformis*), polymyxín (*B. polymyxa*), y gramicidina (*B. brevis*) y numerosas enzimas usadas en la industria farmacéutica y en otras industrias.

En resumen, los *Bacillus* presentan una gama amplia de usos, desde el industrial farmacéutico; en la industria alimentaria y recientemente se ha incrementado su uso como insecticidas y fungicidas, como se menciona anteriormente, en los tipos de control que se han dado para la pudrición café.

## **II OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

**2.1.1** *Aislar y purificar bacterias del género Bacillus de suelos agrícolas y probar su efecto antagónico contra Monilinia fructicola.*

**2.1.2** *Aislar e identificar cepa de Monilinia fructicola.*

### **2.2 Objetivos particulares**

**2.2.1** *Identificar las bacterias Gram positivas con pruebas bioquímicas.*

**2.2.2** *Producir extracto crudo para pruebas de antagonismo.*

**2.2.3** *Valorar la actividad del extracto crudo in vitro contra Monilinia.*

## **III MATERIAL Y METODOS**

*En este capítulo se proporciona una descripción de los materiales y métodos utilizados para las investigaciones realizadas en la búsqueda de alternativas para el control biológico de Monilinia fructicola.*

*Esta investigación se inicia con el aislamiento del patógeno causante de la pudrición café y de cepas potencialmente antagonistas a él. Se realizan pruebas de antagonismo, identificación de las cepas a nivel de especies y la producción del extracto crudo para su valoración contra Monilinia fructicola.*

*En la Figura M-1 se presenta el esquema de la metodología experimental desarrollada en el presente trabajo, y a continuación se describen cada una de las fases experimentales.*

### **3.1 Aislamiento, purificación e identificación de Monilinia fructicola**

*Para realizar el aislamiento de Monilinia se adquirieron frutos de durazno (Prunus persica) con pudrición café. Se lavaron con agua corriente y se sumergieron en una solución de hipoclorito al 1% durante 5 minutos, para desinfectarlos debido a que los hongos fitopatógenos normalmente están acompañados de bacterias y otros hongos secundarios más prolíficos (Fokema, 1973; Royse et al., 1977 y Vanpinder y Deverall, 1984).*

*Las secciones dañadas por la pudrición café fueron cortadas en trozos de 2 cm por 2 cm, se sembraron en placas de PDA (Papa Dextrosa Agar)(Anexo 1), por medio de la técnica de cultivo de punta de hifa (French y Herbert, 1980), se incubaron a 28°C durante 5-6 días. Una vez que el micelio se desarrolló, se purificó e identificó.*

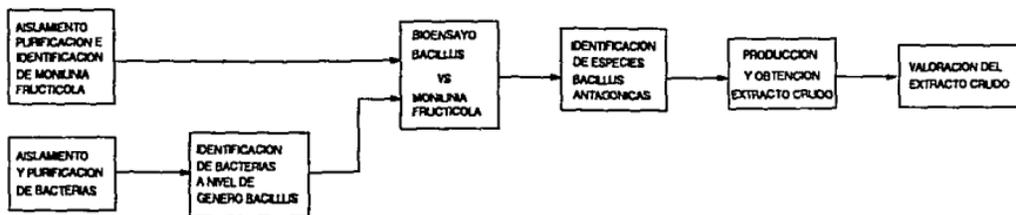
### **3.2 Aislamiento y purificación de bacterias Gram positivas.**

*Para el aislamiento de las cepas bacterianas se utilizaron muestras de suelos agrícolas de Toluca y Chalco, Edo. de México. El procesamiento de la muestra inició con la separación de raíces y cuerpos extraños al suelo por medio del filtrado con un tamiz de 100 mallas. Se preparó una suspensión con 2.0 gr de suelo en 20 ml de agua destilada (Bakken, 1985).*

*Esta solución se colocó en tubos de ensayo, se incubaron en baño maría a una temperatura de 30°C durante 10 min. De cada uno de los tubos se tomaron muestras y se sembraron por estría cruzada en placas con agar nutritivo, este medio es uno de los más utilizados para el cultivo y aislamiento de bacterias, debido a que su reacción es neutra y éstas son favorecidas por medios de reacción neutra con*

FIGURA M-1

METODOLOGIA GENERAL DE LA FASE EXPERIMENTAL



un pH 6.5-7.5 (Burdon, et al., 1982 y French, 1980). Las placas son incubadas a 37°C. Para realizar la purificación de las distintas cepas se sembraron las colonias de interés en otras placa de agar nutritivo, se purificaron e identificaron como Gram positivas con la tinción de Gram (Bakken, 1985) y como formadoras de esporas con la técnica de Shaeffer y Fulton (Rutz, et al., 1986).

### 3.3 Pruebas sobre la actividad antagónica de las bacterias Gram positivas contra Monilia fructicola

Existen algunos ejemplos de organismos que *in vitro* exhiben antibiosis a ciertos patógenos de plantas. Para la demostración de esta antibiosis, el primer paso a seguir es probar que la relación entre estos fenotipos (cepa potencialmente antagónica y patógeno) es antagónica (Atlas, 1990). Para llevar a cabo este tipo de prueba o selección "Primaria" se realizaron bioensayos duales con las cepas Grampositiva y esporógenas.

**Las cepas Gram positivas fueron evaluadas contra Monilia fructicola en cultivos duales.**

Un empaste de micelio de Monilia fructicola de aproximadamente 1cm por 1 cm. fue sembrado en un extremo de la placa de PDA, durante 4-5 días a temperatura ambiente (25 +/- 2°C). Después, en el mismo cultivo se sembró la bacteria Gram positiva en el extremo opuesto donde se sembró el hongo, se incubó a temperatura ambiente durante 3-4 días. Se registró la zona de inhibición del crecimiento de los cultivos. El ancho de la zona de inhibición se midió con tres registros entre ambas colonias izquierda, centro y derecha (Royse, 1978 y Vapinder y Deverall, 1984; Fig. M-2).

### 3.4 Identificación de las especies de Bacillus que presentan antagonismo

Las características fisiológicas y bioquímicas sirven como procedimientos de identificación de microorganismos. Llevando a cabo la siembra de microorganismos en diversos medios de cultivo y estudiando las reacciones fisiológicas y bioquímicas resultantes, se puede por eliminación, hacer un diagnóstico específico e identificación de estos microorganismos (Bryan, 1971).

Los bacteriólogos clasifican los microorganismos analizando un número pertinente de características e intentan con éstas hacer la clasificación de determinadas especies, miembros del mismo género.

El resultado de la diferenciación de características es una clave dicotómica que en ocasiones es muy compleja, pero que establece claramente el género y las especies. Algunas identificaciones requieren un período de tiempo largo y mucho trabajo de laboratorio para clasificar correctamente a los microorganismos (Bolows, 1991).

A continuación se describen las pruebas morfológicas y bioquímicas utilizadas para la identificación de los miembros del género *Bacillus*. Para la clasificación de las especies de *Bacillus* se conjuntaron 2 claves o matrices de identificación de diferente literatura con distintas pruebas bioquímicas, con el objeto de realizar una clasificación lo más fiel posible (Tabla M-1).

#### A) Y B) Tinción de Gram y Tinción de Shaeffer y Fulton

El método de coloración más utilizado es la tinción de Gram. Prácticamente todas las bacterias pueden ser clasificadas como Gram positivas o negativas, según fijen o no el colorante inicial (Gaviffo, et al., 1972).

La técnica de Shaeffer y Fyton se utiliza para tefir las esporas de las bacterias, los colorantes utilizados son verde de malaquita y safranina. Cuando se realiza la tinción de los microorganismos, la espóra se observa de color verde y la bacteria de color rojo, lo cual nos permite determinar la posición de la espóra dentro de la bacteria (Ruiz, et al, 1986).

#### C) Prueba de motilidad (movilidad)

Esta prueba determina si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente en bacilos (bacterias en forma de bastoncillos); sin embargo, algunas formas de cocos son móviles (Burrows y Moulder, 1968; Wilson y Miles, 1964).

A veces, las bacterias con motilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se reversionan en formas móviles (Burrows y Moulder, 1968), otros autores afirman que los organismos no móviles carecen de flagelos (Mac Faddin, 1984).

Esta prueba ayuda a la diferenciación de la especie de *Bacillus anthracis* (-) de otras especies de *Bacillus* (generalmente +). El medio utilizado para esta prueba es Medio de Motilidad (Anexo 2).

Este medio fue distribuido en tubos de ensayo de 10 ml posteriormente esterilizados a 15 libras de presión por 15 minutos. Se dejó enfriar el medio en posición vertical y se refrigeró para su conservación. La inoculación se efectuó con la punción en el centro del medio contenido en el tubo de ensayo, con una asa bacteriológica recta hasta una profundidad de 1.2 cm, se incubó a una temperatura de 37°C durante 24-36 horas. (Shaad, 1988).

FIGURA M-2

BIOENSAYO DUAL  
(DIFERENTES CEPAS DE BACILLUS VS MONILINIA FRUCTICOLA)

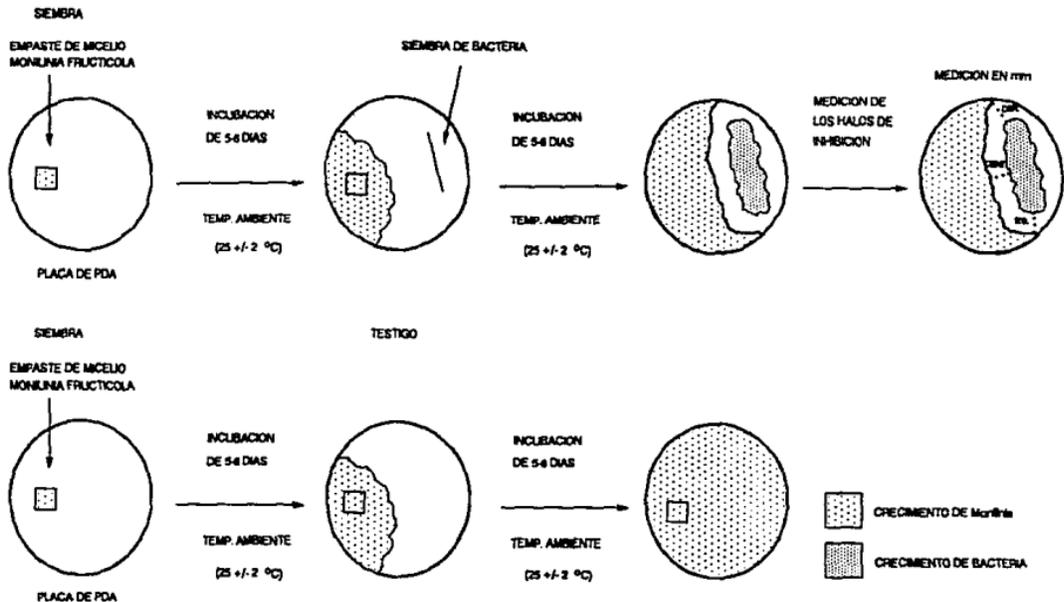


Tabla N-1

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE ALGUNAS ESPECIES COMUNES DE *Bacillus*

	<i>B. Anthracis</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pasteurianus</i>	<i>B. pectinatus</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
A) TINCION DE GRAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B) POSICION DE LA ESPORA	C	V	C	V	C	C	X	X	X	C
C) MOVILIDAD	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D) LIQUEFACCION DE GELATINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E) HIDROLISIS DE ALMIDON	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
F) HEMOLISIS DE SANGRE	-	X	+	X	-	X	-	X	X	+-
G) PRUEBA DE LECHE TORMASOL	-	+-	+	Acido	+-	+-	+	+	-	+
H) PRUEBA DEL CITRATO	+	+-	+	-	+	+	+	+	-	+
I) REDUCCION DE NITRATO	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
J) REACCION VOGES-PROSKAUER	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
K) UTILIZACION	ARABINOSA	-	-	-	+	+	-	+	-	+
	GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	MANITOL	-	+	-	+-	+	+	+	-	+
	SALICINA	-	X	+-	X	+	X	+-	X	X
L) CRECIMIENTO EN NaCl AL 7%	+	X	X	X	+	+	X	X	X	+
M) CRECIMIENTO A PH 5.7	+	-	+	X	+	+	X	X	X	+

LOS DATOS DE LA TABLA FUERON COMPILADOS Y MODIFICADOS DE SCHAAD, 1966, PLANT PATHOGENIC BACTERIA; GRABER, G.D., 1970, RAPID DIAGNOSTIC METHODS IN MEDICAL MICROBIOLOGY. LA REACCION (X), NO ESTA FUNDAMENTADA EN LA LITERATURA CITADA; (+-) CORRESPONDE A REACCIONES QUE PUEDEN SER POSITIVOS O NEGATIVOS; (+) ES POSITIVO; (-) NEGATIVO; (V) ES VARIABLE; (C) LA POSICION DE LA ESPORA ES CENTRAL EN EL *Bacillus*.

Cuando la prueba es positiva (tiene motilidad) los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbiedad. Puede darse un crecimiento en estrías vellosas (Kelly y Fulton, 1953; Titsler y Sandholzer, 1936).

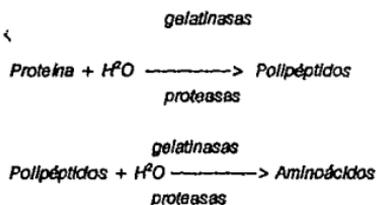
Cuando la prueba es negativa (sin motilidad) dio un crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra, el medio circundante se mantuvo claro e incoloro (Mac Faddin, 1984; Schaad, 1988).

#### D) Licuefacción de gelatina

Esta prueba establece la capacidad del microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licúan la gelatina. En esta prueba se incorpora gelatina a diversos medios para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico que, a su vez, son detectadas por la digestión o licuefacción de la gelatina presente. Estas enzimas, que son capaces de la gelatinólisis, se denominan gelatinasas (Mac Faddin, 1984).

Las proteínas que se incorporan en el medio, son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por lo tanto, para que una célula utilice las proteínas, primero debe ser catabolizada en componentes más pequeños. Las enzimas exocelulares de tipo proteolítico, gelatinasas, son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas, y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana.

El catabolismo de las proteínas por las gelatinasas es un proceso en dos etapas, y el resultado final da una mezcla de aminoácidos individuales (Mac Faddin, 1984).



El medio utilizado fue gelatina nutritiva (Anexo 1). Se distribuyeron 5 ml del medio preparado en tubos de ensayo con tapón de rosca, se esterilizaron a 15 libras de presión por 15 minutos. Los tubos se dejaron enfriar en posición vertical, se refrigeraron para su conservación. La inoculación se hizo a través de una punción en el medio hasta una profundidad de 1.5 cm. Se incubaron a 37°C por 7 días (Cowan y Steel, 1966; Wilson y Miles, 1964), se registraron los cambios diariamente hasta completar el periodo de incubación. El resultado fue positivo cuando el medio se licuó y negativo cuando se mantuvo sólido.

#### **E) Hidrólisis de almidón.**

*Algunas bacterias son capaces de hidrolizar el almidón para poder utilizarlo. Para esta prueba se utilizó el medio de agar almidón (Anexo 2).*

*Se mezcló el almidón en 50 ml de agua destilada. Se le adicionó el agar nutritivo formando una solución homogénea. El medio se esterilizó a 15 libras de presión durante 15 minutos y se vació en cajas de Petri. Para su conservación se mantuvieron en refrigeración. Las placas fueron inoculadas, incubándose por 5 días a una temperatura de 37°C. Para realizar la prueba de hidrólisis se inundaron las placas con una solución de lugol-iodo (Anexo 2). Se disolvió el yodo con el yoduro de potasio (KI) en 10 ml de agua destilada, el volumen se ajustó a 100 ml con agua destilada. Cuando se utilizó esta solución se diluyó a 1/5 con agua destilada.*

*La prueba fue positiva cuando se mostraron zonas claras, es decir hubo hidrólisis del almidón. La prueba negativa mostró un color azul violáceo con el lugol (Ruiz, et al., 1986; Shaad, 1988).*

#### **F) Hemólisis de sangre.**

*Esta prueba es utilizada para determinar si los microorganismos son capaces de llevar a cabo la hemólisis de los eritrocitos. Cuando se lleva a cabo la hemólisis se detecta la presencia de una zona de eritrocitos hemolizados alrededor de una colonia cultivada.*

*Se producen tres tipos de hemólisis, si las colonias están rodeadas por una zona de hemólisis incompleta (Verdosa), se le denomina alfa Incompleta; en la hemólisis beta las colonias están totalmente transparentes (Claras); la ausencia de hemólisis se denomina alfa (Mac Faddin, 1984).*

*El medio utilizado en esta prueba es Agar Sangre (Anexo 2). El medio se remojó con agua desmineralizada durante 15 minutos. La suspensión se hirvió hasta su completa dilución. La solución se esterilizó a 15 libras de presión durante 15 minutos. Al bajar la temperatura del medio a 45 o 50°C, se mezcló en 5 a 8% sangre estéril y desfibrada. El medio fue vaciado en cajas Petri. Se refrigeró para su conservación (Manual Difco, 1953).*

*La prueba fue positiva cuando se presentó una zona clara alrededor de la colonia, y negativa cuando no se presentó cambio de color en el medio.*

### **G) Prueba de leche tomasol.**

*Esta prueba se utilizó para diferenciar organismos sobre la base de sus múltiples reacciones metabólicas en un medio lácteo. La leche tomasolada es un medio diferencial que se emplea para determinar varias reacciones metabólicas (Anexo 1.1) que llevan a cabo los microorganismos, entre ellas se encuentran la coagulación, alcalinización, peptonización, acidificación y digestión del coágulo.*

*El medio utilizado fue Leche Tomasolada (Anexo 1). El medio se hidrató con agua destilada. Se calentó suavemente hasta obtener una completa disolución. La suspensión fue distribuida en tubos de ensayo, 5 ml en cada tubo, se esterilizaron a 15 libras de presión durante 15 minutos. El medio es refrigerado para su conservación. Los tubos con el medio fueron inoculados e incubados a 37°C durante 18 a 24 hrs.*

*Los resultados varían y pueden ser los siguientes:*

#### **Color rojo rosado (A)**

- 1) Reacción ácida
- 2) Fermentación de lactosa

#### **Azul púrpuro (SC)**

- 1) No hay fermentación de lactosa
- 2) No hay cambio en el indicador de pH tomasol; igual que el tubo testigo

#### **Azul (ALC)**

- 1) Reacción alcalina
- 2) El organismo ataca las sustancias nitrogenadas que se encuentran en el medio.

#### **Bianco (RED)**

*Reducción del tomasol a una leucobase.*

#### **Formación de coágulo o cuajo (C)**

*Coagulación de la proteína de la leche.*

#### **Digestión (Peptonización) (D)**

*Se ha digerido la proteína de la leche  
Aclaración del medio*

#### **Gas (CO<sup>2</sup> y H<sub>2</sub>) (G)**

*Burbujas en el medio  
El coágulo puede desintegrarse*

### **Fermentación turbulenta (T)**

*El coágulo ácido es fragmentado por la abundante producción de gas*

#### **H) Prueba del citrato.**

*Esta prueba se utilizó para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad (Mac Faddin, 1984).*

*Algunas bacterias pueden suministrar energía en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico empleando el citrato como única fuente de carbono (Gunsalus y Stanier, 1961; Ruchhoff, et al., 1931; Anexo 1.2).*

*El medio utilizado fue Citrato de Simmons (Anexo 1). El medio se hidrató con agua destilada y se calentó suavemente hasta lograr una disolución. El medio se distribuyó en tubos de ensayo (5 ml en cada tubo), se esterilizaron a 15 libras de presión durante 15 minutos. Para su solidificación se mantuvieron en posición inclinada, se conservaron en refrigeración. Los tubos se inocularon e incubaron a 37°C durante 24 a 48 hrs.*

*La prueba fue positiva si se registró crecimiento con un color azul intenso, negativa si no se observó crecimiento, ni cambio de color verde (Mac Faddin, 1984).*

#### **I) Reducción del nitrato.**

*Esta prueba determina la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre.*

*La reducción del nitrato ( $\text{NO}_3$ ) en nitrito ( $\text{NO}_2$ ) y en gas nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato (DIFCO, Manual, 1963; Pelzcar y Reid, 1965; Anexo 1.3).*

*La prueba de reducción de nitrato se manifiesta por la presencia de un producto final catabólico o la ausencia de nitrato en el medio (Mac Faddin, 1984).*

*El medio utilizado fue Caldo con Nitrato (Anexo 1). El medio fue hidratado con agua destilada, la solución se calentó hasta lograr una homogeneización total. El medio se distribuyó en tubos de ensayo (5ml en cada tubo), se esterilizaron a 15 libras de presión durante 15 minutos. Para su conservación se refrigeraron.*

Los tubos fueron inoculados e incubados a 37°C durante 24 hrs. Para realizar la prueba se agregaron los reactivos (3 gotas de alfanafitilamina y 3 gotas de ácido sulfanílico).

La prueba positiva dio un color rosado o rojo intenso. El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) reducido a ( $\text{NO}_2^-$ ) por el microorganismo. En la prueba negativa no se observó ningún cambio de color (Mac Faddin, 1984).

#### **J) Reacción de Voges-Proskauer.**

Esta prueba se utiliza para determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoina), a partir de la fermentación de la glucosa (Mac Faddin, 1984).

La reacción de Voges-Proskauer (VP) se basa en la detección del acetilmetilcarbinol (acetoina), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico una bacteria puede seguir muchas vías. La producción de acetoina es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa, en las bacterias (Abd-el-Malek y Gibson, 1948; Anexo 1.4).

Para la realización de esta prueba se utilizó el medio Caldo RM/VP (Anexo 2). El medio fue hidratado con agua destilada y calentado suavemente hasta lograr la completa disolución. El medio se distribuyó en tubos de ensayo (5 ml en cada tubo) y se esterilizaron a 15 libras de presión durante 15 minutos. Se conservaron en refrigeración.

Los tubos se inocularon e incubaron a 37°C durante 24 hrs. Para verificar si la prueba es positiva o negativa se agregaron los siguientes reactivos a cada uno de los tubos en el siguiente orden: 6 gotas de una solución de alfa-naftol, 2 gotas de una solución de KOH-Creatinina, se agitó suavemente, y se dejó reposar por 15 minutos (Ruiz, et al., 1986; Mac Faddin, 1984).

El resultado positivo fue cuando se presentó un color rosado en la superficie del medio (presencia de acetoina), negativo cuando el color fue amarillo (al mismo color del reactivo). Puede formarse un color cobrizo, pero aun así la reacción es negativa (debido a la acción de los reactivos al mezclarse) (Mac Faddin, 1984).

#### **K) Utilización de Hidratos de Carbono (Arabinosa, Glucosa, Manitol, Salicina).**

Los caminos metabólicos seguidos por un microorganismo durante la utilización de un sustrato, le permite producir sus materiales estructurales y energía (usualmente con la producción simultánea de subproductos ácidos); estas vías pueden ser oxidativas o fermentativas. La fermentación tiene lugar en

ausencia de oxígeno y con frecuencia el microorganismo produce gran cantidad de ácidos orgánicos (Sindney y JoBarron, 1989).

La prueba de utilización de carbohidratos sirve para determinar la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido, o ácido con gas visible. La forma de utilización de los hidratos de carbono puede ayudar a la diferenciación de diversas especies (Mac Faddin, 1984; Anexo 1.5).

El medio empleado en esta prueba es Medio Basal OF (Anexo 2). Este fue hidratado con agua destilada y calentado suavemente hasta que se logró su disolución. Se agregaron los diferentes azúcares utilizados, preparados previamente al 1%, excepto salicina al 0.5%.

El medio compuesto fue distribuido en tubos de ensayo (5 ml en cada tubo) y esterilizados a 15 libras de presión durante 15 minutos. Para provocar que el medio esté en condiciones anaeróbicas, se le agregó 1 ml de aceite vegetal en cada tubo, previamente esterilizado. Los tubos fueron inoculados e incubados a 37°C durante 18-24 hrs.

Los resultados fueron positivos cuando el medio es ácido pH 6.8 y vira a color amarillo. La producción del gas puede ser variable. Los resultados fueron negativos cuando el medio es alcalino y de color rosa-rojizo (Mac Faddin, 1984).

#### **L) y M) Crecimiento en NaCl al 7 %, Crecimiento a pH 5.7**

Algunos microorganismos se pueden diferenciar por su capacidad de sobrevivir en medios salinos. El género *Bacillus* exhibe un rango muy amplio de características fisiológicas con diferentes rangos facultativos, existen especies dentro de este género que son termófilos facultativos y obligados, acidófilos, halófilos, capaces de reproducirse en temperaturas extremas, pH o salinidad (Bolows, 1991).

Para la prueba de crecimiento en NaCl al 7% se utilizó caldo nutritivo con una solución de glucosa al 0.5% y de NaCl al 7%. (Schaad, 1988). El medio fue inoculado e incubado a 37°C durante 72 hrs. diariamente se observó el crecimiento.

Para la prueba de crecimiento en pH 5.7 se utilizó el Medio Caseína Plus (Anexo 2), ajustándolo a un pH de 5.7. La suspensión fue distribuida en tubos de ensayo (5ml en cada tubo), se esterilizó a 15 libras de presión durante 15 minutos. Para su conservación se refrigeró. El medio fue inoculado e incubado a 37°C durante 72 hrs.

La prueba fue positiva, en las dos pruebas (NaCl 7% y pH 5.7), cuando se dio un crecimiento bacteriano, y negativa cuando no se presentó crecimiento.

### 3.5 Producción y obtención del extracto crudo de especies que presentan mayor halo de inhibición.

Una vez identificadas las cepas, el siguiente paso fue la producción del extracto crudo de la especie y cepa que mayor halo de inhibición presentó en los bioensayos preliminares (Fig. M-3).

Se utilizó también una cepa de colección de la misma especie, para determinar si la especie en general tenía la capacidad de producir toxinas antagónicas a *Monilinia* o solamente la cepa identificada, ya que no todas las cepas de una especie tienen la misma capacidad de producir toxinas y por lo tanto de antibiosis (Di Pietro, 1991). El medio utilizado para la producción del extracto crudo fue caldo papa dextrosa.

#### Preparación del inóculo.

Para realizar la producción del antibiótico, se preparó el inóculo de las dos cepas de *Bacillus*. Se sembraron en tubos de ensayo con caldo papa dextrosa (PDB), a una temperatura de 37°C, durante 24 hrs. Se tomaron 5 ml de NaCl a 0,15 M. y se agregaron a cada uno de los matraces con PDB. Los tubos fueron agitados con cuidado para lavar la células en la superficie del agar. Un mililitro de la suspensión de células fue utilizado como inóculo en la producción del extracto crudo para un litro (Mckeen, et al., 1986). Se inocularon los medios de cultivo e incubaron a 37°C con agitación a 170 RPM, por 36 hrs. (Pusey y Wilson, 1984; Mckeen, et al., 1986).

#### Determinación del número de bacterias en el inóculo

Existen diferentes métodos que pueden emplearse para realizar el conteo, entre éstas se incluyen la cuenta viable en placa, cuenta directa y determinación del número más probable.

Para determinar la cantidad de bacterias contenidas en el inóculo utilizado para la producción del extracto crudo, se utilizó el método de cuenta viable en placa. Este método es uno de los más utilizados (Burdon y Williams, 1982).

En placas de Papa dextrosa agar (PDA) se sembraron diluciones en serie de la suspensión bacteriana (inóculo). La suspensión se extendió sobre la superficie de la placa de agar o técnica de extensión en superficie (French, et al., 1980). Las placas de agar se incubaron a 37°C durante 24 hrs. (Atlas, 1990; Fig. M-4).

La multiplicación de las bacterias en medios sólidos da como resultado la formación de colonias microscópicas visibles a simple vista. Se supone que cada colonia se forma a partir de una sola célula bacteriana y, por lo tanto, contando el número de colonias formadas, y tomando en consideración el factor de dilución, se determinó la cantidad de bacterias de la muestra original (Atlas, 1990).

### **Determinación del crecimiento bacteriano**

Para determinar el tiempo de incubación en la producción del extracto crudo, se realizaron curvas de crecimiento, para las dos cepas utilizadas de *Bacillus*.

Debido a que la densidad óptica del cultivo es proporcional a la densidad celular, la turbidez de una solución se puede usar para estimar el número de células bacterianas. El incremento en la turbidez de un medio de cultivo líquido como resultado del crecimiento bacteriano, puede ser medido con espectrofotómetro, y los resultados obtenidos ser usados para establecer la curva de crecimiento (Atlas, 1990).

Las lecturas de densidad óptica para la realización de la curva de crecimiento se realizaron el colorímetro Klett a 590 nm, cada 6 horas, graficando los resultados, lo que nos permitió establecer el tiempo de incubación en la producción del extracto crudo (Stanier, 1988).

### **Oblención del extracto crudo**

Los medios cultivados son centrifugados a 7,000 rpm por 40 minutos, para remover las células. El sobrenadante es filtrado en papel filtro Whatman No.1.

Esta suspensión se vuelve a filtrar en una membrana Millipore de 0.45 micrómetros y otra de 0.22 micrómetros para esterilizarlo (Fig. M-5), la solución resultante es utilizada para su valoración como extracto crudo (Pusey y Wilson, 1984; De Cal et al., 1988; Vapinder y Deverall, 1984; Jackson, 1991).

### **3.6 Valoración del extracto crudo**

Para determinar si el filtrado crudo del cultivo de las dos cepas (de colección y silvestre) contienen toxinas o sustancias antifúngicas, producidas por estos microorganismos, se realizaron bioensayos, donde se probó la sensibilidad de *Monilinia* al extracto crudo. Para realizar la valoración del extracto crudo se utilizó el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) o discos de papel; el principio de este método se basa en la difusión del antibiótico a través del agar.

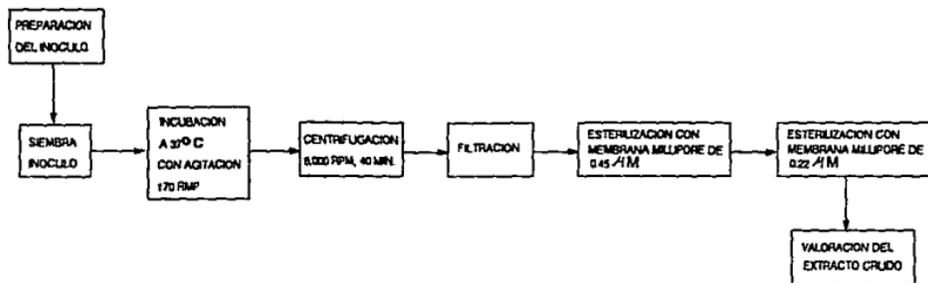
Un empede de micelio de aproximadamente 1 cm por 1 cm de *Monilinia fructicola*, se sembró en placas de PDA a temperatura ambiente (25 +/- 2 °C), durante 5-6 días. En este cultivo se colocó un disco de papel filtro de 6mm de diámetro con 0.1 ml del extracto crudo de los diferentes cultivos utilizados. Se incubó a temperatura ambiente durante 5-6 días. La zona de inhibición se observó alrededor del papel filtro. Para el control se utilizó caldo papa dextrosa (PDB), sin inocular e incubado en las mismas condiciones que para la producción del extracto.

Con este procedimiento se determina la sensibilidad de algunos antibióticos de acuerdo a los estándares establecidos por "The Food and Drug Administration" (FDA) (Vapinder y Deverall, 1984; Salle, 1965; Alcano, 1990).

Para determinar el halo de inhibición se realizaron tres mediciones entre el papel filtro y la colonia de *Monilia*. El hongo presenta un crecimiento radial y las mediciones se realizan a lo largo de su crecimiento, la primera lectura se hace del lado izquierdo, la segunda en el centro y la tercera del lado derecho, como se muestra en la figura M-5 (Royse, 1978).

FIGURA M-3

PRODUCCION DEL EXTRACTO CRUDO



### 3.7 Análisis estadístico

Los valores de los halos de inhibición, que presentaron las diferentes cepas de *Bacillus* frente a *Monilinia fructicola*, se procesaron estadísticamente, primero con la Prueba de Bartlett para analizar la igualdad de la varianza. Esta prueba es ampliamente utilizada. Se plantea la hipótesis:

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \dots = \sigma^2_k$$

$H_1$ : lo anterior no es cierto al menos para una  $\sigma^2_i$

Este procedimiento consiste en calcular una prueba cuya distribución muestral es, aproximadamente, ji cuadrada con  $a-1$  grados de libertad, cuando las muestras aleatorias provienen de poblaciones normales independientes. La prueba estadística es:

$$\chi^2_0 = 2.3025 \frac{q}{c}$$

donde

$$q = (N - a) \log_{10} s_p^2 - \sum_{i=1}^a (n_i - 1) \log_{10} s_i^2$$

$$c = 1.38 (a - 1) \left( \sum_{i=1}^a (n_i - 1) - (N - a) \right)$$

$$s_p^2 = \frac{\sum_{i=1}^a (n_i - 1) s_i^2}{N - a}$$

$s_i^2$  es la varianza muestral de la  $i$ -ésima población.

El valor de  $q$  es grande cuando hay una gran diferencia entre las variancias muestrales  $S^2_i$  y es igual a cero si todas las  $S^2_i$  son iguales. Por lo tanto, debe rechazarse  $H_0$  para los valores grandes de  $\chi^2_0$  en otras palabras, se rechaza  $H_0$  sólo si

$$\chi^2_0 > \chi^2_{\alpha, a-1}$$

en donde la  $\chi^2$  cuadrada con  $a-1$  es el punto alfa porcentual superior de la distribución  $\chi^2$  cuadrada con  $a-1$  grados de libertad.

Una vez realizada la prueba de Bartlett, se procedió a realizar la Prueba de Tukey, para determinar la separación de medias, o diferencias significativas mínimas (Montgomery, 1991).

Con el fin de detectar estadísticamente, si el efecto de las bacterias sobre Monillinia fructicola es significativo se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

$$H_0: Y^1 = Y^2 = Y^3 = Y^n$$

Si las diferencias observadas son debidas al azar, las bacterias y el extracto crudo, no presentan diferencia entre ellas, es decir todas provocan el mismo efecto sobre Monillinia fructicola.

$$H^1: Y^1 = Y^2 = Y^3 = Y^n \text{ (o al menos un par de ellas son diferentes)}$$

Si las diferencias observadas no son debidas al azar, sino a los diferentes efectos de las bacterias y el extracto crudo, sobre Monillinia fructicola.

Tukey (1953) propuso un procedimiento de comparación múltiple que está basado en los intervalos. Su procedimiento requiere del uso de  $q$  alfa ( $a, f$ ) para determinar el valor crítico de todas las comparaciones por pares, independientemente de cuántas medias estén en un grupo. Así la prueba de Tukey declara dos medias significativamente diferentes si el valor absoluto de sus diferencias muestrales excede

$$T = q(a, f) S_n$$

en donde  $S_n$  está definida

$$S_n = \text{MSE}/n$$

*Debe notarse que en todas las comparaciones sólo se usa un valor crítico. Se usa  $q_{.05}$  como base, para determinar el valor crítico y, en consecuencia, ningún par de medias se declara significativamente diferente, a menos que  $|Y_i - Y_j|$  exceda a*

$$T_{.05} = q_{.05}(\alpha, f) S_{Y1}$$

*Al usar este valor se determina si los valores de  $Y_i$  son iguales o diferentes (Montgomery, 1991).*

FIGURA M-4

CUENTA VABLE EN PLACA

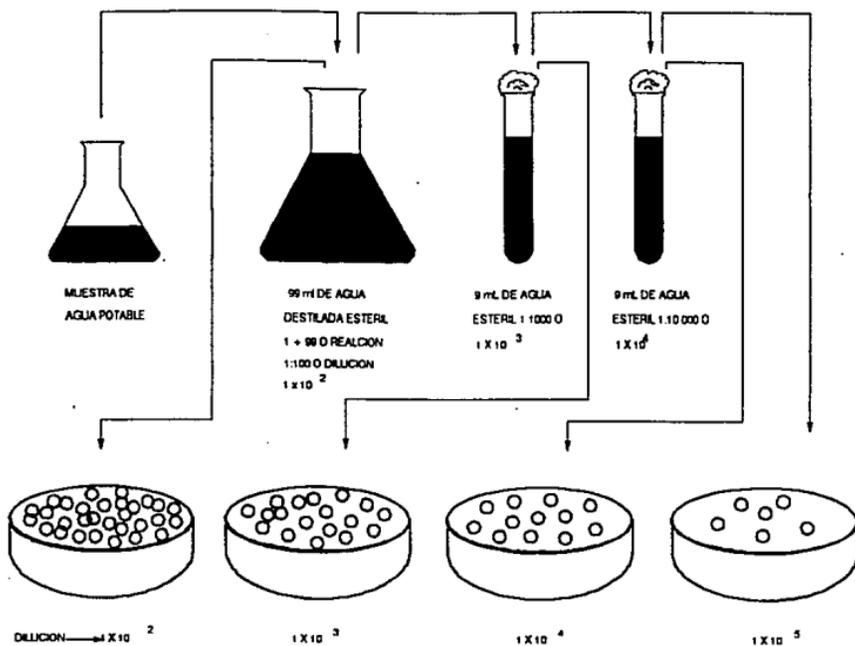
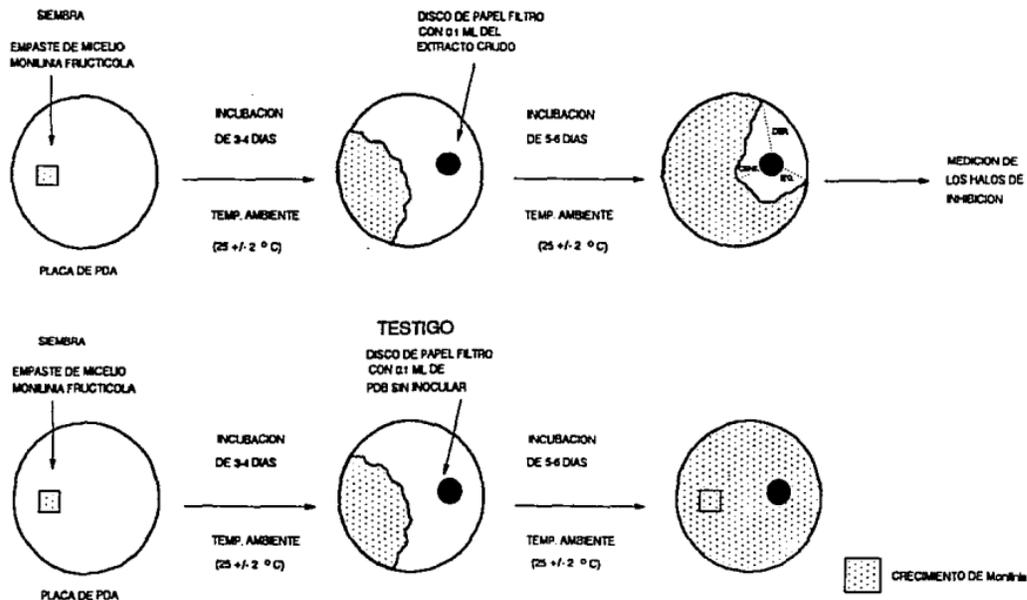


FIGURA M-5

BIOENSAYO  
(VALORACION DEL EXTRACTO CRUDO VS MONILINIA FRUCTICOLA)



## **IV RESULTADOS**

### **4.1 Aislamiento y purificación de *Monilinia fructicola***

Se aislaron cepas de *Monilinia fructicola* y solo se utilizó una de esta para las pruebas de antagonismo.

### **4.2 Aislamiento y purificación de bacterias**

En el presente trabajo se aislaron 30 cepas, de las cuales 14 se identificaron como Gram positivas y formadoras de endosporas.

En la tabla R-1, R-2 y R-3 se presentan los halos de inhibición formados por las 14 cepas contra *Monilinia*. Se realizaron 3 bioensayos, con tres repeticiones cada uno. En cada placa se realizaron 3 mediciones, izquierda, central y derecha, como se muestra en la figura M-2, R-4 y R-5. Todas las cepas presentaron antagonismo contra el fitopatógeno. Las cepas con mayor halo de inhibición son B2, B11, B13. Cada uno de los bioensayos se realizaron en tiempos diferentes, tratando de probar la efectividad de los bacillus, con diferentes tiempos de almacenamiento.

### **4.3 Identificación de las especies que presentan antagonismo**

Se identificaron las 14 cepas que presentaron antagonismo frente a *Monilinia fructicola*. Se realizaron 16 pruebas, de las cuales 2 fueron morfológicas y 14 bioquímicas (Tabla R-4).

Las especies identificadas son bacterias Gram Positivas y esporógenas de la familia *Bacillaceae* del género *Bacillus*, las especies son *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. mycolides* (Mac Fadden, 1984). Las dos especies que mayor número de representantes tienen son: *B. mycolides* y *B. circulans* (Tabla R-5).

### **4.4 Producción y obtención del extracto crudo de *B. licheniformis* (B2) y *B. licheniformis* (ATCC 9960)**

Para la producción del extracto crudo se utilizó sólo una cepa de las 14 que fueron identificadas, B2 (*B. licheniformis*), fue seleccionada por presentar mayor halo de inhibición ante *Monilinia fructicola* (Tabla R-1, R-2, R-3 y R-9).

Además de la cepa B2, se utilizó una cepa de colección (del Depto. de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del IPN) de la misma especie para realizar una comparación, en cuanto a su poder

de inhibición contra fitopatógenos.

Para la producción del extracto crudo se realizaron curvas de crecimiento con *B. licheniformis* (B2) y (ATCC 9980) en caldo papa dextrosa.

Las curvas de crecimiento de las dos cepas B2 y *B. licheniformis* (ATCC9980) muestran que su máximo desarrollo lo alcanzan a las 18 horas de incubación (Figuras R-1 y R-2).

La diferencia en crecimiento de las dos cepas fue realmente marginal. B2 alcanzó su máximo desarrollo a las 18 horas con 800 unidades klett, mientras que *B. licheniformis* (ATCC9980) en 750 unidades klett, manteniéndose constante a partir de las 30 horas con 450 unidades klett. La cepa B2 se mantuvo constante a partir de las 30 horas con 500 unidades klett (Fig. R-1 y R-2)

Se obtuvieron 70 ml de extracto crudo (filtrado crudo) de *B. licheniformis* (B2) con caldo papa dextrosa y 70 ml de extracto crudo de *B. licheniformis* (ATCC 9980).

#### 4.5 Valoración del extracto crudo

La concentración de células por mililitro para la producción del extracto crudo fue de  $3.74 \times 10^7$ . La valoración del extracto crudo sólo fue positiva para *Monilinia fructicola* con el filtrado proveniente de B2 (*B. licheniformis*) como se observa en las Tablas R-6, R-7, R-8; Figuras R-6 y R-7.

TABLA R-1

BIOENSAYO 1 (*Bacillus* vs *Monilinia fructicola*)  
 MEDICION DE HALOS DE INHIBICION EN mm

BACILLUS	IZQUIERDA	CENTRAL	DERECHA
B1	05.00	07.00	08.00
B1	05.00	08.00	08.00
B1	06.56	08.00	06.00
B2	12.00	12.00	17.00
B2	13.00	14.00	16.00
B2	12.70	11.00	17.00
B4	06.00	07.00	04.00
B4	06.00	05.00	05.00
B4	06.30	04.50	05.70
B9	04.00	05.00	02.00
B9	03.00	06.00	03.00
B9	03.30	01.80	05.00
B11	08.00	07.00	08.00
B11	07.00	07.00	08.00
B11	06.50	08.30	07.50
B13	10.00	06.00	09.00
B13	09.00	08.20	06.70
B13	11.40	05.10	07.80
B14	02.00	04.00	01.00
B14	03.30	04.00	01.70
B14	02.50	04.60	09.00
B16	06.20	06.10	06.00
B16	06.00	07.00	05.10
B16	06.30	07.00	05.30
B20	08.00	01.00	09.00
B20	08.00	02.00	06.50
B20	07.50	02.70	06.20
B21	03.00	05.00	02.00
B21	03.50	06.00	01.50
B21	01.90	05.30	03.40
B22	00.50	07.00	07.00
B22	05.00	08.00	06.70
B22	06.10	06.70	06.90
B23	06.20	06.30	06.50
B23	06.50	06.00	05.90
B23	06.50	05.70	07.00
B24	05.00	05.00	09.00
B24	08.00	03.00	07.50
B24	04.10	05.30	08.90
B25	03.00	04.00	01.00
B25	04.00	02.50	02.00
B25	02.80	03.70	03.00

TABLA R-2

BIOENSAYO 2 (*Bacillus* vs *Monilinia fructicola*)  
 MEDICION DE HALOS DE INHIBICION EN mm

BACILLUS	IZQUIERDA	CENTRAL	DERECHA
B1	05.90	07.70	07.30
B1	07.50	07.90	06.00
B1	06.60	07.50	06.20
B2	10.00	13.80	16.70
B2	12.80	14.70	15.60
B2	13.00	10.00	16.00
B4	06.20	06.40	04.30
B4	04.90	05.50	05.30
B4	06.40	04.60	05.70
B9	03.90	05.50	01.70
B9	04.30	06.80	02.00
B9	02.70	02.30	05.10
B11	07.80	06.23	08.50
B11	07.00	07.60	06.50
B11	06.80	08.10	07.70
B13	10.20	05.40	09.10
B13	09.50	07.00	06.60
B13	10.50	06.20	07.50
B14	01.90	03.60	01.60
B14	02.90	03.70	02.00
B14	03.10	02.80	01.00
B16	06.40	05.63	04.20
B16	06.60	05.30	06.10
B16	07.40	05.60	04.80
B20	07.70	02.00	08.00
B20	07.10	03.20	05.60
B20	07.70	03.60	05.50
B21	03.10	04.80	01.90
B21	04.00	05.30	02.70
B21	04.00	02.20	04.30
B22	05.50	06.80	07.20
B22	06.10	07.60	05.70
B22	06.40	06.00	06.70
B23	07.23	06.00	07.00
B23	07.00	05.10	05.90
B23	07.20	06.20	06.00
B24	06.00	04.30	08.76
B24	07.60	03.20	07.80
B24	04.60	06.10	07.90
B25	03.00	04.00	01.00
B25	04.00	02.50	02.00
B25	03.00	03.30	03.80

TABLA R-3

BIOENSAYO 3 (*Bacillus* vs *Monilinia fructicola*)

MEDICION DE MALOS DE INMISION EN mm

BACILLUS	IZQUIERDA	CENTRAL	DERECHA
B1	05.50	06.50	08.10
B1	05.60	08.10	06.00
B1	07.60	06.60	06.00
B2	12.10	11.90	16.90
B2	13.00	15.00	14.30
B2	12.90	10.60	15.00
B4	06.60	07.50	03.20
B4	04.90	05.50	05.30
B4	06.40	04.60	05.70
B9	04.10	04.30	02.80
B9	04.00	05.75	03.20
B9	03.10	02.00	05.50
B11	07.80	06.23	08.50
B11	07.00	07.60	06.50
B11	06.80	08.10	07.70
B13	10.00	05.60	09.00
B13	09.60	07.70	06.70
B13	11.20	07.10	06.60
B14	02.10	02.30	03.00
B14	03.00	02.60	02.00
B14	04.00	01.00	02.00
B16	07.60	03.00	06.80
B16	06.60	07.20	04.90
B16	06.70	06.90	04.60
B20	07.70	02.00	08.00
B20	07.10	03.20	05.60
B20	07.70	03.60	05.50
B21	03.20	04.68	01.90
B21	04.50	06.00	01.80
B21	03.00	05.60	02.90
B22	06.00	06.10	06.90
B22	06.20	07.00	06.10
B22	05.60	07.00	07.40
B23	06.30	05.30	07.80
B23	06.50	06.30	04.73
B23	07.20	05.30	07.00
B24	07.00	05.00	07.40
B24	07.60	03.50	05.10
B24	05.00	05.80	06.00
B25	03.20	01.50	03.20
B25	03.00	02.20	01.50
B25	03.10	03.60	03.00

TABLA R-4

IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO *Bacillus*

	B1	B2	B4	B9	B11	B13	B14	B16	B20	B21	B22	B23	B24	B25
A) TINCION DE GRAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B) POSICION DE LA ESPORA	C	C	C	C	C	C	T	C	T	T	C	C	C	C
C) MOTILIDAD	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D) HIDROLISIS DE GELATINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E) HIDROLISIS DE ALMIDON	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F) HEMOLISIS DE SANGRE	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
G) PEPTONIZACION DE LECHE TORMASOLADA	KPR	KPR	KPR	KPC	KPC	KPR	KPR	KPR	KPR	KPC	KPC	KPC	KPC	KPR
H) UTILIZACION DE CITRATO	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
I) REDUCCION DE NITRATO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
J) REACCION DE VOGES-PROSKAUER	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
K) UTILIZACION	ARABINOSA	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
	GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MANITOL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	SALICINA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L) CRECIMIENTO EN NaCl AL 7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
M) CRECIMIENTO A PH 5.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

LA REACCION (X), NO ESTA FUNDAMENTADA EN LA LITERATURA CITADA; (++) CORRESPONDE A REACCIONES QUE PUEDEN SER POSITIVAS O NEGATIVAS; (+) ES POSITIVO; (-) NEGATIVO; (V) ES VARIABLE; (C) LA POSICION DE LA ESPORA ES CENTRAL EN EL *Bacillus*; (P) FORMACION DE SUERO; (K) PEPTONIZACION; (C) COAGULO; (R) BLANCO (REDUCCION).

TABLA R-5

ESPECIES DE IDENTIFICADAS DEL GENERO *Bacillus*

<i>B. techeniformis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. mycolides</i>
B2	B16	B1	B4
B13	B24	B11	B9
	B23		B14
	B22		B20
			B21
			B25

TABLA R-6

## BIENSAYO 4

EXTRACTO CRUDO DE B2 VS *Monilinia fructicola* (mm)

NO. DE REPLICA	IZQUIERDA	CENTRAL	DERECHA
1	13.20	11.35	11.00
2	11.00	10.00	13.00
3	13.00	12.00	14.00

TABLA R-7

## BIENSAYO 5

EXTRACTO CRUDO DE B2 VS *Monilinia fructicola* (mm)

NO. DE REPLICA	IZQUIERDA	CENTRAL	DERECHA
1	13.00	14.00	11.00
2	11.00	14.00	11.00
3	10.00	11.00	10.00

TABLA R-8

## BIENSAYO 6

EXTRACTO CRUDO DE B2 VS *Monilinia fructicola* (mm)

NO. DE REPLICA	IZQUIERDA	CENTRAL	DERECHA
1	11.00	10.00	14.00
2	13.00	11.00	13.00
3	12.00	10.00	12.00

FIGURA R-1

CURVA DE CRECIMIENTO DE *Bacillus licheniformis* (ATCC9980) EN CALDO PAPA DEXTROSA

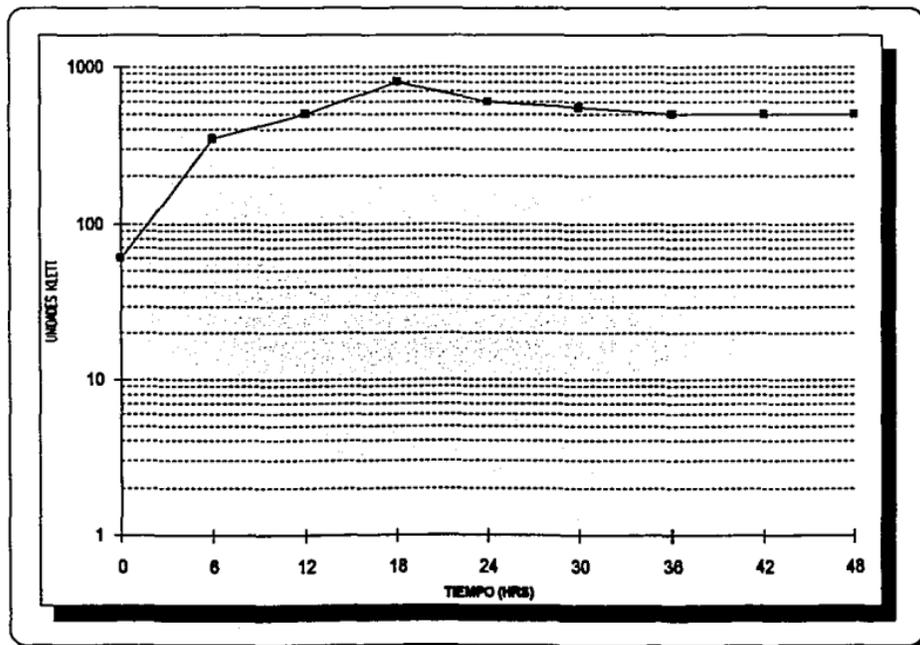
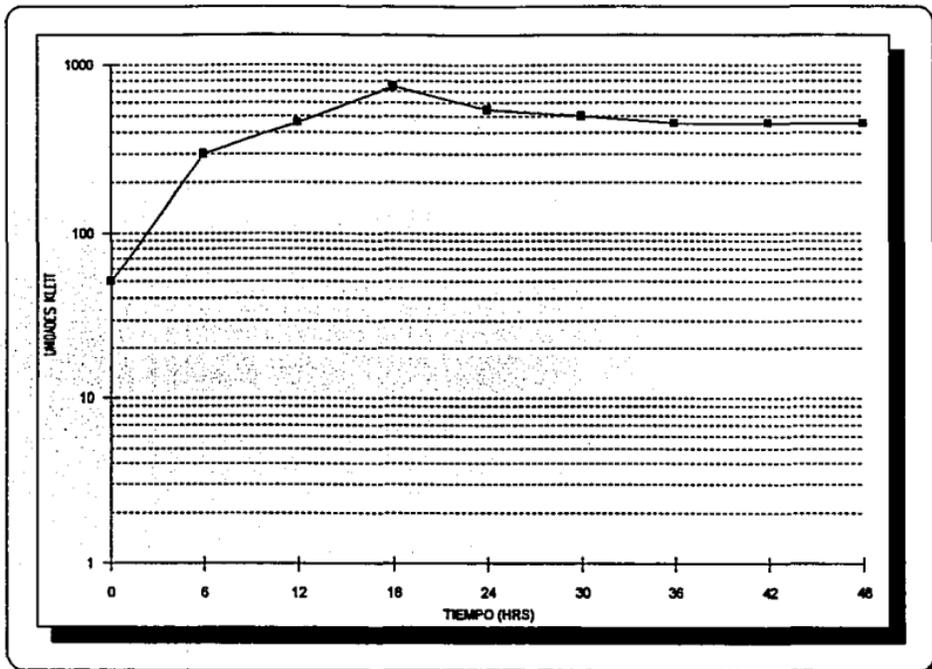


FIGURA R-2

CRECIMIENTO DE *Bacillus licheniformis* (B2) EN CALDO PAPA DEXTROSA



#### 4.6 Análisis estadístico de resultados

Para llevar a cabo el análisis de los resultados, se conjuntaron los valores de los bioensayos duales, es decir, los bioensayos de *Bacillus* vs *Monilinia fructicola* y los bioensayos con el extracto crudo vs *Monilinia fructicola*.

Los datos muestran que las desviaciones estándares presentadas son pequeñas, la desviación estándar más alta la presenta el extracto crudo, le sigue B2, es decir, el halo de inhibición fue más irregular en los bioensayos de esta bacteria y su extracto crudo. (Tabla R-9).

TABLA R-9 MEDIAS Y DESVIACIONES ESTANDARES DE LOS RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS

BACTERIA	NO. DE CASOS	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR
B1	9	0.6784	0.236
B2	9	13.667	0.536
B4	9	05.500	0.192
B9	9	03.783	0.372
B11	9	07.399	0.225
B13	9	08.063	0.244
B14	9	02.541	0.253
B16	9	05.975	0.249
B20	9	05.619	0.261
B21	9	03.604	0.318
B22	9	06.500	0.120
B23	9	06.320	0.282
B24	9	06.054	0.425
B25	9	02.848	0.355
EXTRACTO CRUDO	9	11.946	0.868

En la prueba de Bartlett los valores obtenidos son los siguientes  $F$  calculada = 3.78;  $F$  tabulada = 14; 8099 con una significancia de  $\alpha = 0.05$ .

En la prueba de Tukey los datos fueron los siguientes:

TABLA R-10

ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE	SUMA DE LOS CUADRADOS	F CALCULADA	SUMA DE LOS CUADRADOS	F	SIGNIFICANCIA
ENTRE GRUPOS	1162.280	14	84.449	609.673	0.05
CON GRUPOS	16.622	120	0.139		

En la tabla R-11 se muestra la matriz de comparación de las medias obtenidas de los resultados en los bioensayos, la cual nos muestra las diferencias entre cada una de las medias resultantes de los ensayos. La mayor diferencia entre las medias, la presenta la bacteria B2 contra B25 con 10.819 mm y la menor diferencia se presenta con 0.180 entre las bacterias B22 y B23. Con respecto al extracto crudo de B2 y la bacteria B2 la diferencia es de 1.72, siendo más pequeña la media del extracto crudo (Fig. R-3).

El análisis estadístico indicó que la diferencia entre los promedios de los halos de inhibición de los bioensayos, son estadísticamente significativos. Como se observa en la tabla R-10, los valores de  $F$  observados indican una significancia alta ( $P$  95%) para todos los bioensayos, por lo tanto las diferencias que se observaron se deben al efecto de las bacterias y no al azar. En síntesis las medias presentan diferencias entre sí.

TABLA R-11

MATRIZ DE DOBLE COMPARACION DE MEDIAS (VALOR ABSOLUTO)

	B1	B2	B4	B9	B11	B13	B14	B16	B20	B21	B22	B23	B24	B26	EXTR
B1	0.000														
B2	6.883	0.000													
B4	1.284	8.167	0.000												
B9	3.000	9.883	1.717	0.000											
B11	0.615	6.288	1.899	3.615	0.000										
B13	1.279	5.604	2.563	4.280	0.664	0.000									
B14	4.243	11.126	2.959	1.243	4.858	5.522	0.000								
B16	0.809	7.691	0.475	2.192	1.423	2.086	3.434	0.000							
B20	1.165	8.048	0.119	1.635	1.780	2.444	3.078	0.357	0.000						
B21	3.180	10.063	1.898	0.180	3.975	4.459	1.063	2.371	2.015	0.000					
B22	0.284	7.167	1.000	2.717	0.899	1.583	3.959	0.525	0.881	2.898	0.000				
B23	0.464	7.347	0.820	2.536	1.079	1.743	3.779	0.344	0.701	2.716	0.180	0.000			
B24	0.730	7.813	0.554	2.271	1.344	2.009	3.513	0.079	0.436	2.450	0.446	0.286	0.000		
B26	3.936	10.819	2.852	0.935	4.560	5.215	0.307	3.127	2.770	0.758	3.952	3.471	3.206	0.000	
EXTR	5.163	1.72	6.446	8.163	4.548	3.883	9.406	5.971	6.326	8.343	5.446	5.627	5.692	9.096	0.000

FIGURA R-3

MEDIAS DE LOS VALORES RESULTANTES DE LOS BIOENSAYOS

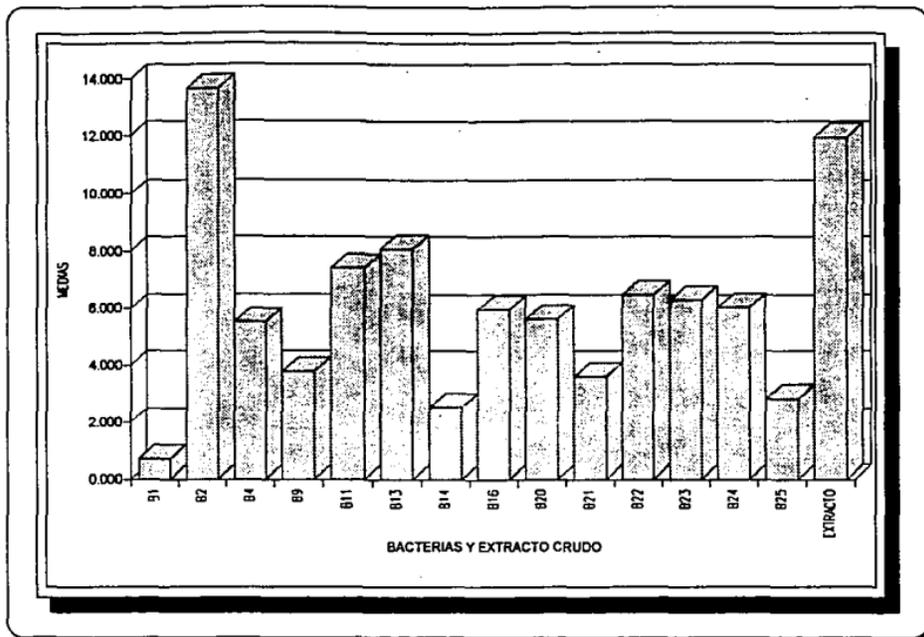


FIGURA R-4 Monilia fructicola CONTRA B2 (B. licheniformis)

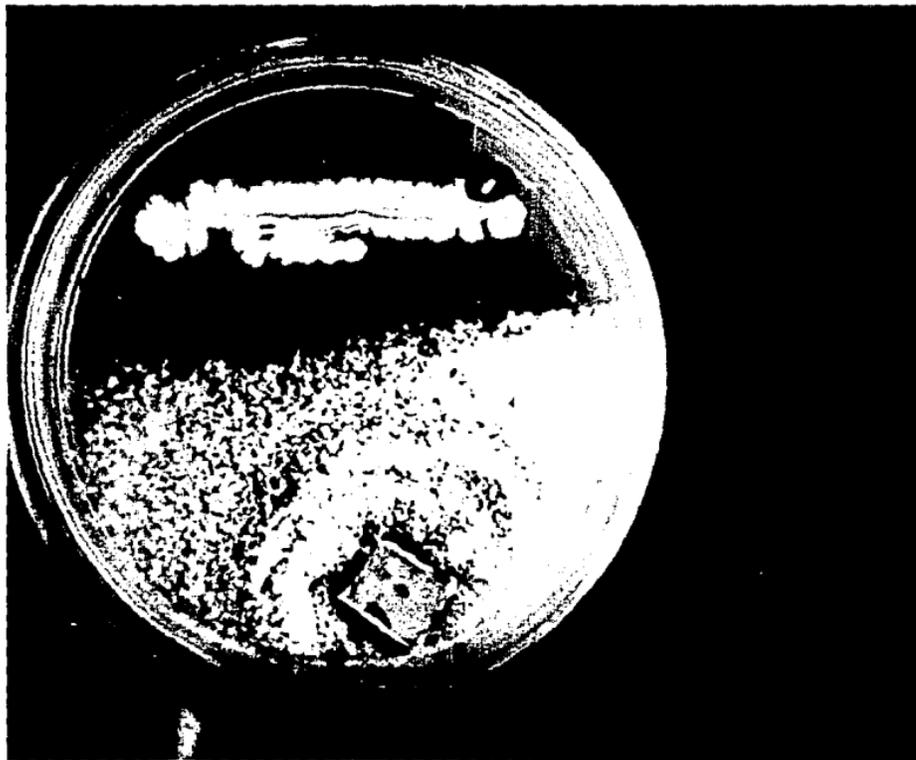
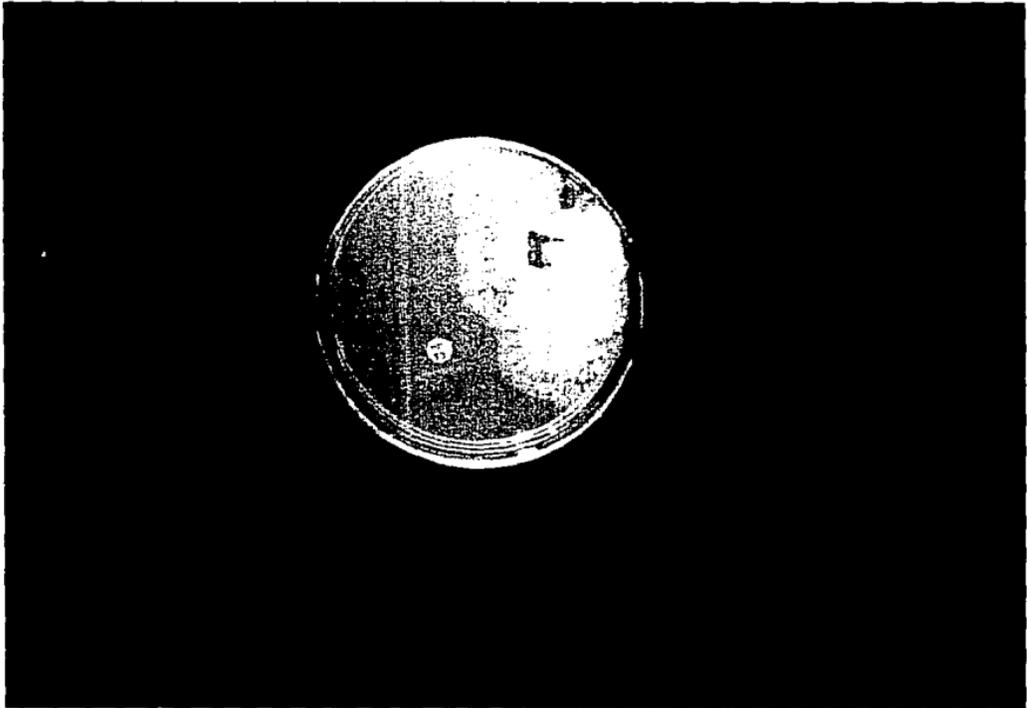


FIGURA R-5 *Monilinia fructicola* CONTRA B2 (*B. licheniformis*)



FIGURA R-6 Monilia fructicola CONTRA EXTRACTO CRUDO DE B2 (B. licheniformis)





## V DISCUSION DE RESULTADOS

El análisis de resultados de ésta investigación se centran fundamentalmente en 3 aspectos:

- 1) Identificación de especies de Bacillus antagonicas
- 2) Producción y valoración del extracto crudo
- 3) Posibilidades de uso del género Bacillus para el control biológico de Monillinia a f

### 1) Identificación de especies antagonicas

Este estudio se inició con el aislamiento de bacterias Gram positivas y esporógenas, ya que la mayoría de las bacterias formadoras de endosporas causan daños a otros organismos mediante la producción de toxinas (Stanier, 1986).

De las cepas aisladas sólo 14 fueron Gram positivas y endosporógenas, este resultado nos muestra la gran diversidad de microorganismo que habitan lo suelos agrícolas y de las posibilidades de obtener este tipo de bacterias para el control biológico de fitopatógenos. En años recientes se ha incrementado el interés por el estudio de microorganismo habitantes del suelo, por ofrecer alternativas para su uso, puesto que son productores de sustancias tóxicas, las cuales pueden ser utilizadas para el control de otros organismos (Di Pietro, et al., 1991; Salle, 1965).

Las cepas seleccionadas como Gram Positivas y formadoras de endosporas, pertenecen al género Bacillus, presentando cierto grado de antagonismo contra Monillinia fructicola. Esto nos muestra la capacidad del género para producir sustancias tóxicas, ya que son considerados como productores de amilasas, proteasas y antibióticos (Steele, 1991).

De las cepas identificadas 2 pertenecen a la especie B. licheniformis; 4 a B. circulans; 2 a B. subtilis y 6 a B. mycolides. Esto nos muestra que se encuentran mayor número de representantes de las especies B. mycolides y B. subtilis (Tabla R-5).

La cepa que presentó mayor halo de inhibición fue B2 perteneciente a la especie de B. licheniformis, le sigue B13 de la misma especie y B11 (B. subtilis) como se muestra en la Tabla R-1, R-2, R-3 y R-9.

Las dos especies que mayor halo de inhibición presentaron fueron B. licheniformis y B. subtilis con menor número de representantes. Las especies con mayor número de representantes presentaron menores halos de inhibición.

Para la identificación de las especies se conjuntaron 2 tablas de características diferenciales de Bacillus, de diferente literatura para que la identificación de las especies fuera lo más fiel posible, ya que no se utilizó la cuenta del porcentaje de Citocina-Guanina en ADN de las especies (Harwood, 1989).

## 2) Producción y valoración del extracto crudo

Las curvas de crecimiento de B. licheniformis (B2) y B. licheniformis (ATCC9980) nos muestran que alcanzan su máximo desarrollo a las 18 hrs. En la literatura ésta especie alcanza su máximo desarrollo a las 24 horas, en esta curva de crecimiento no se menciona el medio utilizado, ni las condiciones de incubación.

Existe una diferencia marginal entre las curvas de crecimiento de las dos cepas. La cepa de colección tiene menor desarrollo que la cepa silvestre (B2). Las posibles causas de esta diferencia son dos, la primera es que B. licheniformis (ATCC9980) no se adaptó totalmente al medio utilizado, la segunda es que su capacidad de desarrollo está aún limitada, por el largo período de almacenamiento (9 años) en liofilización.

Las curvas de crecimiento se realizaron básicamente para determinar el tiempo de incubación para la producción del extracto crudo.

Se produjeron 2 tipos de extracto crudo, los cuales fueron valorados frente a Monilinia fructicola, resultando sólo positivo el extracto crudo de B. licheniformis (B2) con el medio caldo papa dextrosa. El extracto crudo de B. licheniformis (ATCC9980) no presentó inhibición de crecimiento de Monilinia fructicola. Lo que muestra que el medio de caldo papa dextrosa es propicio para la producción de toxinas en la cepa B2, pero no así para la cepa de colección ATCC9980.

Este resultado se debe a que la composición de un medio puede influir en las actividades antibióticas de un microorganismo. Algunos sustratos carecen de efecto apreciable en la estimulación a la producción de toxinas, otros la pueden reducir y algunos la estimulan, aún en miembros de la misma especie (Salle, 1965).

La cepa B. licheniformis tiene una mayor capacidad de inhibición de crecimiento de Monilinia fructicola que B. licheniformis (ATCC9980), este resultado puede deberse a varias razones: que la cepa (ATCC9980) haya perdido gran parte de su capacidad de producción de toxinas, o por ser especialmente productora de ácido glutámico y no tiene la capacidad de producción de compuestos tóxicos para Monilinia. Algunos microorganismos pierden la capacidad de la producción de antibióticos al ser extraídos de su medio, debido a que no son estimulados por otros microorganismos competidores (Demian, 1984; Catalogue of bacteria Phages rDNA vectors, 1985).

### 3) El uso de especies del género Bacillus como fungicidas.

El género Bacillus es considerado como productor de amilasas, proteasas y antibióticos (Steele, 1991). Recientemente las investigaciones sobre su potencial como fungicidas se han incrementado.

A continuación se describen los usos de las especies de Bacillus que presentaron antagonismo frente a Monilinia, en especial B. Licheniformis por presentar mayor grado de antagonismo contra el fitopatógeno antes mencionado.

#### Bacillus licheniformis (Weigman 1996)

B. licheniformis es un bacilo que puede medir de 0.6 a 0.8 micrones de ancho y 1.5-3.0 micrones de largo. Se tinte uniformemente, no forma cápsula aunque pueden presentarse algunas variaciones y puede formar cápsula. Es un microorganismo móvil, Gram positivo. Forma esporas de 0.6-0.9 micrones de ancho y 1.0-1.5 micrones de largo, pueden ser elipsoides o cilíndricas, la posición de la espora puede ser central o para-central. Algunas de estas se forman en 48 hrs. a 37°C, aunque algunas pueden tardarse de 2 a 3 semanas (Bergey's Manual, 1984).

Este Bacillus puede crecer también anaeróbicamente a expensas de sustratos orgánicos no fermentables cuando se les suministra nitrato, ya que es un vigoroso desnitrificante; es la única especie de Bacillus que tiene esta capacidad (Stanier, 1986).

La especie B. licheniformis no ha sido utilizada para el control de fitopatógenos. En la literatura se le considera como uno de los principales productores de bacitrina, antibiótico que sólo es utilizado para combatir bacterias Gram positivas, Gonococos y acidorresistentes. También es productor de alfa amilasa, beta lactamasa, subtilincarsberg, ciclodextrin-glucotransferasa, serina proteasa utilizadas en la industria (Bryan, 1971; Salle, 1965; Stanier et al., 1986; Simonen et al., 1993, Porter, 1985; Harwood y Mazur, 1989).

La bacitrina es una mezcla compleja de polipéptidos, tiene al menos cinco componentes. La hidrólisis ácida del principal de ellos da una mezcla de L- leucina, L- Iisina, L- histidina, D- fenilalanina, D- ornitina, ácido D- glutámico y ácido DL- aspártico (Salle, 1965; Fig. D-1).

Stanier (1986) reporta que la producción de Bacitrina por B. licheniformis comienza a las 6 hrs. de haber iniciado el crecimiento del microorganismo, alcanzando su máxima producción a las 18 hrs. con una concentración de 46 microgramos/ml, sin embargo en esta investigación, el mayor crecimiento de B. licheniformis no concuerda con la mayor producción de Bacitrina (Figura D-2 y D-3).

Las especies B. Mycodex y B. circulans son caracterizadas en la literatura como productoras de Beta amilasas y utilizadas en la industria alimentaria (panadería). Alfa amilasa también es producida por B. circulans, esta proteína sirve para la producción de jarabas, aunque ya en producción a grandes escalas las especies que se utilizan son B. amyloquelicifera y B. licheniformis (Fogarty, 1983, Harwood y Mazur, 1989).

B. circulans también produce Beta glucanasa, conjuntamente con B. amyloquelicifera, sustancia de uso comercial (Priest, 1984). Recientemente se han realizado investigaciones donde demuestran que B. circulans puede ser empleado como insecticida y productor de kanamycin, un antibiótico (Priest, 1984; Thompson and Davis, 1984).

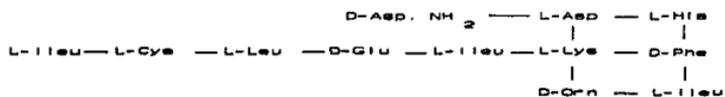
B. subtilis es una de las especies más utilizadas para investigaciones de funcionamiento, replicación y código genético a nivel celular, mecanismos de esporulación y como productora de bacitrina, subtilina, fosfatasa alcalina, Alfa amilasa, bacilopeptidasa F, proteasa extracelular, B glucanasa, levanas, levansucrasa, metaloproteasa, subtilisina E (Simonen et al., 1993).

Esta especie es utilizada ampliamente como agente contra hongos fitopatógenos (Babad et al., 1962; Errington, 1993, McKeen et al., 1986; Pusey y Wilson, 1984; Singh et al., 1984; Swinburne et al., 1975).

FIGURA D-1

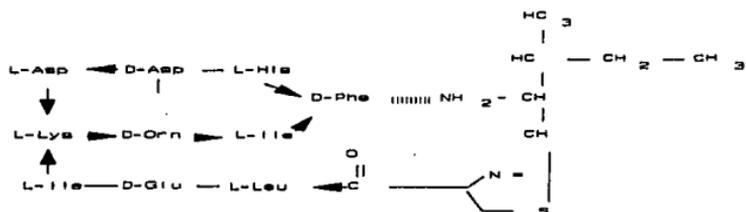
ESTRUCTURA QUIMICA DE LA BACITRINA

BACITRINA A



(Stanier, 1968)

BACITRINA



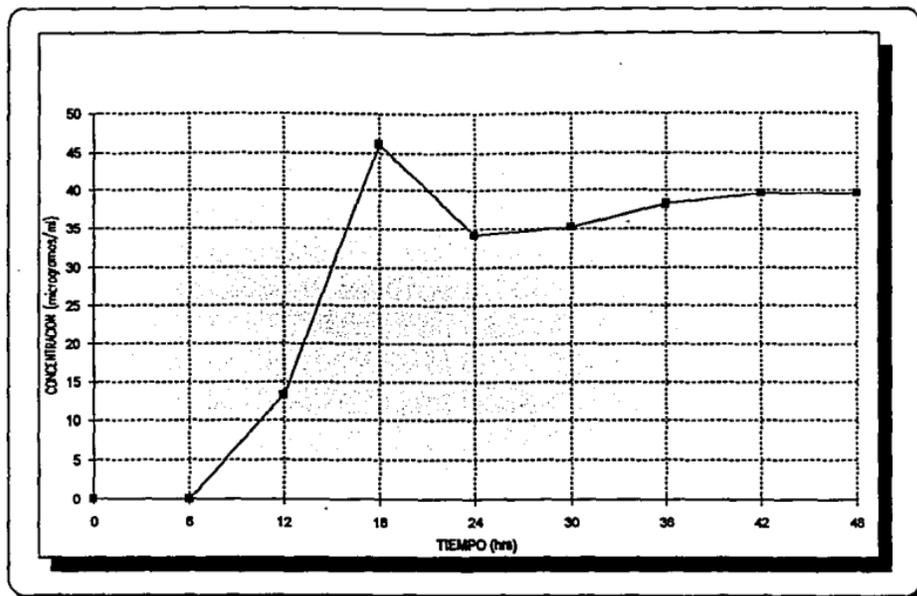
ABREVIATURAS:

ORNITINA, Orn; ASPARRAGINA, Asp<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; FENILALANINA, Phe;  
 LEUCINA, Leu; ISOLEUCINA, Ileu; ACIDO GLUTAMICO, Glu;  
 LISINA, Lys; HISTIDINA, His.

(FARMACOPEA, SECRETARIA DE SALUD, 1968, MEXICO)

FIGURA D - 2

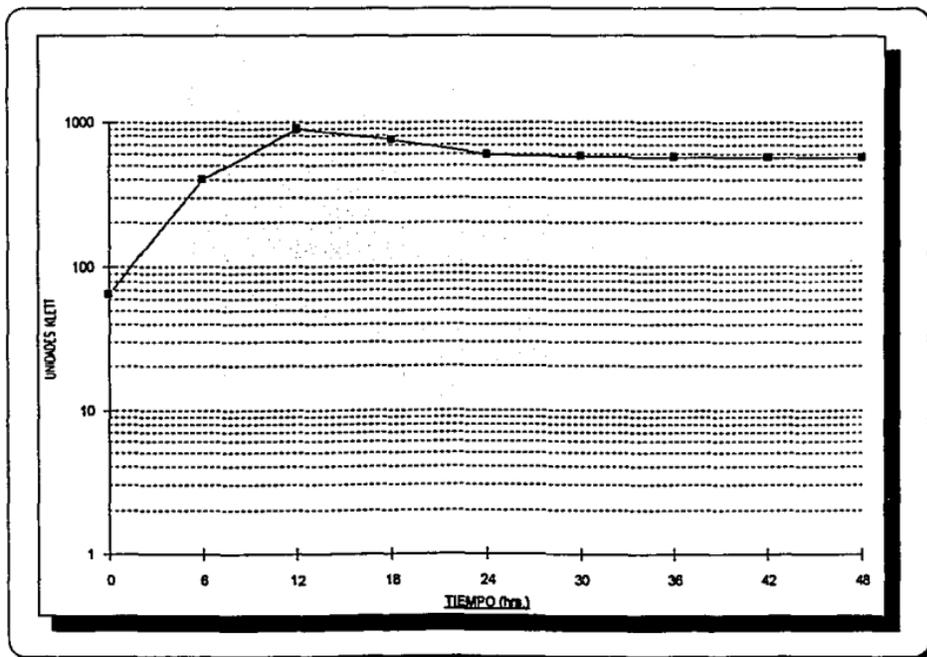
PRODUCCION DE BACITRINA (*Bacillus licheniformis*)



FUENTE: STANIER, 1966.

FIGURA D - 3

CRECIMIENTO DE *Bacillus licheniformis*



FUENTE: STANIER, 1966.

## VI CONCLUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos sugieren que existen posibilidades para el uso de especies de Bacillus en el control de Monilinia fructicola.

Las especies identificadas como antagonicas a Monilinia fueron B. licheniformis, B. mycoloides, B. circulans y B. subtilis, de las cuales las tres primeras no están reportadas en la literatura como fungicidas de fitopatógenos en pruebas realizadas *in vitro*.

La cepa B2 (B. licheniformis) presentó mayor inhibición de crecimiento de Monilinia fructicola, lo cual nos muestra su gran potencial para el control de este fitopatógeno.

B. subtilis es la única especie, de las cuatro mencionadas anteriormente, que ha sido ampliamente utilizada para el control de fitopatógenos (Babab et al., 1952; Errington, 1993; Mokeen et al., 1986; Pusey y Wilson, 1984; Singh et al., 1984; Swinburne et al., 1975).

El hecho de que cuatro especies de Bacillus presenten antagonismo frente a Monilinia, nos muestra el potencial del género Bacillus para ser utilizado en el control biológico de este fitopatógeno.

Se requieren mayores investigaciones para la producción del extracto crudo, extracción y purificación de las toxinas producidas por B. licheniformis (B2) y cotejarlas con las sustancias que están reportadas en la literatura, para determinar que sustancias son las que inhiben el crecimiento de Monilinia fructicola y realizar estudios del comportamiento o efecto de B. licheniformis a nivel Invernadero y campo, para poder establecer su efectividad en el campo.

**VII BIBLIOGRAFIA**

**Abd-el-Malek, Y. and Gibson, T. (1948).** "The bacteriology of milk. II. The staphylococci and micrococci of milk". J. Dairy Res., **15**: 249.

**Agrios, N. G. (1985).** Fitopatología. Ed. Limusa, México, 758 p.

**Aicani, I. E. (1990).** Microbiology. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, 3<sup>a</sup> Edition. EUA. 960p

**Atkins, C.J. and Mims, C.W. (1979).** Introductory Microbiology. Ed. John Wiley & Sons, EUA, 632 p.

**Aoyagi, T., Yoshida, S., Matsuda, N., Ikeda, T., Hamada, M., and Takeuchi, T. (1991).** "Leuhistin, A New Inhibitor of Aminopeptidase M, Produced By *B. laterosporus* BMI156-14F1", Journal Antibiotics, **44**:573-588.

**Asanie, G.S., and Neal, A.L. (1964).** "Characterization of fungistatic substance produced by *Bacillus antagonisticus* to *Ceratocystis ulmi*". Phytopathol. **54**:819-822.

**Atlas, M.R. (1990).** Microbiología (Fundamentos y Aplicaciones), Ed. CECSA, 450p.

**Babad, J., Pinsky, A., Turner-Graff, R., and Sharon, N. (1952).** "An Antifungal Polypeptide Produced by *Bacillus subtilis*". Nature **170**:1148-1152.

**Baker, K.F. and Cook, R.J. (1982).** "Biological Control of Plant Pathogens". American Phytopathological Society. 433 pp.

**Baldon, L.R. (1985).** "Separation and purification of bacteria from soil". Applied and Environmental Microbiology, **49**:1482-1487.

**Barberá, C. (1989).** Pesticidas Agrícolas. 4a. Edición. Editorial Omega. España. 603p.

**BBL Manual of Products and Laboratory Procedures. (1968).** 5th ed., Cockeysville, Md.: Division of BioQuest, Division of Becton, Dickinson and Company, p. 99 y 126.

**Berdý, J. (1987).** "Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure". Adv. Appl. Microbiol. **18**:309-406.

**Bernlohr, R.W. and Novelli, G.D. (1963).** Arch. Biochem. Biophys. **103**:94-104.

**Berry, D.R. (1975).** In The Filamentous Fungi. Vol. 1 (Smith J.E. and Berry, D.R., eds.), Inglid. pp.16-32

- Besson, F. Peypoux, F., Michel, G. and Delcambe, L. (1976). "Characterization of Iturin A in Antibiotics from Various Strains of *Bacillus subtilis*". *J. Antibiotics*, 29:1043-1049.
- Blowers, A. (1991). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society For Microbiology, 5ª Edición, E.U.A., 1364 p.
- Branan, A.L. and Keenan, T.W. (1971). "Diacyl and acetoin production by *Lactobacillus casei*". *Appl. Microbiol.*, 22:517.
- Branson, D. (1972). *Methods in Clinical Bacteriology*, Charles, C. Thomas, Publisher, pp.49-51.
- Brien, P.W. (1967). "The Ecological Significance of Antibiotic Production". *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 7:168-188.
- Bryan, A. H. (1971). *Bacteriología*, Ed. CECSA, 6a. Edición, 595p.
- Burlock, J.D. (1975) *Develop. Ind. Microbiol.* 16:11-19.
- Burlock, J.D. (1961) *Adv. Appl. Microbiol.* 3:293-342.
- Burachik, M., Leardini, N. A., and Paladini, A. C. (1964). "Three Antifungal Polypeptides from *Bacillus subtilis*". *Experientia*. 20:504-505.
- Burdon, K.L. y Williams, R.P. (1982). *Microbiología*, E. Publicaciones cultural, 6ª reimpresión. 1ª edición, México, 830p.
- Burrows, W. and Moulder, J.W. (1968). *Text-book of microbiology*, Vol. I, 19th ed., W. B. Saunders Company, p.324.
- Cantarrow, A. and Schepartz, B. (1962). *Biochemistry*, 3rd ed., W.B. Saunders Company, pp. 273 and 792-793. *Catalogue of Bacteria Phages rDNA Vectors*, 16th Edition, 1985
- Chelutz, E. and Wilson, C.L. (1990). "Postharvest Biocontrol of Green and Blue Mold and Sour of Citric Fruit by *Debaromyces hansenii*". *Plant Dis.* 74:134-137.
- Comisión Nacional de Fruticultura. (1991). "El Durazno". Rev. El Campo, No.1196, Año LXVIII.
- Cook, J.R. (1985). "Biological Control of Plant Pathogens: Theory to Application". *Phytopathol.* 75:25-29.

Cook, J. and Baker, K.F. (1983). "The Nature Practice of Biological of Plant Pathogens". Am. Phytopathol. Soc., EUA, 539 pp.

Cowan, S.T. and Steel, K.J. (1966). Manual for the Identification of Medical Bacteria, Cambridge University Press, pp. 13, 19, 23, 27-28, 33, 93-94, 108, 116, 120, 129, 132, 148, 156, 159-160 and 161.

Cromlyn, R., (1978). Pesticides (Preparation and mode of action). John Wiley and Sons.

Dahn, U., Hagenmales, H., Hohne, H., König, W.A., Wolf, G., et al. (1976). "Stoffwechselprodukte von mikroorganismen. Nikkomycin, ein neuer hemmstoff der chitinsynthese bei pilzen". Arch. Microbiol. 107:143-160.

De Cal, A., M-Sagata, E., Melgarejo, P. (1988). "Antifungal substances produced by Penicillium frequentans and their relationship to the biocontrol of Monilinia laxa". Phytopathology. 78:888-893.

Demian, A.L. (1968). Lloydia 31:395-418.

Demian, A.L. (1975). "Why mode of action studies". Chem. Technol. 5:287-289.

Demian, A.L. and Piret, J.M. (1981). Why Secondary Metabolism?. D. Schlesinger (Ed.). American Society for Microbiology, EUA.

DIFCO Manual. (1953). 9th ed., Difco Laboratories, EUA. 530p.

DIFCO Supplementary Literature. (1968). Difco Laboratories, EUA. p.52.

Di Pietro, D., Gut-Rella, M., Pachlatko, J.P., Schwinn, A. (1991). "Role of Antibiotics Produced by Cheatomium globosum in Biocontrol of Pythium ultimum, a Causal Agent of Damping-off." Phytopathology 82:131-136.

Doelle, H. W. (1969). Bacterial Metabolism, Academic Press, EUA pp. 335, 284-291, 293-298 and 368-369.

Eddy, B.P. (1961). "The Voges Proskauer reaction and its significance: a review." J. Appl. Bacteriol., 24:27.

Eigen, M. y Winkler, R. (1975). "Das Spiel". Piper and Co., Verlag Munich.

El Sector Alimentario en México. Edición 1992, INEGI, CONAL, 308p.

Errington, J. (1983). "Bacillus subtilis Sporulation: Regulation of Gene Expression and Control of Morphogenesis". Microbiological Rev. 57:1-33.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (1988) 5a. Ed., Secretaría de Salud, México, p.1578

Feliciano A., Feliciano, A. J., Vandrúsculo, Adaskaveg, J. E., and Ogawa, J. M. (1992). "Efficacy of Ethanol in Postharvest Benomyl-DCNA Treatments for Control of Brown Rot of Peach". Plant Dis. **79**:226-220.

Fiedler, H. P., Kurth, R., Langharig, J., Delzer, J., Zahner, H., (1982). "Nikkomycins: Microbial Inhibitors of Chitin Synthase". J. Chem. Technol. Biotechnol. **32**:271-280.

Fieser, L.F., and Fieser, M. (1956). Organic Chemistry, 3rd ed., Reinhold Publishing Corporation, pp. 417 and 461.

Fokema N. J. 1973 "The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sarvum*) on agar plates and on rye leaves with pollen" Physiol. Plant. Pathol. **3**:195-205.

French, R.E. y Herbert, T.T. (1990). Métodos de Investigación fitopatológica, Editorial IICA, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Costa Rica, p.280

Galán-Wong, L.J. y Rodríguez, P.C. (1989). "Bioinsecticidas (Microbiología Industrial para su producción)". Información Científica y Tecnológica (CONACYT), **11**:44-47 No.154, México.

Gavilón, G., Juárez, J.C., Figueroa, H.H. (1972). Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo, Ed. Limusa, México, 251p.

Gottlieb, S. (1976). "The production and Role of Antibiotics in Soil". J. Antibiot. **29**:987-1000.

Graber, C.D. (1970). Rapid Diagnostic Methods in Medical Microbiology, The Williams & Wilkins Company, 343 p.

Gunsalus, I.C., and Campbell, J.J.R. (1944). "Diversion of the lactic acid fermentation with oxidized substrate". J. Bacteriol., **48**:455.

Gunsalus, I.C., and Stanier, R.Y. (1961). The Bacteria, Vol.II, Academic Press, pp. 84-89, 92-93, 130-131, 375, 416-417, y 452-453.

Heavik, H.J. (1979). Folia Microbiol. **24**:365-367.

Hesch, J.H. (1972). "Antibiotic mechanism". Ann. Rev. Pharmacol. **12**:35-56.

Harden, A. and Walpole, G.S. (1906). "Chemical action of *Bacillus lactis aerogenes* on glucose and mannitol production of 2,3-butyleneglycol and acetylmethylcarbinol". Proc. Roy. Soc. B., **77**:399.

Harrow, B. and Mazur, A. (1966). Textbook of Biochemistry, 9th ed., W.B. Saunders Company, p. 355.

Hernández, M., Chávez, H. y Bourges, H. (1987). Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos, Tablas de uso práctico, 10a Edición, México.

Herrera, T. y Ulloa, M. (1990). El Reino de los Hongos, Instituto de Biología, UNAM y Fondo de Cultura Económica, México, 1a edición, 562 p.

Hodgeon, B. (1970). J. Theor. Biol. 30:11-119

Hornby, D. (1983). "Suppressive soil. Annu. Rev. Phytopathol. 21:65-85.

Hosono, K. and Susuki, H. (1983). Acylpeptides, the inhibitors of Cyclo Adenosine 3',5' Monophosphate Phosphodiesterase I. Purification, Physicochemical Properties and Structure of Fatty Acid Residues". J. Antibiotics 36:667-673.

Hugh, R. and Lelfson, E. (1959). "The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria". J. Bacteriol. 66:24.

Isono, K. and Susuki, S. (1979). "The Polyoxyins: Pyrimidine Nucleoside Peptide Antibiotics Inhibiting Fungal Cell Wall Biosynthesis". Heterocycles 13:333-351.

Jackson, A.T. (1991). Process Engineering in Biotechnology, Prentice Hall Editor, 147 p.

Jenkins, P.T. (1968). "The Longevity of Conidia of Sclerotinia fructicola (Wint.)". Rehm. under Field Conditions. Aust. J. Biol. Sci. 21:937-945.

Jenkins, P.T. (1968). "A Method to Determine the Frequency of Airborne Bacteria antagonistic to Sclerotinia fructicola (Wint.)". J. Exp. Agric. Anim. Husb. 8:434-435.

Johnson, E. A. and Burdon, K. L. (1946). "Eumycin-A New Antibiotic Active Against Pathogenic Fungi and Higher Bacteria, Including Bacilli of Tuberculosis and Diphtheria". J. Bacteriol. 51:591.

Jones, A. L. and Ehret, G. R. (1976). "Isolation and characterization of benomyl tolerant strains for Monillinia fructicola". Plant Dis. Rep. 60:765-769.

Juni, E. and Hoym, G.A. (1956). "A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethylcarbinol, and diacetyl. I. General aspects of the 2,3-butanediol cycle". J. Bacteriol. 71:425.

Katan, T. and Shabl, E. S. (1981). "Resistance to dicarboximide fungicides in laboratory isolates of Monillinia

- Harrow, B. and Mazur, A. (1966). Textbook of Biochemistry. 9th ed., W.B. Saunders Company, p. 355.
- Hernández, M., Chávez, H. y Bourges, H. (1987). Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos. Tablas de uso práctico, 10a Edición, México.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1990). El Reino de los Hongos. Instituto de Biología, UNAM y Fondo de Cultura Económica, México, 1a edición, 552 p.
- Hodgson, B. (1970). J. Theor. Biol. 30:11-119
- Hornby, D. (1983). "Suppressive soil. Annu". Rev. Phytopathol. 21:65-85.
- Hosono, K. and Susuki, H. (1983). Acylpeptides, the Inhibitors of Cyclic Adenosine 3',5' Monophosphate Phosphodiesterase I. Purification, Physicochemical Properties and Structure of Fatty Acid Residues". J. Antibiotics 36:667-673.
- Hugh, R. and Lelfson, E. (1959). "The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria". J. Bacteriol. 66:24.
- Isono, K. and Susuki, S. (1979). "The Polyoxins: Pyrimidine Nucleoside Peptide Antibiotics Inhibiting Fungal Cell Wall Biosynthesis". Heterocycles 13:333-351.
- Jackson, A.T. (1991). Process Engineering in Biotechnology. Prentice Hall Editor, 147 p.
- Jenkins, P.T. (1968). "The Longevity of Conidia of Sclerotinia fructicola (Wint.)". Rehm. under Field Conditions. Aust. J. Biol. Sci. 21:937-945.
- Jenkins, P.T. (1968). "A Method to Determine the Frequency of Airborne Bacteria antagonistic to Sclerotinia fructicola (Wint.)". J. Exp. Agric. Anim. Husb. 8:434-435.
- Johnson, E. A. and Burdon, K. L. (1946). "Eumycin-A New Antibiotic Active Against Pathogenic Fungi and Higher Bacteria, Including Bacilli of Tuberculosis and Diphtheria". J. Bacteriol. 51:591.
- Jones, A. L. and Ehret, G. R. (1976). "Isolation and characterization of benomyl tolerant strains to Monillinia fructicola". Plant Dis. Rep. 60:765-769.
- Juni, E. and Heym, G.A. (1956). "A cyclic pathway for the bacterial dissimulation of 2,3-butanediol, acetyl/methylcarbinol, and diacetyl. I. General aspects of the 2,3-butanediol cycle". J. Bacteriol. 71:425.

Katan, T. and Shabi, E. S. (1981). "Resistance to dicarboximide fungicides in laboratory isolates of *Monilinia laxa*". J. Plant Pathol. 67:242.

Katz, E. y Demian, A.L. (1977). "The Peptide Antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis and Possible Functions". Bacteriol. Rev. 41:449-474.

Konish, M., Nisho, M. Saitoh, K., Miyaki, T. (1989). Journal Antibiotics, 42:1749-1755.

Kelly, A.T. and Fulton, M. (1953). "Use of triphenyl tetrazolium in motility test medium". Am. J. Clin. Pathol. 23:512.

Krasnikov, N.A. (1954). Usp. Sovrem. Biol. 37:22-32

Lainini, C. and Pareno, F. (1983). Antibiotics. Ed. Springer Verlag, 253p.

Landy, M., Warren, G. H., Rosenman, S. R., and Collo, I. G. (1948). "Bacillomycin: An Antibiotic from *Bacillus subtilis* Active Against Pathogenic fungi". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 67:539-541.

Lorenzo De, V. y Aguilar, A. (1984). "Antibiotics from Gram negative Bacteria: do They Play a Role in Microbial Ecology?". TIBS. 9:266-269.

Luckner, M. (1972) Secondary Metabolism in Plants and Animals, Academic pres. p.4

Luckner, M. and Nover, L. (1972) in Secondary Metabolism and cell Differentiation. (Luckner, M., Nover, L. and Böhm, H., eds.), pp.1-102.

Mao Faddín, J.F. (1984). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Medica Panamericana, México, p. 301.

Mahler, H.R. and Cordes, E.H. (1965). Biological Chemistry. Harper and Row, pp.655-656.

Mahler, H.R. and Cordes, E.H. (1966). Biological Chemistry, Harper and Row, pp. 655-656.

Manual de Agroquímicos, Químicos-Farmacéuticos, Alimenticios y Biológicos Veterinarios. (1988). Vol. I, (Plaguicidas), SARH, Dirección General de Sanidad y Protección Agropecuaria y Forestal, México.

Martin, J.F. and Demain, A. L. (1980). "Control of antibiotic biosynthesis". Microbiol. Rev. 44:230-251.

Mickson, C.D., Reilly, C.C. and Pusey, P.L. (1986). "Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*". Phytopathology 76:136-139.

Molgarejo, P., Carrillo, R. and M-Sagasta, E. (1985). "Mycoflora of Peach Twigs and Flowers and its Possible Significance in Biological Control of *Monilinia laxa*". Trans Br. Mycol. Soc. 85:313-317.

Molgarejo, P., Carrillo, R. and M-Sagasta, E. (1986). "Potencial for Biological Control of *Monilinia laxa*". Crop. Prot. 5:412-426.

Michener, H.D. and Snell, N. (1949). "Two antifungal substances from *Bacillus subtilis* cultures. Arch. Biochem. 22:208-214.

Montgomery, D.C. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo editorial Iberoamerica. 589p.

Nafsaal, O.M. and Tempest, D.W. (1975). Arch. Microbiol. 106:251-258.

Northover, J. and Biggs, A.R. (1990). "Susceptibility of Immature and Mature Sweet and Sour Cherries to *Monilinia fructicola*". Plant Dis. 74:280-284.

Nover, L. and Luckner, (1974). Biochem. Physiol. Pflanzen. 166:293-305.

Oehr, P., and Willecke, K. (1974). "Citrate-Mg<sup>++</sup> transport in *Bacillus subtilis*. Studies with 2-fluoro-L-erythro-citrate as a substrate". J. Biol. Chem. 249:2037.

Ogawa J., English H., Moller, W., Manji, B., Rough, D., Kolke, S. (1980). Brown rot of stone fruits. Division of Agricultural Sciences, University of California, Leaflet 2206, 3-7p.

Ogawa, J.M., Manji, B. T., Rough, D. and Sonoda, R.M. (1981). Monitoring and control of benomyl-resistan *Monilinia fructicola*". (Abstr.) Phytopathology 71:246.

Oginsky, E.L., and Umbreit, W.W. (1969). An Introduction to Bacterial Physiology, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, pp. 33, 232.

Ortiz, V.B. y Ortiz, S.A. (1984). Edafología, Universidad Autónoma de Chapingo, 4a. Edición, p. 374.

Oser, B.L. (1965). Haw's Physiological Chemistry. 14th ed., McGraw-Hill Book Company, p.374.

Parasky, D. and Werkman, C.H. (1947). "The conversion of 2,3-butyleneglycol to acetyl-methyl-carbinol in bacterial fermentation". Arch. Biochem. Biophys. 14:11.

Pelczar, M.J. and Reid, R.D. (1965). Microbiology, 2nd. ed. McGraw-Hill Book Company, p. 567.

Porter J. R. 1985. "Discovering new secondary metabolites: a view from the pharmaceutical industry". *Pestic Sci.* 16:422.

Pusey, P.L. and Wilson, C.L. (1984). "Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*". *Plant Dis.* 68:1101-1105.

Restrepo, J. (1988). "Los agentes agroquímicos en la salud y el ambiente de México". *Cuadernos de Nutrición*, Año VII, vol. 2, No.2, 5-12 páginas, Marzo-Abril, Publicación de Instituto Nacional de Nutrición, CONASUPO y sus Empresas Industriales. México.

Romero, G.J. (1986). Estudio sobre la biosíntesis y regulación de la producción de ácido clavulánico y relación con la biosíntesis de cefamandol en *Streptomyces clavuligerus*. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de León. España. 273 p.

Royce, D.J. and Riles, S. M., 1977. "The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*". *Phytopathology* 68:603-607.

Ruohomäki, C.C., Kallas, J.G., Chinn, B., and Coutier, E.W. (1931). "Coll-aerogenes differentiation in water analysis II. The biochemical differential tests and their interpretation". *J. Bacteriol.* 22:125.

Ruiz, P.J., et al. (1986). Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General, 1986, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, 122 p.

Salle, J.A. (1965). Bacteriología, 2a. ed., Editorial Gustavo Gili, p. 875.

SARH, INIA. (1982). Ciclos de Cultivo. Diagramas de las principales especies vegetales con las se efectúan Investigaciones Agrícolas en México.

Sarkar, N. and Paulus, H. (1972). "Function of peptide antibiotics in sporulation". *Nature New Biol.* 239:228-230

Shabi, E. and Ogama, J.M. (1981). "Benomyl-resistant and sensitive monoaosporic isolates of *Monillinia fructicola*". *J. Plant. Pathol.* 87:252.

Sneath, N.W. (1988), Plant Pathogenic Bacteria, 2a. Edición, Ed. APS Press, EUA, 164p.

Simmons, J.S. (1926). "A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi". *J. Infect. Dis.* 39:209.

Simonen, M. and Palva I., 1993. "Protein secretion in *Bacillus* Species". *Microbiological Reviews*, 57:109-137.

Sindney, M.F. y Jo Barron, E. (1989). Diagnóstico Microbiológico, 7a. edición, Ed. Médica Panamericana, p. 870.

Smith, D.T., Conant, N.I., and Willett, H.P. (1968). Zinsser Microbiology, 14 th ed., Appleton-Century-Crofts, pp. 113, 116-117.

Sokatch, J.R. (1969). Bacterial Physiology and Metabolism, Academic Press, pp. 78, 133-141.

Stahly, G.L. and Werkman, C.H. (1942). "Origin and Relationship of Acetyl methyl carbinol to 2,3 Butyleneglycol in Bacterial Fermentations". Biochem. J., 36:575.

Staley, J. M., Bryant, M. P., Pfennig, N. (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2 y 3, Williams Wilkins & Wilkins Editor.

Stanier, R.Y., Adelberg, E.A. y Ingraham, J.L. (1986). Microbiología, Ed. REPLA, 4a edición, México. 836p. Título original The Microbial World, 1986 4a edición, traducción de Dra. Isabel García y colaboradores. editorial Prentice Hall, Inc. EUA.

Stanier, R.Y., Doudoroff, M. and Adelberg, E.A. (1963). The Microbiol. World, 2nd. ed., Prentice-Hall, Inc., pp. 252, 259, 262-263, 271-272.

Stessel, G.J., Leben, C. and Keltz, G.W. (1953). "Partial Purification and Properties of the Antifungal Antibiotic, Toximycin". Phytopathol. 43:23-26.

Strecker, H.J., and Harary, I. (1954). "Bacterial butyleneglycol dehydrogenase and diacetyl reductase". J. Biol. Chem., 211, 263.

Swinburne, T.R., Barr, J.G. and Brown, A.E. (1975). "Production of Antibiotics of Bacillus subtilis and their Effect on Fungal Colonists of Apple Leaf". Mycol. Soc. 65:211-217.

Sokolnik, M. and Gilpatrick, J.D. (1977). "Tolerance of Monilinia fructicola to benomyl in western New York". Plant. Dis. Rep. 60:651-657.

Tangney, M., Smith, P., Priest, F.G. and Mitchell, J.W. (1992). "Maltose Transport in Bacillus licheniformis NCIB346". J. General Microbiol., 138:1821-1827.

Tempest, D.W. and Neijssel, O.M. (1975) in Proc 6th Internat. Symp. Continuous Culture of Microorganisms (Deran, A.C.R., Ellwood, D.C., Evans, C.G.T., and Melling, J., eds.), pp.283-296, Ellis Horwood Ltd.

Thurmelachal, M.J. and O'Brien, M.J. (1977). "Suppression of Charcoal Rot in Potato whit a Bacterial Antagonist". *Plant Dis. Rep.* 61:543-546.

Tinsler, R.P. and Sandholzer, L.A. (1936). "The use of semi-solid agar for the detection of bacterial motility". *J. Bacteriol.* 31:575.

Ulloa, M. y Hanlin, R. (1978). *Atlas de micología básica*. Ed. Concepto, México, 158p.

Uykhede, R.S. and Sholberg, P.L. (1986). "In Vitro Inhibition of Plant Pathogens by *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* and In Vivo Control of Two Postharvest Cherry Diseases". *Can. J. Microbiol.* 32:963-968.

Vandamme, E. J. (Ed.). *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Marcel Dekker, Inc. pp.32-42.

Vapinder, S. and Deverall, B.J. (1984). "*Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit". *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83(3):487-490.

Vasudeva, R.S., and Chakravarthi, B.P. (1954). "The Antibiotic Action of *Bacillus subtilis* in Relation to Certain Parasitic Fungi, with Special Reference to *Alternaria solani*". *Ann. Appl. Biol.* 41:612-618.

Walpole, G.S. (1911). "The action of *Bacillus lactis aerogenes* on glucose and manitol. II. The investigation of the 2,3-butanediol and the acetylmethylcarbinol formed; the effect of free oxygen on their production; the action of *B. lactis aerogenes* on fructose". *Proc. Roy. Soc. B.* 83:272.

Walton, R.B. and Woodruff, H. B. (1949). "A Crystalline Antifungal Agent, Mycosubtilin, Isolated from Subtilin Broth". *J. Clin. Investig.* 28:924-926.

Whan, J.H. (1977). "Tolerance of *Sclerotinia fructicola* to benomyl". *Plant Dis. Rep.* 60:200-201.

Wilson, G.S. and Miles, A.A. (1964). *Principles of Bacteriology and Immunity* Vol.1, 5th ed., The Williams & Wilkins Company, pp. 32, 35, 483, 489-490, 493-494.

Wiseman, A. (1986). *Principios de Biotecnología*, Ed. Acribia, España, 252p. Título original *Principles of Biotechnology*, ed. Surrey University Press, traducción de Gómez, C. y Moreno, C.

Werkman, C.H. (1930). "An improved technic for the Voges-Proskauer test". *J. Bacteriol.* 20:121.

Zehner, H. (1978). In *Antibiotics and Other Secondary Metabolites, Biosynthesis and Production*. (Hutter, R., Leksinger, L., Nuesch, J., and Wehrli, W., eds.), pp 1-17, Academic Press, EUA.

Zahner, H. (1979). *Folia Microbiol.* 24:435-443.

Zdenko, V. and Zdenek, H. (1986). Overproduction of Microbial Metabolites. Butterworth Publishers. 308p.

Zehr, E.J. (1982). "Control of Brown Rot In Peach orchards". *Plant Dis.* 66:1101-1105.

Zobell, C.E. (1932). "Factors Influencing the reduction of Nitrates and Nitrites by Bacteria in Semisolid Media". *J. Bacteriol.* 24:273.

Zobell, C.E. and Meyer, K.E. (1931). "Reduction of nitrates and nitrites by bacteria in semisolid media". *J. Bacteriol.* 24:273.

## ANEXO 1.1

### Prueba de leche tomasolada

A continuación se describen las diversas funciones metabólicas de un organismo en la prueba de leche tomasol:

- I) Fermentación de lactosa
- II) Caseólisis
- III) Coagulación de la caseína

El tomasol incorporado a la leche es un indicador del pH y un indicador de óxido-reducción que hace que el medio pueda indicar diversas funciones metabólicas. La leche sola contiene el hidrato de carbono (lactosa), junto con tres importantes proteínas como son caseína, lactalbúmina y lactoglobulina (Cantarrow y Schepartz, 1962). Por lo tanto, un organismo puede mostrar una o varias propiedades metabólicas en la leche tomasolada, cada una de ellas propia de una especie determinada, ayudando así a la identificación bacteriana:

- G.1) Fermentación de lactosa
- G.2) Reducción del tomasol
- G.3) Formación de coágulo
- G.4) Formación de gas

**G.1) Fermentación de lactosa.** El tomasol como indicador de pH es rojo en solución ácida (pH 4.5) y azul en condiciones alcalinas (pH 8.3). La leche tomasolada presenta un color azul púrpuro (pH 6.8) cuando no está inoculada (Difco Manual, 1963), pero si un organismo es capaz de fermentar la lactosa, produciendo principalmente ácido láctico se da una condición ácida indicada por el cambio de color del medio, que se vuelve rojo rosado. A veces el ácido butírico es el producto final de la fermentación de la lactosa. Ciertas bacterias que forman álcalis, no fermentan lactosa, pero actúan sobre las sustancias nitrogenadas que se encuentran en la leche liberando amoníaco y dando como consecuencia un pH alcalino que se manifiesta por un color púrpura azulado (Burrows y Moulder, 1968).

Lactosa ———> Glucosa + Galactosa

————> Ac. Láctico

Glucosa ———> Ac. Pirúvico ———> Ac. Butírico

————> CO<sup>2</sup>

**G.2) Reducción del tomasol.** El tomasol es indicador del pH y un indicador de óxido-reducción. Algunos organismos son capaces de reducir el tomasol a una leucobase (blanca) (Mac Faddin, 1984).

**G.3) Formación de coágulo y digestión (peptonización).** Las enzimas proteolíticas provocan la hidrólisis de las proteínas de la leche de lo que resulta su coagulación: la principal enzima responsable de la formación de coágulo es la renina (Burrows y Moulder, 1968; Harow y Mazur, 1966).

La formación de coágulo en un medio de leche tomasolada es causada por una precipitación de la caseína por la formación de ácidos, o por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima renina. La caseína, una fosfoproteína compleja, es la proteína más importante de la leche; globular y soluble en agua o en solución acuosa de ácidos, bases o sales (Cantarow y Schepartz, et al, 1962; Oster, 1965 y Fleser y Fleser, 1966).

**G.3.1) Formación de un coágulo ácido.** La precipitación de la caseína provocada por los ácidos orgánicos a partir de la lactosa (Burrows Y Moulder, 1968).

Lactosa ———> Ac. Láctico

Caseasa

Ac. Láctico + Caseinato de Ca ———>Caseinógeno ———>Polipéptido

(Medio ácido) (Sal de caseína  
soluble)

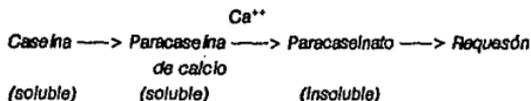
(Insoluble)

En condiciones ácidas, produce un coágulo firme gelatinoso (Cowan, et al., 1966), que no se separa de las paredes del tubo y es fácilmente disuelto cuando es sometido a condiciones alcalinas (Wilson y Miles, 1964).

La leche fresca tiene un pH de 6.6- 6.9 debido a la presencia de fosfatos ácidos. Cantarow y Schepartz aseguran que la caseína "se encuentra probablemente como una sal (Caseinato de calcio) y precipita con la acidificación como ocurre en el proceso de cuajado (fermentación por ácido láctico). La acidificación de la leche con un pH de 4.5 descompone el complejo proteína-caseína para dar un precipitado" (Oser, 1965). La fermentación de la lactosa con el indicador tomasol muestra un color rojo rosado con un pH de 4.5. La lactosa es fermentada dando ácido láctico y otros ácidos orgánicos como productos finales de la glucólisis. Estos, a su vez, se combinan con el caseinato de calcio, sal soluble en agua, para dar caseinógeno que precipita en forma de coágulo insoluble (Wilson y Miles, 1964).

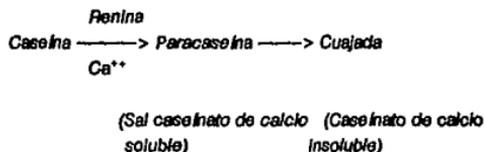
Según Burrows y Moulder, la hidrólisis de la caseína por la actividad enzimática produce una conversión final del precipitado caseinógeno en un líquido claro; el proceso se denomina peptonización, y se manifiesta por una aclaración acuosa del medio causado por la digestión del precipitado (coágulo) y de las proteínas de la leche por las enzimas proteolíticas. Sin embargo, sólo se produce la

peptonización cuando la bacteria desarrollada en la leche tomamolada contiene la enzima proteolítica caseasa. Comúnmente, la peptonización se denomina digestión.



G.3.2) Formación de un cuajo (coágulo). Otra forma de coágulo es el cuajo, o sea el proceso de cuajado de la leche por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima renina, pepsina o quimotripsina contenidas en la leche (Oser, 1965), que según Centarow y Schepartz es secretada como prorenina y luego es activada por iones hidrógenos ( $H^+$ ).

La renina provoca el cuajado de la leche convirtiendo la sal de caseína soluble (caseinogenato de calcio) en una paracaseína insoluble (caseinato de calcio) que es el cuajo o requesón. (Centarow y Schepartz, 1962; Fieser y Fieser, 1956 y Wilson y Miles, 1964).



Según Oser la actividad de la renina "Hidroliza un enlace peptídico por 10,000 en la caseína". Harrow y Mazur afirman que la acción de la renina es, probablemente, la extracción inicial de un enlace peptídico en la caseína seguido por la formación de un coágulo o cuajo; el calcio presente es la sal que actúa como agente estabilizador. Sin embargo, Centarow y Schepartz aseguran que la caseína es hidrolizada en paracaseína soluble que, con el calcio, es convertida en una caseína insoluble (un paracaseinato de calcio) para formar un "requesón".

La paracaseína es precipitada como paracaseinato de calcio por arriba de un pH 4.5. Este requesón es blando, insoluble, no se separa de los costados del tubo después de algunas horas, dando un líquido residual de color grisáceo claro, que se denomina "suero" (Centarow y Schepartz, 1964; Cowan y Steel, 1966 y Wilson y Miles, 1964). No obstante, cuando se registra la formación de coágulo, no importa para los fines de identificación, qué proceso enzimático intervino: simplemente se observa la presencia o ausencia de coágulo (Mac Fadden, 1984).

**G.4) Formación de gas.** Los gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ ) pueden formarse como resultado final de la fermentación de la lactosa, se produce una fermentación turbulenta cuando hay abundancia de gases que descomponen un coágulo ácido.

Las bacterias proteolíticas pueden hidrolizar la leche por acción enzimática para formar un coágulo (cuajo) o producir una reacción alcalina. Algunos organismos producen la enzima lipasa que cataboliza las grasas (lípidos) que se encuentran en la leche dando un líquido amarillo transparente (Burrows y Moulder, 1968).

En una sola bacteria pueda producirse una de estas reacciones metabólicas o una variedad de combinación de las mismas.

- a) Acido, Coágulo, Gas, Fermentación (ACGT)
- b) Acido solamente (A)
- c) Acido con Gas (AG)
- d) Acido con Coágulo (AC)
- e) Acido, Digestión y Gas (ADG)
- f) Acido y Digestión (AD)
- g) Coágulo y Digestión (CD)
- h) Digestión (D)
- i) Coágulo (C)
- j) Reducción (RED)

Se utilizan símbolos o abreviaturas estándares con el fin de registrar todas las reacciones metabólicas que tienen lugar en la leche tomaseolada.

- i) Acido (A)
- ii) Alcalino (ALC)
- iii) Coágulo (C)
- iv) Digestión (D)
- v) Gas (G)
- vi) Fermentación Turbulenta (T)
- vii) Reducción (R o RED)
- viii) Sin cambio (SC, [-] o NEG)

## Anexo 1.2

### Prueba del citrato

Normalmente, el metabolismo del citrato comprende una condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato (Gunsalus y Stanier, 1961) para entrar en el ciclo de Krebs.

El metabolismo del citrato es efectuado por la mayoría de las bacterias a través del ciclo del ácido tricarbóxico o el ciclo de fermentación del citrato (Oehr y Willecke, 1974).

En las bacterias, el desdoblamiento del citrato comprende un sistema enzimático sin la intervención de la coenzima A. Esta enzima se denomina citritasa (citrato oxalacetato-*liasa*) o citrato desmolasa. La enzima requiere un catión bivalente para su actividad que es suministrado por el magnesio o el manganeso (Gunsalus y Stanier, 1961 y Sokatch, 1966).

Originalmente se pensó que la descomposición inicial del citrato daba oxalacetato (la sal del ácido oxalacético) y acetato (la sal del ácido acético). Sin embargo, se considera actualmente que el oxalacetato y el acetato son intermediarios en el metabolismo del citrato (Gunsalus y Stanier, 1961).

Citrato  $\longrightarrow$  Oxalacetato + Acetato

    Piruvato + CO<sup>2</sup>

Los productos obtenidos del metabolismo del citrato dependen del pH del medio. Si el pH aumenta (alcalino), se producen más acetato y formato, con una disminución de la producción de lactato y CO<sup>2</sup>. Por encima de pH 7 no hay producción de lactato y los productos son:

Citrato  $\longrightarrow$  CO<sup>2</sup> + Ac. Fórmico + 2 Ac. Acético

Con un pH ácido, el acetyl carbinol (acetoina) y el lactato son los principales productos de utilización del citrato (Doelle, 1969; Gunsalus y Stanier, 1961).

Independientemente de los productos terminales producidos, el primer paso de la fermentación del citrato da por resultado la producción de piruvato. La degradación del piruvato depende, entonces,

del pH del medio (BBL Manual of Products and Laboratory Procedures, 1968 y Gunsalus y Campbell, 1944).

Citrato ———> Oxalacetato + acetato

Oxalacetato ———> Piruvato + CO<sup>2</sup>

pH alcalino Piruvato ———> Acetato + Formato

pH ácido 2 Piruvato ———> Acetato + CO<sup>2</sup> + Lactato

2 Piruvato ———> Acetoína + 2CO<sup>2</sup>

El medio utilizado para la fermentación del citrato contiene también sales de amonio inorgánicas. Un organismo que es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono utiliza también sales de amonio como su única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio se desdoblan en amoniaco (NH<sup>3</sup>) con la consiguiente alcalinidad (Mac Faddin, 1984).

La utilización de ácidos orgánicos y sus sales como fuente de carbono produce carbonatos y bicarbonatos alcalinos en la nueva degradación (Oehr y Willecke, 1974).

### ANEXO 1.3

#### Prueba del nitrato

El oxígeno sirve como un aceptor de hidrógeno, por ejemplo el aceptor final de protones y electrones. La mayoría de las bacterias aeróbicas son anaerobios facultativos y sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. Esta respiración anaerobia es un proceso de oxidación por el cual las sustancias inorgánicas, especialmente nitrato y sulfato, o raramente hidratos de carbono proporcionan oxígeno para que sirva como aceptor de electrones para suministrar energía (Pelzcar y Reid, 1965 y Stanier et al., 1963).

En la reducción del nitrato, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas. Gunsalus y Stanier aseguran que hay pruebas de que el nitrato actúa como el oxidante final en los sistemas citocromo. La característica del nitrato de reducir una especie en particular es más o menos constante (Gunsalus y Stanier, 1961; Stanier, et al, 1963; ZoBell, 1932).

#### Reducción del nitrato en nitrito



Nitrato

Nitrito

Sin embargo las posibilidades del producto final de reducción del nitrato son muchas:

Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )

Amoníaco ( $\text{NH}_3$ )

Nitrógeno ( $\text{N}_2$ )

Oxido nítrico ( $\text{NO}$ )

Oxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ )

Hidroxilamina ( $\text{R.NHOH}$ )

El producto final de la reducción que se forme depende de la especie bacteriana. El más común es nitrógeno molecular (Gas) por medio de la reducción del nitrito. Estos productos según las condiciones del medio, ya no son más oxidados o asimilados en el metabolismo celular, sino que se excretan en el medio circundante (Cowan y Steel, 1968; Mahler y Cordes, 1966; Smith et al., 1968; Stanier et al., 1963).

La reducción del nitrato en gas nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) u óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) se denomina *desnitrificación*. El nitrato sirve como un aceptor de electrones: por cada molécula de nitrato reducido, se aceptan cinco

electrones (Pelczar y Reid, 1965 y Stanier, et al, 1963).

**Nitrato en nitrógeno molecular.** En el proceso de desnitrificación, el óxido nitroso (un intermediario) puede acumularse y la concentración de nitrato es elevada; sin embargo, cuando ésta es baja, el óxido nitroso es reducido nuevamente a nitrógeno molecular (Stanier et al., 1963).

En la reducción del nitrato pueden producirse varios procesos para la utilización de los productos terminales formados. El amoníaco o hidroxilamina pueden ser asimilados en componentes celulares que contengan nitrógeno (proteínas y ácidos nucleicos) para la síntesis de nuevos compuestos (Mahler y Cordes, 1966 y Smith y Conant, 1968).

## ANEXO 1.4

### Reacción de Voges-Proskauer

El principal producto terminal de la utilización del piruvato por los grupos Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Bacillus, y muchos otros organismos, es el 2,3-butanediol. Sin embargo, la reacción VP se basa en la detección de la acetoina (acetil-metilcarbinol o AMC), un precursor de la producción del 2,3-butanediol (Doelle, 1969; Smith y Conant, 1968).

Una molécula de acetoina se forma por la descarboxilación de dos moléculas de ácido pirúvico. Harden y Walpole afirman que la acetoina es una etapa intermedia en la conversión en 2,3-butanediol. Tanto la acetoina como 2,3-butanediol son productos neutros de la fermentación de la glucosa (Gunsalus y Stanier, 1961).

Harden y Walpole hallaron que cuando se fermenta la glucosa, solamente se forma una pequeña cantidad del precursor acetoina; una parte mayor del carbono de la glucosa es usado por la formación de 2,3-butanediol.

Paretsky y Weikman hallaron que la formación de acetoina se acumula cuando un organismo es cultivado en condiciones aeróbicas. Asimismo, Walpole observó que en Enterobacter aerogenes puede producirse acetoina a partir del 2,3 butanediol con una mayor acumulación de acetoina si el cultivo está expuesto al oxígeno atmosférico. La acetoina puede ser metabolizada por uno de estos dos medios:

J.i) La reducción de 2,3-butanediol, que se acumula a menos que se produzca la reoxidación.

J.ii) Lo que es más raro, por oxidación en diacetilo, que a su vez puede ser catabolizado (Eddy, 1961). Stahly y Weikman encontraron que la formación de acetoina y 2,3-butanediol es un sistema reversible de reducción o de oxidación, en el que la acetoina se convierte por reducción en 2,3-butanediol, o ésta es oxidado en acetoina.

Existen dos enzimas responsables de la oxidación-reducción de la acetoina y el 2,3-butanediol (Strecker y Haray, 1954).

oxidación

2,3-butanediol  $\longrightarrow$  Acetoina (1)

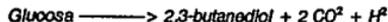
2,3-butanediol deshidrogenasa

reducción

Acetoina  $\longrightarrow$  2,3-butanediol (2)

diacetilo (acetoina) reductasa

*La formación de 2,3-butanediol a partir de la fermentación de la glucosa es por lo general del tipo de "diol Hidrógeno"*



*Esta producción de 2,3-butanediol provoca un aumento de la producción de anhídrido carbónico, con la formación de menos ácidos y la acumulación de acetoina. El equilibrio entre la acetoina y el 2,3-butanediol está determinado por el volumen de hidrógeno disponible (Gunsalus y Stanier, 1961) o las diferencias de potencial oxidación-reducción (Werkman, 1930).*

*En presencia de oxígeno atmosférico y un medio alcalino, los productos finales neutro acetoina y 2,3-butanediol son oxidados en diacétilo, que es el reactante para el color producido en la reacción Vogues-Proskauer. Por lo tanto, el diacétilo es un producto de la oxidación de la acetoina (Sokatch, 1969).*

*Juni y Heym propusieron un ciclo para la descomposición el 2,3-butanediol, la acetoina y el diacétilo por los organismos capaces de utilizar la acetoina y el 2,3-butanediol como única fuente de carbono.*

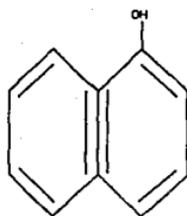
*Comenzando con 2 moléculas de 2,3-butanediol, una molécula del mismo es regenerada y se forman 2 moléculas de ácido acético lo que justifica el aumento de la acidez.*

*Es muy importante el pH del medio de Vogues-Proskauer; se debe evitar un pH ácido. Por encima de un pH de 6.3 hay acumulación de ácido acético y fórmico, con supresión de la producción de CO<sub>2</sub>, H<sup>2</sup>, acetoina y 2,3-butanediol. Por debajo de un pH de 6.3, el ácido acético es convertido en acetoina y 2,3-butanediol, y se suprime la producción de H<sup>2</sup>, mientras que aumenta la de CO<sub>2</sub> (Doelle, 1969 y Gunsalus y Stanier, 1961).*

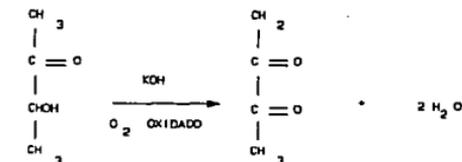
*La solución de alfa naftol y de KOH-cratinina se utilizan para llevar a cabo la detección de la acetoina (acetilmetilcarbinol) actúan por un proceso en dos etapas (Brason, 1972).*

*El primer reactivo agregado al cultivo en prueba es catalizador alfa naftol. Es necesaria una solución alcohólica porque ella actúa como intensificador del color, lo que aumenta la sensibilidad de la reacción sin la pérdida de su especificidad. El alfa naftol se combina con el producto de la reacción del diacétilo y el compuesto de tipo guanidina, arginina, que se encuentra en la peptona desde los primeros momentos de la reacción; por lo tanto, es fundamental agregarlo primero (Mac Faddin, 1984).*

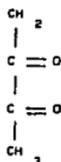
*El segundo reactivo es KOH al 40% (o NaOH al 40%), que cuando se agrega al medio Vogues-Proskauer, contribuye a la absorción del CO<sub>2</sub> (Eddy, 1961).*



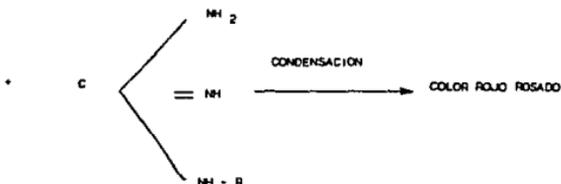
ALFA NAFTOL  
(CATALIZADOR)



ACETOLINA



(DIACETILO)  
SUSTRATO



NUCLEO GUANIDINA PRESENTE  
EN LA PEPTONA  
(ARGININA)

El hidróxido de potasio (KOH) reacciona con la peptona dando un color rosado salmón. La agitación del tubo con el medio y reactivos es para exponer el medio al oxígeno atmosférico para que se oxide la acetolína, cuando existe, en diacetilo. Brander y colaboradores demostraron que la aereación por agitación favorece la acumulación de diacetilo. El KOH actúa como agente oxidante, para apresurar la oxidación de la acetolína en diacetilo, reactante esencial que da una reacción de color con el KOH y la peptona (Mac Faddin, 1984).

## ANEXO 1.5

### Utilización de hidratos de carbono

Los hidratos de carbono se clasifican como: a) monosacáridos, aldehídos polihidroxílicos o cetonas; b) polisacáridos u oligosacáridos, productos de condensación de dos o más monosacáridos y c) alcoholes polihídricos y ciclitoles, productos de la reducción de los monosacáridos (Cantarow y Schepartz, 1962).

Un monosacárido o azúcar simple está compuesto generalmente por 1 a 6 carbonos, la ribosa, ribulosa, xilosa y arabinosa son azúcares con 5 carbonos (pentosas  $C^5H^{10}O^5$ ); la glucosa (dextrosa), fructosa (levulosa), galactosa y manosa son azúcares con 6 carbonos (hexosas  $C^6H^{12}O^6$ ) (Cowen y Steel, 1969; Harrow y Mazur, 1966).

La xilosa, ribosa, arabinosa, glucosa, galactosa y manosa están clasificadas en aldosas (Oser, 1965).

La fermentación es un proceso metabólico de oxidación-reducción anaeróbico en el cual un sustrato orgánico sirve como el aceptor de hidrógeno final (aceptor de electrones) en lugar del oxígeno. La fermentación de sustratos orgánicos como los carbohidratos da tanto productos finales reducidos como oxidados (Stanier, et al, 1963).

El tipo de productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono dependen de varios factores: el tipo de organismo que lleva a cabo el proceso de fermentación; la naturaleza del sustrato que debe ser fermentado y en ocasiones, los factores ambientales como la temperatura y la acidez (Stanier, et al., 1963).

Los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono y los alcoholes, denominados colectivamente "azúcares" son pocos: dos gases, hidrógeno y anhídrido carbónico; algunos pocos ácidos y alcoholes; y una cetona (Oginsky y Umbreit, 1959; Wilson y Miles, 1964).

Algunas bacterias pueden fermentar anaeróbicamente la glucosa, otras la oxidan y algunas pueden metabolizarla por ambos métodos, mientras que otras, aún, son incapaces de utilizar la glucosa. No todos los monosacáridos son degradados por todas las especies bacterianas; sus formas de fermentación difieren, ayudando a la identificación del grupo, género o especie. Asimismo, las bacterias muestran diferencias en los ciclos utilizados para la fermentación del mismo sustrato, dando como resultado diferentes productos finales. La forma y el grado en que es desasimilado un sustrato depende de la especie bacteriana y de las condiciones de cultivo (Pelczar y Reid, 1965).

El ciclo de fermentación que produce el ácido láctico es el proceso más difundido. Sin embargo, se producen otros ciclos de fermentación, que difieren con respecto al sustrato metabolizado o la naturaleza del producto final (Stanier, et al., 1963).

Las bacterias que fermentan un hidrato de carbono son por lo general anaerobios facultativos. Por medio del proceso de fermentación, un hidrato de carbono es degradado (o fermentado) y descompuesto en dos moléculas de carbono, triosas que son nuevamente degradadas en un número de compuestos de 1, 2, 3 y 4 carbonos (Hugh y Lelison, 1953; Cantarow y Schepartz, 1962).

Los productos finales varían con cada especie bacteriana, y depende del sistema enzimático existente en la especie y las condiciones del medio ambiente. Sin embargo, el criterio importante es que antes de la descomposición del azúcar glucosa, ésta es fosforilada en un compuesto glucosa 6-fosfato. La fermentación requiere un compuesto orgánico como aceptor de electrones terminal (Burrows y Moulder, 1968).

El ácido pirúvico es el intermediario clave en la degradación de la glucosa. Una bacteria puede utilizar diferentes ciclos para formar ácido pirúvico y en el mismo organismo puede ocurrir simultáneamente más de un ciclo. Los productos finales característicos de la fermentación bacteriana son: ácido láctico; ácido acético y fórmico; ácido láctico y alcohol etílico; acetilmetilcarbinol y  $\text{CO}_2$ ; ácido succínico o ácido propiónico y  $\text{CO}_2$ ;  $\text{CO}_2$  y isopropanol y butanol (Burrows y Moulder, 1968; Pelczar y Reid, 1965).

## ANEXO 2

### MEDIOS DE CULTIVO

#### PAPA DEXTROSA AGAR (POR LITRO)

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
INFUSION DE PAPA	200,00
DEXTROSA	20,00
AGAR	15,00

CON UN PH FINAL DE 5.6 (DIFCO MANUAL, 1953).

#### CALDO NUTRITIVO (POR LITRO)

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
EXTRACTO DE CARNE	3,00
PEPTONA	5,00

CON UN PH FINAL DE 6.8 (DIFCO MANUAL, 1953).

#### AGAR NUTRITIVO (POR LITRO)

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
EXTRACTO DE CARNE	3,00
PEPTONA	5,00
AGAR	15,00

CON UN PH FINAL DE 6.8 (DIFCO MANUAL, 1953).

#### AGAR CZAPEK (POR LITRO)

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
SACAROSA	30,00
NITRATO DE SODIO	2,00
FOSFATO DIPOSTASICO	1,00
SULFATO DE MAGNECIO	0,50
CLORURO DE POTASIO	0,50
SULFATO FERROSO	0,01
AGAR	15,00

CON UN PH FINAL DE 7.3 (DIFCO MANUAL, 1953).

MEDIO DE NOTILIDAD

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
GELATINA	80.00
PEPTONA	10.00
EXTRACTO DE CARNE	3.0
CLORURO DE SODIO	5.0
AGAR	4.0

POR LITRO, CON UN PH DE 7.3 (BBL, MANUAL OF PRODUCTOS AND LABORATORY PROCEDURES, 1968)

MEDIO GELATINA NUTRITIVA (DIFCO)

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
EXTRACTO DE CARNE	3.00
PEPTONA	5.00
GELATINA	120

EL PH FINAL ES DE 6.8 (DIFCO MANUAL, 1953).

MEDIO DE AGAR ALMIDON (POR LITRO)

CONTENIDO	CANTIDAD
ALMIDON DE PAPA	10.0 (gr)
AGUA DESTILADA	50.0 (ml)
AGAR NUTRITIVO	FALTA (1000 ml)

(MAC FADDIN, 1984)

SOLUCION DE LUGOL-IODO (POR LITRO)

CONTENIDO	CANTIDAD
IODO	5.0 gr/100ml
IODURO DE POTASIO (KI)	10.0 gr/10ml

(MAC FADDIN, 1984)

LECHE TORNASOLADA (POR LITRO)

CONTENIDO	CANTIDAD
LECHE DESCREMADA	105 gr
PURPURA DE BRONOCRESOL	2 ml AL 0.05%.

MEDIO DE CITRATO SIMONS

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
FOSFATO DIHIDROGENADO DE AMONIO	1.00
FOSFATO DIPOTASICO	1.00
CLORURO DE SODIO	5.00
CITRATO DE SODIO	2.00
SULFATO DE MAGNESIO	0.20
AGAR	15.0
AZUL DE BROMOTINDOL	0.08

CON UN PH FINAL DE APROXIMADAMENTE 6.9 (MANUAL DIFCO, 1953).

CALDO CON NITRATO (POR LITRO)

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
EXTRACTO DE CARNE	3
PEPTONA	5
NITRATO DE POTASIO	1.8

CON UN PH FINAL DE 7.0 (MANUAL DIFCO, 1953).

CALDO BR/VP (POR LITRO)

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
PEPTONA	70.0
DEXTROSA	5.00
FOSFATO DIPOTASICO	5.00

CON UN PH FINAL DE 6.9 (DIFCO MANUAL, 1953).

AGAR SANGRE (GELOSA SANGRE)

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
EXTRACTO DE MUSCULO DE CORAZON	10.0
TRIPTOSA	10.0
CLORURO DE SODIO	5.0
AGAR-AGAR	15.00

SE UTILIZA AGUA DESMINERALIZADA (MANUAL DIFCO, 1953).

MEDIO BASAL OF (POR LITRO)

CONTENIDO	CANTIDAD (gr)
PEPTOMA DE CASEINA	2.00
CLORURO DE SODIO	5.00
FOSFATO DIPOTASICO	0.30
AGAR	2.50
AZUL DE BROMOTINOL	0.03

CON UN PH FINAL DE 7.1 (MANUAL DIFCO, 1953; SCHAAD, 1968)