



**Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**



**“Caracterización bioquímica de
Pseudomonas asociadas a
vegetales”**

TESIS

Que presenta:

Ruth Marisol Zanabria Luna

Que para obtener el título de:

Química Farmacéutica Biológica

Directora de tesis

Bióloga Ana Abigail Vega Aragón

Asesores internos de tesis

Q.F.B Patricia Vidal Millán

Q.F.B José Óscar González Moreno

Fes Zaragoza, Ciudad de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a mis padres, hermanos y hermanas que con su ayuda, paciencia y confianza me permitieron realizar y concluir este proyecto, particularmente a mi hermano Efren Zanabria Luna, por todo el sacrificio que hizo para que pudiera concluir mis estudios y a mi hermana Belem Lucero Zanabria Luna por insistirme y apoyarme hasta el final.

Al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), particularmente al área de bacteriología, que me permitieron llevar a cabo mi proyecto de tesis, desarrollar las habilidades aprendidas durante la carrera y adquirir nuevos conocimientos para la vida profesional.

A lo largo de este proyecto tuve la gran fortuna de conocer a maravillosas personas que me ayudaron a desarrollar y concluir este proyecto, a continuación, mencionare algunas de ellas.

En agradecimiento al Dr. Víctor Torres Torres, una gran persona que admiro mucho, ya que siempre confió en mí, por sus sabios consejos, que me ayudaron en la vida personal y profesional, por escucharme y guiarme.

Al LDDOP (Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos) por su apoyo en el proyecto, en especial a la M.V.Z. Linda Coatlicue García López y Q.A. Víctor Manuel Herrera López y durante mi estancia como servicio social recibir capacitación por parte del M.V.Z. Héctor Gutiérrez Licon, Biól. Guillermo Antonio Sosa Andrade, Biól. Abraham Alvarado Miranda y

el Biól. Juan Francisco Ramírez Urrutia, compartiendo su experiencia, habilidad y conocimientos en el laboratorio.

Al área de plaguicidas a la Q.A. Jocelyn Grethel Cedillo Saldana, Q.F.B. Juan José Hernández Soto y de la IBQ. Felipa Cruz Castillo, por apoyarme incondicionalmente para que pudiera concluir con la redacción de este trabajo.

A mi mejor amiga Yareli Casquerra Carrillo, a quien admiro por ser una excelente persona y apreció por todo lo que me ayudo e hizo por mí, ya que estuvo en los momentos más difíciles, me apoyo e insistió para no abandonar este proyecto, sus consejos para ver las cosas de otra manera y compartir sus experiencias y conocimientos.

A mi gran amigo Oscar Gibrán Ábrego Álvarez, con cariño especial, quien dedico de su tiempo y siempre estuvo para apoyarme, sobre todo en los momentos más difíciles con sus palabras y apoyo incondicional, ya que siempre me motivo a desarrollar y terminar este trabajo y compartió sus conocimientos conmigo.

A mis asesores de tesis que con su apoyo y conocimiento permitieron concluir este trabajo.

A mis compañeros y amigos de la FES por su ayuda y apoyo incondicional en los momentos más difíciles, en especial al Q.F.B Joel García Hernández y Jorge Eduardo Mendoza López.

Índice general

I. Resumen.....	1
II. Introducción	1
III. Antecedentes	2
Concepto de enfermedad en las plantas	2
Características de las bacterias fitopatógenas	2
Enfermedades bacterianas en plantas	3
Familia <i>Pseudomonadaceae</i>	4
Clasificación del género	5
Características generales del género <i>Pseudomonas</i>	6
Principales especies de <i>Pseudomonas</i> que afectan a las plantas.....	7
Identificación del género <i>Pseudomonas</i> como fitopatógeno.....	10
Métodos de identificación convencionales	10
Características más notorias de las colonias.....	10
A)Pruebas monoenzimáticas.....	14
B)Pruebas basadas en la presencia de vías metabólicas.....	14
Pruebas de levana, oxidasa, pudrición en papa, arginina dihidrolasa e hipersensibilidad en tabaco (LOPAT).....	15
Prueba de levana	15

Prueba de oxidasa	15
Pruebas de patogenicidad.....	16
Prueba de pudrición en papa	17
Reacción de hipersensibilidad en tabaco	17
Prueba de arginina dihidrolasa.....	18
Otras pruebas	19
Prueba de catalasa	19
Prueba de indol.....	20
Prueba de Hugh Leifson O/F (Oxido-Fermentación)	21
Prueba de hidrólisis de gelatina (licuefacción de gelatina)	22
Prueba de reducción de nitratos/nitritos	23
Sistemas multipuebas	25
Sistema API	25
Métodos de detección moleculares	28
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
IV. Planteamiento y justificación del problema.....	29
V. Hipótesis	29
VI. Objetivo general.....	30
VII. Objetivos específicos	30

VIII. Materiales y métodos	31
IX. Diagrama de flujo.....	33
X. Resultados	34
XI. Anexos	46
Anexo 1.1 Medio BD® <i>Pseudomonas</i> Agar F.....	46
Anexo 1.2 BD® Pseudosel Agar (Cetrimide Agar)	46
Anexo 1.3 BD® MacConkey II Agar	47
Anexo 1.4 BD® <i>Salmonella Shigella</i> Agar.....	48
Anexo 2.1 Prueba de Levana.....	49
Anexo 2.2 Prueba de oxidasa BD BBL™ DrySlide™ Oxidase	49
Anexo 2.3 Prueba de Arginina dihidrolasa	50
Anexo 2.4 Prueba de Hugh Leifson (O/F)	51
Anexo 2.5 Prueba de nitratos.....	52
Anexo 2.6 Pruebas de patogenicidad.....	52
Anexo 2.6.1 Prueba de pudrición en papa	52
Anexo 2.6.2 Reacción de hipersensibilidad en tabaco	53
Anexo 3.1 Uso de las los sistemas multipruebas Api ®20 NE	54
Anexo 3.2 Uso de las los sistemas multipruebas Api ®20 E.....	55
Anexo 3.3 Uso de las los sistemas multipruebas Api ® ID 32E	56
XII. Referencias	57

Listado de figuras

Figura 1. Cepa “P”, en agar sangre, caracterizada como <i>Pseudomonas fluorescens</i>	36
Figura 2. Cepa “F” en agar cetrimida, bajo luz UV, caracterizada como <i>Pseudomonas viridiflava</i>	36
Figura 3. Cepa “N” en agar MacConkey, caracterizada como <i>Pseudomonas fluorescens</i>	36
Figura 4. Cepas “A” (<i>Pseudomonas putida</i>), “B” (<i>Pseudomonas corrugata</i>) y “C” (<i>Pseudomonas putida</i>), en <i>Pseudomonas</i> Agar F, bajo luz UV.	36
Figura 5. Cepa “N”, caracterizada como <i>Pseudomonas fluorescens</i> , en medio EMB	36
Figura 6. Cepa “N”, en agar <i>Salmonella-Shigella</i> , caracterizada como <i>Pseudomonas fluorescens</i>	36
Figura 7. Prueba de Levana. A) Medio sin inocular, B) prueba positiva y C) prueba negativa.	38
Figura 8. Prueba de oxidasa. Sistema BD BBL™DrySlide™. A) Sin inocular; portaobjetos que se divide en cuatro segmentos, B) resultados negativos (amarillo, rosa, gris, etc.) y C) resultado positivo (azul).	38
Figura 9. Prueba de pudrición en papa. A) Sin inocular, B) prueba positiva y C) prueba negativa.	38
Figura 10. Prueba de hipersensibilidad en Tabaco. A) Tabaco sin inocular y B) reacciones de hipersensibilidad positivas.....	39
Figura 11. Prueba de Arginina dihidrolasa. A) Prueba positiva (+) y B) prueba negativa (-).....	39
Figura 12 . Prueba de O/F. en <i>Pseudomonas</i> spp. presentan vía oxidativa. .	39
Figura 13. Prueba de nitratos negativa.....	39
Figura 14. Prueba de indol negativa.....	39
Figura 15. Sistema multipuebas Api®20 NE, corresponde a la cepa “P”, caracterizada como <i>Pseudomonas fluorescens</i>	41
Figura 16. Partes que componen a los microtubos con sustratos deshidratados, corresponde a la cepa “P” , caracterizada como <i>Pseudomonas fluorescens</i> y es positiva a la prueba de licuefacción de gelatina.	41
Figura 17. Sistema multipuebas Api®20 NE, corresponde a la cepa “N”, caracterizada como <i>Pseudomonas fluorescens</i>	42
Figura 18. Sistema multipuebas Api® ID 32E, corresponde a la cepa “N”, caracterizada como <i>Pseudomonas fluorescens</i>	42

Listado de cuadros

Cuadro 1. Algunos síntomas de enfermedades producidas por bacterias fitopatógenas	3
Cuadro 2. Características distintivas de géneros de la familia <i>Pseudomonadaceae</i>	5
Cuadro 3. Otras especies de <i>Pseudomonas</i> fitopatógenas	8
Cuadro 4. Principales pruebas para caracterizar al género de <i>Pseudomonas</i>	9
Cuadro 5. Identificación de especies saprofitas de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes asociadas a plantas	9
Cuadro 6. Características de las colonias que se aplican a la identificación de bacterias	11
Cuadro 7. Interpretación y forma de reportar la prueba de levana.....	15
Cuadro 8. Interpretación y forma de reportar la prueba de oxidasa	16
Cuadro 9. Interpretación y forma de reportar la prueba de pudrición en papa	17
Cuadro 10. Interpretación y forma de reportar la prueba de hipersensibilidad en tabaco	18
Cuadro 11. Interpretación y forma de reportar la prueba de arginina dihidrolasa	18
Cuadro 12. Interpretación y forma de reportar la prueba de KOH.....	19
Cuadro 13. Interpretación y forma de reportar la prueba de catalasa	20
Cuadro 14. Interpretación y forma de reportar la prueba de indol.....	21
Cuadro 15. Interpretación y forma de reportar la prueba de Hugh Leifson (O/F)	22
Cuadro 16. Interpretación y forma de reportar la prueba de hidrólisis de gelatina	23
Cuadro 17. Interpretación y forma de reportar la prueba de reducción de nitratos/nitritos.....	24
Cuadro 18. Comparación entre sistemas de identificación	26
Cuadro 19. Comparación entre los sistemas de identificación manuales convencionales y comerciales.....	27
Cuadro 20. Resultados de la morfología colonial sembrada en medio <i>Pseudomonas</i> Agar F	34
Cuadro 20.1. Formación de pigmentos que se utilizan para identificación de las colonias de <i>Pseudomonas</i> spp. y se reportan en morfología colonial	35
Cuadro 21. Reporte de crecimiento en medios selectivos y diferenciales.....	35
Cuadro 22. Comparación entre los sistemas manuales de identificación convencionales, pruebas bioquímicas tradicionales y técnicas moleculares (se reporta % de identificación)	37

Cuadro 23. Valoración del coeficiente kappa (Landis y Koch, 1977)	37
Cuadro 24. Resultados en los sistemas multipruebas	40

Listado de tablas

Tabla 1. Componentes del medio BD® <i>Pseudomonas</i> Agar F	46
Tabla 2. Componentes del medio BD® Pseudosel Agar (Cetrimide Agar)	46
Tabla 3. Componentes del medio BD® MacConkey II Agar	47
Tabla 4. Componentes del medio BD® <i>Salmonella Shigella</i> Agar	48
Tabla 5. Componentes del medio levana	49
Tabla 6. Componentes del medio arginina dihidrolasa	50
Tabla 7. Componentes del medio Hugh Leifson (O/F)	51
Tabla 8. Componentes del medio Prueba de nitratos	52

Resumen

Mediante pruebas bioquímicas tradicionales se realizó la caracterización de 10 aislamientos de cepas presuntivas al género *Pseudomonas*, las cuales se determinó el índice kappa (k), el cual es el resultado de los valores reportados teóricamente en relación con los obtenidos experimentalmente, este valor se comparó con los resultados obtenidos frente a otros sistemas de identificación como son los sistemas multipuebas conocidos como Api®20 NE, Api ®20 E e ID 32 E® y técnica molecular PCR.

El valor más cercano obtenido fue de 85.71% en la identificación de la cepa R, caracterizada como *Pseudomonas fluorescens*, la morfología colonial fue de gran utilidad en la identificación de las *Pseudomonas* spp.

Introducción

El presente trabajo contiene conceptos básicos y generales de las bacterias, y de manera específica las características del género *Pseudomonas*, lo cual permite conocer su comportamiento metabólico frente a las pruebas bioquímicas y así caracterizarlas mediante métodos tradicionales, como son las pruebas bioquímicas, pruebas fisiológicas (patogenicidad) y finalmente corroborar en algunas cepas dicha identificación con técnicas moleculares como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se considera de importancia fitopatológica a este género por el daño que ocasiona en algunos cultivos vegetales, ya que genera importantes problemas económicos, cabe mencionar que este género comparte algunas especies patógenas con los humanos, como es el caso de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Antecedentes

Concepto de enfermedad en las plantas

Las plantas desarrollan una enfermedad cuando una o varias de sus funciones son alteradas por los organismos patógenos o por determinadas condiciones del medio.

Las plantas, al igual que el hombre y los animales, pueden verse afectadas por una serie de enfermedades causadas por bacterias. Las enfermedades bacterianas pueden ser nocivas, especialmente porque el control directo es imposible en muchos casos.

Características de las bacterias fitopatógenas

La mayoría de las bacterias fitopatógenas tienen forma de bacilo; la única excepción es *Streptomyces* spp., que es filamentosa. Los bacilos son cilíndricos y en los cultivos jóvenes tienen una longitud que va de 0.6-3.5 μm y un diámetro de 0.5 -1.0 μm . En los cultivos viejos, los bacilos de algunas especies son mucho más largos e incluso pueden tener forma filamentosa. En ocasiones se dan variaciones de la forma de bastón en forma de una maza, una Y o una V y otras formas ramificadas, incluso algunas bacterias, en ocasiones, pueden encontrarse dispuestas en pares o en cadenas cortas.

Las paredes celulares de la mayoría de las especies de bacterias están cubiertas por un material viscoso que puede ser delgado (caso en el cual se le denomina capa mucilaginosa o denso) o formando una masa relativamente amplia en cuyo caso se le denomina cápsula. La mayoría de las bacterias fitopatógenas poseen delicados flagelos en forma de filamentos que a menudo son considerablemente más largos que las células que los formaron. En algunas especies bacterianas, cada bacteria presenta un solo flagelo, mientras que otras poseen un ramillete de flagelos en uno de sus extremos o un ramillete de ellos en cada extremo y otras poseen flagelos peritricos, es decir, distribuidos sobre toda su superficie.³³

Las plantas pueden desarrollar una variedad de anomalías morfológicas o metabólicas como resultado de infecciones microbianas (cuadro 1). La invasión de las células vegetales por microorganismos patógenos a veces resulta en la

muerte rápida de la planta. En otros casos, la planta puede sufrir cambios más lentos.

Cuadro 1. Algunos síntomas de enfermedades producidas por bacterias fitopatógenas¹³

Enfermedad	Síntomas
Necrosis (pudrición)	Muerte de células vegetales, aparecen manchas de tejidos degradados en áreas localizadas
Cancros	Tejidos en sobrecrecimiento celular localizada que resulta en lesión, generalmente en el tallo
Marchitez	Flacidez de los tejidos debido a la pérdida de turgencia por la invasión de los tejidos vasculares
Roya	Signos producidos por algunos hongos con pérdida de follaje
Clorosis	Pérdida de la capacidad fotosintética debido al blanqueo de la clorofila
Hipoplasia	Retraso en el crecimiento.
Hiperplasia	Crecimiento excesivo
Agallas	Crecimiento tumoral

Enfermedades bacterianas en plantas

Muchas bacterias patógenas de plantas pueden permanecer viables en latencia en las plantas porque son resistentes a la desecación. Muchos son parásitos obligados y no pueden competir con las bacterias saprofitas del suelo. Otros patógenos bacterianos obligados de las plantas pueden reproducirse en el suelo, a menudo causando enfermedades solo después de que se hayan desarrollado suficientes poblaciones en el suelo.

Algunas enfermedades bacterianas son causadas por patógenos que tienen una fase permanente del suelo: por ejemplo, algunas especies fluorescentes de *Pseudomonas*, las cuales pueden infectar a las plantas ocasionando pudriciones blandas. Estos organismos, se presentan como saprófitos en la rizosfera e infectan las plantas a través de las raíces.

Muchas enfermedades de plantas causadas por bacterias son transmitidas por semillas. Las bacterias pueden ser transportadas en las semillas como contaminantes de la superficie o en el micrópilo, por ejemplo *Pseudomonas phaseolicola*, se transporta en el micrópilo y causa aureola de frijoles.¹³

Los géneros de bacterias patógenas más comunes en la agricultura son los siguientes: *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderi*, *Acidovorax*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Streptomyces* y *Xylella*. Algunas de estas atacan a un amplio número de cultivos mientras que otras son más específicas. La apariencia de los síntomas puede variar según el cultivo.³⁴

La importancia de elección del género *Pseudomonas* spp. en este trabajo se debe a su amplia distribución, y no solo es de importancia clínica, debido a los daños que pueden ocasionar en los humanos, este género y específicamente algunas especies pueden ocasionar daños a las plantas vegetales que pueden generar pérdidas económicas.

Para su caracterización bioquímica el químico se encarga de realizar pruebas microbiológicas, entre las que se cuenta la morfología colonial, las pruebas bioquímicas tradicionales y sistemas de análisis bioquímicos comerciales, que permiten conocer el comportamiento metabólico de las bacterias.

Familia *Pseudomonadaceae*

Los miembros de la familia *Pseudomonadaceae* poseen una naturaleza altamente cosmopolita es una indicación de fuertes atributos de supervivencia en los miembros de esta familia (Tabla 2). Estos atributos incluyen su capacidad de crecer utilizando una amplia variedad de fuentes de carbono. Además, el contenido genómico en promedio de GC es alrededor del 65% en moles, lo que permite que el DNA de estas bacterias sobreviva a los efectos dañinos de la luz ultravioleta emitida por el sol, mejor que las bacterias con genomas de contenido en GC en el rango de 50% en moles (por ejemplo, la familia *Enterobacteriaceae*).²⁵

Cuadro 2. Características distintivas de géneros de la familia *Pseudomonadaceae*²⁵

Género	Características principales	Hábitat.
<i>Frateria</i>	Colonias amarillas o anaranjadas; producen ácido y sulfuro de hidrógeno	Epifito Japonés de la frambuesa (<i>Rubus parvifolius</i> L.); Lily (<i>Lilium auratum</i> Lindl.)
<i>Pseudomonas</i>	Producen pigmentos difusibles en medios libres de hierro; produce catalasa y nitrato reductasa	Cosmopolita; algunas especies son patógenos de humanos, animales y plantas
<i>Rhizobacter</i>	Colonias de color blanco amarillento o blanco; tiende a agregarse y flocularse en caldo de cultivo; puede utilizar almidón y dextrina	Causa agallas en zanahorias (<i>Daucus carota</i> L.)
<i>Xylophilus</i>	Las células son pigmentadas y móviles con un sólo flagelo polar; produce catalasa pero no citocromo oxidasa, crecen mejor en medios que contienen extracto de levadura (1%), D-galactosa (2%) y carbonato de calcio (2%), en él se produce un pigmento marrón difusible	Asociado con partes leñosas de la vid (<i>Vitis</i> spp.), causando necrosis y culminando con necrosis de cancro
<i>Zoogloea</i>	Las células se agregan en sedimentos floculantes debido al material de polisacárido ácido fibrilar extracelular; las células acumulan ácido poli- β -hidroxibutírico en medio rico; utiliza una amplia variedad de azúcares, alcoholes y aminoácidos; la mayoría de las cepas producen citocromo oxidasa, proteasa y ureasa	Entornos acuáticos enriquecidos orgánicamente, como las aguas residuales

Clasificación del género

En 1973, Palleroni y sus colaboradores propusieron subdividir el género (*Pseudomonas*) en cinco grupos de homología de rRNA (grupos de rRNA I a IV), en función de los porcentajes de similitudes de las especies de *Pseudomonas* de varios por hibridaciones de rRNA: ADN. La heterogeneidad entre este antiguo género de especies fluorescentes y no fluorescentes se refleja en la presencia de especies distantes relacionadas que desde entonces se han colocado en géneros existentes o recién definidos. Las especies de *Pseudomonas* patógenas de plantas, anteriores de los grupos de ARN II a IV se han reclasificado a los otros géneros, incluidos *Burkholderia*, *Ralstonia* y

Acidovorax. Nuevos análisis moleculares y reordenamientos taxonómicos identificaron las especies de ARNr del grupo I, incluidas las especies tipo *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies de fluorescentes como *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. syringae*, como miembros de un grupo filogenéticamente homogéneo como *Pseudomonas* (sensu stricto). Esta clasificación está dada de acuerdo con la información filogenética obtenida del ARNr 16S. La taxonomía molecular basada en 16 secuencias de ARNr ahora ubica al género *Pseudomonas*, que se conoce como el grupo de *Pseudomonas* de tipo I o fluorescentes, en el grupo llamado *Pseudomonas* y parientes.²⁸

La nomenclatura de las bacterias en el género *Pseudomonas* ha cambiado considerablemente durante la última década. Está actualmente restringido a aquellas especies relacionadas con la especie tipo *Pseudomonas aeruginosa*, es decir, las *Pseudomonas* genuinas del grupo de ARNr I que pertenecen a la subclase Gamma de las Proteobacterias. Hasta 2005, el género *Pseudomonas* comprende 18 especies patógenas de plantas descritas válidamente y 3 especies patógenas para los hongos.⁴

Características generales del género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* comprende un grupo de bacterias Gram negativas bacilos rectos o ligeramente curvos, 0.5-1.0 X 1.5-4.0 µm en tamaño. Son móviles por uno o varios flagelos polares y el contenido de G+C de DNA es de 58-71%. No se conocen etapas de reposo en este género. Son bacterias catalasa positiva y aerobios estrictos a excepción de algunos que desnitrifican. Un rasgo característico de la mayoría de las especies es la producción de pigmentos fluorescentes, que se convierten en medios visibles deficientes en hierro, como B de King (BK). Las únicas excepciones son algunas cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* y la especie *Pseudomonas corrugata*.

Principales especies de *Pseudomonas* que afectan a las plantas

Las *Pseudomonas* fitopatógenas causan numerosas enfermedades en las plantas con diversos síntomas incluyendo canchales, marchitez, tizones, manchas en las hojas (patovares de *Pseudomonas syringae*), pudriciones suaves o de color café (patovares de *P. viridiflava*, *P. marginalis*), tumores o agallas (patovares de *P. savastanoi*), y tizones de hongos comestibles (*P. tolaasii*, *P. agarici*).²⁸

Entre las especies oxidasa negativas, *Pseudomonas syringae* es económicamente la más importante con más de 50 patovares. El concepto de patovar se introdujo para distinguir las bacterias de una misma especie que exhiben diferentes habilidades patogénicas en relación a su hospedante. El término "patovar" no forma parte de la jerarquía taxonómica y, por lo tanto, debe eliminarse como nombre primario de un organismo tan pronto como se obtienen datos suficientes para justificar la clasificación de especies y subespecies. Dentro de *P. syringae*, los patovares más importantes y mejor estudiados son *coronafaciens*, *glycinea*, *lachrymans*, *morsprunorum*, *persicae*, *phaseolicola*, *pisi*, *syringae*, *tabaci* y *tomato*. En los últimos años, *P. syringae* pv. *tomato* y el pv. *maculicola* se han convertido en organismos modelo importantes para estudiar los mecanismos moleculares de las respuestas del huésped a la infección.

Pseudomonas savastanoi es una especie inductora de agallas en olivo y adelfa. La especie pectinolítica *P. viridiflava* tiene un amplio rango de hospedante causa lesiones necróticas en hojas y tallos y pudriciones basales de tallo y raíz.⁴

Cuadro 3. Otras especies de Pseudomonas fitopatógenas²⁵

Especie	Hospedante primario	Efectos sobre los hospedantes y otras características.
<i>P. corrugata</i>	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. var. <i>esculentum</i> Mill.); pimiento (<i>Capsicum frutescens</i> L.)	La clorosis de la punta de la hoja, necrosis del tallo, produce dos inductores de péptidos de respuesta de hipersensibilidad (HR)
<i>P. fluorescens</i>	Apio (<i>Apium graveolens</i> L.) y coliflor (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.)	Lesiones acuosas, pudrición blanda; produce biosurfactante
<i>P. viridiflava</i>	Frijol (<i>Phaseolus</i> spp.)	Putrefacción acuosa de la hoja, necrosis del tallo; patógeno débil oportunista

Cuadro 4. Principales pruebas para caracterizar al género de *Pseudomonas*²⁸

Característica	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
Pigmento	-	+
Levana	-	-
Oxidasa	+	-
Prueba de pudrición en Papa	-	+
Arginina dihidrolasa	+	+
Hipersensibilidad en Tabaco	ND	+
Hidrólisis o licuefacción de gelatina	+	+
Prueba de nitratos	+	-

(+): prueba positiva

(-): prueba negativa

ND: no determinada

Cuadro 5. Identificación de especies saprofitas de *Pseudomonas* fluorescentes asociadas a plantas²⁸

Característica	<i>Pseudomonas fluorescens</i>					<i>Pseudomonas putida</i>	
	bvI	bvII	bvIII	bvIV	bvV	bvA	bvB
Pigmento	-	-	-	+	+	-	-
				azul			
Levana	+	+	-	+	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Prueba de pudrición en papa	-	-	-	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa	+	+	+	+	+	+	+
Hipersensibilidad en tabaco	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis o licuefacción de gelatina	+	+	+	+	-	-	-
Prueba de nitratos	-	+	+	+	-	-	-

Identificación del género *Pseudomonas* como fitopatógeno

Métodos de identificación convencionales

En la identificación de un cultivo puro utilizando métodos convencionales, se pueden determinar las siguientes características fenotípicas:

1.-Morfología de la colonia bacteriana. La forma, el color y el olor de una colonia pueden ser una indicación de un patógeno bacteriano (cuadro 6), pero muchas otras bacterias no patógenas pueden formar colonias similares. La producción de pigmento difusible también es importante.²

Características más notorias de las colonias

Por lo común, la valoración de las características más notorias de las colonias se realiza mediante la inspección visual del crecimiento en la superficie de las placas de agar. La inspección se lleva a cabo sosteniendo la placa en una mano y observando la superficie del agar para detectar crecimiento bacteriano. Cada placa debe ser estudiada cuidadosamente, debido a que las bacterias inicialmente recuperadas de la muestra son generalmente cultivos mixtos y pueden estar presentes diversos tipos de colonias. Las colonias puntiformes, correspondientes a bacterias de crecimiento lento pueden ser pasadas por alto entre colonias de mayor tamaño, sobre todo si estas últimas tienen tendencia a crecer expandiéndose sobre toda la superficie de la placa.

Durante el examen, las placas deben de ser viradas en distintas direcciones bajo una iluminación brillante y directa, de modo que la luz se refleje desde distintos ángulos.

También deben ser observadas bajo microscopio simple para observar las características principales del género de color blancas o amarillas.³³

Cuadro 6. Características de las colonias que se aplican a la identificación de bacterias⁵

Tamaño: diámetro

Forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, con forma de huso

Elevación: plana, elevada, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada

Margen (borde de la colonia): entero, ondulado, lobulado, lacerado, filamentoso, enrollado

Color: blanco, amarillo, negro, sepia, naranja y otros

Superficie: opaca, brillante, otras

Densidad: opaca, traslúcida, transparente, otras

Consistencia: butirosa, viscosa, membranosa, quebradiza, otras

Las placas de agar sangre también pueden ser examinadas por transiluminación de una luz brillante desde atrás de la placa, para detectar las reacciones hemolíticas en el agar.

2.-Morfología de las células bacterianas. Los patógenos de las plantas son bacilos Gram negativos o son filamentosos (*Streptomyces* spp.).

Las principales formas que adoptan son esferas, bastones, bastones doblados o curvos, y espirales. Las morfologías bacterianas comunes incluyen cocos (redondos), cocobacilos (ovoides) y bacilos (con forma alargada), además formas fusiformes (extremos puntiagudos) o curvas. Las disposiciones celulares también son dignas de mención porque las células pueden aparecer con patrones característicos: en forma individual, en pares, en tétradas, en racimos o cadenas.³²

La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas:

A.-Gram positivas.

Tiene un grosor de casi 80 nm y está compuesta principalmente de varias capas de peptidoglicano. Atrapadas dentro de esta matriz de peptidoglicanos se encuentra una variedad de proteínas, polisacáridos y moléculas únicas denominadas ácidos teicoicos. Son polímeros de unidades de ribitol ($C_5H_{12}O_5$) o de glicerol ($C_3H_8O_3$) unidos por enlaces fosfodiéster. Los ácidos ribitol teicoicos están asociados con la pared celular con la cara interior de la membrana de la célula bacteriana.

Los ácidos teicoicos estabilizan la pared celular, mantienen la asociación de la pared con la membrana celular, quelan pequeños iones necesarios para el funcionamiento y la integridad de la pared celular y participan en la interacción celular y la adherencia a mucosas u otras superficies.

B.-Gram negativas.

Su pared celular es más delgada con respecto a las bacterias Gram positivas pero estructuralmente son más complejas. Por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra el espacio periplasmático, un compartimiento que contiene enzimas y que se encuentra entre la membrana citoplasmática y la porción exterior de la pared celular. Una capa de peptidoglicano de una sola unidad de espesor forma el borde externo del espacio periplasmático. Como los peptidoglicanos se disponen en una monocapa, el entrecruzamiento sólo ocurre entre filamentos adyacentes de peptidoglicanos más profundas o más externas a la superficie de la célula. Los entrecruzamientos están formados por la unión del grupo carboxilo del residuo terminal de D-alanina. La capa de peptidoglicanos de las bacterias Gram negativas es bastante "laxa", es decir, sólo alrededor de la mitad de las cadenas peptídicas que pueden unirse a residuos de ácido N-acetilmurámicos están realmente entrecruzadas.⁵

Los lipopolisacáridos (LPS) son únicos en las bacterias gram negativas en la membrana externa de las bacterias gram negativas. Las moléculas de los LPS son los determinantes antigénicos de superficie más importantes (llamados somáticos o antígeno O)

de las bacterias Gram negativas y son responsables de la actividad de endotoxina de las células de dichas bacterias. Las moléculas de los LPS son glucolípidos complejos compuestos por una porción lipídica llamada lípido A, la región del centro o core polisacárido que en general es similar en estructura dentro de un género o una especie dados de bacterias y cadenas laterales O-específicas, que son regiones de estructura bioquímica variable que confieren una entidad serológica única a las especies de bacterias G-.¹⁰

3.-Características fisiológicas. La determinación puede ser el crecimiento a diferentes temperaturas, por ejemplo, 4°C o 37°C; punto de muerte térmica (para bacterias fitopatógenas usualmente 50-55°C, cuando se mantiene durante 10 minutos a esta temperatura en medio líquido); crecimiento a diferentes niveles de NaCl, por ejemplo 2, 5 y 7%, etc.²

4.-Características bioquímicas.

Se define a una prueba bioquímica a cualquier reacción que pone en evidencia la presencia o ausencia de una enzima, vía metabólica o alguna otra propiedad característica de una especie, que la revela como tal. Su fin es netamente taxonómico, por lo que la elección adecuada de la batería de reacciones a realizar sobre un cultivo puro desconocido, es fundamental y definitoria para su identificación.²³

En las pruebas bioquímicas se determina la expresión del material genético por los diversos sistemas enzimáticos de la bacteria. Al ofrecer los nutrientes de las bacterias en un tubo de cultivo o placa de agar, se puede verificar la acción de estos sistemas enzimáticos. Se han desarrollado pruebas para determinar si las bacterias pueden descomponer ciertas fuentes de carbono (por ejemplo, azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, glucósidos) y / o fuentes de nitrógeno (por ejemplo, aminoácidos). Esto puede hacerse mediante la inoculación de tubos que contienen una única fuente de carbono o nitrógeno en medio mínimo, incluido un indicador de pH. Si la bacteria es capaz de descomponer la fuente de carbono o nitrógeno en productos ácidos o alcalinos, el indicador de pH (y, por lo tanto, el color del medio) cambiará.²

El protocolo de identificación más usado consiste en determinar las propiedades morfológicas y metabólicas de las bacterias desconocidas y compararlas con otras bacterias conocidas, como control de referencia.

A) Pruebas monoenzimáticas

Cada bacteria produce un espectro de enzimas distinto. Por ejemplo, algunas enzimas son necesarias para el metabolismo individual de la bacteria, mientras que otras les ayudan a competir con las demás bacterias o establecer una infección. Las pruebas que detectan enzimas bacterianas concretas son simples, rápidas y generalmente fáciles de interpretar. Se puede llevar a cabo con organismos que ya se han hecho crecer en un cultivo y a menudo proporcionan una identificación presuntiva. Ejemplos de este tipo de pruebas se considera a la catalasa y la prueba de oxidasa.

B) Pruebas basadas en la presencia de vías metabólicas

Estas pruebas determinan la presencia de una vía metabólica en un aislamiento bacteriano, en vez de detectar una sola enzima. Entre los ensayos que se usan habitualmente cabe mencionar los que detectan la oxidación y la fermentación de distintos carbohidratos, la capacidad de degradar aminoácidos y el uso de sustratos específicos.¹⁸

Pruebas de levana, oxidasa, pudrición en papa, arginina dihidrolasa e hipersensibilidad en tabaco (LOPAT)

Estas pruebas son muy útiles para la identificación de especies dentro de las *Pseudomonas* spp. fluorescentes e incluyen la producción de levana en medio de sacarosa, reacción de oxidasa, actividad pectolítica en rodajas de papa (prueba de pudrición en papa) o gel de pectato, actividad de arginina dihidrolasa y reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco.⁴

Prueba de levana

Fundamento

La levana es un polisacárido de unidades de fructuosa que se produce a partir de la sacarosa por medio de la enzima sacarasa, y forma parte de las pruebas denominadas de LOPAT, para la separación del grupo fluorescente del género *Pseudomonas*.³¹

Cuadro 7. Interpretación y forma de reportar la prueba de levana³¹

Resultado	Interpretación	Forma de reportar
Consistencia y elevación de las colonias bacterianas son pulvinadas y mucoides	Producción de levana	Levana +
Las colonias son planas y secas	No presenta producción de levana	Levana -

Prueba de oxidasa

Fundamento

Una de las pruebas claves para diferenciar a las *Pseudomonas* de otros bacilos Gram negativos es a través de la detección de la enzima citocromo oxidasa.³¹

Un resultado positivo de oxidasa consiste en una serie de reacciones, con un componente autooxidable del sistema citocromo como catalizador final. Los sustratos artificiales pueden ser sustituidos por los aceptores naturales de electrones en cualquier parte dentro de la cadena de transporte de electrones donde ellos reducen el sistema citocromo c-citocromo oxidasa. Los diversos colorantes reactivos de la prueba de oxidasa son aceptores artificiales de electrones; el reactivo p-fenilendiamina y el indofenol son tanto aceptores como dadores de electrones. Estos sustratos artificiales pueden ser incoloros o coloreados, lo cual depende de su estado; la reacción de oxidasa final brinda un producto coloreado.³⁰

Cuadro 8. Interpretación y forma de reportar la prueba de oxidasa²⁴

Resultados	Interpretación	Forma de reportar
Azul fuerte/ morado en 20 segundos	Citocromo c oxidasa está presente	Oxidasa +
sin cambio de color a azul / púrpura en 20 segundos	La citocromo c oxidasa no se encuentra presente	Oxidasa -

Pruebas de patogenicidad

Para realizar la prueba de patogenicidad, es necesario seleccionar un método de inoculación adecuado al hospedante, lo cual dependerá del tipo de síntoma, órgano o tejido afectado y la vía de entrada del patógeno, además, para tratar de reproducir los síntomas típicos, en nivel de invernadero, también se deben de considerar las condiciones ambientales que permiten la manifestación de los síntomas en el campo. Es preciso señalar que para realizar estas pruebas es necesario que los cultivos bacterianos estén puros y no tengan mucho tiempo de haberse sembrado en medios de cultivo ya que se podrían correr el riesgo que pierdan su virulencia.

La penetración de las bacterias, a sus hospedantes generalmente es pasiva, esto es, entran através de heridas o aberturas naturales, por lo que al hacer la inoculación artificial se debe de favorecer su penetración.

Punción. El método más apropiado de inoculación artificial de bacterias causantes de marchitez o pudriciones blandas, es la punción al tallo o tejidos carnosos de la planta. Con esta técnica se pueden obtener los síntomas típicos, independientemente del número de células bacterianas.

La suspensión bacteriana también puede ser introducida con una jeringa hipodérmica.³¹

Prueba de pudrición en papa

Fundamento

Para bacterias aisladas de órganos con pudrición, la patogenicidad se puede valorar con la prueba de pudrición de tubérculo de papa. Sirve para diferenciar patovares de *Pseudomonas* fluorescentes.

Cuadro 9. Interpretación y forma de reportar la prueba de pudrición en papa³¹

Resultados	Interpretación	Forma de reportar
Consistencia blanda o pudrición	Indica que la bacteria inoculada sintetiza enzimas pectolíticas y es muy probable que sea el agente causal de la pudrición	Pudrición en papa+
Sin cambios	No hay cambios en los tejidos inoculados, no hay pudrición	Pudrición en papa-

Reacción de hipersensibilidad en tabaco

Fundamento

La reacción de hipersensibilidad es una prueba muy útil dentro de la fitobacteriología, porque con ella se puede determinar fácil y rápidamente si una bacteria es o no fitopatógeno, sobre todo para aquellas bacterias aisladas de muestras con manchas foliares y tizones, aunque también algunas que causan pudriciones pueden dar la reacción positiva.

Esta prueba, también es útil en la identificación de especies de *Pseudomonas* del grupo fluorescente.

Cuadro 10. Interpretación y forma de reportar la prueba de hipersensibilidad en tabaco³¹

Resultados	Interpretación	Forma de reportar
La zona infiltrada presenta pérdida de turgencia o necrosis	La bacteria es fitopatógena	Hipersensibilidad en tabaco+
No se observan cambios significativos	La bacteria no es fitopatógena	Hipersensibilidad en tabaco -

Prueba de arginina dihidrolasa

Fundamento

Determinar la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar un aminoácido para formar una amina con la resultante alcalinidad.³⁰

Si la bacteria en estudio presenta la arginina desaminasa y la citrulina ureidasa, en el medio de cultivo se acumulará NH_3 , el cual lo alcalinizará, provocando que el indicador rojo de fenol vire de color rosa al violeta.³¹

Cuadro 11. Interpretación y forma de reportar la prueba de arginina dihidrolasa³¹

Resultados	Interpretación	Forma de reportar
Color rosa a violeta	Alcalinización del medio	Arginina dihidrolasa+
Color rojo	No hay alcalinización del medio	Arginina dihidrolasa-

OTRAS PRUEBAS

Prueba de KOH (prueba de la potasa o también llamado test de la cuerda)

Fundamento

Consiste en la capacidad del KOH (potasa) que tiene para disolver las paredes de bacterias Gram negativo. Este fenómeno se produce debido a que las bacterias Gram negativas tienen una pared de peptidoglucano mucho más fina. Por ende, es más fácil disolver la pared de bacterias Gram negativas que las Gram positivas. Y al romperse la pared de las bacterias Gram negativas, se libera el contenido interior incluido el material genético.

Por tanto, esta prueba tan simple, nos sirve para distinguir bacterias Gram positivas de las bacterias Gramnegativas.³⁶

Cuadro 12. Interpretación y forma de reportar la prueba de KOH³⁶

Resultados	Interpretación	Forma de reportar
Solución viscosa y se creará una especie de cuerda	La bacteria es Gram negativa	KOH o test de la cuerda+
No presenta viscosidad ni formación de hilo	La bacteria es Gram positiva	KOH o test de la cuerda-

Prueba de catalasa

Fundamento

El peróxido de hidrógeno y el radical superóxido son tóxicos porque oxidan los productos bioquímicos y los hacen no funcionales. Sin embargo, los organismos que los producen también producen enzimas capaces de descomponerlos.

El superóxido dismutasa cataliza la conversión de radicales superóxido (el más letal de los dos compuestos) en peróxido de hidrógeno. La catalasa convierte peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso. En gran parte (existen excepciones), la capacidad de sintetizar estas enzimas protectoras explica la capacidad de un organismo para sobrevivir en presencia de oxígeno.

Las bacterias que producen catalasa pueden ser detectadas fácilmente utilizando peróxido de hidrógeno de grado analítico.²⁴

Cuadro 13. Interpretación y forma de reportar la prueba de catalasa²⁴

Resultados	Interpretación	Forma de reportar
Producción de burbujas	Catalasa está presente	Catalasa+
Sin producción de burbujas	Catalasa se encuentra ausente	Catalasa-

Prueba de indol

Fundamento

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol (metil indol) y ácido indolacético (IAA, indolacetato).

El indol liberado de la molécula de triptófano puede detectarse por medio de un reactivo que involucra una combinación química que produce un color definido. La presencia o la ausencia de formación de indol se usan para la identificación bacteriana.³⁰

Cuadro 14. Interpretación y forma de reportar la prueba de indol²⁴

Resultados	Interpretación	Forma de reportar
Anillo rojo al agregar el reactivo de Kovacs	Organismo que produce triptofanasa e hidroliza triptófano en indol y piruvato	Indol+
El color del reactivo no cambia	Organismos que no producen triptofanasa y no hidrolizan triptófano	Indol-

Prueba de Hugh Leifson O/F (Oxido-Fermentación)

Fundamento

Al obtener energía de los alimentos, las bacterias pueden ser oxidativas o fermentativas.

Las bacterias oxidativas utilizan el oxígeno para producir dióxido de carbono y agua.

Estas bacterias tienen un sistema enzimático citocromo. Al utilizar compuestos orgánicos como donantes de electrones, con oxígeno como el último receptor de electrones (e hidrógeno), producen CO₂ y agua como productos finales. Las bacterias fermentativas, por otra parte, también utiliza compuestos orgánicos para energía, pero carecen de sistema de citocromo. En lugar de producir solo CO₂ y agua, producen productos finales complejos, como ácidos, aldehídos y alcoholes. Varios gases, como el dióxido de carbono, hidrógeno y metano también son producidos. En las bacterias fermentativas, los compuestos orgánicos actúan tanto como donadores de electrones, como aceptores de electrones.

Azúcares, principalmente glucosa, son compuestos ampliamente utilizados para organismos fermentativos. Otras sustancias como ácidos orgánicos, aminoácidos, purinas y pirimidias también pueden ser fermentados por algunas bacterias. Los productos finales de una fermentación en particular son

determinados por la naturaleza del microorganismo, las características del sustrato y condiciones ambientales como son la temperatura y el pH.

Aunque la fermentación y la respiración representan dos tipos diferentes de reacción que producen energía, ambas pueden estar presentes en el mismo organismo, como es el caso de los anaerobios facultativos.²⁶

Cuadro 15. Interpretación y forma de reportar la prueba de Hugh Leifson (O/F)²⁴

Sellado	Sin sello	Interpretación	Forma de interpretar
Verde o azul	cualquier cantidad de amarillo	Oxidación	O
Amarillo en todo el tubo	Amarillo en todo el tubo	Oxidación y fermentación o sólo fermentación	O-F o F
Ligeramente amarillo en la parte superior	Ligeramente amarillo en la parte superior	Oxidación y fermentación lenta o fermentación lenta solamente.	O-F o F
Verde o azul	Verde o azul	Sin metabolismo del azúcar, se considera organismo no sacarolítico	N

Prueba de hidrólisis de gelatina (licuefacción de gelatina)

Fundamento.

Determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licúan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación.

La gelatina, una proteína derivada del colágeno animal, se incorpora a diferentes medios de cultivo para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (proteinasas), detectadas por digestión o licuefacción de la gelatina. Las enzimas capaces de producir gelatinólisis se denominan gelatinasas. Estas enzimas proteolíticas a menudo son importantes factores de virulencia de algunos microorganismos. Las proteínas naturales son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por ende, para que una célula pueda usar las proteínas, éstas primero deben ser catabolizadas a componentes más pequeños. Ciertas bacterias segregan gelatinasas exocelulares para degradar las proteínas y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana.³⁰

Cuadro 16. Interpretación y forma de reportar la prueba de hidrólisis de gelatina²⁴

Resultado	Interpretación	Forma de interpretar
Gelatina es líquida (control es sólido)	Gelatinasa está presente	Hidrólisis de gelatina o licuefacción de gelatina+
Gelatina es sólido	No se encuentra presente la gelatinasa	Hidrólisis de gelatina o licuefacción de gelatina-

Prueba de reducción de nitratos/nitritos

Fundamento.

El caldo nitrato es un medio indefinido de extracto de carne, peptona, y nitrato de potasio (KNO₃). Contiene una campana de Durham invertida, esta es colocada en cada caldo para atrapar una porción de cualquier gas. En contraste con muchos medios diferenciales, no se incluyen indicadores de color. La reacción de color obtenida en el caldo nitrato tienen lugar como resultado de la reacción entre productos metabólicos y reactivos añadidos después de la incubación.²⁴

En el proceso de desnitrificación, puede acumularse óxido nitroso (un intermediario) si la concentración de nitrato es alta; cuando la concentración de nitrato es baja, el óxido nitroso es reducido con posterioridad a nitrógeno molecular. En la reducción de nitratos pueden ocurrir diversos procesos para la utilización de los productos finales obtenidos. El amoníaco o la hidroxilamina pueden estar asimilados en los componentes celulares que contienen nitrógeno (proteínas y ácidos nucleicos) para la síntesis de nuevos compuestos. Por consiguiente, en la prueba de reducción de nitratos, la reducción se evidencia por la presencia de un producto final catabólico o por la ausencia de nitrato en el medio.³⁰

Cuadro 17. Interpretación y forma de reportar la prueba de reducción de nitratos/nitritos²⁴

Resultado	Interpretación	Forma de interpretar
Gas (no fermentador)	Desnitrificación-producción de nitrógeno en forma de gas ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$)	Producción de gas+
Gas (fermentador, u otro status desconocido)	Fuente de gas es desconocido; requiere adición de reactivos.	
Color rojo (Después de la adición del reactivo A y B)	Reducción de nitrato a nitrito ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$); nitrato reductasa está presente.	Reducción de nitrato a nitrito +
Sin cambio de color (Después de la adición del reactivo A y B)	Prueba incompleta, requiere de la adición de polvo de zinc	
Sin cambio de color (después de la adición del zinc)	Reducción de nitrato a compuestos de nitrógeno no gaseoso ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}, 1/2\text{N}_2\text{O}$ o $1/2\text{N}_2$)	Nitratos +
Color rojo (después de la adición de polvo de zinc)	No hay reducción de nitrato	Nitratos-

Sistemas multipuebas

Estos sistemas proporcionan resultados específicos y rápidos en comparación con las pruebas tradicionales, sin embargo pueden dar información no precisa, si se utilizan de forma incorrecta. Todos eligen condiciones, muy precisas de concentración del inóculo, de inoculación, de incubación y de lectura, que si no se observan a detalle pueden dar lugar a importantes errores. También conviene conocer las limitaciones propias en cada caso. Estos sistemas se pueden dividir en dos grupos: manuales y automatizados.²⁰

Sistema API

Las tiras API que se derivan de su nombre en inglés “Analytical Profile Index”, que significa Índice de Perfil Analítico, es un sistema que permite la determinación simultánea de la reacción de un organismo a una variedad de medios de diagnóstico cuidadosamente seleccionados a partir de una sola inoculación. Consta de una bandeja de plástico con 20 microtubos llamados cúpulas, cada uno con un tipo diferente de medio deshidratado. El medio contenido en cada una de las cúpulas es rehidratado e inoculado con una suspensión bacteriana obtenida a partir de una colonia purificada.²⁷

De acuerdo a los microorganismos de interés, será el sistema que se utilice, para la caracterización de las cepas se utilizaron los siguientes sistemas de identificación Api ®20 NE, Api ®20 E e ID 32 E®. En el cuadro 19 se muestra la comparación.²⁰

Cuadro 18. Comparación entre sistemas de identificación^{56, 57,58}

Nombre del sistema de identificación	Introducción y objeto del ensayo.	Composición
Api ®20 NE	Es un sistema estandarizado para la identificación de los bacilos Gram negativos no enterobacterias y no fastidiosos (por ejemplo: <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> , etc.), que combinan 8 ensayos convencionales, 12 ensayos de asimilación y una base de datos.	Contiene los 20 microtubos con los substratos deshidratados) con cámara de incubación (fondo y tapa)
Api ®20 E	Es un sistema estandarizado que permite la identificación de <i>Enterobacteriaceae</i> y otros bacilos Gram negativos no exigentes	Contiene los 20 microtubos con los substratos deshidratados) con cámara de incubación (fondo y tapa)
ID 32 E®	Es un sistema estandarizado para la identificación de las <i>Enterobacteriaceae</i> y otros bacilos Gram negativos no exigentes, que utiliza 32 ensayos bioquímicos miniaturizados, así como la base de datos específica. La lista completa de bacterias que pueden identificarse con este sistema está indicada.	La galería ID 32 E incluye 32 cúpulas de ensayo que contienen un reactivo deshidratado con cámara de incubación (fondo y tapa)

La lectura de resultados se efectúa visual y directamente, interpretando el color de cada reacción, tras la adición de reactivos reveladores. Con los resultados se establece un código numérico que corresponde a una determinada especie reflejada en unos cuadros.

Los resultados presentan una correlación con las pruebas clásicas superior al 90%.²⁰

Cuadro 19. Comparación entre los sistemas de identificación manuales convencionales y comerciales^{22,27,40}

Tipo de sistema de caracterización taxonómica.	Ventajas	Desventajas
Pruebas bioquímicas tradicionales	<ul style="list-style-type: none"> • Ocupan poco espacio en la incubadora. • La interpretación de las pruebas es relativamente fácil. • Se pueden preparar pruebas específicas que permiten la identificación más precisa de la bacteria. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se requiere de mayor tiempo para prepararse. • Se requiere de diferentes reactivos químicos. • Se debe tener cuidado para inocularlas. • Mayor dificultad, en cuanto a preparación de medios, lavado de material de vidrio y esterilización de materiales. • Se requiere de mayor tiempo para evaluar el resultado.
Sistemas multipuebas (API)	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizan pequeñas cantidades de medios. • Ocupan poco espacio en una incubadora. • Excelente concordancia con los métodos tradicionales. • Fácil de usar y leer. • Evita la contaminación y errores inherentes a las técnicas de tubos múltiples; los compartimientos individuales ayudan a eliminar contaminaciones cruzadas de los medios. • Más económico, elimina la preparación de medios, lavado de material de vidrio y esterilización de materiales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Incapacidad de detectar reacciones débiles. • Algunas pruebas son difíciles de interpretar. • A veces es necesario hacer pruebas bioquímicas o serológicas adicionales. • La mayoría de estas pruebas no están diseñadas para bacterias fitopatógenas. • Los resultados depende de la observación.

Debido a la complejidad de la detección, caracterización e identificación de las bacterias fitopatógenas, ha sido necesario utilizar diferentes técnicas complementarias, entre ellas es de gran ayuda el uso de técnicas moleculares, ya que nos permiten confirmar la identidad de la bacteria analizada.

Métodos de detección moleculares

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La caracterización molecular es una herramienta importante para la identificación de patógenos de plantas con la ayuda de iniciadores o primers específicos de locus/genes, que amplifican o multiplican una secuencia específica del DNA bacteriano.

Esta multiplicación se alcanza repitiendo ciclos de:

- 1) Desnaturalización (fusión) de ácido nucleico, generalmente a 95°C.
- 2) Recocido de cadenas cortas (específicas) de ácidos nucleicos, los llamados iniciadores (estos iniciadores han sido ensamblados artificialmente y consisten en una secuencia que se sabe que es específica para organismo objetivo), en c. 68°C (dependiendo de los iniciadores utilizados).
- 3) Extensión de hebras de ácido nucleico a 72°C en presencia de nucleótidos libres y una polimerasa de ácido nucleico termoestable (generalmente polimerasa Taq, originalmente aislada de la bacteria termofílica de aguas termales *Thermus aquaticus*, pero también disponible como producto sintetizado artificialmente). Después de la multiplicación, se pueden visualizar los productos de PCR en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio mediante electroforesis.

Teóricamente, la sensibilidad de la PCR es muy alta: una copia del DNA objetivo en una muestra puede ser detectado.

Planteamiento y justificación del problema

El área de bacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) se encarga del diagnóstico de bacterias fitopatógenas, entre los géneros de importancia agrícola se encuentra *Pseudomonas* spp. debido a las enfermedades que ocasionan en cultivos de importancia agrícola.

El CNRF cuenta con una colección de bacterias fitopatógenas, por lo que se reciben donaciones; una de las actividades para que las cepas puedan ingresar es su curación por lo que deben caracterizarse nuevamente. Para su análisis se asignaron un grupo de 10 cepas presuntivas a *Pseudomonas* spp. y de acuerdo a sus características metabólicas, esto permite su caracterización, además deben realizarse pruebas de patogenicidad, inoculación de pruebas bioquímicas tradicionales, el uso de sistemas como API® y finalmente confirmarse por técnicas moleculares para determinar género y especie para resguardo en la colección.

Hipótesis

Las pruebas bioquímicas tradicionales requieren de tiempo para poder realizarse e interpretarse, por lo que en el proceso de diagnóstico se requiere de implementar sistemas de identificación confiables y rápidos como los sistemas como API®; el uso de ambas metodologías permitirá realizar la identificación de género y especie de dichas cepas.

Objetivo general

Caracterizar mediante pruebas bioquímicas, bacterias del género *Pseudomonas* spp. asociadas a cultivos vegetales.

Objetivos específicos

- Reactivar y purificar 10 aislamientos de bacterias asociadas a cultivos vegetales en diferentes medios de cultivo.
- Caracterizarlas mediante pruebas bioquímicas tradicionales,
- Caracterizarlas por medio de los sistemas multipuebas de identificación como son:
 - API® ID 32 E™,
 - API® 20 NE™ y
 - API® 20E™
- Hacer una comparación entre los resultados obtenidos mediante los diferentes sistemas de identificación.
- Realizar las pruebas de LOPAT.
- Analizar los aislamientos mediante la técnica de biología molecular (PCR) para corroborar la identificación de las bacterias

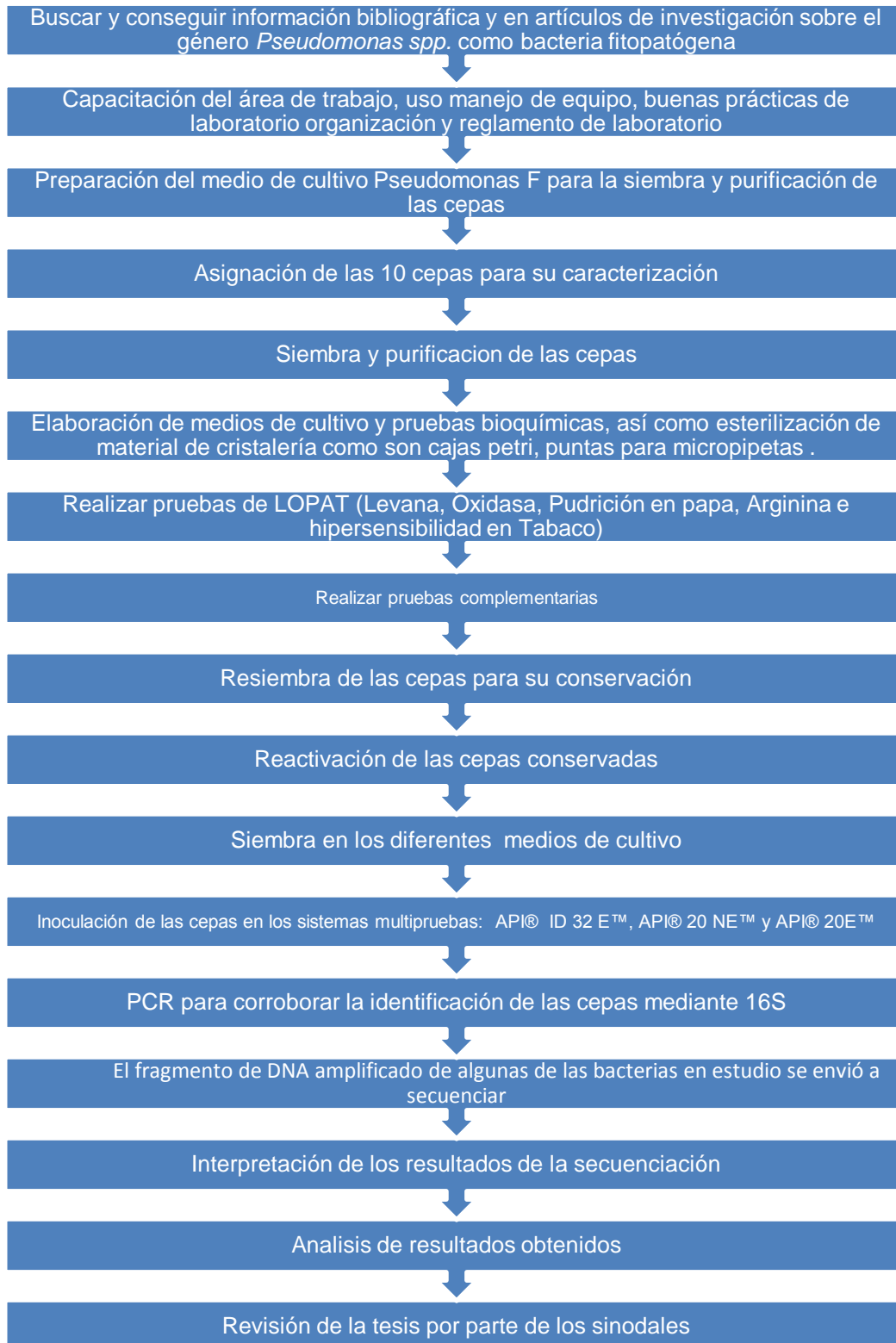
Materiales y métodos

1. Búsqueda de información del género de *Pseudomonas* spp. en libros, revistas, páginas de internet, etc.
2. Capacitación por parte de los responsables de laboratorio de bacterias del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), conocer las normas, manejo de equipo y material de laboratorio y las áreas con las que cuenta.
3. Preparación del medio de cultivo *Pseudomonas* F para la siembra y purificación de las cepas. (**Anexo 1.1**)
4. Asignación por parte de la asesora del proyecto del material biológico (10 cepas) presuntivas al género *Pseudomonas* spp.
5. Siembra y purificación de las cepas en el medio por estria cruzada para observar la morfología colonial que presentan las cepas.
6. Elaboración de medios de cultivo y pruebas bioquímicas, así como esterilización de material de cristalería como son cajas petri, puntas para micropipetas
7. Realizar pruebas de LOPAT (Levana (**Anexo 2.1**), Oxidasa (**Anexo 2.2**), Pudrición en papa (**Anexo 2.6.1**), Arginina (**Anexo 2.3**) e hipersensibilidad en Tabaco (**Anexo 2.6.2**)) para identificación de *Pseudomonas* fluorescentes.
8. Realizar pruebas complementarias (KOH, catalasa, motilidad o movilidad, indol, Hugh Leifson (O/F) (**Anexo 2.4**), hidrólisis de gelatina (licuefacción de gelatina) y reducción de nitratos (**Anexo 2.5**).
9. Resiembra de las cepas para su conservación en glicerol como crioprotector.
10. Reactivación de las cepas conservadas, se observa la morfología colonial y se compara con la anterior para determinar si la cepa sufrió algún cambio.
11. Posteriormente se siembran en los medios de cultivo como son BD® Pseudosel Agar (**Anexo 1.2**), BD® MacConkey II Agar (**Anexo 1.3**), BD®

Salmonella Shigella Agar (**Anexo 1.4**) y agar sangre, este último nos permite observar la formación de hemólisis, la cual nos es de utilidad para identificar a las bacterias así como para determinar su patogenicidad.

12. Inoculación de las cepas en los sistemas multipuebas: API® 20 NE™ (**Anexo 3.1**), API® 20E™ (**Anexo 3.2**) y API® ID 32 E™ (**Anexo 3.3**)
13. Realización de la técnica molecular de PCR para corroborar la identificación de las cepas mediante 16S y utilizando como iniciadores 8F-1492R y 70F-70R. Posteriormente se prepara un gel de agarosa para realizar electroforesis.
14. El fragmento de DNA amplificado de algunas de las bacterias en estudio se envió a secuenciar.
15. Análisis e interpretación de las secuencias.
16. Conservación de cepas.
17. Una vez obtenidos los resultados de cada una de las pruebas se realiza el análisis de cada una, para el caso de las pruebas bioquímicas tradicionales se utiliza el índice kappa el cual nos permite hacer una comparación entre lo reportado teóricamente y lo obtenido experimentalmente respecto a las pruebas que se realizaron.
18. Con los resultados permite construir una tabla comparativa entre los métodos de identificación y caracterización de las cepas.
19. Revisión de la tesis por parte de los sinodales.

Diagrama de flujo



Tipo de estudio/diseño de la investigación: Observacional-Prolectivo-Transversal-Descriptivo.

RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos en los análisis realizados a las 11 cepas bacterianas pertenecientes al género de *Pseudomonas*.

Cuadro 20. Resultados de la morfología colonial sembrada en medio *Pseudomonas* Agar F

Cepa	Características morfológicas	
1A	<ul style="list-style-type: none"> • Color: Gris • Forma: circulares • Borde: Liso • Elevación: Elevado 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: Mucoide • Luz reflejada: Brillante • Luz transmitida: Opaca • Pigmentación: Fluoresceína
1B	<ul style="list-style-type: none"> • Color: amarillo • Forma: circular • Borde: Liso • Elevación: plana 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: Húmedo • Luz reflejada: Mate • Luz transmitida: Opaca • Pigmentación: sin pigmentación
1C	<ul style="list-style-type: none"> • Color: Amarillo • Forma: circular • Borde: liso • Elevación: Plano 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: Húmedo • Luz reflejada: Brillante • Luz transmitida: Opaca • Pigmentación: Fluoresceína
2E	<ul style="list-style-type: none"> • Color: Amarillo • Forma: Irregular • Borde: Ondulado • Elevación: Plana 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: Húmedas • Luz reflejada: Mate • Luz transmitida: Opaca • Pigmentación: Poca pigmentación de fluoresceína.
2F	<ul style="list-style-type: none"> • Color: Amarillo • Forma: Irregular • Borde: Liso • Elevación: Plana 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: Húmedo • Luz reflejada: brillante • Luz transmitida: Opaca • Pigmentación: Pioverdina: amarillo-verde
2G	<ul style="list-style-type: none"> • Color: Gris • Forma: circular • Borde: Liso • Elevación: plana 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: Húmeda • Luz reflejada: Mate • Luz transmitida: Opaca • Pigmentación: Pioverdina: amarillo-verde
3N	<ul style="list-style-type: none"> • Color: Gris • Forma: Circular • Borde: Liso • Elevación: plana 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: húmedo • Luz reflejada: Mate • Luz transmitida: Opaca • Pigmentación: Pioverdina: amarillo-verde
1Ñ	<ul style="list-style-type: none"> • Color: Gris • Forma: Irregular • Borde: Liso • Elevación: Plana 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: Húmedo • Luz reflejada: mate • Luz transmitida: Opaca • Pigmentación: Pioverdina: amarillo-verde
1O	<ul style="list-style-type: none"> • Color: gris • Forma: circular • Borde: liso • Elevación: plano 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: mucoide • Luz reflejada: brillante • Luz transmitida: opaca • Pigmentación: Pioverdina: amarillo-verde
2P	<ul style="list-style-type: none"> • Color: Gris • Forma: Redondas • Borde: liso • Elevación: plano 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: humedo • Luz reflejada: mate • Luz transmitida: opaca • Pigmentación: Pioverdina: amarillo-verde
1R	<ul style="list-style-type: none"> • Color: gris • Forma: circular • Borde: liso • Elevación: plano 	<ul style="list-style-type: none"> • Aspecto: seco • Luz reflejada: mate • Luz transmitida: opaca • Pigmentación: Pioverdina: amarillo-verde

La letra identifica a la cepa y el número se refiere a los números de aislamientos.

Cuadro 20.1. Formación de pigmentos que se utilizan para identificación de las colonias de *Pseudomonas* spp. y se reportan en morfología colonial⁷

Pigmento	Color
Piocianina	Azul
Fluoresceína	Amarillo
Piorrubina	Rojo-marrón
Piomelina	Café
Pioverdina	Amarillo-verde

Cuadro 21. Reporte de crecimiento en medios selectivos y diferenciales

Cepas	<i>Pseudomonas</i> Agar F	Cetrimida	MacConkey.	<i>Salmonella</i> - <i>Shigella</i> .	EMB (Eosina y Azul de Metileno)	Agar Sangre
A	+	+	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: α
B	+	-	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: γ
C	+	+	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: γ
E	+	+	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: γ
F	+	+	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: γ
G	+	+	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: γ
N	+	+	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: γ
Ñ	+	+	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: γ
O	+	+	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: γ
P	+	+	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: γ
R	+	+	+	+	+	+ Tipo de hemólisis: γ

(+) = Crecimiento en el medio

(-) = Ausencia.

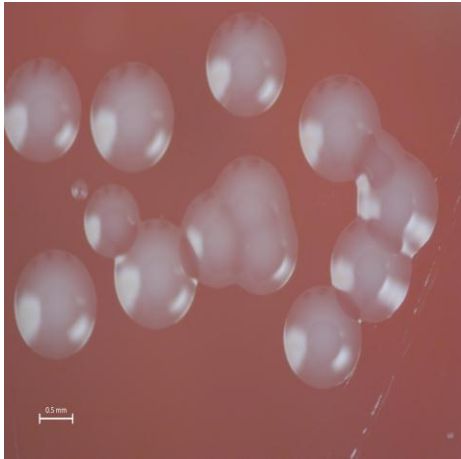


Figura 1. Cepa "P", en agar sangre, caracterizada como *Pseudomonas fluorescens*.

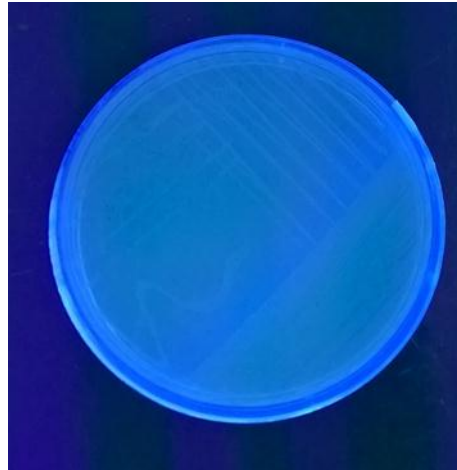


Figura 2. Cepa "F" en agar cetrimida, bajo luz UV, caracterizada como *Pseudomonas viridiflava*

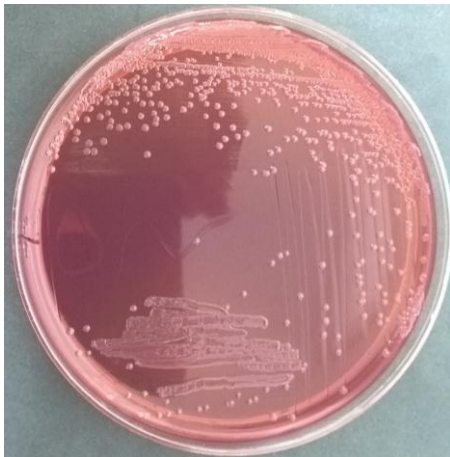


Figura 3. Cepa "N" en agar MacConkey, caracterizada como *Pseudomonas fluorescens*.

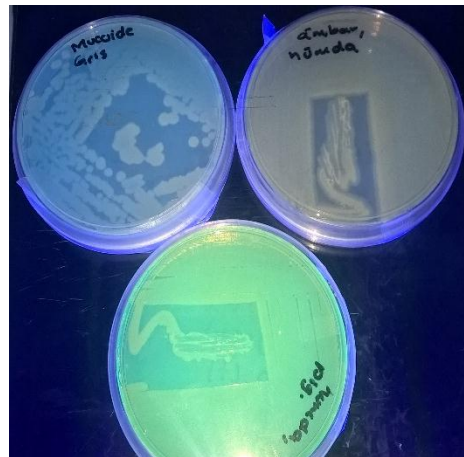


Figura 4. Cepas "A" (*Pseudomonas putida*), "B" (*Pseudomonas corrugata*) y "C" (*Pseudomonas putida*), en *Pseudomonas* Agar F, bajo luz UV.



Figura 5. Cepa "N", caracterizada como *Pseudomonas fluorescens*, en medio EMB.



Figura 6. Cepa "N", en agar *Salmonella-Shigella*, caracterizada como *Pseudomonas fluorescens*.

Cuadro 22. Comparación entre los sistemas manuales de identificación convencionales, pruebas bioquímicas tradicionales y técnicas moleculares (se reporta % de identificación)

CEPA	Pruebas bioquímicas tradicionales			API®20NE	PCR
	Microorganismo identificado	K (coeficiente kappa)	S _{SM} (Coeficiente de asociación múltiple)		
1A	<i>Pseudomonas putida</i>	0.42 (moderada)	71.42%	<i>Pseudomonas putida</i> (91.00%)	No se realizó
1B	<i>Pseudomonas corrugata</i>	0.69(Considerable)	85.71%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99.90%)	<i>Pseudomonas corrugata</i> (99.90%)
1C	<i>Pseudomonas putida</i>	0.71 (Considerable)	85.71%	<i>Pseudomonas putida</i> (86.00%)	<i>Pseudomonas putida</i> (98.20%)
2F	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	0.5 (Moderada)	85.71%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (95.80%)	<i>Pseudomonas viridiflava</i> (98.85%)
2G	<i>Pseudomonas putida</i>	0.57 (Moderada)	78.57%	<i>Pseudomonas putida</i> (99.50%)	<i>Pseudomonas putida</i> (98.92%)
3N	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.65 (Considerable)	85.71%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99.90%)	No se realizó
1Ñ	<i>Pseudomonas putida</i>	0.42 (Moderada)	71.42%	<i>Pseudomonas putida</i> (99.50%)	<i>Pseudomonas putida</i> (98.79%)
1O	<i>Pseudomonas putida</i>	0.28 (Aceptable)	64.28%	<i>Pseudomonas putida</i> (91.00%)	No se realizó
2P	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.65 (Considerable)	85.71%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99.90%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (98.41%)
1R	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.68 (Considerable)	85.71%	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (77.00%)	No se realizó

La letra identifica a la cepa y el número se refiere a los números se aislamientos.

Cuadro 23. Valoración del coeficiente kappa (Landis y Koch, 1977)

Coeficiente kappa	Fuerza de concordancia
0.00	Pobre (Poor)
0.01-0.20	Leve (Slight)
0.21-0.40	Aceptable (Fair)
0.41-0.60	Moderada (Moderate)
0.61-0.80	Considerable (Substantial)
0.81-1.00	Casi perfecta (Almost perfect)

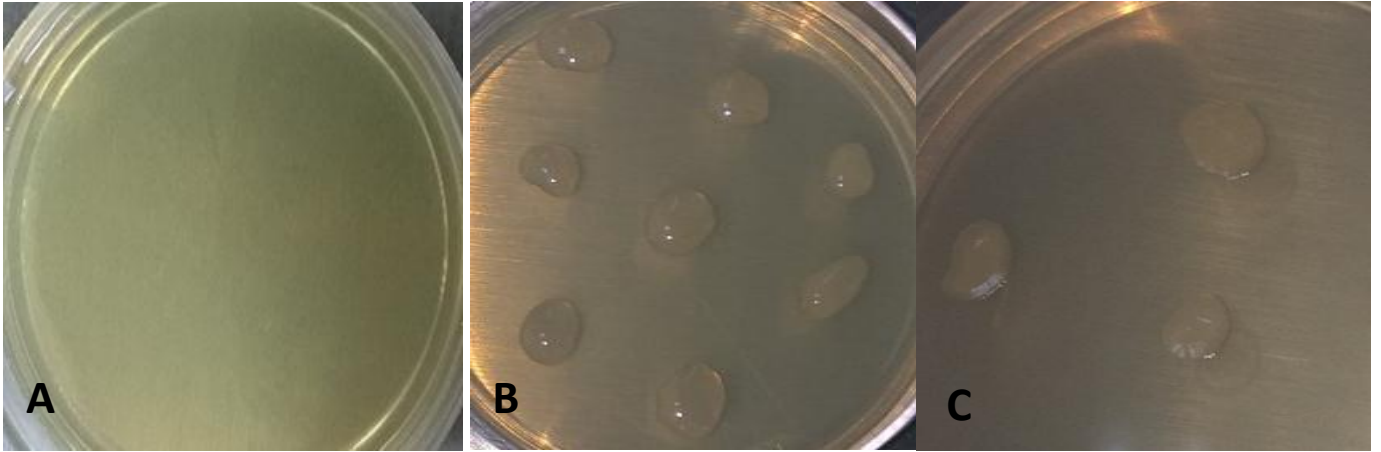


Figura 7. Prueba de Levana. A) Medio sin inocular, B) prueba positiva y C) prueba negativa.

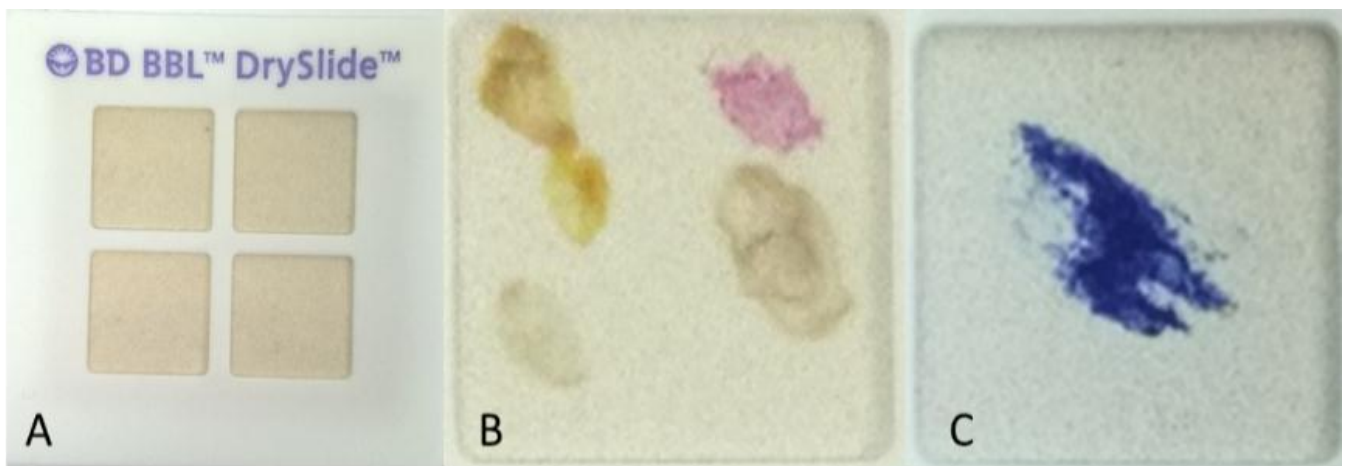


Figura 8. Prueba de oxidasa. Sistema BD BBL™ DrySlide™. A) Sin inocular; portaobjetos que se divide en cuatro segmentos, B) resultados negativos (amarillo, rosa, gris, etc.) y C) resultado positivo (azul).

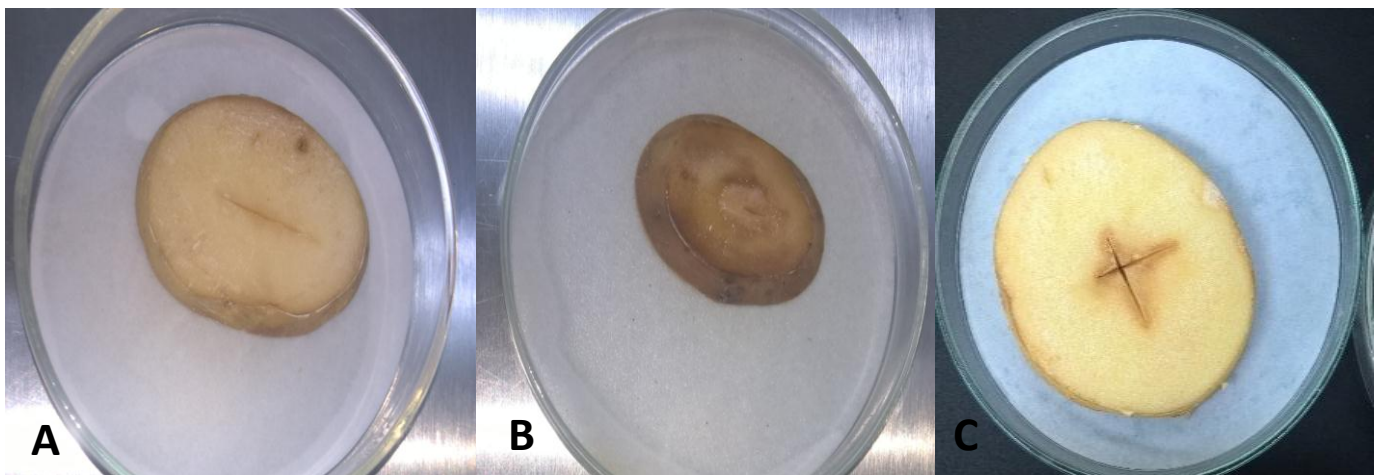


Figura 9. Prueba de pudrición en papa. A) Sin inocular, B) prueba positiva y C) prueba negativa.

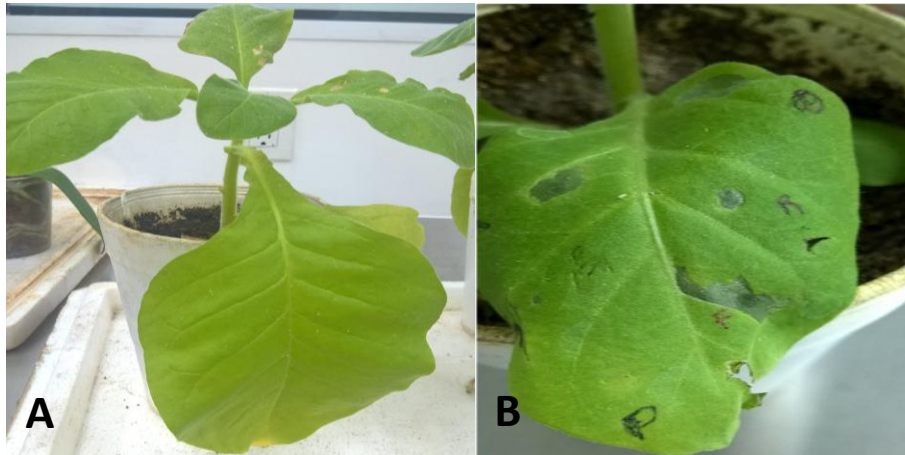


Figura 10. Prueba de hipersensibilidad en Tabaco. A) Tabaco sin inocular y B) reacciones de hipersensibilidad positivas.

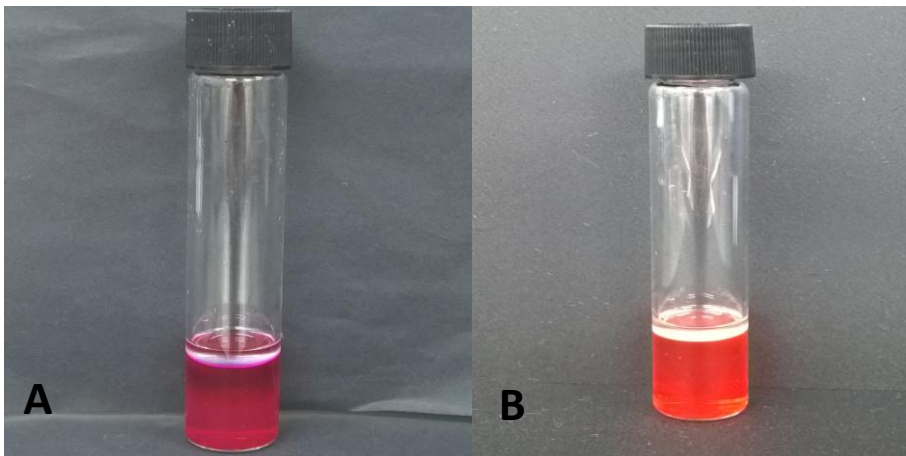


Figura 11. Prueba de Arginina dihidrolasa. A) Prueba positiva (+) y B) prueba negativa (-)

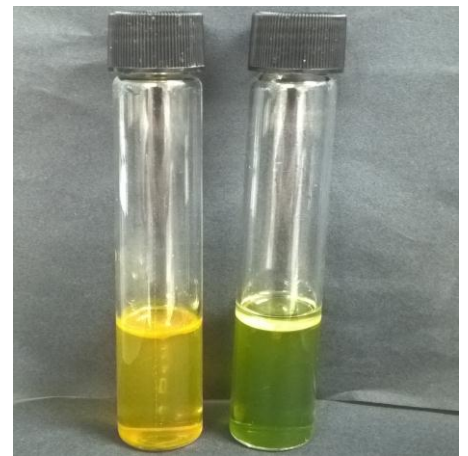


Figura 12. Prueba de O/F. en *Pseudomonas* spp. presentan vía oxidativa.

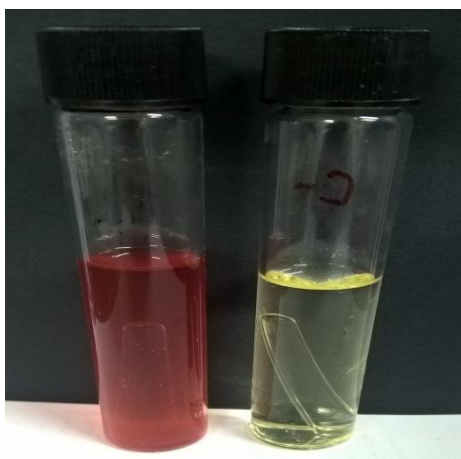


Figura 13. Prueba de nitratos negativa

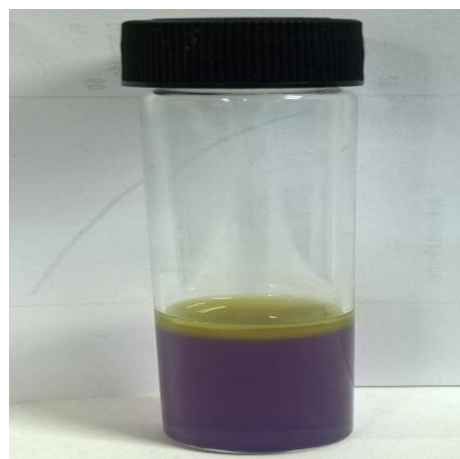


Figura 14. Prueba de indol negativa

Cuadro 24. Resultados en los sistemas multipuebas

CEPA	API® ID 32 E™	API® 20 NE™	API® 20E™
1B	<i>Burkholderia cepacia</i> (28.00%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99.90%)	<i>Bodetella/Alcaligenes</i> (39.30%)
1C	<i>Pseudomonas putida</i> (67.00%)	<i>Pseudomonas putida</i> (86.00%)	<i>Bodetella/Alcaligenes</i> (39.30%)
2F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (perfil dudoso)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (95.80%)	<i>Bodetella/Alcaligenes</i> (39.30%)
2G	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (42.50%)	<i>Pseudomonas putida</i> (99.50%)	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> (66.40%)
3N	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (37.30%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99.90%)	No fermentadora spp (perfil inaceptable)
1Ñ	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (47.70%)	<i>Pseudomonas putida</i> (99.50%)	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> (80.70%)
1O	No identificado	<i>Pseudomonas putida</i> (91.00%)	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> (66.40%)
1R	No identificado	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (77.00%)	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> (66.40%)

La letra identifica a la cepa y el número se refiere a los números se aislamientos.

RESULTADOS DE IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE ALGUNAS CEPAS MEDIANTE SISTEMA MULTIPRUEBAS

a) Api ®20 NE



Figura 15. Sistema multipuebas Api ®20 NE, corresponde a la cepa "P", caracterizada como *Pseudomonas fluorescens*.

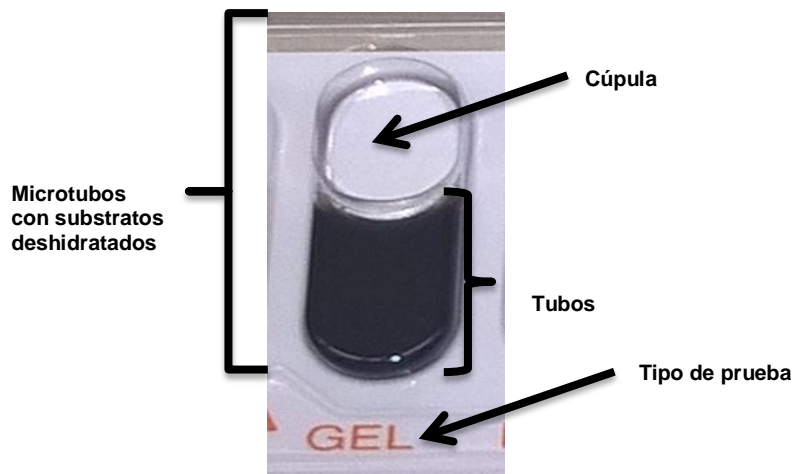


Figura 16. Partes que componen a los microtubos con sustratos deshidratados, corresponde a la cepa "P", caracterizada como *Pseudomonas fluorescens* y es positiva a la prueba de licuefacción de gelatina.

b) Api® 20 E

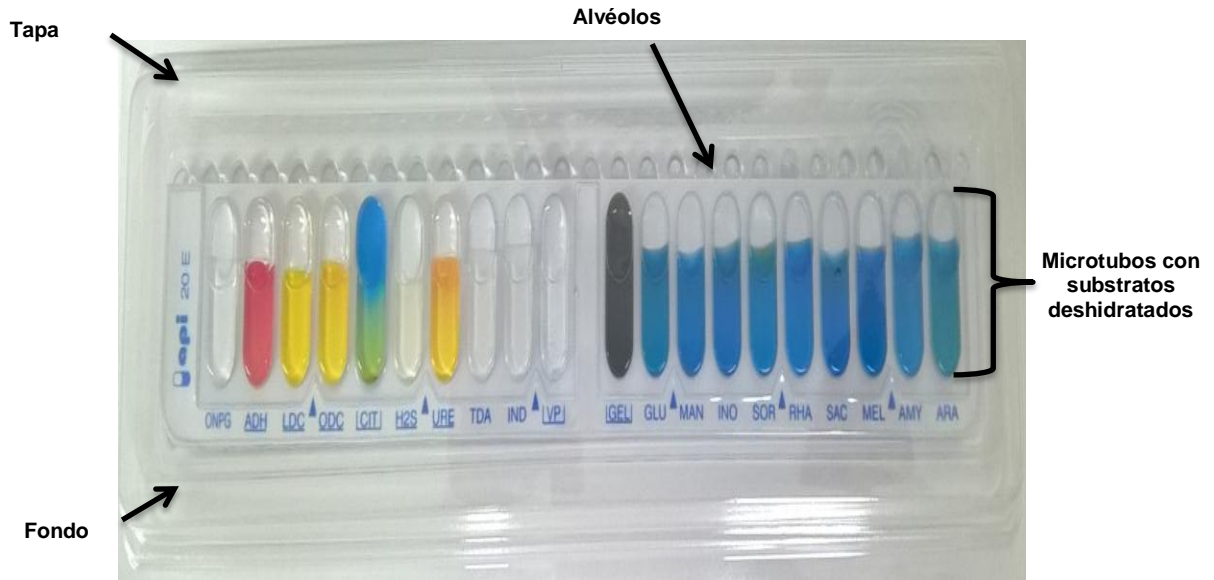


Figura 17. Sistema multipuebas Api® 20 NE, corresponde a la cepa "N", caracterizada como *Pseudomonas fluorescens*.

c) Api® ID 32E



Figura 18. Sistema multipuebas Api® ID 32E, corresponde a la cepa "N", caracterizada como *Pseudomonas fluorescens*.

Discusión de resultados

De las 11 cepas bacterianas que se caracterizaron, una se identificó como *Staphylococcus epidermidis*, y las 10 restantes pertenecen al género *Pseudomonas*, a las especies *putida*, *corrugata*, *viridiflava* y *fluorescens*.

En cuanto a lo reportado en la morfología colonial en los medios de cultivos se observó la producción del pigmento fluorescente bajo luz UV característico de este género y a simple vista el aspecto de sus colonias algunas mucoides y otras secas y de color amarillo o gris.

Se obtuvo un mejor aislamiento en el medio de cultivo agar cetrimida que en el medio *Pseudomonas* Agar F, esto se debe a los componentes que poseen cada uno, y principalmente la cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio) es un compuesto de amonio cuaternario que inhibe una amplia variedad de otros organismos, es por eso que se obtienen mejores aislamientos de *Pseudomonas* en este medio, sin embargo algunas son inhibidas como en el caso de *Pseudomonas corrugata*; en cuanto a la formación de pigmentos para ambos resultan medios adecuados para este fin.

En el caso de la cepa F según lo reportado, las colonias de *Pseudomonas fluorescens* sobre agar y sus propiedades bioquímicas son similares a las de *P. aeruginosa*, pero produce solamente un pigmento (fluoresceína).²⁹

Su crecimiento en medios de cultivos diferenciales y selectivos fue favorable, ya que son medios para bacterias Gram negativas y sus componentes promueven el crecimiento y desarrollo de las colonias de *Pseudomonas*.

El paso siguiente al aislamiento de una determinada cepa, es su identificación; para ello deben realizarse las pruebas bioquímicas. Son cualquier reacción que pone en evidencia la presencia o ausencia de una enzima, vía metabólica o alguna otra propiedad característica de una especie, que la identifica como tal.²²

En este caso se realizaron pruebas como las LOPAT y pruebas complementarias que permitieron caracterizar las cepas presuntivas y con los datos obtenidos, calcular el índice kappa (k), el cual determina la concordancia que existe entre los resultados experimentales y teóricos, en el caso de la cepa

O su valor es muy pequeño a diferencia de las demás, sin embargo, es aceptable.

De igual forma se determinó el coeficiente de asociación múltiple (S_{SM}) este mide las coincidencias y diferencias en los estados de caracteres entre dos o más OTU (unidades taxonómicas operacionales), en este caso frente a las pruebas bioquímicas teóricas y experimentales, los resultados obtenidos se consideran aceptables, el porcentaje se puede deber al tipo de cepa y las modificaciones genéticas que han sufrido.

Los índices que se calcularon mediante la comparación de lo reportado teórico con lo experimental, se consideran aceptables y aunque en algunos casos el porcentaje de identificación no es tan cercano entre los sistemas de identificación utilizados, los índices permiten determinar las similitudes para identificación y caracterización de cepas y son útiles cuando no se cuenta con técnicas moleculares, debido a su alto costo en cuanto a equipos y reactivos.

Para realizar la comparación de los tres sistemas comerciales que permiten identificar al género *Pseudomonas*, se prepararon las soluciones bacterianas de las cepas: B, C, F, G, N, Ñ, O y R, como se puede observar en el cuadro 25, el mejor sistema es API® 20 NE™, ya que el porcentaje de identificación es aceptable, mientras que en los otros sistemas es un poco bajo o en ocasiones no se identifica el microorganismo, alguna de las razones por las que no se identifica el género puede deberse al tipo de pruebas, ya que están diseñadas para analizar Enterobacterias y bacterias de importancia humana.

Sin embargo, para realizar técnicas moleculares se debe conocer el fundamento, manejo y condiciones del equipo y reactivos, así como la habilidad práctica.

Para confirmar el género y especie de algunas cepas se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el fragmento de DNA amplificado que se obtuvo, se observó por electroforesis y se envió a secuenciar.

A las cepas que no se les realizó PCR y secuenciación, dieron resultados similares tanto por métodos tradicionales como son las pruebas bioquímicas y el sistema comercial API® 20 NE™, se identificó al mismo microorganismo.

Conclusiones

Mediante el uso de índices como es kappa y el de asociación múltiple, se concluye que es posible determinar la similitud que existe entre los resultados teóricos y experimentales.

En cuanto a la comparación de los sistemas de identificación multipuebas y el que mejores resultados proporciona es el API® 20 NE™, por las necesidades metabólicas que presenta este género.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica complementaria en la identificación de los microorganismos, en este caso permitió diferenciar las cepas cuyos resultados no eran concluyentes por las pruebas bioquímicas.

Los métodos tradicionales continúan siendo importantes y útiles en la caracterización de las bacterias; el uso de sistemas multipuebas comerciales son confiables, pero se debe tener conocimiento previo de las características básicas y requerimientos especiales de cada bacteria analizada, para que se pueda seleccionar un sistema multipuebas, así como los medios de cultivos especiales y pruebas adicionales para realizar la identificación de una bacteria.

Anexos

Anexo 1.1 Medio BD® Pseudomonas Agar F³⁸

Tabla 1. Componentes del medio BD® Pseudomonas Agar F³⁸

Digerido pancreático de caseína	10.0 g
Peptona de proteosa No. 3	10.0 g
Fosfato dipotásico	1.5 g
Sulfato de magnesio	1.5 g
Agar	15.0 g

Fórmula por litro de agua purificada

Modo de preparación.

- Pesar 38.0 g del medio y colocar en un matraz Erlenmeyer y disolver en 1L de agua destilada estéril
- Añadir 10 mL de glicerol, mezclar y colocar el matraz Erlenmeyer en una parrilla de agitación y calentamiento para dejar hervir durante 1 minuto
- Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 .
- Esterilizar en autoclave a 120°C por 15 minutos.
- Una vez que el medio alcanza una temperatura de 45-50°C realizar el vaciado del medio en cajas de Petri estériles hasta que solidifique el medio para su almacenaje.

Anexo 1.2 BD® Pseudosel Agar (Cetrimide Agar)³⁹

Tabla 2. Componentes del medio BD® Pseudosel Agar (Cetrimide Agar)³⁹

Digerido pancreático de gelatina	20.0 g
Cloruro de magnesio	1.4 g
Sulfato de potasio	10.0 g
Glicerol	10.0 mL
Cetrimida	0.3 g
Agar	13.6 g

Fórmula por litro de agua purificada

Modo de preparación.

- Pesar 45.3 g del medio, colocar en un matraz Erlenmeyer y disolver en 1L de agua destilada estéril
- Añadir 10 mL de glicerol, mezclar y colocar en una parrilla de agitación y calentamiento para dejar hervir durante 1 minuto.
- Ajustar el pH a 7.2 ± 0.2 .
- Esterilizar en autoclave a 120°C por 15 minutos.
- Una vez que el medio alcanza una temperatura de $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$ realizar el vaciado del medio en cajas de Petri estériles hasta que solidifique el medio para su almacenaje.

Anexo 1.3 BD® MacConkey II Agar⁴⁰

Tabla 3. Componentes del medio BD® MacConkey II Agar⁴⁰

Digerido pancreático de gelatina	17.0 g
Digerido pancreático de caseína	1.5 g
Digerido péptico de tejido animal	1.5 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro sódico	5.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar	13.5 g

Fórmula por litro de agua purificada

Modo de preparación:

- Pesar 36 g del polvo, colocar en un matraz Erlenmeyer y disolver en 1L de agua destilada estéril.
- Dejar reposar 10 minutos para correcta hidratación del agar.
- Mezclar y colocar en una parrilla de agitación y calentamiento para dejar hervir durante 1 minuto.
- Ajustar el pH a 7.2 ± 0.2 .

- Esterilizar en autoclave a 120°C por 15 minutos,
- Una vez que el medio alcanza una temperatura de 45-50°C se realizó el vaciado del medio en placas de Petri estériles hasta que solidifique el medio para su almacenaje.

Anexo 1.4 BD® *Salmonella Shigella* Agar⁴¹

Tabla 4. Componentes del medio BD® *Salmonella Shigella* Agar⁴¹

Extracto de carne bovina	5.0 g
Digerido pancreático de caseína	2.5 g
Digerido péptico de tejido animal	2.5 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	8.5 g
Citrato sódico	8.5 g
Tiosulfato sódico	8.5 g
Citrato férrico	1,0 g
Rojo neutro	0,025 g
Agar	13,5 g
Verde brillante	0,330 mg

Fórmula por litro de agua purificada.

Modo de preparación.

- Pesar 60 g del medio, colocar en un matraz Erlenmeyer y disolver en 1L de agua destilada estéril
- Mezclar y colocar el matraz en una parrilla de agitación y calentamiento para dejar hervir durante 1 minuto,
- Ajustar el pH a 7.2 ± 0.2 .

- Este medio no se esteriliza, se deja enfriar de 45-50°C y se realiza el vaciado del medio en cajas de Petri hasta que solidifique para su almacenaje.

ANEXO 2.1 Prueba de Levana³¹

Tabla 5. Componentes del medio levana³¹

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	10.0 g
Sacarosa	50.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1000 mL

Fórmula por litro de agua purificada.

Modo de preparación:

- Pesar la cantidad exacta de cada uno de los componentes, esto va a depender del volumen que se desee preparar y colocarse en un matraz Erlenmeyer.
- Calentar para disolver los componentes.
- Esterilizar en autoclave a 120°C por 15 minutos,
- Una vez que el medio alcanza una temperatura de 45-50°C se realizó el vaciado del medio en placas de Petri estériles hasta que solidifique el medio para su almacenaje.

Anexo 2.2 Prueba de oxidasa BD BBL™ DrySlide™ Oxidase⁴²

Procedimiento de análisis:

- Abrir la bolsa que contiene los y tomar el número de portaobjetos que necesita. Después de abrir la bolsa, los portaobjetos BD BBL™ DrySlide™ Oxidase restantes pueden conservarse en la bolsa original hasta 1 semana a temperatura ambiente. Doblar una vez la parte superior de la bolsa y sellar bien con la cinta autoadhesiva

(suministrada). Desechar los portaobjetos sin utilizar 1 semana después de abrir el paquete. No volver a introducir en la bolsa un BD BBL™ DrySlide™ Oxidase que ha sido utilizado por completo o en parte (por contener organismos).

- Utilizar un asa bacteriológica, escoger colonias aisladas o una banda de crecimiento confluyente del cultivo a analizar.
- Extender el organismo directamente sobre la zona de reacción del BD BBL™ DrySlide™ Oxidase. Cada zona de reacción puede acomodar hasta 4 pruebas. Para asegurar que la reacción se produzca correctamente, extender el inóculo en la zona de reacción sobre un círculo de 3–4 mm de diámetro.
- Inspeccionar la zona de reacción para observar la presencia de un color morado oscuro a los 20 segundos. Los cambios de color que aparecen después de los 20 segundos deben descartarse.

Anexo 2.3 Prueba de Arginina dihidrolasa³¹

Tabla 6. Componentes del medio arginina dihidrolasa³¹

Peptona	1.0 g
NaCl	5.0 g
K₂HPO₄	0.3 g
Agar	3.0 g
Rojo de fenol	0.1 g
Agua destilada	1000 mL

Fórmula por litro de agua purificada.

Modo de preparación:

- Realizar los cálculos de acuerdo al volumen que se desea preparar, esto ira en función del número de tubos a preparar, se le adiciona aproximadamente 6 mL a cada tubo.

- Pesar cada uno de los reactivos a excepción del agar y adicionarlos en un matraz Erlenmeyer para disolverlos y agregar el volumen de agua destilada.
- Ajustar el pH a 7.2.
- Agregar el agar y dejar en calentamiento y agitación por 3 minutos.
- Distribuir en tubos de vidrio y esterilizar en autoclave a 120°C por 15 minutos.

Anexo 2.4 Prueba de Hugh Leifson (O/F) ³¹

Tabla 7. Componentes del medio Hugh Leifson (O/F) ³¹

Peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Agar	3.0 g
Azul de bromotimol	0.003 g
Glucosa	10.0 g
Agua destilada	1000 mL

Fórmula por litro de agua purificada.

Modo de preparación:

- Realizar los cálculos de acuerdo al volumen que se desea preparar, esto ira en función del número de tubos a preparar, se adiciona aproximadamente 6 mL a cada tubo.
- Pesar cada uno de los reactivos a excepción del agar y adicionar en un matraz Erlenmeyer para disolverlos y adicionar el volumen de agua destilada.
- Ajustar el pH a 7.1.
- Agregar el agar y dejar en calentamiento y agitación por 3 minutos.
- Distribuir en tubos de vidrio y esterilizar en autoclave a 120°C por 15 minutos.

Anexo 2.5 Prueba de nitratos³¹

Tabla 8. Componentes del medio Prueba de nitratos³¹

Extracto de carne	5.0 g
Peptona	3.0 g
Nitrato de potasio	1.0 g
Agua destilada	1000 mL

Fórmula por litro de agua purificada.

Modo de preparación:

1. Realizar los cálculos de acuerdo al volumen que se desea preparar, esto ira en función del número de tubos a preparar, se le adiciona aproximadamente 6 mL a cada tubo.
2. Pesar cada uno de los reactivos y adicionarlos en un matraz Erlenmeyer para disolverlos y agregar el volumen de agua destilada.
3. Ajustar el pH a 7.1.
4. Agregar el agar y dejar en calentamiento y agitación por 3 minutos.
5. Se distribuye en tubos de vidrio, colocar una campana de Durham y esterilizar en autoclave a 120°C por 15 minutos.

Anexo 2.6 Pruebas de patogenicidad

Anexo 2.6.1 Prueba de pudrición en papa

Preparación del material para inoculación³¹

- Tomar una papa y lavar con solución de cloro al 1% durante 5 minutos.
- Secar y desinfectar superficialmente con etanol al 70% seguido con un flameado (evite adicionar mucho etanol porque al quemarse podrá dañar las capas externas de tubérculo y se correrá el riesgo de contaminación por bacterias esporuladas como *Bacillus* spp.

- Colocar la papa en una tapa de caja estéril y cortar en rebanadas de aproximadamente 5mm de grosor.
- Colocar cada rebanada en una caja petri con papel filtro (previamente esterilizado).
- Adicionar de 2-3 mL de agua estéril a la caja Petri con papel filtro, solo para humedecer el papel, esto con la finalidad de crear un ambiente húmedo.
- A cada una de las rebanadas se les hace una incisión superficial y colocar una asada de la bacteria.

Anexo 2.6.2 Reacción de hipersensibilidad en tabaco³¹

Procedimiento:

- Preparación de la suspensión.
- Sembrar por estría cruzada la cepa a la que se le quiere realizar la prueba, esto con la finalidad de observar la morfología colonial.
- Se toma una colonia diferenciada y aislada y se siembra por estría abierta.
- En un tubo que contenga aproximadamente 700 µl agua destilada estéril, se le coloca una asada de la cepa, proveniente de un cultivo puro.
- Se coloca en agitación aproximadamente 5 min.
- Con ayuda de una jeringa esterilizada sin aguja se toma una pequeña muestra de la suspensión bacteriana, se infiltra a los espacios intercelulares de una hoja de tabaco (*Nicotiana tabacum*) ya sea a través de la nervadura central o de lámina foliar.
- Las plantas tratadas se mantienen a temperatura ambiente (20-30°C) y se observan los cambios después de 24 hrs.

Anexo 3.1 Uso de los sistemas multipuebas Api ®20 NE

- I. Para la preparación de la suspensión bacteriana, tomar una asada del cultivo puro y colocarla en una ampolleta Api® NaCl al 0.85% con volumen de 5 ml y ajustar a 0.5 en escala de McFarland
- II. Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y colocar agua destilada o desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles a liberar gases ((Cl₂, CO₂...)) en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.
- III. Tomar una galería de su envase original y rellenar los tubos (y no las cúpulas) de los ensayos desde NO₃ al PNPG con la suspensión bacteriana utilizando una micropipeta, para evitar la formación de burbujas en el fondo de los microtubos, se coloca la punta de la micropipeta sobre el lateral de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia adelante.
- IV. Abrir una ampolla API® AUX Medium y se adicionan 200 µL de la suspensión bacteriana, homogenizar con la punta de la micropipeta evitando la formación de burbujas.
- V. Rellenar los microtubos de las siguientes pruebas: de GLU al PAC.
- VI. Sellar con aceite de parafina las siguientes pruebas: GLU, ADH, URE.
- VII. Cerrar la cámara de incubación e incubar a 29°C±2°C durante 24-48 hrs.

INTERPRETACIÓN

Realizar las lecturas, una lectura a las 24 hrs y otra a las 48 hrs.

Para reportar los resultados serán de la siguiente manera: positivo (+) o negativo (-), mediante la comparación de colores, primero con la tabla que se encuentra en la ficha técnica y después con la tabla de comparación de colores.

Las siguientes pruebas requieren de la adición de reactivos:

- Ensayo NO₃ nitratos.
- Ensayo TRP (L-triptófano).

Anexo 3.2 Uso de los sistemas multipruebas Api ®20 E

PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

- Prueba de O/F
 - Prueba de oxidasa
 - Siembra en agar Mac Conkey
- I. Para la preparación de la suspensión bacteriana, tomar una ampolleta Api® NaCl al 0.85% con volumen de 3 ml, y adicionar una colonia bien aislada proveniente del cultivo puro y homogenizarla.
 - II. Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y colocar agua destilada o desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles a liberar gases (Cl₂, CO₂...)) en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.
 - III. Tomar una galería de su envase original y rellenar los tubos (y no las cúpulas) con la suspensión bacteriana utilizando una micropipeta, para evitar la formación de burbujas en el fondo de los microtubos, se coloca la punta de la micropipeta sobre el lateral de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia adelante, a excepción de las pruebas CIT, VP y GEL, llenar el tubo y la cúpula y para las pruebas: ADH, LDC, ODC, H₂S, URE crear una atmosfera anaerobia llenando la cúpula con aceite de parafina.
 - IV. Cerrar la cámara de incubación e incubar a 36°C+/- 2°C durante 18-24 hrs.

INTERPRETACIÓN

Para reportar los resultados serán de la siguiente manera: positivo (+) o negativo (-), mediante la comparación de colores, primero con la tabla que se encuentra en la ficha técnica y después con la tabla de comparación de colores.

Revelar los ensayos que necesitan la adición de reactivos:

- Prueba de TDA.
- Prueba VP.
- Prueba de nitratos

Anexo 3.3 Uso de los sistemas multipruebas Api® ID 32E

Se pueden utilizar los medios nutritivos habitualmente empleados en el laboratorio para seleccionar las colonias:

- Mac Conkey + cristal violeta
 - Agar tripticaseína (TSA)
 - Hektoen
 - XLD
 - Desoxicolato-citrato de sodio-Lactosa-Sacarosa (DCLS)
 - Eosina-Azul de Metileno (EMB)
- I. Para la preparación de la suspensión bacteriana, tomar una ampolleta de Api® NaCl al 0.85% con volumen de 3 ml, y colocar 1 o varias colonias idénticas, preferentemente de cultivos jóvenes (de 18-24 hrs) una colonia bien aislada proveniente del cultivo puro, homogenizarla y ajustar a 0.5 en escala de McFarland
 - II. Inocular la galería distribuyendo 55µl de suspensión por cada cúpula, cubrir los ensayos ODC, ADH, LDC, URE, LARL, GAT, 5KG con 2 gotas de aceite de inmersión (cúpulas 1.0, etc.)
 - III. Incubar a 36°C-+2C durante 24 hrs (+-2 horas) en anaerobiosis.

INTERPRETACIÓN

Para reportar los resultados serán de la siguiente manera: positivo (+) o negativo (-), mediante la comparación de colores, primero con la tabla que se encuentra en la ficha técnica y después con la tabla de comparación de colores.

Revelar los ensayos que necesitan la adición de reactivos:

- Revelar la reacción IND (indol).

REFERENCIAS

- 1) García Rodríguez J.A. y Picazo J.J. Compendio de Microbiología Médica. 1ª edición. España: Editorial Hartcourt; 2000.
- 2) Janse J. Phytobacteriology. Principles and practice. 1ª edición. Estados Unidos de América: CABI publishing; 2005.
- 3) Hernández Urzúa M.A. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud. 1ª edición. México: Editorial Médica Panamericana; 2016.
- 4) Gnanamanickman S.S. Plant-associated bacteria. 1a edición. Holanda, Dordrecht: editorial Springer; 2007.
- 5) Koneman E.W., Allen S. D., Janda W. M., et al. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas a color. 5ª edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2003.
- 6) Ryan K. J. y Ray G. C. Sherris microbiología médica. 6ª edición. México: Mc Graw Hill; 2017.
- 7) Murray P. R., Drew L. W., Kobayashi G. S. y Thompson J. H. Microbiología Médica. 1ª edición. España: Mosby-Year Book; 1992.
- 8) Prats G. Microbiología Clínica. 1ª edición. Buenos Aires; Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2005.
- 9) Pelczar M. J., Reid R. D. y Chan E.C.S. Microbiología. 2ª edición. México: Mc Graw Hill; 1982.
- 10) Forbes B. A., Sahm F. D., Weissfeld S. A. y Treviño A. E. Bailey & Scott.; diagnóstico microbiológico. 11ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2004.
- 11) Ford M. Medical Microbiology. 2ª edición. Gran Bretaña: editorial Oxford, 2014.
- 12) Granados Pérez R. y Villaverde Peris M.C. Microbiología. Tomo 1.
- 13) Atlas M.R. y Bartha Richard. Microbial Ecology. Fundamentals and applications. 3ª edición. Estados Unidos de América: editorial The Benjamin/Cummings publishing company, INC.; 1946.
- 14) Walker S. T. y Aguilar Ortega M.T. Microbiología. 1ª edición. México: Mc Graw Hill- Interamericana; 2000.
- 15) Schlegel H.G. y Lalucat J. Microbiología general. 1ª edición. España: Ediciones Omega; 1997.
- 16) Kumar Sharma D. Microbiology. 1ª edición. India: editorial Alpha Science International Ltd.; 2013.
- 17) Harvey R.A., Champe C.P. y Fisher D.B. Lippincott´s Illustrated Reviews: Microbiología. 2ª edición. China: Editorial Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
- 18) Brooks F.G., Carroll C.K, Butel S. J., et al. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25ª edición. China: Mc Graw Hill; 2010.
- 19) Tortora J. G., Funke R. B. y Case L.C. Introducción a la microbiología. 12ª edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2017.

- 20) García Martos P., Fernández del Barrio M.T. y Paredes Salido F. Microbiología Clínica Aplicada. 1ª edición. España: Ediciones Díaz de Santos, S.A.; 1997.
- 21) Romero C. R. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª edición. México: Editorial Médica panamericana; 2007.
- 22) Vullo D. L., Wachsmann M.B. y Alche L.E. Microbiología en práctica. Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de microbiología básica y aplicada. 1ª edición. Buenos Aires: Editorial Atlante Argentina S.R.L.; 2000.
- 23) Pommerville J. C. Fundamentals of microbiology. 11ª edición. Estados Unidos de América: Editorial Jones & Bartlett learning; 2018.
- 24) Leboffe M. J. Microbiology. Laboratory Theory & Application. 4ª edición. Estados Unidos de América: Editorial Morton Publishing; 2015.
- 25) Kado C. I. Plant bacteriology. 1ª edición. Estados Unidos de América: Editorial The American Phytopathological Society; 2010.
- 26) Benson H.J. Microbiological application. Laboratory manual in general microbiology. 8a edición. Estados Unidos de América: Editorial Mc Graw Hill; 2002.
- 27) Black J. G. Microbiology. Principles and application. 3ª edición. Estados Unidos de América: Editorial Prentice-Hall; 1996.
- 28) Schaad N.W. y Jones B. Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria. 3a edición. Estados Unidos de América: The American Phytopathological Society (APS PRESS); 2001.
- 29) Collins C.H. y Lyne M.P. Métodos microbiológicos. 1ª edición. España: Editorial acribia, S.A.; 1989.
- 30) MacFaddin J.F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición. Buenos Aires: editorial Médica Panamericana; 2004.
- 31) Rodríguez M.M.L. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Autónoma Chapingo, México; 2006.
- 32) Mérida de la Torre F. J., Moreno Campoy E. Manual para técnico superior de laboratorio clínico y biomédico. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. España; 2015.
- 33) Agrios G.N. Fitopatología. 2ª edición. Distrito Federal, México: editorial Limusa; 2011
- 34) Seminis. Cómo afectan las enfermedades bacterianas a tus cultivos. [Internet], 2017, [revisado; 06/12/2017, consultado 7 Feb 2020]. Disponible en: <https://bit.ly/3aHDpB4>.
- 35) Olmo Axayacatl. Algunos de los efectos benéficos de *Pseudomonas* en las plantas. 2018, [revisado; 30/01/2018, consultado 7 Feb 2020]. Disponible en: <https://bit.ly/2TG3EIR>.
- 36) Microbiología671. Prueba de la potasa. 2018, [revisado; 01/03/2018, consultado 20 Ene 2020]. Disponible en: <https://bit.ly/2Q7GnXU>.
- 37) Secretaría de salud. Norma Oficial Mexicana. NOM-087-ECOL-1995, Que establece los requisitos para la separación, envasado,

- almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica. Diario Oficial de la Federación, México, 7 de noviembre de 1995.
- 38) BD. BD *Pseudomonas* Agar F. Información.
 - 39) BD. BD Pseudosele Agar (Cetrimide Agar). [Internet], 2013, [revisado; abril 2013, consultado 10 Ago 2019]. Disponible en: <https://bit.ly/2xzdWLY>.
 - 40) BD. BD MacConkey II Agar. [Internet], 2014, [revisado; julio 2014, consultado 10 Ago 2019]. Disponible en: <https://bit.ly/2TNtnc1>.
 - 41) BD. BD *Salmonella Shigella* Agar. [Internet], 2013, [revisado; abril 2013, consultado 10 Ago 2019]. Disponible en: <https://bit.ly/2QcXzex>.
 - 42) BD. Package Insert, BD BBL DrySlide Oxidase. [Internet], 2018, [revisado; octubre 2018, consultado 8 Feb 2020]. <https://bit.ly/33cemDE>.
 - 43) Cerda L. J. y Villarroel del P. L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. Rev. Chil. Pediatr. [Internet] 2008 [consultado 26 Ene 2020]; 79 (1): 54-58. Disponible en: <https://bit.ly/2UeWEeT>.
 - 44) Crisci V. J. y López A. M. F. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. [Internet] January 1983
 - 45) M. Dimartino, S. Panebianco, A. Vitale, I. Castello, C. Leonardi, G. Cirvilleri and G., et al. Occurrence and pathogenicity of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* on tomato plants in Italy. J. Plant Pathol. [internet] 2011 [consultado 19 agosto 2019]; 93 (1):79-87 Disponible en: <https://bit.ly/2W8gevL>.
 - 46) Young M., Gardan L., Ren X. Z. y Hu F. P. Genomic and phenotypic characterization of the bacterium causing blight of kiwifruit in New Zealand. Plant Pathol. [internet] 1997 [consultado 19 agosto 2019]; 46 (1): 857–864 Disponible en: <https://bit.ly/38NSPIS>.
 - 47) Catara V. Pathogen profile *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource?. Mol. Plant Pathol. [internet] 2007 [consultado 19 agosto 2019]; 8(3):233–244 Disponible en: <https://bit.ly/2IN0Kp7>.
 - 48) Wilkie J.P., Dye D.W. y Watson D.R.W. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. N. Z. J. Agric. Res. [internet] 1973 [consultado 19 agosto 2019]; 16(3):315-323. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/00288233.1973.10421110>.
 - 49) González A. J. y Rodicio M.R. Caída de botón floral en kiwi causada por *Pseudomonas viridiflava* y *Pseudomonas syringae* en el Principado de Asturias. Bol. San. Veg. Plagas. [internet] 2007 [consultado 19 agosto 2019]; 33 (1): 517-525. Disponible en: <https://bit.ly/2IHZCb5>.
 - 50) González A. J., Rodicio M.R. y Mendoza M. C. Identification of an Emergent and Atypical *Pseudomonas viridiflava* Lineage Causing Bacteriosis in Plants of Agronomic Importance in a Spanish Region. Appl. Environ. Microbiol. [internet] 2003 [consultado 15 agosto 2019]; 69 (1): 2936–2941. Disponible en: [https:// DOI: 10.1128/AEM.69.5.2936–2941.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2936-2941.2003).

- 51) El-Hendawy. H.H. Association of pectolytic fluorescent pseudomonads with postharvest rots of onion. *Phytopathol. Mediterr.* [internet] 2004 [consultado 15 agosto 2019]; 43 (1): 369–376. Disponible en: <https://bit.ly/2Qh9KqK>.
- 52) Instructivo de uso de las tiras Api®20 NE™ Biomeriux®.
- 53) Instructivo de uso de las tiras Api® ID 32E™ Biomeriux®.
- 54) Instructivo de uso de las tiras Api®™ Api®20 E Biomeriux®.