# IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

EMIRA GARCÉS DE GRANADA
BERTHA COBA DE GUTIÉRREZ
NANCY ISABEL CASTILLO O.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

# IDENTIFICACION DE BACTERIAS FITOPATOGENAS

autores

EMIRA GARCÉS DE GRANADA
Bióloga Ms. Fitopatología
Universidad Nacional de Colombia
Sede Bogotá

BERTHA COBA DE GUTIERREZ
Bacterióloga
Universidad Nacional de Colombia
Sede Bogotá

NANCY ISABEL CASTILLO O.
Bióloga
Universidad Nacional de Colombia
Sede Bogotá

NOVIEMBRE 1.996

© IDENTIFICACIÓN
DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS
Emira Garcés de Granada
Bertha Coba de Gutiérrez
Nancy Isabel Castillo O.
Primera Edición, 1997

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Decano: Enrique Forero G.
Vicedecano Académico: Mauricio García C.
Vicedecano Bienestar: Emira Garcés
Secretario Académico: Gregorio Portillo B.
Subsecretario Académico: Emiliano Barreto
Asistente Administrativo: Arturo Garzón

ISBN: 958-628-128-0

Diseño de Carátula: Jorge Bayona C.

Impreso por
Imprenta Universidad Nacional
Santafé de Bogotá, D.C., Colombia

# INDICE

**PRESENTACIÓN**

**INTRODUCCION.**

**1. ALGUNAS CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES DE LA MORFOLOGÍA BACTERIAL.**
1.1. Forma y disposición de las células bacteriales.
1.2. Tamaño de las células bacteriales.
1.3. La pared celular bacteriana.
Bibliografía.

**2. LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS.**
2.1. Identificación preliminar de bacterias fitopatógenas.
2.2. Aislamientos con medios diferenciales comunes.
2.3. Actividad enzimática.
**2.4. PRÁCTICA No. 1:** Aislamiento de bacterias fitopatógenas.
2.4.1. Objetivo.
2.4.2. Aislamiento de bacterias fitopatógenas a partir de material vegetal.
Bibliografía.

**3. LOS COLORANTES EN LAS TINCIONES BACTERIALES.**
3.1. La tinción de Gram.
3.2. **PRÁCTICA No. 2:** Análisis preliminares para la identificación de bacterias fitopatógenas.
3.2.1. Objetivo.
3.2.2. Procedimiento para la tinción de Gram.
3.2.3. Determinación de esporas.
3.2.4. Coloración de flagelos.
a. Coloración de Ryu.
b. Coloración de Bayle.
Bibliografía.

**4. GÉNERO *Agrobacterium*.**
4.1. **PRÁCTICA No. 3:** Aislamiento y determinación de *Agrobacterium sp.*

4.1.1. Objetivo.
4.1.2. Aislamiento a partir de material vegetal.
4.1.3. Aislamiento a partir de suelo.
4.1.4. Coloración de Gram, determinación de esporas y flagelos.
4.1.5. Prueba de oxidasa.
4.1.6. Prueba de catalasa.
4.1.7. Producción de ureasa.
4.1.8. Utilización del citrato.
4.1.9. Ensayo de patogenicidad.
Bibliografía.

5. GÉNERO *Erwinia.*
5.1. **PRÁCTICA No. 4:** Aislamiento y determinación de ***Erwinia sp.***
5.1.1. Objetivo.
5.1.2. Aislamiento a partir de material vegetal.
5.1.3. Coloración de Gram, determinación de esporas y flagelos.
5.1.4. Pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa.
5.1.5. Prueba de anaerobiosis.
5.2. **TIZONES Y MARCHITAMIENTOS.**
5.2.1. Acidificación de carbohidratos.
5.2.2. Fermentación de azúcares y producción de $H_2S$.
5.2.3. Reacción de hipersensibilidad.
5.2.4. Ensayo de patogenicidad para ***Erwinia amylovora.***
5.3. **PUDRICIONES BLANDAS.**
5.3.1. Medio selectivo CVP (cristal violeta - pectato, modificado).
5.3.2. Ensayo de diagnóstico: Producción de ácido a partir de compuestos orgánicos.
5.3.3. Pudrición blanda en tubérculos de papa.
Bibliografía.

6. GÉNERO *Pseudomonas.*
6.1. **PRACTICA No. 5:** Aislamiento y determinación de ***Pseudomonas sp.***
6.1.1. Objetivo.
6.1.2. Tinción de Gram, determinación de esporas y flagelos.
6.1.3. Pruebas de oxidasa y catalasa.
6.1.4. Prueba de anaerobiosis.
6.1.5. Crecimiento en medio ácido.
6.1.6. Desarrollo a 42°C.
6.1.7. Fluorescencia sobre medio KB (King et al. Medio B).
6.1.8. Licuefacción de gelatina.

6.2. MEDIOS SELECTIVOS.
6.2.1. CVP (cristal violeta - pectato modificado).
6.2.2. KBBC (Moham; Schaad).
6.3. ENSAYO DE DIAGNOSTICO: Acumulación de poly-B-hidroxibutirato.
Bibliografía.

7. GÉNERO *Xanthomonas.*
7.1. **PRÁCTICA No. 6:** Aislamiento y determinación de *Xanthomonas sp.*
7.1.1. Objetivo.
7.1.2. Medios para el aislamiento de *Xanthomonas sp.*
7.1.3. Tinción de Gram, determinación de esporas y flagelos.
7.1.4. Pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa.
7.1.5. Prueba de anaerobiosis.
7.1.6. Medio GYCA ( agar - glucosa - Carbonato de calcio )
7.1.7. Hidrólisis de proteínas.
Bibliografía.

8. BACTERIAS FITOPATÓGENAS CORYNEFORMES.
8.1. Género *Corynebacterium.*
8.2. Género *Arthobacter.*
8.3. Género *Clavibacter.*
8.4. Género *Rhodococcus.*
Bibliografía.

9. OTRAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS.
9.1. Género *Bacillus.*
9.1.1. Aislamiento de *Bacillus.*
a) Medio Mundt y Hinke.
b) Medio CAG ( caseína - agar plus- glucosa )
9.2. Género *Clostridium.*
9.3. *Xyllela fastidiosa.*
9.4. Género *Streptomyces.*
9.4.1. Aislamiento de *Streptomyces scabies.*
Bibliografía.

## ANEXOS

**ANEXO No. 1:** Medios comunes para el aislamiento de diferentes bacterias fitopatógenas.

**ANEXO No. 2:** Preparación de soluciones para realizar la coloración de Gram.

**ANEXO No. 3:** Medios selectivos para los diferentes biovares de *Agrobacterium sp.*

**ANEXO No. 4:** Medio CVP (cristal violeta- pectato modificado).

**ANEXO No. 5:** Medios selectivos para el aislamiento de *Erwinia sp.*

**ANEXO No. 6:** Medio para el aislamiento de *Bacillus sp.*

Bibliografía.

# PRESENTACIÓN

*Una de las actividades naturales en el ejercicio de la docencia es la elaboración de las llamadas "notas del curso". Son los apuntes que el profesor va acumulando como resultado de sus "preparaciones de clase". Por lo general son escritos que se van depurando semestre a semestre y que, en un momento determinado se deben considerar en su versión final.*

*Tal decisión no es sencilla. Siempre se puede añadir un experimento más, reescribir el capítulo tal, modificar la metodología de la práctica cual..., en fin. Por otra parte, los estudiantes ansían tener "la fuente" en la cual sus profesores basan sus clases.*

*La comisión que recientemente nombró el Decano para el análisis del estado de la docencia en la Facultad, encontró recomendable estimular la producción académica que se produzca alrededor de la actividad docente.*

*Por tal razón, la Facultad de Ciencias ha decidido participar en la edición de textos producidos por sus profesores, en donde se satisfaga lo mencionado anteriormente. Vale decir, un texto lo suficientemente acabado y respaldado por evaluaciones objetivas, y que por su naturaleza resulte de consulta obligada para los estudiantes.*

*La COLECCIÓN DE LA FACULTAD DE CIENCIAS se inicia así, con el título "Identificación de bacterias fitopatógenas" de la profesora del Departamento de Biología Emira Garcés de Granada, con la colaboración de Bertha Coba de Gutiérrez y Nancy Isabel Castillo.*

***Mauricio García Castañeda***
Vicedecano Académico
Facultad de Ciencias

Santafé de Bogotá, abril de 1977

# INTRODUCCION

La experiencia adquirida gracias al contacto diario con los alumnos nos permite reconocer el valor positivo que un texto práctico de laboratorio les proporciona, facilitándoles la comprensión y ejecución de las actividades propias del área en que se desempeñen.

Nuestro propósito al realizar éste libro es mantener la uniformidad en la orientación, necesaria para la docencia, dirigida en especial a los alumnos que proceden de diversos tipos de formación.

Con éste libro de prácticas para la identificación de bacterias fitopatógenas, esperamos llenar en parte el vacío en el que se ven avocados los alumnos de fitopatología, al tratar de establecer un protocolo inicial para la determinación de agentes bacterianos patógenos de plantas; así mismo es nuestro fin que este texto sea un apoyo como libro de consulta para estudiantes de áreas afines.

El presente texto contiene una breve discripción de cada uno de los grupos de bacterias fitopatógenas, las técnicas para su aislamiento, las pruebas preliminares para la clasificación de estos grupos y las pruebas bioquímicas específicas para su identificación.

# 1. ALGUNAS CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES DE LA MORFOLOGÍA BACTERIAL

Entre las características más importantes de la célula bacterial están su tamaño, forma, estructura y arreglo. Estas características constituyen la morfología de la célula bacteriana. Algunas especies de bacterias poseen apéndices, los cuales se pueden observar por medio de técnicas especiales de tinción o al microscopio electrónico.

## 1.1. Forma y disposición de las células bacteriales.

Los organismos bacteriales individuales tienen una de las siguientes tres formas generales:

1. Elipsoidal o esférica,
2. cilíndrica,
3. espiral o helicoidal.

1.- Las células bacteriales esféricas se denominan **cocos**; muchas bacterias de esta forma exhiben modelos de ordenamiento que son importantes para fines de identificación. Algunos de estos arreglos son:

| | |
|---|---|
| a. Diplococos: | 2 células bacteriales. |
| b. Estreptococos: | cadena de células. |
| c. Tetradas: | células arregladas en cuadro. |
| d. Estafilococos: | arreglo en racimos irregulares. |
| e. Sarcina: | arreglo en forma cúbica con 8 ó más células. |

Las diferentes agrupaciones de cocos se presentan debido a peculiaridades en la reproducción de las diferentes células. Las bacterias se multiplican o reproducen predominantemente por el proceso conocido como **FISIÓN BINARIA**, por medio del cual una simple célula se divide transversalmente produciendo dos nuevas células.

2.- Las células bacteriales cilíndricas o **bacilos** no tienen la misma variedad de arreglos que los cocos. Ocasionalmente ellos se presentan en pares denominados diplobacilos o en cadenas llamadas estreptobacilos. En algunos casos estos arreglos no son modelos característicos morfológicos sino que son debidos al estado de crecimiento o a las condiciones de cultivo de la bacteria, por ejemplo, el bacilo de la difteria tiende a producir grupos de células alineadas por el lado en forma de empalizada; el bacilo de la tuberculosis, puede presentarse en un arreglo de tres bacilos formando una estructura ramificada. Sin embargo, estos grupos son la excepción a la regla pues para la mayoría de los bacilos las células aparecen solitarias. Existen marcadas diferencias en las dimensiones de las diferentes especies de bacilos; algunos son ligeramente más largos que anchos mientras otros son varias veces más largos que anchos.

3.- Las células bacteriales en forma de espiral o helicoidal se presentan predominantemente como células individuales, sin embargo, las células individuales de diferentes especies exhiben notables diferencias de longitud, número y amplitud de las espirales y rigidez de las paredes celulares. Los espirilos cortos o incompletos son conocidos con el nombre de **bacterias coma o vibriones**.

## 1.2. Tamaño de las células bacteriales.

Algunas bacterias son extremadamente pequeñas pero es posible medir sus dimensiones con relativa facilidad y exactitud. Para este propósito el microscopio esta equipado con un ocular micrométrico. La unidad de medida bacterial es la **micra**, la cual equivale a 1/1000 mm ($10^{-3}$ mm). Las bacterias más frecuentemente estudiadas en el laboratorio miden de 0.5 a 1.0 por 2.0 a 5.0 micras. Los estreptococos y los estafilococos tienen un diámetro de 0.75 a 1.25 micras.

Los micoplasmas, bacterias del orden Micoplasmatales, presentan formas muy pequeñas de dimensiones que llegan al límite del poder de resolución del microscopio. Estos son pleomórficos y sus pequeños elementos cocoides tienen entre 0.1 a 0.3 micras de tamaño (Tovar, 1977).

## 1.3. La pared celular bacteriana.

Las paredes celulares de las bacterias son rígidas y porosas, semejantes a estuches que proporcionan protección física a la célula. Puesto que las bacterias poseen una elevada presión osmótica interna, y dado que frecuentemente pueden hallarse expuestas a condiciones ambientales externas completamente variables, e incluso, a veces a un entorno hipotónico, por fuerza han de poseer una pared celular rígida para impedir el hinchamiento y ruptura de la membrana celular. La estructura y biosíntesis de las paredes celulares bacterianas han sido estudiadas a fondo debido a que contienen antígenos específicos útiles para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, y debido a que la biosíntesis de las paredes celulares bacterianas es inhibida por la penicilina y otros antibióticos de gran utilidad en la medicina.

Clásicamente las bacterias se dividen en organismos **Gram-positivos** y **Gram-negativos**, según su reacción frente a la tinción de Gram, procedimiento empírico en que las células son sucesivamente tratadas por el colorante cristal violeta, y por iodo, y después decoloradas y tratadas con safranina. Las células Gram-positivas poseen paredes celulares que contienen muy pocos lípidos, mientras que las paredes de las células Gram-negativas son ricas en lípidos. Las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas parecen relativamente delgadas, pero son muy densas y constituyen cerca del 20-30% del peso seco de la bacteria.

Las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas poseen una característica molecular común: en ambas un rígido entramado estructural está constituido por cadenas polisacarídicas paralelas unidas covalentemente por medio de cadenas peptídicas transversales. Este retículo constituye más del 50% del peso de la pared celular; a él se hallan ligados componentes accesorios característicos que son diferentes en las células Gram-positivas y en las Gram-negativas.

Este rígido armazón recibe el nombre de **peptidoglucano** o **mureína**. La unidad básica que se repite en la estructura del peptidoglucano es el **muropéptido**, el cual es un disacárido constituido por N-acetil-D-glucosamina y ácido N-acetilmurámico con enlace B(1➢➢4). Al grupo carboxilo de los restos de ácido N-acetilmurámico del esqueleto se unen cadenas laterales tetrapeptídicas, cada una de las cuales contiene L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico o D-glutamina, y además ácido meso-diaminopimélico, L-lisina, L-hidroxilisina o bien ornitina, según la especie bacteriana de la cual se trate.

Las cadenas polisacarídicas paralelas de la pared celular se hallan unidas transversalmente mediante sus cadenas laterales peptídicas. El resto de D-alanina terminal de la cadena lateral de una cadena polisacárida se une covalentemente con la cadena peptídica lateral de una cadena polisacárida adyacente, bien directamente o a través de un péptido de conexión. El peptidoglucano forma una estructura covalente continua alrededor de la célula; las bacterias Gram-positivas se hallan encajonadas por un total de hasta 20 capas de peptidoglucano con enlaces cruzados.

Además del entramado del peptidoglucano, las paredes celulares bacterianas contienen cierto número de polímeros accesorios que ascienden casi al 50% del peso de la pared.

Estos componentes accesorios difieren de una especie a otra. Existen tres tipos de polímeros accesorios:

1. Los **ácidos teicoicos** que constituyen entre el 20 y el 40% del peso seco de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, son cadenas polímeras de moléculas de glicerina o de ribitol, unidas entre si por puentes fosfodiéster.

2. Los **polisacáridos accesorios** que contienen ramnosa, glucosa, galactosa o manosa (o sus aminas). Según las especies pueden ser mucilaginosos o bien formar cápsulas resistentes y duras. Tanto los ácidos teicoicos como los polisacáridos de las paredes bacterianas son antigénicos.

3. Los **polipéptidos o proteínas**.

Las paredes de las células Gram-negativas son mucho más complejas que las de las células Gram-positivas. Sus componentes accesorios están constituidos por polipéptidos, lipoproteínas y sobre todo, por un lipopolisacárido muy complejo cuya estructura está comenzando a conocerce ahora. Posee un esqueleto trisacárido, unidad que se repite y que está constituida por dos heptosas y ácido octulosónico (azúcar ácido de 8 carbonos). A este esqueleto se hallan unidas cadenas laterales oligosacarídicas y el ácido graso B-hidroximirístico, que confiere a esta compleja estructura su carácter lipídico.

El lipopolisacárido forma una membrana lipídica exterior y contribuye a la compleja especificidad antigénica de las células Gram-negativas. La pared celular de los organismos Gram-positivos puede considerarse como una caja rígida y quebradiza, como el caparazón de un crustáceo, mientras que la pared celular de los organismos Gram-negativos posee una cutícula exterior rica en lípidos, con el esqueleto peptidoglucano rígido sepultado debajo (Lenhinger, 1991) (Ver Tabla No. 1).

**Tabla No. 1. Diferencias relativas de la pared celular de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.**

| CARACTERÍSTICAS | BACTER. GRAM(+) | BACTER. GRAM(-) |
|---|---|---|
| **Contenido de peptidoglucanos** | Alto | Bajo |
| **Ácido teicoico** | Positivo | Negativo |
| **Contenido de aminoácidos** | Menor | Mayor |
| **Inhibición por colorantes básicos** | Mayor | Menor |
| **Susceptibilidad a antibióticos** | Mayor | Menor |
| **requerimientos nutricionales** | Complejos | Simples |
| **Contenido de lípidos** | Bajo | Alto |
| **Resistencia a desintegración física** | Mayor | Menor |

## BIBLIOGRAFIA

LEHNINGER, A. 1991. Bioquímica. 2a. edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona.

TOVAR, R. 1977. Guías y lecturas para la práctica del curso de microbiología agrícola. 3a. edición. Ed. U. Nacional. Bogotá.

# 2. LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Por muchos años el estudio de las bacterias fitopatógenas fue labor de un pequeño grupo de biólogos, pero a partir de 1970 el interés creció debido al desarrollo en técnicas inmunológicas y en biología molecular, y a la facilidad con la cual las bacterias fitopatógenas pueden ser manipuladas genéticamente.

Las pérdidas de cosechas causadas por bacterias fitopatógenas son de menor importancia que las causadas por agentes fungales y virales. Los ejemplos incluyen la marchitez bacterial en patata, tomate y otras cosechas ocasionada por ***Pseudomonas solanacearum***, y la mancha quemada de las peras ocasionada por ***Erwinia amylovora***. Se han reportado severas pérdidas en cosechas de alimentos importantes como arroz por ***Xanthomonas campestris*** pv. ***oryzae***, en trigo por ***Pseudomonas syringae***, en soya por ***P. syringae*** pv. ***glycinea***, en cazabe por ***P. syringae*** pv. ***manihotis*** y en patata por ***Erwinia carotovora***.

En la mayoría de los casos las pérdidas son principalmente por pudrición en el almacenaje. La importancia económica de las enfermedades bacteriales es mayor en las regiones de clima subtropical que en las de clima templado (Billing, 1987).

Los principales síntomas producidos por bacterias en las plantas son agallas, marchitamientos, secreciones, pudriciones suaves o blandas, pudriciones secas, chancros, quemazones, manchas de las hojas, frutos y tallos, roñas, etc.

Entre las principales enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas tenemos :

**Marchitez y cáncer:** Estas inician como áreas locales de células muertas (necrosis) y se pueden observar como manchas en hojas, vainas o frutos, ennegrecimiento de las flores (marchitez) o lesiones sobre el tallo (cáncer). La enfermedad puede permanecer localizada o tornarse sistémica y extenderse a través de la planta. La causa precisa de la muerte celular es desconocida.

**Marchitez vascular:** Este término es usado para denotar las enfermedades donde los vasos del xilema son invadidos por el patógeno que los necrosa. Los polisacáridos extracelulares frecuentemente tienen un papel en el desarrollo de la enfermedad pero también enzimas degradadoras de pared celular y alteraciones en el balance regulador del desarrollo de la planta pueden estar involucrados.

**Pudriciones blandas:** Estas se presentan cuando hay separación de las células huésped por lisis de la lámina media, lo cual conduce a un colapso del tejido; el tejido muerto permanece blando y húmedo.

**Agallas:** Estas se forman como resultado de la proliferación de las células huésped (hiperplasia) por lo cual se forma un tejido tumoral sobre raíces, tallos y hojas (Billing, 1987).

## 2.1. Identificación preliminar de bacterias fitopatógenas.

Las bacterias fitopatógenas convencionalmente se dividen en dos grupos:
1) Aquellas que se desarrollan en un medio bacteriológico estándar y,
2) aquellas que no se desarrollan sobre medio bacteriológico estándar (Schaad, 1988).

1) Los géneros dentro del primer grupo son relativamente fáciles de diferenciar entre sí con base en la coloración de Gram, presencia de esporas, presencia de flagelos, desarrollo aeróbico o anaeróbico y características de la colonia sobre ciertos medios de agar **(ver Tabla 2)**.

La coloración de Gram está relacionada con las propiedades estructurales y químicas de la pared celular y éstas características sirven como paso básico y rápido en la identificación inicial de bacterias fitopatógenas. La coloración de Gram es muy importante cuando se identifica una bacteria desconocida y es un procedimiento que no debe ser omitido **(Práctica No. 2)**.

Las bacterias que retienen el color violeta después del lavado con alcohol son Gram positivas. Las bacterias que pierden el color violeta con el lavado de alcohol y son coloreadas con un constrastante como safranina, son Gram negativas.

La prueba de anaerobiosis es clave para la identificación de los géneros **Erwinia** y **Clostridium** **(Práctica No. 4)**. También la presencia de esporas es una prueba importante para la diferenciación de bacterias Gram positivas **(Práctica No. 2)**.

2) Los miembros del segundo grupo son relativamente nuevos para los fitopatólogos y se diferencian inicialmente sobre las siguientes bases:

a) Desarrollo sobre un medio complejo.
b) Presencia o ausencia de la pared celular.
c) Morfología helicoide **(Ver tabla 3)**.

## 2.2. Aislamiento con medios diferenciales comunes.

Una buena práctica para diferenciar entre aislamientos de bacterias fitopatógenas es el uso de los siguientes medios comunes:

**Erwinia**, **Xanthomonas** y **Agrobacterium** se desarrollan bien sobre agar nutritivo-glucosa (NGA) o sobre agar extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC). Unas pocas especies o pathovares no se desarrollan sobre NGA, por ejemplo, ***E. stewartii*** y ***X. campestris*** pv. ***oryzae*** pero crecen bien sobre caldo nutritivo-extracto de levadura (NBY); el medio agar D1M (medio modificado de Kado), es selectivo para ***Agrobacterium sp.***

Los **Pseudomonados fluorescentes** tienen un desarrollo muy característico sobre medio agar King et al. medio B (KB); ***Clavibacter*** sp. crece bien sobre NBY.

Si se sospecha de la presencia de **Bacillus** o de **Clostridium** se puede utilizar agar caseina-glucosa plus (CAG), e incubar además en una cámara anaeróbica.

Si se sospecha **Streptomyces** se debe incluir **agar tirosina (ver anexo 1)**. En la gráfica No. 1 se observa un diagrama de flujo que orienta con respecto a los medios más comunes para el desarrollo de ciertas bacterias fitopatógenas.

**Tabla No. 2. Características usadas para la diferenciación de géneros reconocidos de bacterias fitopatógenas, las cuales se desarrollan sobre un medio estándar.**

| CARACTERÍSTICAS | Erwinia | Pseudomonas | Xanthomonas | Agrobacterium | Clavibacter | Clostridium. | Bacillus | Streptomyces |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Colonias amarillas o naranjas sobre medio NGA, YDC o NBY | v- | - | +a | - | +b | - | - | - |
| Pigmento fluorescente sobre KB | - | v+ | - | - | - | - | - | - |
| Desarrollo anaeróbico | + | - | - | - | - | + | + | - |
| Desarrollo aeróbico | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Más de 4 flagelos peritricos | + | - | - | - | - | v+ | v+ | - |
| Desarrollo sobre medio D1M | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Tinción de Gram | - | - | - | - | + | + | v+ | + |
| Presencia de esporas | - | - | - | - | - | + | + | - |
| Micelio aéreo | - | - | - | - | - | - | - | + |

v, variable de un 21 a 79% positivo.

a, colonias de los pathovares ***manihotis*** y ***mangiferaeindicae*** son poco coloreadas.

b, colonias de ***Clavibacter michiganense*** subsp. ***sepedonicum*** son generalmente poco coloreadas.

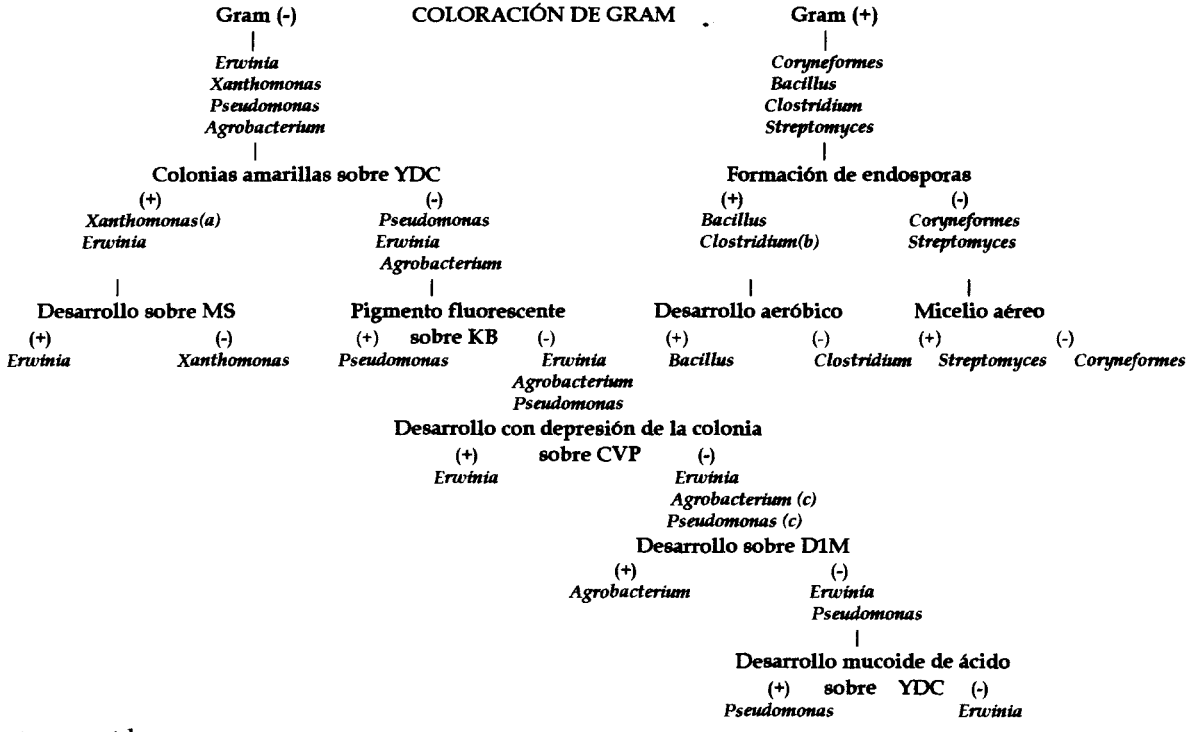
**Tabla No. 3. Características usadas para diferenciar bacterias fitopatógenas fastidiosas de afiliación no conocida.**

| CARACTERÍSTICAS | *Xyllella fastidiosa* | Spiroplasma | Semejantes a mycoplasmas |
|---|---|---|---|
| Desarrollo sobre PD-3 y CS- | +a | - | - |
| Posee pared celular | + | - | - |
| Requiere suero para su | - | + | - |
| Tiene morfología helicoidal | - | + | - |

a, Agar PD-3 y CS-20 son medios especiales para el desarrollo de ***Xyllella fastidiosa.***

(Tablas 2 y 3, Tomadas de Schaad N., Plant pathogenic bacteria, 1988).

**Gráfica No. 1. Flujo para diferenciar los géneros de bacterias fitopatógenas más comunes (Schaad, 1988).**




(a) Colonias usualmente mucoides.

(b) Las células de **Clostridium** contienen esporas y por lo tanto se ven hinchadas, lo que no ocurre con las células de **Bacillus**.

(c) Algunas especies de **Agrobacterium** y **Pseudomonas** pueden formar huecos poco profundos sobre medio CVP.

(**TOMADO DE**: Schaad N., Plant pathogenic bacteria, 1988)

## 2.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Para que una célula viva se desarrolle y reproduzca, debe ser capaz de efectuar gran número de cambios químicos, poder modificar los nutrientes del medio en que vive antes de que entren a la célula, y hacer cambios adicionales una vez que estos penetran a la misma. Algunos de los materiales son luego asimilados y pasan a formar parte de la célula, mientras que otros son descompuestos para obtener la energía que se requiere para la síntesis. La mayoría de estos cambios son realizados por las enzimas (Pelczar, 1982).

Para la identificación y diferenciación de bacterias fitopatógenas es usual realizar pruebas para la determinación de la producción de algunas enzimas por parte de estas bacterias, como son catalasa, oxidasa, ureasa, gelatinasa, etc.

## 2.4. PRACTICA No. 1: AISLAMIENTO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS.

**2.4.1. OBJETIVO:** Aprender a realizar aislamientos de bacterias fitopatógenas a partir de material vegetal enfermo.

Las observaciones iniciales al colectar una muestra son muy importantes. Se debe tratar de identificar la planta hospedante y el tipo de tejido afectado, y posteriormente registrar los síntomas. Con ésta información se consultan libros y manuales para tratar de determinar que patógenos se han reportado atacando el hospedante y produciendo síntomas similares. Paralelamente se aisla el agente causal de la enfermedad y se realizan pruebas de laboratorio para su identificación.

### 2.4.2. Aislamiento de bacterias fitopatógenas a partir de material vegetal.

- Remueva una pequeña cantidad de tejido (trozos de 0.5 a 1.0 $cm^2$) de una región intermedia entre tejido lesionado y sano usando un bisturí estéril.

- El tejido se lava con agua estéril y se desinfecta la superficie de éste con una solución de hipoclorito de sodio al 5.25%. Después enjuague con agua estéril. Si el tejido es difícil de cortar se puede usar un mortero y macerarlo durante 2 a 3 minutos.

- Los cortes de tejido o una pequeña cantidad de macerado del material vegetal se suspenden en tubos de ensayo con agua destilada estéril.

- Al cabo de 24 horas, con la ayuda de un asa bacteriológica, se toma una pequeña cantidad de la suspensión de los tubos y se extiende sobre medio agar glucosa nutritivo (NGA) en estrías o rejilla.

- Se debe trabajar con 2 o más muestras por planta, y con 2 o más cajas de Petri por muestra. Las cajas se incuban a 27°C y son examinadas diariamente en los siguientes 4 a 7 días. En la mayoría de los casos las colonias que se desarrollan durante las primeras 24 horas son de organismos no patógenos, mientras que aquellas que se desarrollan entre 24 a 72 horas se deben considerar como patógenos sospechosos.

- Para lograr obtener colonias puras del patógeno se recomienda hacer una transferencia de la colonia en estudio a un tubo con agua destilada estéril, agitar bien y volver a realizar la siembra en rejilla sobre agar glucosa nutritivo (NGA) al menos 2 veces más.

- Si se considera que una especie en particular es el agente causal, se sugiere seguir las técnicas de aislamiento para cada género. Si no hay crecimiento de alguna colonia sobre el medio, determine si el organismo causal es anaeróbico (*Clostridium* sp.) o un organismo de clasificación no conocida. (tal como *Xylella fastidiosa*).

- Determine forma y coloración de las colonias, si hay difusión de color al medio, aspecto de la colonia como tipo de bordes, elevación, etc.

## BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G. 1986. Fitopatología. Ediciones Limusa. Méjico.

BILLING, E. 1987. Bacteria as plant pathogens. Van nostrand Reinhold Co. Ltd. Berkshire, Inglaterra.

SCHAAD, N. W. 1988. Plant pathogenic bacteria. APS press. Minnesota, Estados Unidos.

PELCZAR, M. 1982. Microbiología. McGraw Hill. Cuarta edición. México.

# 3. LOS COLORANTES EN LAS TINCIONES BACTERIALES

Los colorantes se clasifican en naturales y sintéticos. Los colorantes naturales son utilizados principalmente con fines histológicos. La mayoría de las tinciones bacteriales son hechas con colorantes sintéticos los cuales son de anilina derivados del benceno.

Hay tres grupos de colorantes: ácidos, básicos y neutros. Un colorante ácido (o aniónico) es aquel cuya carga es negativa; un colorante básico (o catiónico) es aquel cuya carga es positiva y un colorante neutro es una sal compleja formada por una mezcla de soluciones acuosas de ciertos colorantes ácidos y básicos como el eosinato de azul de metileno.

Los colorantes ácidos tiñen generalmente los componentes básicos de la célula y los colorantes básicos tiñen los componentes ácidos de ésta.

La coloración de la pared bacterial es una propiedad atribuida a un intercambio de cargas electrolíticas entre la pared y el colorante. La importancia primordial de la acidez o la alcalinidad de los colorantes, debidas a la asociación de iones $H^+$ y $OH^-$ es conocida actualmente por los investigadores.

Las proteínas y los ácidos aminados son compuestos anfóteros, es decir, tienen la propiedad de reaccionar frente a los ácidos y las bases. Así, por ejemplo, los iones del colorante reemplazan iones de los compuestos celulares. Ciertos grupos químicos de la célula como las proteínas y los ácidos nucleicos pueden estar envueltos en la formación de sales con iones cargados positivamente como el sodio o el potasio, por consiguiente el área periférica de la célula puede tener cargas negativas en combinación con cargas positivas:

$$(\text{célula bacterial}^-)\ (Na^+)$$

Si utilizamos como colorante una sal como el azul de metileno-cloruro, el cual está compuesto de una carga positiva (azul de metileno, que es un colorante básico) y de un ion cargado negativamente como el cloro, el intercambio iónico que ocurre durante la tinción puede ser esquematizado en la siguiente ecuación:

$$(\text{cél. bacterial}^-)(Na^+) + (\text{azulmetileno}^+)(Cl^-) \gg\gg (\text{cél. bacterial}^-)(\text{azulmetileno}^+) + (Na^+Cl^-)$$

Estas reacciones de tinción son aparentemente una combinación de reacciones físico-químicas.

## 3.1. LA TINCIÓN DE GRAM.

La tinción de Gram es una técnica desarrollada por el físico danés Christian Gram en el año de 1884, a la cual se le han hecho muchas modificaciones pero finalmente todas llevan al mismo principio esencial. El frotis de la bacteria es sucesivamente teñido con una solución de cristal violenta y con una solución diluida de lugol o solución de yodo. La preparación es tratada luego con un solvente orgánico tal como el alcohol o la acetona. Las células Gram negativas son rápida y completamente decoloradas por el solvente orgánico mientras que las células Gram positivas resisten la decoloración y retienen el cristal violeta.

El tratamiento con el solvente orgánico es seguido por la contratinción con un colorante rojo como la safranina. Las células Gram positivas retienen el color púrpura o azul oscuro conferido por el cristal violeta y yodo, mientras que las células Gram negativas exhiben el color rojo de la safranina o la fuschina.

En la determinación de la reacción de Gram de una bacteria, es necesario utilizar células derivadas de un cultivo jóven, debido a que ciertas bacterias son solamente Gram positivas durante el periodo de crecimiento activo y reducen su capacidad para retener el complejo de cristal violeta-yodo después de que el crecimiento activo cesa; esto es particularmente cierto en muchas bacterias esporiformes. **La característica de coloración de las células Gram positivas esta condicionada por el estado fisiológico de las mismas.**

Algunas teorías sugieren que la reacción positiva a la tinción de Gram se debe a la formación de un complejo especial celular constituido por magnesio-ácidos ribonucleicos-proteínas-carbohidratos, el cual forma una sustancia insoluble con el cristal violeta y el lugol. Otros ensayos realizados sugieren que el alto contenido de lípidos en la pared celular de los organismos Gram negativos hace que durante la tinción el tratamiento con el alcohol disuelva y extraiga los lípidos, lo cual trae como consecuencia el incremento en la porosidad o permeabilidad de la pared celular, por tanto el complejo cristal violeta-yodo puede ser extraído.

## 3.2. PRACTICA No. 2: ANÁLISIS PRELIMINARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS.

**3.2.1. OBJETIVO:** Realizar coloración de Gram, coloración de flagelos y determinación de la presencia de esporas, para iniciar la identificación de bacterias fitopatógenas con base en la morfología de la bacteria.

### 3.2.2. Procedimiento para la tinción de Gram.

Los siguientes puntos son importantes para una óptima tinción:

a) Use reactivos que no tengan mas de un año de preparados, especialmente la solución de yodo. Si esta solución no se almacena en un frasco ámbar o en un lugar oscuro se decolora y pierde su efectividad.
b) Use una solución bacterial fresca, idealmente aquella que se encuentra en fase exponencial (luego de 24 horas de incubación). Las células en fase estacionaria tienen una reacción variable a la tinción.
c) Use controles Gram positivos y Gram negativos conocidos.
d) En el frotis bacterial deben quedar grupos bien separados de bacterias (Shaad, 1988).

**Coloración:**

a) Sobre una cara de una lámina portaobjetos limpia, extienda una fina película de la suspensión bacterial y séquela al aire, sin calor. Luego flameé la lámina por la cara opuesta para así fijar la bacteria a la lámina.

b) Esparza solución de cristal violeta sobre el frotis y déjela actuar por 1 minuto.

c) Lave con agua por unos pocos segundos. Seque el exceso de agua sobre un papel filtro.

d) Esparza solución de iodo por un minuto sobre el frotis.

e) Lave con agua por unos segundos. Seque el exceso de agua.

f) Decolore con un solvente como alcohol o etanol por unos 30 segundos, hasta que el alcohol fluya sin color de la lámina. Seque la lámina.

g) Juague el alcohol con agua por 2 segundos.

h) Contraste esparciendo solución de safranina por 10 segundos sobre el frotis.

i) Lave con agua, seque la lámina y examínela al microscopio.

**Resultados:** Coloración púrpura a azul oscuro: bacterias Gram positivas.
Coloración roja: bacterias Gram negativas.
Determine además la forma de las bacterias y el tipo de agrupación predominante (Shaad, 1988).

En el anexo No. 2, se describen las fórmulas de preparación de cada uno de los reactivos utilizados para esta coloración.

### 3.2.3. Determinación de esporas.

- Suspenda una pequeña porción de la colonia de bacterias que se desarrolló sobre el agar en una gota de agua sobre una lámina muy limpia y seque al aire. Extienda sobre el frotis una solución acuosa de verde de malaquita al 5% y repose por 10 minutos.

- Luego flameé la lámina hasta que la solución de colorante emita vapores. Lave con agua corriente y seque rápidamente.

- Esparza sobre el frotis safranina 0.5% durante 15 segundos. Enjuague con agua y seque la lámina. Observe las células a 40X.

**Resultado:** Las células bacteriales colorean de rojo y las esporas de verde.

### 3.2.4. Coloración de flagelos.

**a) Coloración de Ryu.**

- Siembre la bacteria sobre agar nutritivo por 16 a 24 horas.

- Suspenda la bacteria en agua destilada estéril y con un asa bacteriológica haga un frotis sobre una lámina completamente limpia. Seque al aire y fije el frotis por un corto tiempo sobre una llama.

- Extienda el colorante para flagelos sobre el frotis durante 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.

- Lave con agua destilada estéril y seque la lámina al aire. Examine el frotis con el objetivo de inmersión.

**Colorante para flagelos:**

**Solución A:**

Solución acuosa de fenol(*) al 5% 10 ml.

| | |
|---|---|
| Ácido tánico | 2 g. |
| Solución de sulfato de aluminio potásico | 10 ml. |

**Solución B.**

| | |
|---|---|
| Solución alcohólica de cristal violeta | 10 ml. |

Mezcle 10 volúmenes de la solución A por 1 volumen de la solución B. Utilice las soluciones el mismo día de su preparación.

(*) **PRECAUCIÓN**: Tenga cuidado al preparar la solución de fenol, ya que éste es un reactivo altamente tóxico y cáustico. Utilice protector para los ojos, guantes y delantal de caucho cuando manipule ésta sustancia, ya que puede ser absorbido por la piel.
Los cristales de fenol pueden ser disueltos en su envase, en baño María a 60°C. La cantidad necesaria de fenol disuelto es pipeteada, pero no con la boca, y adicionada al agua para preparar la solución (5 ml. de fenol disuelto en 95 ml. de agua destilada).

**b) Coloración de Bayle.** (modificado por Fisher y Conn).
Se debe usar láminas limpias y cultivos jóvenes para realizar esta coloración.

**Solución Bailey A o mordiente:**

| | |
|---|---|
| - Ácido tánico (10% solución acuosa) | 18 ml. |
| - $FeCl_3.6H_2O$ (6% solución acuosa) | 6 ml. |

Filtrar la solución.

**Solución Bailey B:**

| | |
|---|---|
| - Solución Bailey A | 3,5 ml. |
| - Fuschina básica (0,5% en alcohol etílico) | 0,5 ml. |
| - HCL concentrado | 0,5 ml. |
| - Formalina | 2,0 ml. |

Filtrar la solución.

**Solución C o Fuschina-carbol de ziehl:**

**Solución a:**

| | |
|---|---|
| - Fuschina básica (90%) | 0,3 gr. |
| - Alcohol etílico (95%) | 10,0 ml. |

**Solución b:**

| | |
|---|---|
| - Fenol | 5,0 gr. |
| - Agua destilada | 95 ml. |

Adicione la solución **a** a la solución **b** gradualmente, agite vigorosamente y filtre a través de papel de filtro antes de usar.

**Procedimiento de coloración**

- Realice un frotis de la solución bacterial sobre una lámina limpia.
- Extienda la solución Bailey A sobre el frotis durante 3 minutos y medio a temperatura ambiente.
- Escurra la solución de la lámina y sin lavarla adicione la solución Bailey B, y deje actuar durante 7 minutos a temperatura ambiente.
- Enjuague la lámina con agua destilada.
- Antes de secar la lámina, cubra el frotis con fuschina-carbol de Ziehl y flameé la lámina hasta que la solución de colorante emita vapores.
- Lave con agua corriente.
- Seque al aire y examine el frotis.

**Resultados:** Los flagelos toman una coloración roja.

BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G. 1986. Fitopatología. Ediciones Limusa. Méjico.

SCHAAD, N. W. 1988. Plant pathogenic bacteria. APS press. Minnesota, Estados Unidos.

TOVAR, R. 1977. Guías y lecturas para la práctica del curso de microbiología agrícola. 3a. edición. Ed. U. Nacional. Bogotá.

## 4. GÉNERO *Agrobacterium*

El género **Agrobacterium** pertenece a la familia **Rhizobiaceae**, pero su inhabilidad para inducir la formación de nódulos para la fijación de nitrógeno atmosférico lo diferencia de las **Rhizobiaceae** simbióticas.

El tamaño de los bacilos del género **Agrobacterium** oscila entre 0.6 a 1.0 por 1.5 a 3.0 micras y se presentan generalmente simples o en pares. No forman endospora y son Gram negativos. Son mótiles gracias a la presencia de 1 a 6 flagelos peritricos.

Son bacterias aeróbias, con un tipo de metabolismo donde el oxígeno es el aceptor final del electrón. Algunas cepas tienen la capacidad de un metabolismo anaeróbico en la presencia de nitratos y otras cepas son capaces de desarrollarse bajo tensiones de oxígeno muy reducidos como lo es en el interior de los tejidos vegetales. La temperatura óptima para su desarrollo es de 25 a 28°C. Las colonias son generalmente convexas, circulares, lisas y de color blanco a beige brillante. Su desarrollo sobre medios que contienen carbohidratos esta usualmente acompañado por una copiosa producción de polisacárido viscoso extracelular.

Estas bacterias tienen una reacción catalasa positivo y usualmente oxidasa y ureasa positivo. La mayoría de las cepas de ***Agrobacterium tumefaciens*** biovar 1 y, ***Agrobacterium radiobacter*** biovar 1, son productoras de 3-Ketoglicósidos.

Son quimiorganotróficos, utilizando un amplio rango de carbohidratos, sales de ácidos orgánicos y aminoácidos como fuentes de carbono, pero no son capaces de utilizar celulosa, almidón, agar de glucosa, D-galactosa y otros carbohidratos. Las sales de amonio y nitratos pueden ser utilizadas como fuentes de nitrógeno por cepas de algunas especies y biovares; otras cepas requieren aminoácidos y factores adicionales para su desarrollo.

Con la excepción de ***Agrobacterium radiobacter***, los miembros de este género invaden la corona, raíces y tallos de una gran variedad de dicotiledóneas y algunas gimnospermas debido a heridas, causando la transformación de las células internas de las plantas originando tumores (hiperplasia), o produciendo una gran cantidad de raíces adventicias. Las enfermedades que inducen en las plantas son conocidas como agalla de la corona, raíz velluda o agalla paluda. Algunas cepas poseen un amplio rango de hospederos mientras que otras son muy específicas, por ejemplo, los aislamientos obtenidos de la uva de vino; muchas otras cepas no son patogénicas.

Generalmente la clasificación de las especies del género **Agrobacterium** se ha realizado por su comportamiento fitopatológico. Las cepas que causan agalla de la corona son ubicados como ***Agrobacterium tumefaciens***, las cepas que producen raíces adventicias como ***Agrobacterium rhizogenes***, las que ocasionan agalla sobre ***Rubus*** sp. se conocen como ***Agrobacterium rubi*** y las no patogénicas como ***Agrobacterium radiobacter***. El problema con esta nomenclatura radica en el hecho de que la patogenicidad esta asociada con la presencia de un largo plásmido inductor de tumor (Ti-plásmido) o inductor de raíz (Ri-plásmido) presente en las células bacteriales y el cual puede ser transferido a cepas no patogénicas las cuales se tornan patogénicas.

De este modo el rango de especie de una cepa individual puede ser cambiado de acuerdo a la presencia o ausencia de este plásmido. Además no existe una correlación entre la nomenclatura actual y la estructura taxonómica basada en las características morfológicas, fisiológicas y genotípicas del género. Los resultados obtenidos de los análisis de caracteres fenotípicos, DNA cromosomal, y la comparación de modelos electroforéticos de proteínas, muestran que el género **Agrobacterium** consta de al menos 3 grupos taxonómicos. Los dos grupos mas amplios corresponden al biovar 1 y 2, y un tercer grupo más pequeño, biovar 3.

La agrobacteria es un habitante del suelo. Las cepas oncogénicas se presentan principalmente en suelos previamente contaminados con material vegetal enfermo. Algunas cepas no oncogénicas de **Agrobacterium** se han aislado de especímenes humanos.

Especie tipo: ***Agrobacterium tumefaciens***.

Algunos ejemplos de enfermedades producidas por ***Agrobacterium sp.*** son :

- Agalla de la corona de muchas plantas leñosas, principalmente frutales de hueso y pepita, sauces, zarzas, vides y algunos ornamentales como rosa y crisantemo, entre otras : ***Agrobacterium tumefaciens***.

- Agalla del tallo en frambuesas y zarzamoras: ***Agrobacterium rubi***

- Raíz pilosa o velluda de manzano: ***Agrobacterium rhizogenes***.

## 4.1. PRACTICA No. 3 : AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE *Agrobacterium sp.*

**4.1.1. OBJETIVO:** Aprender a realizar aislamientos de bacterias fitopatógenas a partir de material vegetal infectado y de suelo, y realizar las pruebas bioquímicas y de patogenicidad que conduzcan a la identificación de *Agrobacterium sp.*

Las cepas de **Agrobacterium** pueden ser aislada de tumores, fluidos vasculares, de la superficie de plantas con síntomas, de suelo y agua. A diferencia de muchas enfermedades bacteriales en plantas, la agalla de la corona no contiene masas de bacterias y no se presenta un exudado bacterial.

**4.1.2. Aislamiento a partir de material vegetal:** La superficie de la agalla se lava y se retira el tejido muerto el cual tiene un color café, para así eliminar bacterias secundarias. Se cortan dos a tres pequeños trozos de diferentes puntos del interior del tumor en cuadritos de aproximadamente 2 x 3 mm. y se colocan en 1 a 2 ml. de agua destilada estéril por 30 minutos para permitir que la bacteria se esparza dentro del líquido. De los tumores generalmente se aislan agrobacterias patogénicas y no patogénicas.

Algunas veces se realiza la esterilización de la superficie de la agalla antes del aislamiento, por inmersión del tumor en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 10 a 20 minutos; sin embargo el desinfectante puede penetrar al interior del tejido y matar el patógeno, por lo cual para reducir este riesgo se juaga el tejido tratado con algunos cambios de agua estéril antes de cortarlo.

Los trocitos de tejido se colocan en tubos de ensayo con agua destilada estéril durante 24 horas al cabo de las cuales se realiza una siembra en rejilla sobre medio D1M. Las colonias de **Agrobacterium** sobre éste medio presentan un color amarillo brillante y los bordes de la misma son enteros.

Si se desea conocer el biovar al cual pertenece la cepa en estudio se utilizan los siguientes medios selectivos para cada uno:

Para el Biovar 1 -- Brisbane y Kerr medio 1A.
Para el Biovar 2 -- Medio 2E.
Para el Biovar 3 -- Roy y Sasser (Ver Anexo 3).

Debido a que más de una cepa de **Agrobacterium** puede cohabitar en el mismo tumor puede ser necesario usar los tres medios a la vez para determinar el biovar predominante.

**4.1.3. Aislamiento a partir de suelo:** El uso de un medio selectivo es de gran ayuda para el aislamiento de cepas de **Agrobacterium** a partir de suelo ya que estas compiten pobremente con otros microorganismos cuando se desarrollan sobre medios no selectivos.

El procedimiento de aislamiento más frecuentemente usado consiste en extender 1 ml. de una dilución seriada 10 veces sobre un medio sólido, como D1M, con un rastrillo bacteriológico. Inoculados los medios se incuban a 27°C.

Colonias simples de un medio selectivo pueden albergar cepas de diferentes biovares así como de otras bacterias, por lo cual es necesario repicar varias veces la bacteria para aislarla pura. Para esta repicación, las colonias individuales del medio selectivo son suspendidas en agua destilada estéril y extendidas sobre PDA. Las colonias simples de PDA son nuevamente seleccionadas y repicadas. El proceso se repite hasta que todas las colonias aparecen homogéneas. Sobre PDA las cepas de **Agrobacterium** se desarrollan bien y sus colonias son generalmente fáciles de distinguir de otras especies ya que éstas son convexas, brillantes, circulares con borde entero, y de color blanco a beige.

**4.1.4. Coloración de Gram y determinación de esporas y flagelos.**
Realizar las coloraciones pertinentes (práctica No. 2) para determinar si las bacterias aisladas son Gram positivas o Gram negativas, lo mismo que para observar la presencia de esporas y la disposición de los flagelos si los hay.

**4.1.5. Prueba de oxidasa.**
Esta prueba se usa para determinar la presencia del citocromo C en las bacterias que lo poseen en sus cadenas respiratorias.

Para realizar esta prueba se debe usar un inóculo de 24 horas máximo. Tome con un asa bacteriológica una pequeña cantidad del inóculo y frótela sobre un papel filtro impregnado con una solución acuosa de tetramethyl-p-phenylenediamina dehidrocloruro al 1% (preparación fresca). Comercialmente se obtienen las tiras impregnadas para ésta prueba.

La reacción oxidasa positiva se evidencia por la aparición de un color púrpura que se desarrolla en unos 30 segundos. Sí en 60 seg. no aparece color, la reacción es negativa.

### 4.1.6. Prueba de catalasa.

La enzima catalasa se encuentra presente en muchos microorganismos aeróbicos. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación de oxígeno molecular.

Para ésta prueba utilice cultivos jóvenes (16-24 horas) y peróxido de hidrógeno al 3% ($H_2O_2$). La producción de burbujas de gas indican una reacción positiva, la cual puede observarse así:

- Mezclando una pequeña cantidad de células bacteriales con una gota de $H_2O_2$ sobre una lámina portaobjetos muy limpia,
- adicionando 1 ml. de $H_2O_2$ sobre la superficie de un cultivo en tubo inclinado, ó
- adicionando 1 ml. de $H_2O_2$ a 5 ml. de caldo de cultivo con bacterias.

$$2\,H_2O_2 \;\gg\gg\gg \text{catalasa} \;\gg\gg\gg\; 2\,H_2O + O_2 \text{ (burbujas)}$$

### 4.1.7. Producción de ureasa.

Preparar medio YS modificado y dispensarlo en tubos de ensayo. Inocular los tubos con la bacteria y colocarlos sobre un agitador a incubar a 28°C aproximadamente. Los tubos control deben contener el medio basal sin urea y se inoculan e incuban a la vez con los tubos problema.

Un incremento en la alcalinidad (pH 9.0) se evidencia por la aparición de un color rojo magenta, lo cual indica la actividad de ureasa, debido a la hidrólisis de urea a amonio.

**Medio YS** (caldo de sales de levadura)

| REACTIVO | g/L |
|---|---|
| $NH_4H_2PO_4$ | 0.5 |
| $K_2HPO_4$ | 0.5 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 |
| NaCl | 5.0 |
| Extracto de levadura (0.1% p/v) | 5.0 |
| Rojo de cresol (0.0016% p/v) | |

Esterilice en autoclave el medio. Esterilice por filtración una solución de urea al 10%; adicione al medio hasta obtener una concentración del 2%.

### 4.1.8. Utilización de citrato.

Esta prueba nos indica la capacidad de las bacterias para metabolizar el citrato, y para la cual se utiliza el medio Simmons que contiene citrato como única fuente de carbono, fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y azul de bromotimol como indicador de pH. Aquellas bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse produciendo la alcalinización del medio, dando como resultado un cambio de color en el medio de verde a azul.

**Medio Agar Citrato de Simmons**

| REACTIVO | g/l |
|---|---|
| Fosfato monoamónico | 1 g. |
| Citrato sódico | 2 g. |
| Fosfato dipotásico | 1 g. |
| Sulfato magnésico | 0.2 g. |
| Azul de bromotimol | 0.088 g. |
| Agar | 15 g. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

Sembrar en cajas de Petri con este medio la bacteria en estudio e incubar a 37°C durante 24 a 48 horas y registrar los resultados.

### 4.1.9. Ensayo de patogenicidad.

Para el ensayo de patogenicidad se puede utilizar zanahoria para determinar la presencia de ***Agrobacterium tumefaciens*** y ***Agrobacterium rhizogenes.*** Para mejores resultados se deben usar zanahorias que no hayan tenido un tiempo muy prolongado de almacenamiento.

- Pele la zanahoria y lávela con etanol al 95%, juague con etanol al 70% y esterilice la superficie con hipoclorito de sodio al 5% durante 15 minutos. Juague nuevamente la zanahoria con tres cambios de agua destilada estéril y corte con un bisturí estéril rodajas de más o menos 5 mm. de grosor.

- Coloque los cortes sobre papel filtro húmedo dentro de cajas de Petri, a manera de cámara húmeda, e inocule el tejido con una suspensión de bacterias con la ayuda de copitos de algodón estériles. El inóculo debe ser de $10^6$ a $10^7$ ufc/ml. más o menos. La cámara debe mantenerse húmeda durante el tiempo de ensayo.

- Observe la formación de tumores luego de unas tres semanas.

Sí se cuenta con la facilidad de obtener plántulas de tomate o tabaco, éstas se pueden inocular con una suspensión bacterial con la ayuda de un spray, una jeringa hipodérmica, con una pipeta o con un asa bacteriológica, sobre cortes realizados al tallo o sobre las hojas más jóvenes. Luego de tres semanas se empieza a observar la formación de tumores.

## BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G. 1986. Fitopatología. Ediciones Limusa. Méjico.

HOLT, J. et al. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9a. edición. Williams & Wilkins. Baltimore. Estados Unidos.

SCHAAD, N. W. 1988. Plant pathogenic bacteria. APS press. Minnesota, Estados Unidos.

## 5. GÉNERO *Erwinia*

**Erwinia** causa enfermedades tales como cáncer, agallas, manchas en las hojas, tizones, marchitamiento y pudriciones que pueden ser blandas o no. Este género consta de once especies con un pathovar, que causan tizones y marchitamiento, y de cuatro especies y tres pathovars que producen pudriciones blandas, todas ellas con diversas propiedades patogénicas y fenotípicas.

Estas bacterias son bacilos rectos, con un tamaño entre 0.5 a 1.0 por 1.0 a 3.0 micras. Se presentan simples o en pares y algunas veces en cadenas cortas. Su motilidad se debe a flagelos peritricos (excepto *E. stewartii*).

Son aeróbicas facultativos y quimiorganotróficas con dos tipos de metabolismo respiratorio, aeróbico y fermentativo. Su temperatura óptima de desarrollo es de 27 a 30°C. La D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácidos; muchas especies no producen gas.

Estas bacterias son Gram negativas y su reacción a la oxidasa es negativa, a la catalasa positiva y a la ureasa negativa. También son negativas para lisina decarboxilasa, arginina hidrolaza y ornitina decarboxilasa. Muchas especies no reducen nitratos. Son capaces de fermentar fructosa, galactosa, B-methyl-glucosida y sacarosa; usualmente fermentan D-manitol, D-manosa, ribosa y D-sorbitol, pero rara vez fermentan adonitol, dextrina, dulcitol y melezitosa. Utilizan acetato, fumarato, gluconato, malato y succinato como fuentes de carbono y energía, pero no pueden hacer lo mismo con benzoato, oxalato o propionato.

Estas bacterias generalmente se hallan asociadas a plantas como patógenos, saprófitos o como constituyentes de la flora epífita. Muy rara vez han sido aisladas de humanos.

Existe una propuesta para clasificar las especies que producen pudriciones dentro de tres grupos, "amylovora", "herbicola" y "carotovora", pero las inconsistencias, interrelaciones y ausencia de características peculiares entre cepas la hacen controversial.

Especie tipo: ***Erwinia amylovora***

Algunas de las enfermedades mas comunes causadas por ***Erwinia*** **sp.** son:
- Tizón de fuego del peral y el manzano: ***Erwinia amylovora.***
- Marchitez bacteriana en Cucurbitáceas: ***Erwinia tracheifila.***

- Marchitez de Stewart en el maíz: ***Erwinia stewartii.***
- Pudrición blanda en numerosos frutos carnosos, hortalizas y plantas de ornato: ***Erwinia carotovora.***
- Pierna negra de la papa: ***Erwinia carotovora var. atroseptica.***

## 5.1. PRACTICA No. 4: AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE *Erwinia sp.*

**5.1.1. OBJETIVO:** Realizar aislamientos de posible *Erwinia sp.*, a partir de material vegetal y realizar algunas pruebas bioquímicas que permitan su identificación como agente patógeno.

Las cepas de **Erwinia** que producen tizones y marchitez, no son organismos del suelo pero si infectan tejidos vivos de las plantas, por lo que son relativamente fáciles de aislar. Si se colectan tejidos recién infectados, usualmente se obtienen cultivos puros de un aislamiento inicial usando medios comunes tales como KB o YDC (ver anexo 1).

### 5.1.2. Aislamiento a partir de material vegetal.

Si se sospecha que una especie de **Erwinia** es causante de enfermedad en plantas, una porción del tejido infectado se corta en pequeños trozos y se sumerge en agua destilada estéril. Una pequeña cantidad de esta suspensión se esparce sobre la superficie de un medio sólido como KB, YDC y CVP, para especies que producen pudrición blanda, o medio MS el cual es altamente selectivo y ayuda a determinar si un organismo es o no **Enterobacteriaceae**. Sin embargo, algunas especies no se desarrollan sobre este medio. Algunos pseudomonados y otras bacterias pueden formar colonias sobre el medio pero estos de distinguen fácilmente por su coloración azulada, en contraste con el color rojo naranja de las enterobacterias. Este color rojo naranja es causado por una reacción ácida como resultado de la fermentación de la fuente de carbono (ver anexo 5 ).

El medio de Crosse y Goodman con un alto contenido de sacarosa es un medio semiselectivo para ***E. amylovora*** y más fácil de preparar que el medio MS. Las colonias se distinguen por la formación de cráteres o depresiones sobre la superficie brillante observables al estereoscopio (ver anexo 5).

Las siguientes pruebas bioquímicas se realizan de la misma manera que para los aislamientos de ***Agrobacterium sp.***:

### 5.1.3. Coloración de Gram, determinación de esporas y flagelos.

### 5.1.4. Pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa.

Registrar los datos obtenidos en las pruebas b y c, y verificar si corresponden a las características presentadas por *Erwinia* sp.

### 5.1.5. Prueba de anaerobiosis. (Metabolismo oxidativo o fermentativo).

Medio para desarrollo anaeróbico (Hugh and Leifson).

| REACTIVO | POR LITRO |
|---|---|
| Peptona | 2.0 g. |
| NaCl | 5.0 g. |
| $KH_2PO_4$ | 0.3 g. |
| Agar | 3.0 g. |
| Azul de bromotimol (1%) | 3.0 ml. |

Disuelva los reactivos y ajuste el pH a 7.0. Adicione 5 ml. de medio en tubos de ensayo y esterilice en autoclave a 121°C por 20 minutos. Prepare una solución acuosa de glucosa al 10% y esterilice por filtración. Adicione 0,5 ml. de ésta preparación a cada tubo con medio. Inocule los tubos con el organismo a ser analizado. Cubra los tubos con una capa de unos 5 mm. de vaselina estéril o con parafina. Los tubos de control no se cubren con esta capa. Un cambio de color de azul a amarillo en los tubos se reporta como positivo para desarrollo anaeróbico o fermentación.

## 5.2. TIZONES Y MARCHITAMIENTOS

### 5.2.1. Acidificación de carbohidratos.

Muchas bacterias poseen la facultad de utilizar como fuente de energía la degradación de carbohidratos con la consecuente acidificación del medio que además puede estar acompañada de la producción de gases.

Para este análisis se siembra la bacteria en estudio en un caldo azucarado con glucosa, sacarosa, manitol, etc., que lleva incorporado un indicador de pH como púrpura de bromocresol y una campana Durham para recoger los gases.

Los tubos se incuban a 37°C durante 24 horas al cabo de las cuales se registra la variación de color debido a la acidificación del medio y la producción de gases.

### 5.2.2. Fermentación de azúcares y producción de $H_2S$.

Para esta prueba se utiliza un medio diferencial (Kligler) de color rojo, que demuestra algunas características enzimáticas de las bacterias.

**Medio Agar Kligler.**

| REACTIVO | g/L. |
|---|---|
| Extracto de carne | 3 g. |
| Extracto de levadura | 3 g. |
| Peptona | 20 g. |
| Cloruro sódico | 5 g. |
| Lactosa | 10 g. |
| Glucosa | 1 g. |
| Citrato férrico amónico | 0.3 g. |
| Tiosulfato sódico | 0.3 g. |
| Rojo fenol | 0.05 g. |
| Agar | 15 g. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

Sembrar la bacteria a estudiar en un tubo parcialmente inclinado con este medio, sembrando tanto en superficie como en profundidad, con una aguja. Incubar a 37ºC por 24 horas y registrar los resultados.

**Resultados:** Para la fermentación de azúcares, si el color en el fondo del tubo cambia a amarillo,es debido a la fermentación de la glucosa,ya que al estar en una pequeña proporción, la cantidad de ácidos que se forman en la superficie del tubo será pequeña y estos serán neutralizados por las aminas derivadas de la descarboxilación oxidativa de las proteínas (dependiente del $O_2$), manteniéndose así el color rojo de la superficie.

Si en la superficie también se produce un viraje a color amarillo, es porque la bacteria fermenta la lactosa y los ácidos producidos modifican el pH de la superficie. El no cambio de color en ninguna porción del medio, indica que no hay fermentación de alguno de los dos azúcares. Si hay producción de gases, esta se verá por la aparición de burbujas o la rotura y/o elevación del agar del fondo del tubo.

La producción de ácido sulfhídrico se determina por la aparición de un color negro en el tubo debido a que algunas bacterias son capaces de utilizar el tiosulfato como aceptor final de electrones en la cadena de transporte y como consecuencia este compuesto reduce a ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro presente en el medio formando sulfuro de hierro de color negro.

### 5.2.3. Reacción de hipersensibilidad.

Preparar un inóculo de la bacteria problema, de aproximadamente $10^9$ ufc/ml. Aplicar esta preparación fresca en el espacio intercelular de hojas de tabaco con una jeringa. Si al cabo de 24 horas el tejido se ha colapsado completamente, la reacción es positiva, es decir la bacteria problema es ***Erwinia sp.***

### 5.2.4. Ensayo de patogenicidad para *Erwinia amylovora.*

Si se sospecha de ***E. amylovora***, para el ensayo de patogenicidad se utilizan trozos de manzano o pera verde, de aproximadamente 1,5 cm. de diámetro y se inoculan inyectando suspensión bacterial con una aguja hipodérmica. Los trozos de fruta se incuban en una cámara húmeda a 28°C. Al cabo de 4 o 5 días la reacción positiva se evidencia por la formación de un anillo de tono pardo alrededor del sitio de inóculo.

## 5.3. PUDRICIONES BLANDAS

### 5.3.1. Medio selectivo CVP (cristal violeta - pectato, modificado).

Quizás uno de los medios más efectivos y fáciles de preparar es el medio cristal violeta-pectato (CVP). Sobre este medio las especies de **Erwinia** que producen pudriciones blandas forman colonias iridiscentes y translúcidas, con depresiones en forma de copa, mientras que las colonias de **Pseudomonas** forman depresiones poco profundas. (Ver anexo No. 4).

### 5.3.2. Ensayo de diagnóstico: producción de ácido a partir de compuestos orgánicos.

| REACTIVO | POR LITRO |
|---|---|
| Peptona | 10 g. |
| Bromocresol púrpura (Bp), solución indicadora (1,5 g. de Bp/100 ml. de etanol) | 0.7 ml. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

Adicionar asépticamente una solución acuosa de compuesto orgánico al 10%, en la cantidad suficiente como para obtener una concentración final de 1% de la fuente de carbono (D-glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa u otros carbohidratos). Inocular el medio preferiblemente con 0.1 ml de una suspensión acuosa de la bacteria (aproximadamente a $10^8$ ufc/ml.), de no más de 24 horas de crecimiento, e incubar a 27°C. La reacción positiva se evidencia por cambios en el indicador (de azul a amarillo), en un tiempo máximo de 7 días.

### 5.3.3. Pudrición blanda en tubérculos de papa.

Sumerja el tubérculo recién cosechado en una solución de hipoclorito de sodio al 5.25% durante 10 minutos, luego déjelo secar al ambiente por 30 minutos y realice una segunda inmersión en hipoclorito por 10 minutos más, y nuevamente deje secar al ambiente por 30 minutos. Este procedimiento reduce las poblaciones bacterianas de la superficie del tubérculo.

Corte tajadas de un grosor de 7-8 mm, coloque cada tajada en una caja de Petri la cual contiene un círculo de papel filtro de 9 cm. de diámetro, humedecido con agua destilada estéril. Realice un corte pequeño en el centro de la rodaja con una cuchilla estéril e inocule allí con una suspensión bacterial de aproximadamente $10^8$ ufc/ml de no más de 24 horas de desarrollo. Incluya un testigo con una rodaja no inoculada de cada tubérculo utilizado, como control. Incube a 20 - 24°C durante 48 horas.

Una decoloración uniforme sobre la superficie de la rodaja es un resultado positivo; una decoloración únicamente en el punto de inoculación es un resultado negativo.

**Nota:** este no es un ensayo de patogenicidad, ya que algunas bacterias no patogénicas pueden causar pudrición en el tejido de la papa.

## BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G. 1986. Fitopatología. Ediciones Limusa. Méjico.

HOLT, J. et al. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9a. edición. Williams & Wilkins. Baltimore. Estados Unidos.

SCHAAD, N. W. 1988. Plant pathogenic bacteria. APS press. Minnesota, Estados Unidos.

## 6. GÉNERO *Pseudomonas*

Las bacterias de este género son bacilos rectos o ligeramente curvos, pero nunca helicoides, su tamaño oscila entre 0.5 a 1.0 por 1.5 a 5.0 micras. Muchas especies acumulan poly-B-hidroxybutyrato como reserva de carbono las cuales se observan como inclusiones sudanofílicas en el citoplasma.

Estos bacilos no forman proteca y se encuentran rodeados por una cápsula. No se les conoce estados de reposo. Presentan motilidad la cual se debe a uno o varios flagelos polares, en algunas especies se puede formar un flagelo lateral corto; rara vez son inmóviles.

Son Gram negativos y pueden ser oxidasa positivo o negativo, pero su reacción a catalasa es positiva. Son quimiorganotróficas y alguna especies son quimiolitotróficas facultativas, capaces de usar el hidrógeno o el CO como fuentes de energía.

Son bacterias aeróbicas con un metabolismo de respiración estricto donde el oxígeno es el aceptor final del electrón; en algunos casos el nitrato puede ser usado como un receptor alterno de electrón, permitiendo que el desarrollo pueda ocurrir anaeróbicamente.

No producen xanthomonadinos. Muchas de las especies, sino todas, disminuyen su desarrollo en condiciones ácidas (pH 4,5). Generalmente no requieren de factores de desarrollo orgánicos.

Las especies del género **Pseudomonas** están ampliamente distribuidas en la naturaleza y algunas especies son patógenos de humanos, animales y plantas.

Especie tipo: ***Pseudomonas aeruginosa***.

Las bacterias dentro del género **Pseudomonas** causan numerosas enfermedades en plantas con diversa sintomatología incluyendo marchitamiento vascular, cáncer, pudriciones blandas, marchitamiento de inflorescencias y vástagos, manchas en las hojas, tumores o agallas, y marchitamiento en setas. Otras bacterias de éste género se hallan asociadas con plantas como habitantes de la rizosfera o las hojas. Ejemplos de ***Pseudomonas sp.*** fitopatógenas son:

- Fuego silvestre del tabaco: ***Pseudomonas tabaci***.
- Fuego negro del tabaco: ***P. angulata***.
- Mancha foliar angular del pepino: ***P. lacrymans***.
- Tizón de halo del fríjol: ***P. phaseolicola***.

- Mancha foliar bacteriana del clavel: ***P. woodssi.***
- Mancha foliar bacteriana de la gardenia: ***P. gardeniae.***
- Tizón bacteriano de la soya: ***P. glycinea.***
- Mancha del fruto del manzano: ***Pseudomonas sp.***
- Tizón del peral y los cítricos, la mancha foliar del fríjol y el tizón de la lila: ***P. syringae.***

## 6.1. PRACTICA No. 5: AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE *Pseudomonas sp.*

**6.1.1. OBJETIVO:** Realizar las diferentes pruebas fisiológicas y bioquímicas que conduzcan a la identificación de bacterias del género **Pseudomonas** fitopatógenas.

**6.1.2. Realizar tinción de Gram, coloración de esporas y flagelos.**

**6.1.3. Realizar prueba de oxidasa y catalasa.**

**6.1.4. Realizar reacción de anaerobiosis.**
Observar los resultados obtenidos en estas pruebas y verificar si corresponden a ***Pseudomonas sp.*** fitopatógenas.

**6.1.5. Desarrollo en un medio con pH ácido.**
Preparar agar nutritivo (AN) y ajustar el pH a 4.5 con HCl 1N; esterilizar en autoclave el medio, servir en tubos o cajas de Petri e incubar durante 8 días. Registrar el tipo de crecimiento.

**6.1.6. Desarrollo a 42°C.**
Inocular con la bacteria problema un tubo con medio AN e incubar a 42°C durante 24-48 horas, y al cabo de las cuales observar desarrollo de colonias.

**6.1.7. Fluorescencia sobre agar KB (King et al. Medio B).**
Los dos grupos de Pseudomonados fluorescentes son:

1) El grupo fluorescente, el cual produce un pigmento fluorescente (fluoresceína, amarillo o piocianina, azul) sobre KB, produce poca acumulación de poly-B-hidroxibutirato (PHB) y no se desarrolla sobre D-arabinosa como fuente de carbono.

La pigmentación amarilla se observa bajo una lámpara de luz ultravioleta. Para realizar la extracción del pigmento piocianina, se adiciona al tubo de ensayo con la colonia bacterial, 5 ml. de cloroformo y se agita suavemente y se deja reposar durante 5 minutos. Posteriormente se decanta el líquido en un tubo limpio y se observa el cloroformo de color azul por la piocianina extraída del medio.

2) El grupo no fluorescente, el cual usualmente acumula PHB y usa D-arabinosa como fuente de carbono, pero no produce pigmento fluorescente sobre KB.

### 6.1.8. Licuefacción de gelatina.

Para esta prueba se usa medio de gelatina comercial (BBL. Difco, oxoid, etc.) o se prepara el siguiente medio:

| REACTIVO | g/L |
|---|---|
| Extracto de carne | 3 g. |
| Peptona | 5 g. |
| Gelatina | 120 g. |
| Agua destilada | 1 L. |

Disuelva los ingredientes y sirva en tubos. Esterilice en autoclave durante 12 a 15 minutos a 121°C y enfríe los tubos sin inclinar. Inocule la bacteria de cultivo jóven en los tubos con una aguja. Incube a 20-22°C. Después de 3, 7, 14 y 21 días coloque los tubos a 4°C por 30 minutos o en un baño con hielo por 20 minutos, antes de registrar los resultados.

**Resultado:** Si el medio se torna fluido, el resultado es positivo ya que se hidroliza la gelatina. Las especies ***P. aeruginosa, P. fluorescens, P. chlororaphis y P. aureofaciens,*** tienen una reacción positiva; la especie ***P. putida*** da una reacción negativa.

Colonias con pigmento
fluorescente difusible
al medio
|
Crecimiento a 42°C
Piocianina
(+)----------(-)
*P. aeruginosa* Gelatina
(-)----------(+)
*P. putida* Pigmento amarillo, *P. fluorescens*
Pigmento naranja, *P. aureofaciens*

## 6.2. MEDIOS SELECTIVOS.

**6.2.1. Crecimiento sobre CVP (medio cristal violeta - pectato modificado).** Ver el anexo No. 4.
Registrar sí al observar al estereoscopio, las colonias formadas presentan depresiones poco profundas.

**6.2.2. Desarrollo sobre KBBC (medio Mohan; Schaad).**
Este medio es usado para el aislamiento de *P. syringae* pv. *syringae* de plantas y semillas. También es usado para el aislamiento de los pathovars *pisi* y *tomato*.

Adicionar los siguientes ingredientes a 900 ml. de KB:

| REACTIVO | CANTIDAD |
|---|---|
| - Ácido bórico, solución acuosa al 1,5%. | 100 ml. |
| - Cephalexina (solución stock de 10 mg/10 ml de agua destilada). | 0.08 ml. |
| - Cycloheximida (solución stock de 100 mg/ml de metanol al 75%). | 0.20 ml. |
| - Agar | 16.0 g. |

## 6.3. PRUEBA DE DIAGNOSTICO: Acumulación de poly-B-hidroxibutirato (PHB).

La detección de gránulos de "poly B" se observa al microscopio en fase de contraste. Para éste ensayo se utiliza agar nutritivo (NGA), al cual se le adiciona 5 g/L de DL-B-hydroxibutirato y se ajusta el pH a 7.2. Se incuba la bacteria durante 12 a 24 horas. La acumulación de material orgánico de reserva celular se ve favorecido en algunas bacterias en ausencia de nitrógeno en el medio.

**Para su observación:**

1. Prepare una solución de sudán negro B (0,3 g en 100 ml de etanol al 70%). Después de disolver el colorante, revuelva la solución a intervalos y utilícela luego de 12 horas de su preparación. Esta solución permanece estable durante algunos meses si se almacena a temperatura ambiente y en un recipiente hermético.

2. Realice un frotis con la suspensión bacterial, de no más de 24 horas, sobre una lámina portaobjetos; seque al aire y fije con calor.

3. Esparza la solución de sudán negro B sobre la lámina y déjela actuar de 10 a 15 minutos.

4. Escurra el exceso de colorante, seque y lave la lámina con xylol.

5. Seque la lámina y realice una coloración de contraste con safranina al 0.5% durante 5 a 10 segundos. Evite la sobrecoloración con el contrastante. Lave y seque la lámina.

6. Examine al microscopio bajo el objetivo de inmersión con un microscopio de luz.

**Resultados:** Los gránulos de poly-B se observan de color azul oscuro.

## BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G. 1986. Fitopatología. Ediciones Limusa. Méjico.

HOLT, J. et al. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9a. edición. Williams & Wilkins. Baltimore. Estados Unidos.

SCHAAD, N. W. 1988. Plant pathogenic bacteria. APS press. Minnesota, Estados Unidos.

## 7. GÉNERO *Xanthomonas*

Las bacterias de éste género son bacilos rectos, con un tamaño que usualmente oscila entre 0.4 a 0.7 por 0.7 a 1.8 micras. Generalmente no forman agrupaciones. No producen inclusiones de poly-B-hidroxibutirato. No forman cápsula o proteca. No se le conocen estados de reposo. Su motilidad se debe a un flagelo polar simple (excepto en *X. maltophilia*, la cual tiene flagelos multitricos).

Son bacterias Gram negativas y su reacción a la oxidasa es negativa o débilmente positiva; son catalasa positivas. También son quimiorganotróficas, capaces de usar una amplia variedad de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como fuente de carbono. Son capaces de producir pequeñas cantidades de ácido a partir de muchos carbohidratos, pero no lo producen sobre medios purple milk o litmus milk. Se desarrollan sobre lactato de calcio pero no sobre glutamina. No son capaces de usar la asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno.

El desarrollo de estas bacterias se ve inhibido por 0,1% (y usualmente 0.02 %) de cloruro de tripheniltetrozolio. Los factores de desarrollo usualmente requeridos incluyen metionina, ácido glutámico, ácido nicotínico o una combinación de éstos.

Son bacterias aeróbicas, con un metabolismo respiratorio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrón. No produce denitrificación o reducción de nitratos (excepto *X. maltophilia*, la cual si reduce nitratos o nitritos).

La temperatura óptima para su desarrollo es de 25 a 30°C. Las colonias son usualmente amarillas, de bordes lisos y butirosas ó viscosas. Presenta pigmentos bromados (bromo), ésteres de aril polienes o "xanthomonadinos" muy característicos (excepto *X. maltophilia*, la cual no produce xanthomonadinos).

Las bacterias de éste género son patógenos de plantas (excepto *X. maltophilia*, la cual es un patógeno oportunista de humanos).

Especie tipo: ***Xanthomonas campestris***.

Bacterias fitopatógenas de ***Xanthomonas sp.*** producen enfermedades como:

- Tizón común del fríjol: *X. phaseoli*.
- Pústula bacteriana de la soya: *X. phaseoli* var. *sojensis*.

- Mancha foliar angular del algodón: *X. malvacearum.*
- Tizón foliar bacteriano del arroz: *X. oryzae.*
- Tizón bacteriano o roya de los cereales: *X. translucens.*
- La mancha bacteriana de los frutos de hueso: *X. pruni.*
- La roya roja y pudrición del cogollo de la caña de azúcar: *X. rubrilineans.*

## 7.1. PRACTICA No. 5: AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE *Xanthomonas sp.*

**7.1.1. OBJETIVO:** Realizar aislamientos de posible ***Xanthomonas sp.***, a partir de material vegetal y realizar algunas pruebas bioquímicas que permitan su identificación como agente patógeno.

### 7.1.2. Medios para el aislamiento de *Xanthomonas sp.*

Para el aislamiento a partir de material vegetal se pueden usar los medios diferenciales YDC, YNA o GYCA.

**Medio YNA** (agar nutritivo - extracto de levadura)

| REACTIVO | g/L |
|---|---|
| Extracto de levadura | 5 g. |
| Agar nutritivo | 23 g. |

### 7.1.3. Realizar tinción de Gram, coloración de esporas y flagelos.

### 7.1.4. Realizar prueba de oxidasa y catalasa.

### 7.1.5. Pruebas de ureasa y anaerobiosis.

Observar los resultados obtenidos en estas pruebas y verificar si corresponden a ***Xanthomonas sp.***

### 7.1.6. Medio GYCA (agar - glucosa - carbonato de calcio).

Este medio se utiliza para la evaluación de pigmentación.

| REACTIVO | g/L. |
|---|---|
| Extracto de levadura | 5.0 |
| Glucosa | 5.0 |
| $CaCO_3$ | 40.0 |

| | |
|---|---|
| Agar | 15.o |

Mezclar los reactivos y antes de que se solidifique el medio, agítelo en un vórtex y colóquelo rápidamente en agua fría para evitar que el carbonato de calcio se sedimente. No es aconsejable almacenar este medio más de un mes.

### 7.1.7. Hidrólisis de proteínas.

***Xanthomonas campestris*** es una bacteria proteolítica, es decir es una bacteria que digiere proteínas; para determinar ésta reacción se realiza la siguiente prueba:

| REACTIVO | CANT./L. |
|---|---|
| Leche descremada | 100 ml. |
| Púrpura de bromocresol (p/v) | 0.004%. |
| Agar | 15.0 g. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

Disolver el agar en el agua destilada y esterilizar por separado ésta mezcla y la leche descremada, durante 30 minutos, 3 días sucesivos. Para mezclar el agar y la leche, se deben enfriar a 45ºC más o menos. Servir en cajas de Petri. Inocular la bacteria con una aguja bacteriológica e incubar y registrar crecimiento durante 3, 5 y 7 días.

**Resultado:** Una reacción positiva se determina por la formación de un halo claro alrededor de las colonias, lo cual indica la digestión de caseína por las bacterias proteolíticas.

## BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G. 1986. Fitopatología. Ediciones Limusa. Méjico.

HOLT, J. et al. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9a. edición. Williams & Wilkins. Baltimore. Estados Unidos.

SCHAAD, N. W. 1988. Plant pathogenic bacteria. APS press. Minnesota, Estados Unidos.

## 8. BACTERIAS FITOPATÓGENAS CORYNEFORMES (Gram positivas)

El término coryneforme se refiere a un grupo diverso de bacterias de diferentes hábitats, incluyendo algunas bacterias fitopatógenas, que usualmente se presentan como bacilos de forma irregular en cultivos en medios complejos.

Estas bacterias varían considerablemente en tamaño y forma e incluye formas rectas, curvadas, forma de cuña y forma de garrote. Usualmente se presentan en arreglos angulares, frecuentemente en V. Las células pueden tener movimiento o no. No forman endosporas. Son Gram positivas, pero pueden decolorarse fácilmente y no presentar una coloración uniforme.

Las bacterias coryneformes fitopatógenas, generalmente se ajustan a la anterior descripción y en adición, pero no exclusivamente, son todas aérobicas facultativas, su reacción a la catalasa y a la oxidasa es positiva y frecuentemente contienen gránulos metacromáticos.

Hasta hace poco, las bacterias coryneformes fitopatógenas eran todas clasificadas en el género **Corynebacterium**, debido a sus características morfológicas y de coloración. Actualmente la clasificación de bacterias fitopatógenas en este género se considera inapropiado debido a recientes estudios fisiológicos, de taxomonía numérica y quimiotaxonomía.

Además, las diferencias que se presentan entre estos patógenos garantizan su clasificación como especies distintas. Una de las propuestas reclasifica las bacterias fitopatógenas Coryneformes en los siguientes géneros:

**Arthobacter** (con una especie).
**Clavibacter** (con 5 especies y 7 subespecies).
**Rhodococcus** (con una especie).
**Corynebacterium** (con una especie y 4 subespecies).

Estas bacterias causan una gran variedad de enfermedades con síntomas que incluyen agallas, gomosis y marchitamientos. Cada uno de estos fitopatógenos se encuentra asociado únicamente a un género de planta hospedera a excepción de ***Rhodococcus fascians***.

Las bacterias fitopatógenas Coryneformes son fáciles de identificar cuando se aislan de lesiones tempranas de un hospedero conocido, con síntomas característicos y gracias a su morfología celular y coloración de Gram; otras características de identificación son la morfología de la colonia, su pigmentación en medios complejos y la presencia o ausencia de motilidad.

La formación de las colonias de éstas bacterias requiere de 3 a 21 días, dependiendo del patógeno; las bacterias que se desarrollan más rápidamente son las subespecies de ***Corynebacterium flaccumfaciens*** y las de desarrollo más lento son las subespecies de ***Clavibacter xyli***.

La morfología colonial varía de pequeña, circular y convexa, a larga, irregular y fluida; su pigmentación es usualmente en matices de amarillo a naranja en medios ricos en nutrientes, con una minoría de especies no pigmentadas.

El medio de preferencia recomendado para observar el desarrollo, pigmentación y diferencias entre sí, es el medio NBY, a excepción de la especie ***Clavibacter xyli***, la cual se desarrolla únicamente sobre el medio especial SC (ver anexo No. 6).

## 8.1. Género Corynebacterium.

Conformado por bacterias rectas o ligeramente curvadas, son bacilos delgados con punta cónica o alguna veces puntas redondeadas, con un tamaño de 0.3 a 0.8 por 1.5 a 8.0 micras. Generalmente presentan arreglos simples o en pares en forma de V o en empalizada.

Son bacterias Gram positivas y comúnmente forman gránulos metacromáticos de polimetafosfato dentro de la célula. No son mótiles y no forman esporas. Son anaeróbicas facultativas, su reacción a la catalasa es positiva y son quimiorganotróficas con metabolismo fermentativo.

***Corynebacterium michiganense*** causa el cáncer bacteriano y marchitez del tomate.

## 8.2. Género Arthobacter.

Estas bacterias son bacilos irregulares con terminaciones circulares y un tamaño que oscila entre 0.8 a 1.2 por 1.0 a 8.0 micras. Forman arreglos en V. En la fase estacionaria del cultivo la bacteria se observa en forma de cocco.

Son Gram positivas, aunque se decoloran fácilmente. Algunas especies son mótiles. No forman esporas y son aeróbicas. Su reacción a la catalasa es positiva, son quimiorganotróficas con metabolismo oxidativo. La temperatura óptima para su desarrollo ésta entre 25 - 30ºC.

**Arthobacter** es un género que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, principalmente en el suelo.

## 8.3. Género Clavibacter.

Son bacilos rectos a ligeramente curvados. Su tamaño oscila entre 0.4 a 0.75 por 0.8 a 2.5 micras. Se arregla en pares, en V o en empalizada.

Son Gram positivos, no mótiles y no forman esporas. Son aeróbicos obligados y requieren de medios enriquecidos nutricionalmente, sobre los cuales se desarrolla lentamente. Son quimiorganotróficas con metabolismo respiratorio. Su reacción a la catalasa es positiva y a la oxidasa es negativa. Su temperatura óptima de desarrollo es de 20 a 29$^0$ C, rara vez se desarrolla a 35$^0$ C.

Estas bacterias son parásitos obligados de varías plantas con flores.

## 8.4. Género Rhodococcus.

Este género se ha clasificado dentro de los Actinomicetes. Se presenta en forma de bacilos o micelios extensamente ramificados. Forma colonias pigmentadas y son Gram positivos y aerobicos.

## BIBLIOGRAFIA

HOLT, J. et al. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9a. edición. Williams & Wilkins. Baltimore. Estados Unidos.

SCHAAD, N. W. 1988. Plant pathogenic bacteria. APS press. Minnesota, Estados Unidos.

# 9. OTRAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS

## 9.1. GÉNERO *Bacillus*.

Son células con forma de bacilos rectos, su tamaño oscila entre 0.5 a 2.5 por 1.2 a 10.0 micras y frecuentemente están agrupadas en pares o cadenas, con extremos redondeados o cuadrados. Son mótiles gracias a flagelos perítricos. La endospora es oval o algunas veces redonda a cilíndrica y son muy resistentes a muchas condiciones adversas; no se encuentra más de una endospora por célula y la esporulación no esta limitada a la exposición al aire.

Son Gram positivas y usualmente su reacción a catalasa es positiva.

Estas bacterias son aeróbicas o anaeróbicas facultativas y presentan una amplia diversidad de habilidades fisiológicas para adaptarse al calor, el pH y la salinidad. Son quimiorganotróficas con un metabolismo respiratorio o fermentativo.

Se encuentran en un amplio rango de hábitats; unas pocas especies son patógenas en vertebrados o invertebrados.

Especie tipo: ***Bacillus subtilis***.

La diferenciación entre especies de **Bacillus** es difícil debido a su amplio número y a las frecuentes descripciones incompletas de un número de nuevas especies reportadas. Algunas enfermedades causadas por ***Bacillus sp.*** son:

- Mancha blanca del trigo: ***Bacillus megaterium*** pv. ***cerealis***.
- Daños en cultivo de tejidos de la palma datilera: ***Bacillus circulans***.
- Daños en óvulos y semillas de papa: ***B. megaterium*** y ***B. cereus***.

### 9.1.1. AISLAMIENTO DE *Bacillus sp.*

**a) MEDIO MUNDT Y HINKE**

A 1000 ml de caldo nutritivo Difco, adicione:

| REACTIVO | g/L. |
|---|---|
| Extracto de levadura | 3.0 gr. |
| Glucosa | 5.0 gr. |
| Cycloheximida | 2.0 gr. |
| Agar (para medio líquido) | 5.0 gr. |
| Agar (para medio sólido) | 17.0 gr. |

Esterilizar en autoclave el medio a 121°C durante 15 minutos.

**b) MEDIO CAG (agar plus-caseína-glucosa)**

| REACTIVO | POR LITRO |
|---|---|
| Caseína ácida hidrolizada | 10.0 g. |
| Extracto de levadura | 5.0 g. |
| Glucosa | 5.0 g. |
| $K_2HPO_4$ | 4.0 g. |
| Agar | 17.0 g. |

Después de esterilizar en autoclave el medio, adicione 10 ml. de glucosa en solución al 50 %, previamente esterilizada en autoclave.

## 9.2. GÉNERO *Clostridium.*

Son células en forma de bacilo con un tamaño entre 0.3 a 2.0 por 1.5 a 20.0 micras y frecuentemente se agrupan en pares o en cortas cadenas con terminaciones redondeadas o en puntas. Comúnmente son pleomórficas.

Usualmente son mótiles gracias a flagelos perítricos. La forma oval o esférica de la endospora generalmente engloba la célula.

Son Gram positivas en cultivos jóvenes y usualmente son catalasa negativas. Son anaeróbicos obligados; si su desarrollo ocurre en presencia de aire, éste es limitado y la esporulación es inhibida. Metabólicamente son muy diversos, con temperaturas óptimas para su desarrollo entre 10° C a 65°C.

Muchas especies son quimiorganotróficas y algunas son quimioautotróficas o quimiolitotróficas. Pueden ser sacarolíticas y/o proteolíticas o ninguna de las dos. Usualmente producen mezclas de ácidos orgánicos y alcoholes a partir de carbohidratos o peptonas.

Se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente y muchas especies producen potentes exotoxinas; algunas son patógenas de animales debido a la infección de heridas o a la absorción de las toxinas.

Especie tipo: ***Clostridium butyricum.***

Muchas nuevas especies han sido descritas recientemente y actualmente el género contiene cerca de 100 especies.

## 9.3. GÉNERO *Xylella*.

Este género fue creado en 1987 por Wells et al. (Int. J. Syst. Bacteriol. 37:136-143), e incluye una única especie, ***Xylella fastidiosa***.

Las bacterias de ésta especie son bacilos rectos simples, con un tamaño entre 0.25 a 0.35 por 0.9 a 3.5 micras y forma largos hilos filamentosos bajo alguna condiciones de cultivo. No presentan motilidad.

Las colonias son de dos tipos: convexas a pulvinadas lisas, opalescentes y con márgenes enteras, ó umbonadas rugosas con márgenes finamente onduladas.

Son bacterias Gram negativas. Su reacción a oxidasa es negativa y a catalasa positiva. Son estrictamente aeróbicas, no fermentativas, no halofílicas y no pigmentadas.

Nutricionalmente son "fastidiosas", requiriendo medios especiales como BCYE que contiene charcoal, o medios glutamina-peptona (PW) que contiene albúmina de suero.

La temperatura óptima para su desarrollo es de 26 a 28°C y el pH de 6,5 a 6,9. Su hábitat es el xilema de plantas.

Especie tipo: ***Xylella fastidiosa***.

Las principales características de ésta especie son el hidrolizar gelatina y usar hippurato. Muchas cepas producen B-lactamasa. No fermenta la glucosa. Su reacción a pruebas como indol, $H_2S$, B-galactosidasa, lipasa, amilasa, coagulasa y fosfatasa, es negativa. Esta especie ha sido aislada como fitopatógena de tejidos de cierto número de plantas hospederas. La cepa tipo fue aislada de uva de vino con la enfermedad de Pierce.

## 9.4. GÉNERO *Streptomyces*.

son Actinomicetos cuya hifa vegetativa tiene un diámetro entre 0.5 a 2.0 micras y producen un micelio extensamente ramificado. Al madurar, el micelio aéreo forma cadenas de 3 o más esporas. Unas pocas especies forman cortas cadenas de esporas por encima del sustrato. En algunas especies se pueden formar estructuras similares a esclerocios, picnidios, esporangios y sinnematas. Las esporas no son mótiles.

Las colonias tienen una forma discreta y liquenoide, cueruda o butirosa. Inicialmente las colonias tienen una superficie lisa pero luego desarrollan una trama de micelio aéreo que puede aparecer fluocosa, granular, polvosa o aterciopelada. Producen una gran variedad de pigmentos responsables del color del micelio vegetativo y aéreo; también forman pigmentos difusibles en el medio de desarrollo.

Muchas cepas producen uno o más antibióticos. Estos Actinos son Gram positivos pero no por fijación de alcohol-ácido. Su reacción a la catalasa es positiva.

Son anaeróbicos y quimiorganotróficos con un metabolismo de tipo oxidativo. Generalmente reducen nitratos a nitritos y degradan adenina, esculina, caseína, gelatina, hipoxantina, almidón y L-tirosina. Usan un amplio rango de compuestos orgánicos como fuentes de carbono para energía y desarrollo.

Su temperatura óptima de desarrollo es de 25 a 35°C, pero algunas especies se desarrollan a temperaturas dentro de los rangos psicrofílicos y termofílicos; el rango de pH óptimo es de 6,5 a 8,0.

**Streptomyces** se halla ampliamente distribuido y en abundancia en suelos, incluyendo compost. Unas pocas especies son patógenas de animales y humanos, otras son fitopatógenas.

Especie tipo: ***Streptomyces albus***.

En cuanto a los especies fitopatógenas, ***Streptomyces scabies*** causa la sarna común del tubérculo de papa (***Solanum tuberosum***); también infecta la raíz de rábano, remolacha, nabo de Suecia, nabo, zanahoria y chirivía.

### 9.4.1. AISLAMIENTO DE *Streptomyces scabies*.

**MEDIO YME ( Agar extracto de malta y levadura).**

| REACTIVO | CANT./L. |
|---|---|
| Extracto de levadura | 4.0 gr. |
| Extracto de malta | 10.0 gr. |
| Dextrosa | 4.0 gr. |
| Agar | 20.0 gr. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

Ajuste el pH a 7.3 con NaOH antes de adicionar el agar. Esterilice en autoclave y sirva el medio en cajas de Petri.

## BIBLIOGRAFIA

**HOLT, J. et al.** 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9a. edición. Williams & Wilkins. Baltimore. Estados Unidos.

**SCHAAD, N. W.** 1988. Plant pathogenic bacteria. APS press. Minnesota, Estados Unidos.

# ANEXO No. 1. MEDIOS COMUNES PARA EL AISLAMIENTO DE DIFERENTES BACTERIAS FITOPATÓGENAS.

## 1.1. NGA (agar glucosa nutritivo) y NGB (caldo glucosa nutritivo).

| Reactivo | g/L |
|---|---|
| Extracto de carne | 3.0 |
| Peptona | 5.0 |
| Glucosa | 2.5 |
| Agar* | 15.0 |

* Para la preparación del caldo no se adiciona agar.
Esterilizar en autoclave el medio y servirlo.

## 1.2. YDC (Extracto de levadura-dextrosa-$CaCO_3$).

| Reactivo | g/L |
|---|---|
| Extracto de levadura | 10.0 |
| Dextrosa (glucosa) | 20.0 |
| Carbonato de calcio | 20.0 |
| Agar | 15.0 |

Esterilizar en autoclave el medio y servirlo.

## 1.3. NBY (Agar-caldo nutritivo-extracto de levadura).

| Reactivo | g/L |
|---|---|
| Caldo nutritivo | 8.0 |
| Extracto de levadura | 2.0 |
| $K_2HPO_4$ | 2.0 |
| $KH_2PO_4$ | 0.5 |
| Glucosa | 2.5 |
| Agar | 15.0 |

Después de esterilizar en autoclave el medio adiciónele 1.0 ml. de solución estéril de $MgSO_4.7H_2O$.

**1.4. Medio D1M (Usado para diferenciar colonias de *Agrobacterium sp.* de *Pseudomonas spp).***

| **Reactivo** | **g/L** |
|---|---|
| Manitol | 15.0 |
| LiCl | 6.0 |
| $NaNO_3$ | 5.0 |
| $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ | 0.002 |
| $K_2HPO_4$ | 2.0 |
| $MgSO_4.H_2O$ | 0.2 |
| Azul de bromotimol | 0.1 |
| Agar | 15.0 |

Después de esterilizar en autoclave el medio, el pH se debe ajustar a 7.2 y el medio presentará una coloración azul oscuro.

**1.5. KB (Agar de King et al. medio B).**

| **Reactivo** | **por litro** |
|---|---|
| Peptona protéica No. 3 | 20.0 g. |
| $K_2HPO_4$ | 1.5 g. |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 1.5 g. |
| Agar | 15.0 g. |
| Glicerol | 15.0 ml. |

Esterilizar en autoclave el medio, ajustar el pH a 7.2 y servirlo.

**1.6. CAG (agar caseina glucosa plus).**

| **Reactivo** | **por litro** |
|---|---|
| Caseína ácida hidrolizada | 10.0 g. |
| Extracto de levadura | 5.0 g. |
| Glucosa | 5.0 g. |
| $K_2HPO_4$ | 4.0 g. |
| Agar | 17.0 g. |

Esterilizar en autoclave el medio y servirlo.

**1.7. AT (agar tirosina).**

| **Reactivo** | **Por litro** |
|---|---|
| Caseinato de sodio | 25.0 g. |
| Nitrato de sodio | 10.0 g. |
| L-tirosina | 1.0 g. |
| Agar | 15.0 g. |

## ANEXO No. 2. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA REALIZAR LA COLORACIÓN DE GRAM.

**2.1. Solución de oxalato de amonio - cristal violeta de Hucker.**

**Solución A:**

| | |
|---|---|
| Cristal violeta (Difco) | 2.0 g. |
| Alcohol etílico (95%) | 20.0 ml. |

**Solución B:**

| | |
|---|---|
| Oxalato de amonio (Fisher) | 0.8 g. |
| Agua destilada | 80.0 ml. |

Mezcle las soluciones A y B. Almacene durante 24 horas antes de su uso. Filtre la solución con papel de filtro.

**2.2. Solución de lugol modificada para Gram.**

| | |
|---|---|
| Iodo | 1.0 g. |
| Yoduro de Potasio (Baker) | 2.0 g. |
| Agua destilada | 300.0 ml. |

Permita que la solución de iodo se disuelva durante la noche en un lugar oscuro. A la vez, macere en un mortero el iodo y el yoduro de potasio, secos y adicione poca agua. Continúe macerando con la solución de iodo y enjuague con agua dentro de un envase oscuro.

**2.3. Decolorantes.**

a. Alcohol etílico al 95% (agente más lento).
b. Acetona (agente más rápido).

c. Acetona - alcohol (agente intermedio):

| | |
|---|---|
| Alcohol etílico 95% | 100.0 ml. |
| Acetona | 100.0 ml. |

Con práctica, cualquiera de los 3 decolorantes puede producir buenos resultados.

**2.4. Contrastantes.**

**Solución Stock:**

| | |
|---|---|
| Safranina O (Fisher) | 2.5 g. |
| Alcohol etílico (95%) | 100.0 ml. |

**Solución de trabajo:**

| | |
|---|---|
| Solución Stock | 10.0 ml. |
| Agua destilada | 90.0 ml. |

## ANEXO No. 3. MEDIOS SELECTIVOS PARA LOS DIFERENTES BIOVARES DE *Agrobacterium* sp.

**1. Medio 1A para Biovar 1.**

| | |
|---|---|
| L(-) arabitol | 3.04 g/L. |
| $NH_4NO_3$ | 0.16 g/L. |
| $KH_2PO_4$ | 0.54 g/L. |
| $K_2HPO_4$ | 1.04 g/L. |
| Taurocolato de Sodio | 0.29 g/L. |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.25 g/L. |
| Agar | 15.0 g/L. |
| Cristal violeta, solución 1% (w/v) | 2.0 ml. |

Esterilizar en autoclave y enfriar a más o menos 50°C y adicionar 1.0 ml. de solución de cicloheximida al 2% y 6.6 ml. de solución de $Na_2SeO_3$ al 1%, soluciones esterilizadas por filtración.

**2. Medio 2E para Biovar 2.**

| | |
|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 0.16 g/L. |
| Erithritol | 3.05 g/L. |
| $KH_2PO_4$ | 0.54 g/L. |
| $K_2HPO_4$ | 1.04 g/L. |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.25 g/L. |
| Taurocolato de Sodio | 0.29 g/L. |
| Solución de extracto de levadura al 1% (w/v) | 1 ml. |
| Verde de malaquita en solución al 0.1% (w/v) | 5 ml. |
| Agar | 15.0 g/L. |

Esterilizar en autoclave y enfriar a más o menos 50°C y adicionar 1.0 ml. de solución de cicloheximida al 2% y 6.6 ml. de solución de $Na_2SeO_3$ al 1%, soluciones esterilizadas por filtración.

**3. Medio Roy-Sasser para Biovar 3.**

| | |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 0.70 g/L. |
| $K_2HPO_4$ | 0.90 g/L. |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.20 g/L. |
| Adonitol | 4.0 g/L. |
| Extracto de levadura | 0.14 g/L. |
| NaCl | 0.20 g/L. |
| $H_3BO_3$ | 1.0 g/L. |
| Agar | 15.0 g/L. |
| Clorothalonil (Bravo 500), en solución al 4% (w/v) | 0.5 ml. |

Ajuste el pH a 7.2, esterilizar en autoclave, enfriar a 50°C y adicionar asépticamente los siguientes reactivos (después de disolver separadamente en pocos mililitros de agua destilada y esterilizar por filtración):

| | |
|---|---|
| Cloruro de trifeniltetrazolio | 80.0 mg. |
| D-cycloserina | 20.0 mg. |
| Trimethoprim (con una gota de HCl en agua destilada) | 20.0 mg. |

Las colonias del Biovar 3 son contables después de 4 días de incubación a 27°C. Estas pueden tener centro rojo oscuro con puntos blancos. Se recomienda la comparación con aislamientos ya determinados.

**ANEXO No. 4. MEDIO CVP ( cristal violeta - pectado modificado). Usado para diferenciar *Erwinia sp.* de *Pseudomonas sp.* y *Agrobacterium sp.***

1. Coloque sobre una plancha magnética un recipiente con 500 ml. De agua destilada estéril.

2. Inicie la plancha a baja velocidad y adicione:

a) 1.0 ml de solución acuosa de cristal violeta al 0.075% (peso/volumen), para una concentración final de 1.5 microgramos por mililitro de cristal violeta.
b) 4.5 ml. de NaOH, 1N (8 g. De NaOH/200 ml. de agua destilada).
c) 6 ml. de $CaCl_2.2H_2O$ al 10% . Use esta solución fresca.
d) 2.0 g. de agar difco.
e) 1.0 g. de $NaNO_3$.
f) 2.5 g. de citrato de trisodio dihidratado.

3) mezcle a alta velocidad por 15 segundos.

4) Adicione lentamente 9 gr. de polipectato de sodio, mezclando bien para que no se formen grumos.

5) Coloque este medio en un recipiente de 2 litros de capacidad y adicione 0.5 ml. de sulfato lauryl de sodio al 10%.

6) Tape el recipiente con papel de aluminio y esterilice en autoclave por 25 minutos a 120ºC y 15 libras de presión. Permita que la presión se libere lentamente a fin de evitar la formación de burbujas en el medio.

7) Vierta a las cajas tan pronto como sea posible.

8) Antes de inocular el medio, permita que éste se seque durante 48 horas a temperatura ambiente.

## ANEXO No. 5. MEDIOS SELECTIVOS PARA EL AISLAMIENTO DE *Erwinia sp.*

**1. Medio MS (Miller, Schroth): Usado para diferenciar *Erwinia sp.* de *Xanthomonas sp.***

La siguiente preparación es para un litro de medio y se debe verter en recipientes de 200 ml. en caso de almacenamiento, el cual no debe ser mayor a 2 semanas. Adicione cada uno de los siguientes reactivos en el orden de la lista y permitiendo que cada uno de estos se disuelva antes de adicionar el siguiente reactivo:

| REACTIVO | **En 800 ml. de agua destilada.** |
|---|---|
| Agar | 15.0 g. |
| Manitol o sorbitol | 10.0 g. |
| Ácido nicotínico | 05 g. |
| L-asparagina anhídrida | 3.0 g. |
| $K_2HPO_4$ dibásico | 2.0 g. |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 g. |
| Taurocolato de sodio (Difco) | 2.5 g. |

En otro recipiente mezcle los siguientes reactivos y al disolverlos bien adiciónelos a la anterior mezcla :

| | | |
|---|---|---|
| Tergitol 7 | 0.1 ml. | |
| Ácido nitrilotriacético | 10 ml. | De una solución al 2%. (20 g. más 14.6 g. de KOH por litro). |
| Azul de bromotimol | 9.0 ml. | Solución acuosa al 0.5% |
| Rojo neutro | 2.5 ml. | Solución acuosa al 0.5% |
| Hidróxido de sodio | 5.0 ml. | Solución 1 N ( no lo use sí forma precipitado). |
| Nitrato de talio | 1.75 ml. | Solución acuosa al 1%. |
| Cloruro de cobalto | 50.0 ml. | Solución acuosa a 14mM. |
| Cycloheximida | 5.0 ml. | Solución acuosa al 1%. |

Lleve el medio a un volumen de 1 litro con agua destilada y el pH a 7.3.

**2. Medio de alta concentración de sacarosa 40% (Crosse y Goodman).**

| | |
|---|---|
| Sacarosa | 160.0 gr. |
| Agar nutritivo | 12.0 gr. |
| Cristal violeta | 0.8 ml. (0.1% en alcohol absoluto). |
| Cycloheximida | 20.0 ml. (0.1%). |
| Agua destilada | 380.0 ml. |

El medio se esteriliza en autoclave y se sirve en cajas de Petri y se seca en una incubadora a 30°C durante dos horas antes de su uso. Se prepara una suspensión bacterial y se esparce 0.1 ml. de esta sobre la superficie del medio. Luego de 60 horas de incubación a 28°C se observa la superficie de cada colonia a 15 o 30 aumentos.

## MEDIO No. 6. MEDIO SC PARA EL AISLAMIENTO DE *Clavibacter xyli*.

| REACTIVO | POR LITRO | |
|---|---|---|
| Fitona, peptona o soytona | 8.0 g. | |
| Hemin cloride | 15.0 ml. | Prepare una solución 0.1% (peso/volumen) en NaOH 0.05N. |
| $KH_2PO_4$ | 1.5 g. | |
| $K_2HPO_4.3H_2O$ | 0.5 g. | |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 g. | |
| Agar corn meal | 17.0 g. | |
| Glucosa | 1.0 ml. | Solución acuosa al 50% (p/v). |
| L-cisteína | 10.0 ml. | Solución acuosa al 10% (p/v). |
| Albúmina de suero bovino fracción V | 10.0 ml. | Solución acuosa al 20% (p/v). |

Estos ingredientes son adicionados y disueltos en agua deionizada en el mismo orden en que se presentan. El medio se esteriliza en autoclave sin la glucosa, la cisteína y el suero bovino. Estos tres reactivos se adicionan al medio a 50°C y esterilizados por filtros. El pH debe ser de 6.6 - 6.7 sin ajustarlo.

## BIBLIOGRAFIA.

SCHAAD, N. W. 1988. Plant pathogenic bacteria. APS press. Minnesota, Estados Unidos.

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
## FACULTAD DE CIENCIAS
## DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

COLECCIÓN DE LA FACULTAD DE CIENCIAS