

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología



Instituto Nacional de Aprendizaje
Especializado en Agricultura Orgánica.

EFEECTO BIOCONTROLADOR DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* SOBRE DOS
ESPECIES DE HONGOS FITOPATÓGENOS DEL GÉNERO *FUSARIUM SP.*

Proyecto de graduación para optar por el grado de bachiller en Ingeniería en
Biotecnología

Laura Ulloa Acuña

Cartago, Junio 2011.

EFFECTO BIOCONTROLADOR DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* SOBRE DOS ESPECIES DE HONGOS FITOPATÓGENOS DEL GÉNERO *FUSARIUM SP*

Laura Ulloa Acuña*

RESUMEN

La aplicación de microorganismos para el control de enfermedades en los cultivos es una alternativa viable tanto para aquellos países subdesarrollados como en aquellos en donde existe un excesivo uso de plaguicidas que contaminan el ambiente, deterioran el suelo y dañan la salud humana. El objetivo de la investigación consistió en comprobar el efecto antagonista que presenta la bacteria *P. fluorescens* sobre dos especies de hongos fitopatógenos correspondientes a *F. oxysporum* y *F. moniliforme* para determinar si la bacteria ejerce un antagonismo sobre estas dos especies de hongos con el fin de ser utilizada como un agente de control biológico, dentro de un manejo integrado y así disminuir el uso de fungicidas en los cultivos. Se colectaron muestras de suelo y raíz dentro de tres plantaciones de papa y se realizaron aislamientos bacterianos y pruebas confirmatorias (Api 20E y Vitek) para evidenciar si se estaba bajo la presencia de *P. fluorescens*. Se logró aislar tres cepas con las cuales se realizaron pruebas de antagonismo dando como resultado, luego de ocho días de incubación, que las cepas aisladas presentaban un efecto supresor sobre el crecimiento de los hongos en cuestión. Sin embargo en comparación con estudios anteriores estos porcentajes resultaron bajos. También se evaluó la compatibilidad de las cepas bacterianas frente a tres fungicidas utilizados para el control de *Fusarium sp*, ninguna de las tres fue inhibida por los agroquímicos.

Palabras claves: antagonista, *P. fluorescens*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, control biológico, manejo integrado, cepas.

*INFORME TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago. 2011.

BIOCONTROL EFFECT OF *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ON TWO SPECIES OF
PHYTOPATHOGENIC FUNGI *FUSARIUM SP.*

Laura Ulloa Acuña*

ABSTRACT

The application of microorganisms to control diseases in crops is a viable alternative both for those developing countries as those where there is excessive use of pesticides that pollute the environment, damage the soil and human health. The objective of this research was to test the antagonistic effect making the bacteria *P. fluorescens* on two species of phytopathogenic fungi for *F. oxysporum* and *F. moniliforme* to determine if the bacteria exert antagonism on these two fungal species to be used as a biological control agent within an integrated and thus reduce the use of fungicides on crops. Soil samples were collected within three root and potato plantations and bacterial isolates were made and confirmatory tests (API 20E and Vitek) to show whether it was in the presence of *P. fluorescens*. Was isolated three strains which were tested for antagonism resulting, after eight days of incubation, showed a suppressive effect on the growth of fungi in question. However, in comparison with previous studies these percentages were low. We also assessed the compatibility of the bacterial strains against three fungicides to control *Fusarium sp*, none of the three was inhibited by the chemicals.

Keywords: antagonist, *P. fluorescens*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, biological control, integrated management strains.

* Final Graduation Report, School of Biology, Biotechnology Engineering, Technological Institute of Costa Rica, Cartago. 2011.

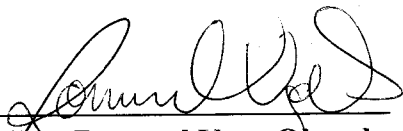
EFFECTO BIOCONTROLADOR DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* SOBRE DOS
ESPECIES DE HONGOS FITOPATÓGENOS DEL GÉNERO *FUSARIUM SP.*

Informe presentado a la escuela de Biología
del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar por el título de bachiller en Ingeniería en Biotecnología.


Miembros del tribunal



**Ing. William Rivera Méndez,
Profesor Asesor-ITCR**



**Ing. Rommel Vega Obando,
Asesor-Empresa**



**M.Sc. Olga Rivas Solano,
Lector**

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de graduación
a Dios porque fue el que me dio
la capacidad para poder culminar esta etapa de mi vida.
Muchas gracias Señor.

Laura



AGRADECIMIENTOS

Deseo extender un agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que colaboraron para poder realizar mi práctica de especialidad:

Al Instituto Nacional de Aprendizaje Especializado en Agricultura Orgánica, específicamente a Rommel Vega, Claudio Orozco y Rony Cortés por la atención brindada y el buen trato que me dieron durante los meses que estuve realizando mi práctica dentro de esta institución.

Al profesor William Rivera por su disposición, interés por la práctica y por estar pendiente durante todo el proceso.

A la profesora Olga Rivas por su asesoramiento y ayuda.

Al profesor Carlos Alvarado por el excelente trabajo realizado al brindarme la información pertinente para la presentación del TFG y los trámites de graduación.

A los agricultores de papa de la zona norte de Cartago que me permitieron tomar muestras dentro de sus plantaciones, por su gentileza y su buena atención.

Al CEQUIATEC por brindarme la ayuda para la compra de reactivos y por su asesoría en las pruebas realizadas.

Al Área de Bacteriología Médica de la Universidad de Costa Rica por el préstamo de sus servicios.

A la Escuela de Agropecuaria por el suministro de fungicidas.

A la Vicerrectoría de Vida Estudiantil y Servicios Académicos por la ayuda económica brindada.

A los demás profesores de la escuela que de alguna u otra manera colaboraron para que llegara a culminar esta etapa de mi vida.

A mis padres Vilma Acuña, Danilo Ulloa; y a Julio Leiva por sus palabras de motivación que me ayudaron a seguir adelante, por el deseo de ver mi superación cada día, los quiero mucho.

Muchas gracias a todos.



INDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
INDICE GENERAL	7
INDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE TABLAS	10
Capítulo I. INTRODUCCIÓN.....	12
Capítulo II. REVISIÓN DE LITERATURA	15
1. Control biológico	15
2. <i>Fusarium</i> sp.	16
<i>F. moniliforme</i>	17
<i>F. oxysporum</i>	18
3. <i>Microorganismos antagonistas</i>	19
<i>Clasificación taxonómica de P. fluorescens</i>	19
<i>Estudios y resultados anteriores</i>	20
Capítulo III. OBJETIVOS.....	22
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	22
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	22
Capítulo IV. MATERIALES Y METODOS.....	23
I. Trabajo en campo.....	23
a. <i>Zonas de muestreo</i>	23
b. <i>Toma de muestras</i>	24
II. Trabajo en laboratorio.....	26
a. <i>Medición de pH</i>	26
b. <i>Aislamiento primario</i>	26
Muestras de suelo	26
Muestras de raíz.....	27
c. <i>Emisión de fluorescencia</i>	27
d. <i>Aislamiento secundario (purificación de bacterias)</i>	27
e. <i>Tinción de Gram</i>	28

f. Pruebas para verificar la presencia de <i>P. fluorescens</i>	28
Api 20E.....	28
VITEK.....	29
g. Pruebas de antagonismo	29
Primera prueba de antagonismo.....	30
Segunda prueba de antagonismo	31
Análisis de los datos	32
h. Pruebas de compatibilidad a fungicidas	33
Capítulo V. RESULTADOS	35
I. Trabajo en laboratorio	35
a. Medición de pH	35
b. Aislamiento primario	36
Muestras de suelo	36
Muestras de raíz.....	37
c. Aislamiento secundario	38
d. Tinción de Gram	39
e. Pruebas para verificar la presencia de <i>P. fluorescens</i>	40
Api 20E.....	40
VITEK.....	40
f. Pruebas de antagonismo	40
Primera prueba de antagonismo	40
Segunda prueba de antagonismo	43
g. Prueba de compatibilidad a fungicidas	45
Capítulo VI. DISCUSIÓN	46
I. Trabajo en laboratorio	46
a. Aislamiento primario	46
b. Aislamiento secundario	46
c. Pruebas para verificar la presencia de <i>P. fluorescens</i>	47
Api 20E.....	47
VITEK.....	47
d. Pruebas de antagonismo	48
e. Prueba de compatibilidad a fungicidas	50
Capítulo VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
Capítulo VIII. BIBLIOGRAFÍA	53
Capítulo IX. ANEXOS	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Fusariosis en espiga de maíz causada por <i>F. moniliforme</i>	17
Figura 2.2 <i>F. oxysporum sp. lycopersicum</i> en tomate	18
Figura 4.1 Plantación 2 de <i>Solanum tuberosum</i> , Tierra Blanca.....	24
Figura 4.2 Muestreo de rizósfera, plantación 1 de <i>Solanum tuberosum</i> Tierra Blanca	25
Figura 4.3 Muestreo de raíz, plantación 1 de <i>Solanum tuberosum</i> Tierra Blanca.	25
Figura 4.4 Prueba Api 20E para la identificación de <i>P. fluorescens</i>	29
Figura 4.5 Primera prueba de antagonismo..	31
Figura 4.6 Segunda prueba de antagonismo..	32
Figura 5.1. Emisión de fluorescencia bacterias aisladas de suelo.....	36
Figura 5.2 Emisión de fluorescencia bacterias aisladas de raíz de <i>Solanum tuberosum</i>	37
Figura 5.3 Diferentes morfologías de colonias encontradas en las muestras de raíz.....	38
Figura 5.4 Tinción bacteriana, bacilos Gram negativos	39
Figura 5.5 Inhibición de <i>P. fluorescens</i> sobre dos especies de <i>Fusarium</i> sp.....	41
Figura 5.6 Inhibición de <i>P. fluorescens</i> sobre <i>F. oxysporum</i> , primera prueba de antagonismo .	42
Figura 5.7 Inhibición de <i>P. fluorescens</i> sobre <i>F. moniliforme</i> , primera prueba de antagonismo.	42
Figura 5.8 Inhibición de <i>P. fluorescens</i> sobre dos especies de <i>Fusarium</i> sp.....	44
Figura 5.9 Inhibición de <i>P. fluorescens</i> , segunda prueba de antagonismo.....	45



INDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Datos básicos de las fincas evaluadas.....	23
Tabla 4.2. Información general de los fungicidas evaluados	33
Tabla 5.1 Mediciones de pH del suelo de cada plantación muestreada	35
Tabla 5.2 Emisión de fluorescencia de las bacterias aisladas en las muestras de suelo.....	36
Tabla 5.3 Emisión de fluorescencia de las bacterias aisladas en las muestras de raíz en <i>Solanum tuberosum</i>	37
Tabla 5.4 Efecto inhibitorio de <i>P. fluorescens</i> , primera prueba de antagonismo.	41
Tabla 5.5 Efecto inhibitorio de <i>P. fluorescens</i> , segunda prueba de antagonismo.....	43
Tabla 9.1 Clasificación del suelo según su grado de acidez.	61
Tabla 9.2 Promedio de los datos obtenidos por repetición en la prueba 1 de antagonismo desde el día 0.	65
Tabla 9.3 Promedio de los datos obtenidos por repetición en la prueba 2 de antagonismo desde el día 0.	65
Tabla 9.4 ANOVA. <i>P. fluorecens</i> vrs <i>F. oxysporum</i>	66
Tabla 9.5 ANOVA. <i>P. fluorecens</i> vrs <i>F. moniliforme</i>	66



Capítulo I. INTRODUCCIÓN

El control de enfermedades fúngicas que afectan a los cultivos agrícolas ha sido una preocupación para los agricultores, pero la mayor inquietud radica en buscar alternativas viables, que disminuyan los costos de producción y los perjuicios ambientales.

A nivel nacional, dentro de las enfermedades fúngicas más importantes están aquellas producidas por *Fusarium* sp. Este es un hongo que presenta rápido crecimiento y causa el marchitamiento en varias especies de plantas. Tiene un efecto bastante fuerte, principalmente en raíces, tubérculos y bulbos; y según un reporte del Ministerio de Agricultura, se contabilizan 21 cultivos atacados por este género entre los de uso local y de exportación. Algunos de los más comunes son *Zea mays*, *Ananas comosus*, *Saccharum officinarum*, *Sechium edule*, *Solanum tuberosum*, *Phaseolus vulgaris* y *Carica papaya* (MAG, 1991).

En busca de una solución rápida, el agricultor ha basado su combate en la utilización de plaguicidas para controlar este y otro tipo de patógenos, y esto se ha hecho evidente gracias al aumento en el uso de estos productos en América Central. Las importaciones de plaguicidas crecieron de casi 54 millones de kilogramos por año en el periodo de 1980-1989 a más de 60 millones por año durante 1999. En Costa Rica se pasó de importar 2.648 toneladas métricas de ingrediente activo en 1977 a 11.636 toneladas en el 2006 representando un aumento del 340% en un periodo de 30 años (Ramírez *et al*, 2009). En América Central los plaguicidas más importantes han sido los “insecticidas” sin embargo en Costa Rica el principal grupo importado son los fungicidas debido a su uso en los cultivos de banano, para combatir *Mycosphaerella fijiensis* (Sanz *et al*, 1997) y en piña ya que el uso de insumos químicos utilizados en este cultivo supera por mucho a los usados en banano (Castro *et al*, 2009). El mayor problema con respecto al aumento en el uso de agroquímicos es la alta toxicidad de estos productos tanto en la salud humana como en el medio ambiente, además del inconveniente de la resistencia generada en los organismos blanco, con lo que se induce al agricultor a utilizar cada vez mayores concentraciones de químicos para eliminar las plagas (Wesseling *et al*, 2003).



A raíz de esta necesidad es que el control biológico ha tomado gran relevancia a nivel mundial, siendo un área importante de investigación para la búsqueda de nuevos microorganismos que cumplan con los requisitos necesarios para ser utilizados como una nueva alternativa en la agricultura. Dentro de los microorganismos más utilizados se encuentran las bacterias antagonicas como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp, *Serratia* sp; las cuales tienen diferentes mecanismos de acción, ya sea por competencia de espacio o nutrientes, antibiosis, interacción directa con el organismo patógeno, o por predación y resistencia inducida (Bernail *et al*, s.f).

Las bacterias del género *Pseudomonas* sp han sido consideradas como importantes agentes de biocontrol por su capacidad de inhibir organismos patógenos como bacterias, hongos, nemátodos y virus, a través de sus mecanismos de acción particulares como son la producción de sideróforos, ácido cianhídrico y antibióticos; además de su comprobada capacidad para inducir resistencia sistemática en ciertas especies de plantas. Dentro de este género bacteriano una de las más importantes es *P. fluorescens*, la cual ha sido investigada para verificar su eficiencia y posible uso como biocontrolador (Chávez, 2007).

Gracias a los antecedentes encontrados sobre el efecto antagonico de esta bacteria frente a diferentes géneros de hongos, el Instituto Nacional de Aprendizaje Especializado en Agricultura Orgánica consideró importante realizar una investigación cuyo objetivo fue comprobar el efecto biocontrolador de cepas nativas de *P. fluorescens* frente a dos especies de hongos del género *Fusarium*. Esta alternativa permitiría disminuir en gran manera el uso excesivo de fungicidas que son aplicados para controlar el desarrollo de estos hongos, y de este modo se mejoraría la calidad del producto, la seguridad física de los trabajadores y también se reduciría la contaminación química al medio ambiente.



Para lograr este objetivo se realizaron muestreos tanto de suelo como de raíz dentro de plantaciones de papa en la zona Norte de Cartago y fueron transportadas al Laboratorio de Fitoprotección del Instituto Nacional de Aprendizaje Especializado en Agricultura Orgánica. Aquí se realizaron aislamientos para la obtención de *P. fluorescens* y se efectuaron pruebas de antagonismo de la bacteria con dos especies de hongos del género *Fusarium* que corresponden a las especies *F. oxysporum* y *F. moniliforme*.



Capítulo II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Control biológico

El control biológico surgió a partir de la década de 1970 como una disciplina académica. Hoy en día se considera toda una ciencia madura con gran apoyo tanto del sector público como privado. En los últimos cuarenta años se ha generado un gran aprendizaje gracias al desarrollo de la investigación en este ámbito y actualmente se buscan nuevas respuestas con el fin de desarrollar tecnologías y aplicaciones más innovadoras (Pal *et al*, 2006).

Se han desarrollado una serie de definiciones entorno a lo que se considera control biológico. Si se enfoca a nivel de fitopatología, este se podría definir como el fenómeno natural que consiste en la regulación del número de plantas y de insectos, animales superiores y microorganismos por medio de enemigos naturales (parásitos, predadores y patógenos) y por otro lado a la manipulación de esos agentes naturales por el hombre para reducir las pérdidas en agricultura, forestación o productos comerciales (Zerba 1994, citado por Humeres 2004). Como bien lo menciona esta definición, el control biológico se considera un fenómeno natural, ya que en los ecosistemas existe una continua interacción entre los patógenos potenciales y sus antagonistas de forma tal que estos mecanismos últimos contribuyen a que, en la mayoría de los casos, la enfermedad no se desarrolle. Estos organismos antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica muy importante para su selección como agentes biocontroladores, ya que disminuye el riesgo de desarrollar resistencia en el patógeno e incluso otra opción para evitarlo es la combinación de varios antagonistas con diferentes modos de acción (Fernández *et al*, 2001).



El control biológico viene a hacer una herramienta biotecnológica aplicada dentro de un manejo integrado de plagas que permite a los agricultores disminuir en gran medida el uso de agroquímicos y utilizar diferentes estrategias en conjunto, que son tanto beneficiosas para la salud de ellos mismos y sus trabajadores, como para el mismo ambiente y la biodiversidad microbiológica de los suelos cultivados. Un ejemplo claro de esto corresponde al actual uso de hongos entomopatógenos los cuáles se combinan con otras medidas de control como prácticas culturales o productos botánicos (Monzón, 2001).

2. *Fusarium* sp.

Fusarium sp es un Hyphomycete que pertenece al Orden Moniliales y se caracteriza por presentar un rápido crecimiento. Las colonias son generalmente pálidas o poseen una coloración muy característica: rosada, púrpura o amarilla. El micelio es extensivo y similar al algodón, y los conidióforos son variables, delgados o simples. Muchas de las especies dentro de este género son fitopatógenas y causan síntomas como la epinastia, obstrucción y empardecimiento de los vasos xilemáticos, necrosis, marchitamiento y finalmente la muerte de la planta. Este hongo genera efectos muy serios principalmente en cultivos como las hortalizas, raíces, tubérculos y bulbos (Domsch, 1993; Barnett *et al.*; 1998; citado por Porras, 2000).

Una de las preocupaciones más relevantes con respecto a la seguridad alimentaria radica en que este fitopatógeno es capaz de producir micotoxinas que llegan a almacenarse en alimentos que son de gran interés, como en el caso del maíz. Este hongo es el causante de la enfermedad que origina la pudrición de las espigas de maíz y se pueden señalar tres especies que son predominantemente responsables: *F. moniliforme*, *F. graminearum* y *F. subglutinans*, siendo *F. moniliforme* una de las de mayor relevancia (Demain, 1995; citado por Porras, 2000).



F. moniliforme

Es un hongo facultativo de distribución cosmopolita en todos los tipos de clima y posee un amplio ámbito de hospedantes. Se destaca como el agente causal de las enfermedades de mayor importancia económica que producen pudrición de la mazorca y la germinación prematura del maíz. Es capaz de producir sustancias tóxicas como la zearalenona, tricotecenos, fusarina, moniliformina y fumaginas que al ser ingeridos tienen efectos cancerígenos, teratógenos, mutagénicos, eméticos y estrogénicos (Bravo *et al*, 2000).



Figura 2.1 Fusariosis en espiga de maíz causada por *F. moniliforme* (INTA, 2002)



F. oxysporum

Es el causante de la enfermedad de Panamá en el cultivo de banano y su modo de acción es colonizando los conductos xilemáticos de la planta bloqueando los vasos, lo que genera el marchitamiento de las hojas, amarillamiento, necrosis y muerte de la planta. Se encuentra como saprófito en el suelo o como patógeno especializado y parasita más de 100 especies de plantas entre Gimnospermas y Angiospermas. Produce colonias de rápido crecimiento con morfologías variables y genera tres tipos de esporas: microconidias, macronidias y clamidosporas (Garces de Granada *et al*, 2001).



Figura 2.2 *F. oxysporum sp. lycopersicum* en tomate (Rodrigo, 2005).



El control biológico con diferentes organismos se ha llegado a aplicar para este género de hongo que causa grandes pérdidas agrícolas. Larkin *et al* 1999 (citado por Porras, 2000) reportan el control sobre *F. oxysporum* por algunos organismos antagonistas como *Fusarium* spp no patogénicos y cepas del género *Pseudomonas*, las cuales pueden suprimir el crecimiento de *Fusarium* sp si se aplican sobre las raíces y semillas de varios cultivos. Inclusive se ha evaluado la combinación de *P. fluorescens* con *Fusarium* spp no patogénicos dando como resultado una supresión eficiente de la marchitez causada por hongos fitopatógenos de este género (Leeman *et al*, 1996).

3. *Microorganismos antagonistas*

Los microorganismos antagonistas (hongos, levaduras y bacterias) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutas y vegetales. Para seleccionar a los microorganismos antagonistas se deben considerar características como la capacidad para colonizar rápidamente la superficie de los frutos y persistir en ellos de manera efectiva, mayor habilidad para adquirir nutrientes y capacidad de sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales (Hernández *et al*, 2007).

Clasificación taxonómica de P. fluorescens

Reino: Bacteria.

Filo: Proteobacteria.

Clase: Gammaproteobacteria.

Orden: Pseudomonadales.

Familia: Pseudomonadaceae.

Género: *Pseudomonas*.

Especie: *P. fluorescens*.



P. fluorescens es un bacilo Gram negativo, se moviliza a través de flagelos polares, es saprófita, habita principalmente en suelo y agua. Es una bacteria incapaz de formar esporas y crece aeróbicamente. Su temperatura óptima se encuentra entre los 25-30° C y se desarrollan óptimamente a un pH neutro. Esta especie se encuentra dentro del grupo de las fluorescentes ya que contiene el pigmento fluoresceína que la hace reaccionar momentáneamente frente a luz ultravioleta (Santoyo, 2009). Es denominada a nivel mundial como Rizobacteria Promotora del Crecimiento (PGPR) por lo que es capaz de colonizar la rizósfera de las plantas y presentar actividad antagónica hacia diversos patógenos (Perotti *et al*, 2005). Esto gracias a la producción de antibióticos (como el 2,4-diacetilfluoroglucinol) y sideróforos lo que le permite a la bacteria tener capacidad fungistática y bacteriostática cuando el hierro en el medio donde se encuentra es bajo y es una inductora de resistencia sistémica lo que disminuye la susceptibilidad de la planta hacia el patógeno (Loper 1988, Haas y Défago 2005, citados por Chávez 2007).

Estudios y resultados anteriores

Esta especie bacteriana y otras del género *Bacillus sp* se han considerado las más eficientes para controlar enfermedades foliares y radicales, inclusive en los Estados Unidos ya hay registros del uso comercial de varias especies de microorganismos para el control biológico de patógenos del suelo, entre estos microorganismos se encuentra *P. fluorescens* como una de las alternativas más eficientes (Fernández *et al*, 2001).

Por otro lado estudios realizados con *Arabidopsis* han permitido hacer evidente el efecto de la especie *P. fluorescens* favoreciendo la resistencia sistémica inducida en esta planta y por consiguiente la supresión de enfermedades (Oyoque, 2008).



Otros estudios realizados en arroz y maíz demostraron que esta bacteria es capaz de ejercer un efecto inhibitorio sobre los hongos *Fusarium* sp, *Curvularia* sp, *F. oxysporum* y *A. alternaria*, aludiendo su eficacia a la producción de metabolitos por parte de la bacteria (Trujillo *et al*, 2007). También, dentro de otras investigaciones se ha visto que esta bacteria inhibe el crecimiento de *Gaeumannomyces graminis var.trici*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Phytophthora cinnamomi*, suprime la pudrición de raíz por *Thielaviopsis basicola* (Leeman *et al*, 1995), protege los cultivos de caña de azúcar de la enfermedad del damping-off causada por *Pythium ultimum* (Oyoque, 2008), entre otros.



Capítulo III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de varios aislamientos de *P. fluorescens* para su uso como controlador biológico de dos hongos del género *Fusarium sp.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar un muestreo de rizósfera y rizoplano, en plantaciones de papa.
2. Aislar a partir de muestras de suelo *P. fluorescens*.
3. Verificar a través de pruebas de confirmación la identificación positiva de *P. fluorescens*.
4. Desarrollar pruebas de antagonismo entre las cepas bacterianas aisladas y las especies *F. oxysporum* y *F. moniliforme*.
5. Verificar la sobrevivencia de *P. fluorescens* ante la presencia de fungicidas utilizados para el control de *Fusarium sp.*



Capítulo IV. MATERIALES Y METODOS

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Fitoprotección del Centro Especializado en Agricultura Orgánica del Instituto Nacional de Aprendizaje (INA), ubicado en el cantón de Oreamuno, Cartago, en los meses de febrero a mayo del 2011.

I. Trabajo en campo

a. Zonas de muestreo

Se seleccionaron tres plantaciones ubicadas en la zona Norte de Cartago:

Tabla 4. 1. Datos básicos de las fincas evaluadas.

*Nombre de referencia	Zona	Coordenadas geográficas	Altitud (m.s.n.m)	Temperatura ambiental (° C)	Variedad de la papa
Plantación 1	Tierra Blanca	N 054° 98.70´ W 021° 01.72´	1924	16	Floresta y Granola
Plantación 2	Tierra Blanca	N 054° 90.53´ W 021° 06.07´	2091	14	Granola
Plantación 3	San Juan de Chicué.	N 055° 16.93´ W 021° 46.85´	2841	14	Granola

*El nombre de referencia se utilizó para posteriormente rotular los aislamientos.





Figura 4.1 Plantación 2 de *Solanum tuberosum*, Tierra Blanca.

b. Toma de muestras

Para el aislamiento de *P. fluorescens* se tomaron muestras de suelo y raíz dentro de las plantaciones de papa:

- Se tomaron 3 submuestras por plantación de la rizósfera (suelo a 2mm de distancia de la raíz) y 3 submuestras del rizoplano (raíces de papa), de 3 plantas diferentes. Estas fueron seleccionadas al azar de tal forma que las tres plantas formaran una V.
- De cada submuestra de suelo se colectaron aproximadamente 30g en bolsas plásticas, y de la submuestra de raíz se tomaron segmentos de diferentes tamaños hasta completar aproximadamente 40cm y se envolvieron en papel periódico seco. Todas las muestras fueron cuidadosamente rotuladas y almacenadas en una hielera.
- En cada plantación se tomaron las coordenadas geográficas y altitud utilizando un GPS etrexVista GARMIN; y se midió temperatura ambiental (tabla 4.1).



- Todas las muestras fueron colectadas en las horas de la mañana el mismo día y luego transportadas al laboratorio donde se dejaron dentro de la hielera incubadas en frío a 1,1 ° C hasta su procesamiento.



Figura 4.2 Muestreo de rizósfera, plantación 1 de *Solanum tuberosum* Tierra Blanca



Figura 4.3 Muestreo de raíz, plantación 1 de *Solanum tuberosum* Tierra Blanca.



II. Trabajo en laboratorio

a. Medición de pH

Se tomaron 5g de cada una de las 3 submuestras, por plantación, para obtener una sola muestra compuesta por sitio. De cada muestra compuesta se pesaron 10g y se colocaron en un erlenmeyer con 25ml de agua desionizada. Las tres mezclas se agitaron por 10 minutos y trascurrido el tiempo establecido se midió el pH de cada suelo utilizando un pH-metro.

b. Aislamiento primario

Se preparó medio de cultivo Agar Pseudomonas F Difco™ para el crecimiento de las bacterias tanto de las muestras de suelo como de las de tejido radical.

Muestras de suelo

- De cada submuestra colectada por plantación se tomaron 5g con el fin de obtener una muestra compuesta de 15g, por lo tanto al final se tenían 3 muestras compuestas correspondientes a las tres plantaciones estudiadas. La cantidad de suelo restante se mantuvo almacenada en frío a 1,1 °C por si era necesaria su utilización posteriormente.
- De cada muestra compuesta se pesaron 10g y se colocaron en 100ml de agua estéril, esta se agitó por aproximadamente 5 minutos dentro de la cámara de flujo laminar y se tomó 1ml de la solución la cual se traspasó a un tubo de ensayo con 9ml de agua estéril, esta correspondería a la dilución 10^{-2} , se siguió el mismo procedimiento hasta la dilución 10^{-5} .
- De las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} se tomaron 0,5ml y se colocaron en el medio Agar Pseudomonas F Difco™ previamente preparado. Se dispersó la muestra con una espátula Drigalsky.



- De cada muestra compuesta se realizaron tres repeticiones por dilución.
- Las placas se incubaron a 28° C por 48 horas.

Muestras de raíz

- Se tomaron dos raíces por cada muestra colectada por plantación, se lavaron con agua destilada para eliminar la tierra, se cortaron en segmentos muy pequeños (aproximadamente 5mm) y se colocaron en un colador previamente esterilizado.
- En la cámara de flujo laminar se sumergió el colador dentro de una solución de cloro al 1% por 1 minuto. Transcurrido el tiempo se pasó a una solución de alcohol de 96% durante 30 segundos y finalmente se colocó en agua destilada.
- Los segmentos se transfirieron a una toalla estéril para remover el exceso de humedad.
- En placas con medio Agar Pseudomonas F Difco™ se sembraron 5 segmentos; uno en el centro y los otros cuatro en los extremos, formando una “+”.
- Se realizaron tres repeticiones por plantación.
- Las placas se incubaron a 28° C por 48 horas.

c. Emisión de fluorescencia

Para verificar la emisión de fluorescencia las placas con los aislamientos primarios fueron observadas bajo una lámpara de luz ultravioleta. Aquellas colonias que presentaban el pigmento fueron señaladas con marcador. Las observaciones se realizaron a las 24 horas y 48 horas.

d. Aislamiento secundario (purificación de bacterias)

Tanto de las muestras de suelo como de raíz; se tomaron las bacterias que mostraban un buen crecimiento y emisión de fluorescencia y se subcultivaron en Agar nutritivo Difco™ realizando rayados con un asa bacteriológica. Se incubaron a 28° C por 48 horas.



e. Tinción de Gram

A las placas seleccionadas y subcultivadas se les realizó tinción de Gram. Se efectuaron observaciones bajo un microscopio óptico OLYMPUS BX41 para clasificarlas según su morfología y tinción, y se obtuvieron fotografías de cada una de las bacterias.

f. Pruebas para verificar la presencia de *P. fluorescens*

Api 20E

Se realizaron pruebas de Api 20E para las placas que presentaron una clara emisión de fluorescencia y que mostraron una morfología de bacilos Gram negativas. Las placas seleccionadas fueron nuevamente subcultivadas ya que para realizar las pruebas era necesario que las bacterias tuvieran entre 18 a 24 horas de crecimiento. El procedimiento realizado se basó en el manual de referencia de la casa comercial bioMérieux® S.A. (Anexo 1).

La prueba de oxidasa fue efectuada con tiras de papel que contienen este reactivo y que al entrar en contacto con la colonia, si la tira cambiaba a color azul-morado se establecía que la bacteria era oxidasa positiva, por el contrario si no variaba de coloración la bacteria se consideraba oxidasa negativa.





Figura 4.4 Prueba Api 20E para la identificación de *P. fluorescens*.

VITEK

Aquellas bacterias cuyo perfil numérico resultó positivo para *P. fluorescens* fueron llevadas al laboratorio de Bacteriología Médica de la Universidad de Costa Rica, donde se realizó la identificación de los aislamientos utilizando el sistema VITEK®.

g. Pruebas de antagonismo

Se evaluaron dos pruebas de antagonismo para verificar el efecto biocontrolador de las tres cepas aisladas, correspondientes a *P. fluorescens*, sobre *F. oxysporum* y *F. moniliforme*. A cada cepa se le asignó una codificación para ser diferenciada y todas se aislaron de las muestras de suelo:

- Cepa aislada de la plantación 1, de la dilución 10^{-5} : PsF1.
- Cepa aislada de la plantación 2, de la dilución 10^{-4} : PsF2.
- Cepa aislada de la plantación 3, de la dilución 10^{-4} : PsF3.



Para iniciar ambos ensayos, se realizó la purificación de las dos cepas de hongos proporcionadas por el INA. Para esto se subcultivaron dos veces en medio Agar Papa Dextrosa Sharlau Microbiology acidificado (1ml de ácido cítrico al 1% por cada 100ml de medio) y se incubaron por 6 días a 28° C a una humedad relativa del 80% y a un fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

Primera prueba de antagonismo

Se realizó siguiendo la metodología empleada por Trujillo y colaboradores (2007), la cual se describe a continuación:

En placas con medio PDA se realizó un rayado de la bacteria. En otra placa de PDA con el hongo previamente crecido se efectuaron perforaciones en la parte central de la colonia utilizando un sacabocados de 5mm. Se tomó un disco de la cepa fúngica y se colocó en el centro de la placa de PDA inoculada con la bacteria. Se hicieron cinco repeticiones por hongo. Las placas se incubaron a 28° C por 8 días. También se preparó un testigo que únicamente contenía el disco del hongo sin la bacteria.

El efecto antagónico de la bacteria se determinó a través de las mediciones del diámetro de crecimiento del hongo (cm) en comparación con el testigo. Este procedimiento se efectuó con las tres cepas bacterianas aisladas.



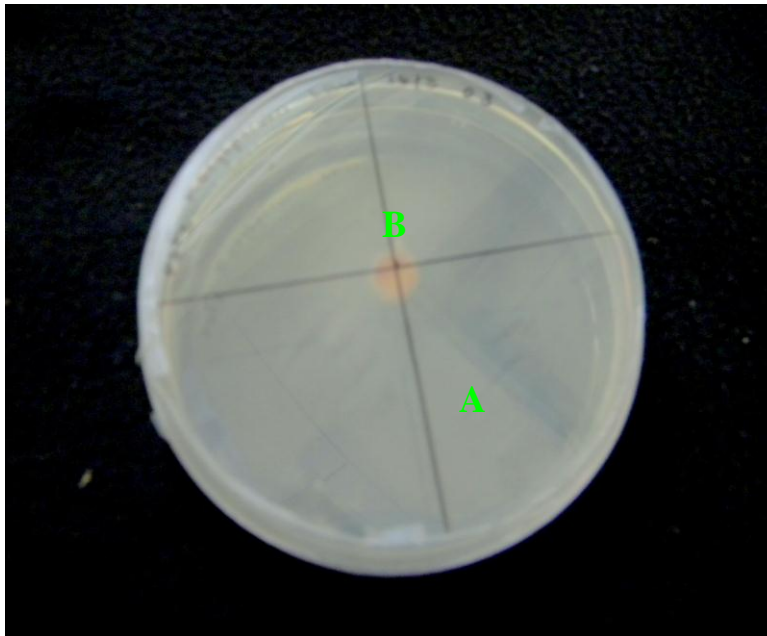


Figura 4.5 Primera prueba de antagonismo. A. cepa bacteria, B. disco del hongo.

Segunda prueba de antagonismo

Se colocaron las tres cepas bacterianas en el borde de la caja Petri de tal forma que cada asada tuviera una longitud de 3cm de largo. En el centro, del otro lado de la placa, se colocó un disco del hongo. Este procedimiento se realizó con *F. oxysporum* y *F. moniliforme*, 10 repeticiones por cada hongo, y se preparó testigo de las cepas de los hongos y de las cepas bacterianas. Se incubaron a 28° C a una humedad relativa del 80% por 8 días a un fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad. El efecto antagónico de la bacteria se determinó a través de las mediciones del diámetro de crecimiento del hongo (cm) en comparación con el testigo.



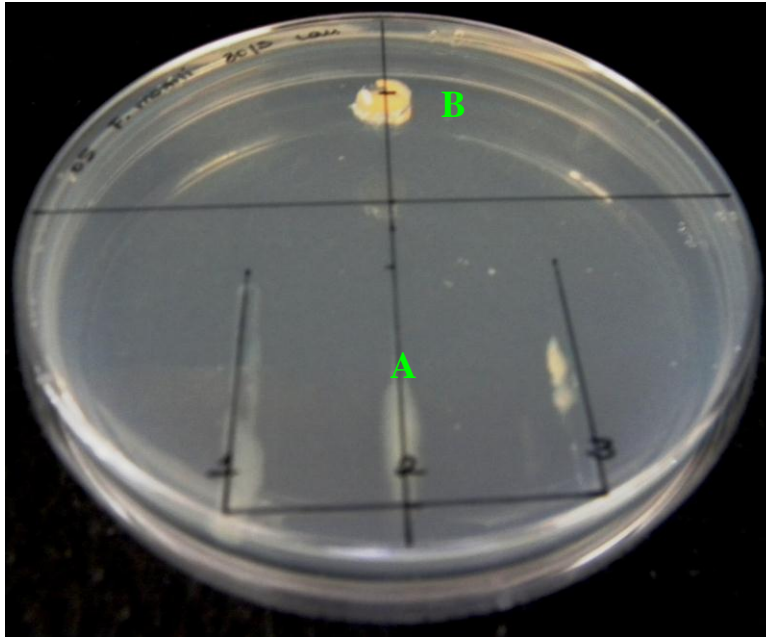


Figura 4.6 Segunda prueba de antagonismo. A. cepas bacterianas, B. disco del hongo. Los números indican la cepa bacteriana: el 1 corresponde a la PsF1, el 2 a la PsF2 y el 3 a la PsF3.

Análisis de los datos

Porcentaje de inhibición

Para determinar el porcentaje de inhibición de la bacteria sobre el hongo se utilizó la siguiente fórmula en ambas pruebas (Venner *et al*, 2009).

$$\% \text{Inhibición} = \frac{\text{crecimiento libre} - \text{crecimiento influenciado}}{\text{crecimiento influenciado}} \times 100$$



Análisis estadístico

Para la prueba 1 se realizó un análisis de varianza con el programa estadístico Statistix para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los tratamientos aplicados sobre cada hongo.

h. Pruebas de compatibilidad a fungicidas.

Dilución del fungicida en el medio de cultivo (Sharvelle 1961 citado por Quintero, 1997).

- Se evaluaron tres fungicidas: Previcur®, Crizeb® y Amistar® 50WG.
- Para realizar la prueba se calculó la cantidad de gramos o ml necesarios de cada fungicida para preparar 400ml de solución según la dosis comercial de cada producto:

Tabla 4. 2. Información general de los fungicidas evaluados

Nombre comercial	Ingrediente activo	Modo de acción	Dosis comercial por litro de agua	Dosis requerida para preparar 400 ml
Previcur® N 722 SL	Propamocarb-HCl	Sistémico, ataca hongos que causan daño en raíces, cuello, base del tallo y hojas. Controla <i>Fusarium sp.</i>	5ml	2ml
Crizeb™ 50 SC	Carbendazim	Sistémico de amplio espectro, controla <i>Fusarium oxysporum</i>	5ml	2ml
Amistar®50 WG	Azoxistrobin 50.00%;	Sistémico, controla gran variedad de hongos, entre ellos <i>Fusarium sp</i>	0,3g	0,1g



- Se prepararon 1200ml de Agar nutritivo Difco TM con el doble de los ingredientes requeridos y se dispensaron 400ml en tres erlenmeyer. Se autoclavaron por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión.
- Para el caso de los fungicidas líquidos, estos se esterilizaron utilizando filtros miliporo de 0,22 µm y se agregaron al medio de cultivo. El fungicida sólido se agregó directamente, sin ninguna esterilización previa.
- Se realizó un rayado de cada cepa bacteriana en los medios de cultivo preparados, obteniéndose 4 repeticiones por fungicida.
- Se realizó un rayado de cada cepa bacteriana en Agar nutritivo Difco TM sin la adición de ninguno de los fungicidas que sirvió como testigo.
- Las bacterias se incubaron a 28° C por 24 horas y se realizaron observaciones del crecimiento en los tres tratamientos.



Capítulo V. RESULTADOS

I. Trabajo en laboratorio

a. Medición de pH

Los siguientes datos corresponden a los resultados obtenidos al realizar las mediciones de pH de las muestras de suelo colectadas en cada plantación

Tabla 5.1 Mediciones de pH del suelo de cada plantación muestreada

Zona de muestreo	PH
Plantación 1	5,60
Plantación 2	5,30
Plantación 3	5,72

Según el Soil Survey Division Staff, 1993 (citado por Zapata, 2002) los suelos se clasifican de varias maneras según su valor de pH (Anexo 2).

De acuerdo a su acidez el suelo de las plantaciones 1 y 3 se puede clasificar dentro del rango de un suelo moderadamente ácido. En la plantación 2 se estaría en presencia de un suelo fuertemente ácido.

P. fluorescens crece mayormente en condiciones de pH neutras y se inhibe a condiciones de acidez menores a 4,5 en suelos que son ultra y extremadamente ácidos (Zapata, 2002).



b. Aislamiento primario

Muestras de suelo

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de fluorescencia realizadas a las bacterias aisladas en suelo, se efectuaron tres repeticiones por dilución.

Tabla 5.2 Emisión de fluorescencia de las bacterias aisladas en las muestras de suelo.

Zona de muestreo	Plantación 1		Plantación 2		Plantación 3	
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Observaciones	En las tres placas se observó fluorescencia mayormente en la “1”	En las tres placas se observó fluorescencia	En las tres placas se observó fluorescencia	En las tres placas se observó fluorescencia mayormente en la “2” y “3”	En las tres placas se observó fluorescencia	Muy poca fluorescencia mayormente la “1”.

En la siguiente figura se observan dos bacterias aisladas de las plantaciones 1 y 2 que emitieron fluorescencia al ser sometidas a luz UV.

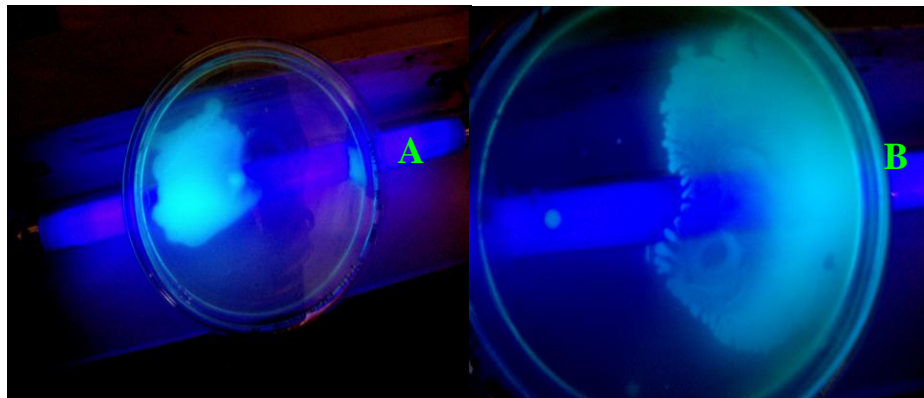


Figura 5.1 Emisión de fluorescencia bacterias aisladas de suelo. A. muestra de suelo plantación 1; B. muestra de suelo plantación 2.



Muestras de raíz

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de fluorescencia realizadas a las bacterias aisladas en raíz, se efectuaron tres repeticiones por plantación.

Tabla 5.3 Emisión de fluorescencia de las bacterias aisladas en las muestras de raíz en *Solanum tuberosum*

Zona de muestreo	Plantación 1	Plantación 2	Plantación 3
Observaciones	Únicamente las placas “2” y “3” emitieron fluorescencia.	En las tres placas se observó fluorescencia.	Muy poca fluorescencia. Mayormente la placa “3”.

Se observaron morfologías diferentes en las bacterias que se desarrollaron dentro de las placas de Petri alrededor del tejido radical de *Solanum tuberosum*.

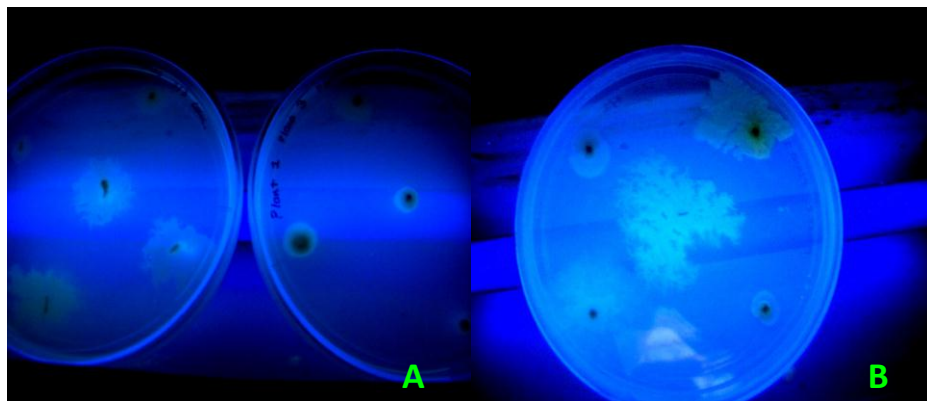


Figura 5.2. Emisión de fluorescencia bacterias aisladas de raíz de *Solanum tuberosum* A. muestra de raíz plantación 1; B. muestra de raíz plantación 2.



c. Aislamiento secundario

Las placas seleccionadas y subcultivadas en agar nutritivo, principalmente las correspondientes a las muestras de tejido radical, presentaron morfologías de la colonia muy diferentes entre sí. Fue posible evidenciar 4 tipos de morfología en las colonias bacterianas dentro de las plantaciones 1 y 2 de las muestras radicales. De la plantación 3 se obtuvo muy poco desarrollo bacteriano alrededor del tejido, lo que dificultó la obtención de colonias. Por esta razón no fueron tomadas en cuenta.

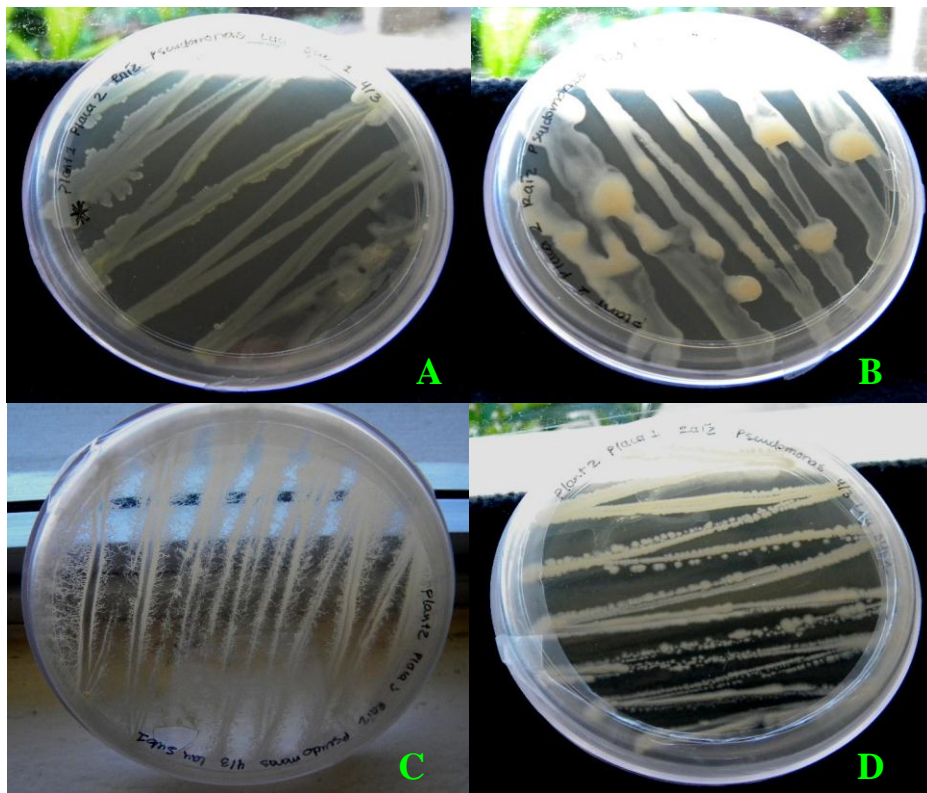


Figura 5. 3 Diferentes morfologías de colonias encontradas en las muestras de raíz A. plantación 1; B. C. y D. plantación 2.



d. Tinción de Gram

Se obtuvieron 14 placas, tanto de las muestras de raíz como de las muestras de suelo, que presentaron tinción Gram negativa y morfología de bacilos. Estas bacterias se almacenaron para ser analizadas posteriormente.

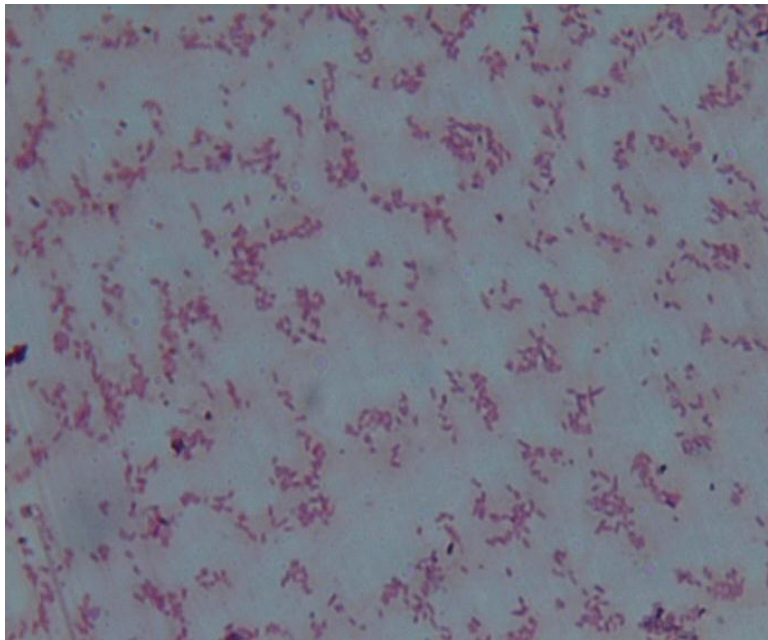


Figura 5.4 Tinción bacteriana, bacilos Gram negativos. 100x



e. Pruebas para verificar la presencia de *P. fluorescens*

Api 20E

Se analizaron las 14 placas seleccionadas por su emisión de fluorescencia y crecimiento. De estas únicamente 3 resultaron con un perfil numérico el cual indicaba que la bacteria podía corresponder al género *Pseudomonas*. Estas bacterias fueron aisladas dentro de la plantación 1 bajo una dilución de 10^{-5} , plantación 2 bajo una dilución de 10^{-4} y plantación 3 bajo una dilución de 10^{-4} (Anexo 3). Las otras 11 placas analizadas restantes resultaron en otros géneros bacterianos.

VITEK

Las tres cepas bacterianas cuyos perfiles numéricos indicaban que se podía estar bajo la presencia de *Pseudomonas* fueron analizadas con el sistema VITEK® dando como resultado que las tres cepas correspondían a la especie *P. fluorescens* (Anexo 4)

Además, durante el análisis se evidenció el crecimiento de cepas de *B. cereus* en los aislamientos.

f. Pruebas de antagonismo

Primera prueba de antagonismo

Después de 8 días de incubación se observaron diferencias de crecimiento entre cada uno de los tratamientos realizados (Anexo 5). En la tabla 5.4 y la figura 5.5 se muestran los porcentajes de inhibición por parte de las tres cepas de *P. fluorescens* aisladas sobre los dos hongos evaluados.



Tabla 5.4 Efecto inhibitorio de *P. fluorescens*, primera prueba de antagonismo.

Cepa bacteriana	Hongo	% Inhibición
PsF1	<i>F. oxysporum</i>	39.67
	<i>F. moniliforme</i>	10.94
PsF2	<i>F. oxysporum</i>	28.71
	<i>F. moniliforme</i>	17.47
PsF3	<i>F. oxysporum</i>	5.29
	<i>F. moniliforme</i>	10.79

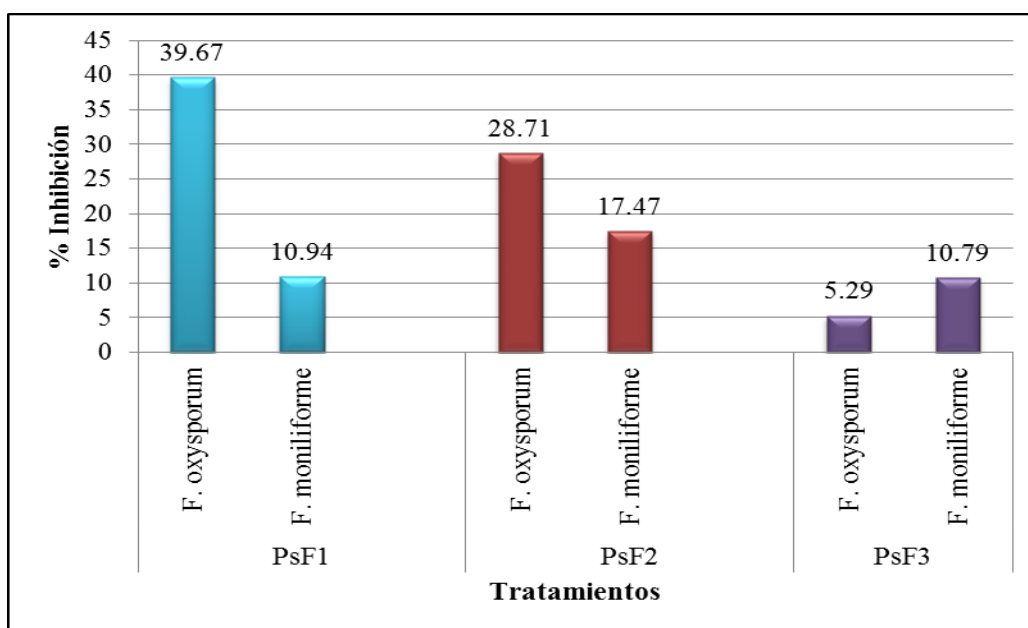


Figura 5.5 Inhibición de *P. fluorescens* sobre dos especies de *Fusarium* sp

Se puede observar que el mayor porcentaje de inhibición de la cepa PsF1 resultó sobre *F. oxysporum*. Para la cepa PsF2 de igual manera la mayor inhibición se generó sobre *F. oxysporum* y en el caso de la cepa PsF3 hubo una mayor inhibición sobre *F. moniliforme* sin embargo la diferencia con *F. oxysporum* fue muy pequeña.



Analizando las tres cepas en conjunto se puede establecer que la que tiene mayor efecto inhibitorio sobre *F. oxysporum* corresponde a la PsF1, y la que inhibe mayormente a *F. moniliforme* es la PsF2.

Se obtuvieron fotografías de los resultados obtenidos donde fue posible observar las diferencias de crecimiento entre cada una de las repeticiones en comparación con el testigo (figura 5.6 y figura 5.7)

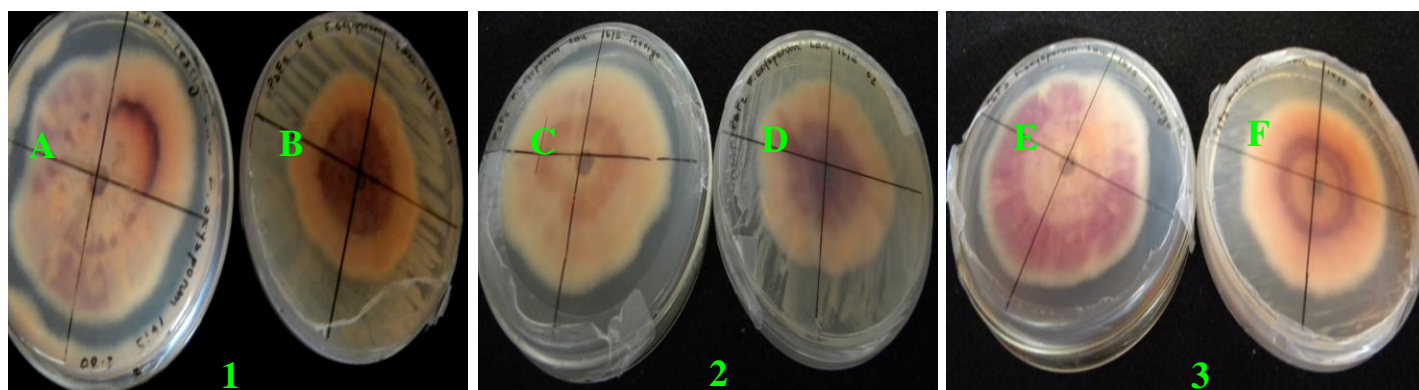


Figura 5.6 Inhibición de *P. fluorescens* sobre *F. oxysporum*, primera prueba de antagonismo 1. Tratamiento PsF1, A. Testigo, B. *F. oxysporum*; 2. Tratamiento PsF2, C. Testigo, D. *F. oxysporum*; 3. Tratamiento PsF3, E. Testigo, F. *F.oxysporum*.

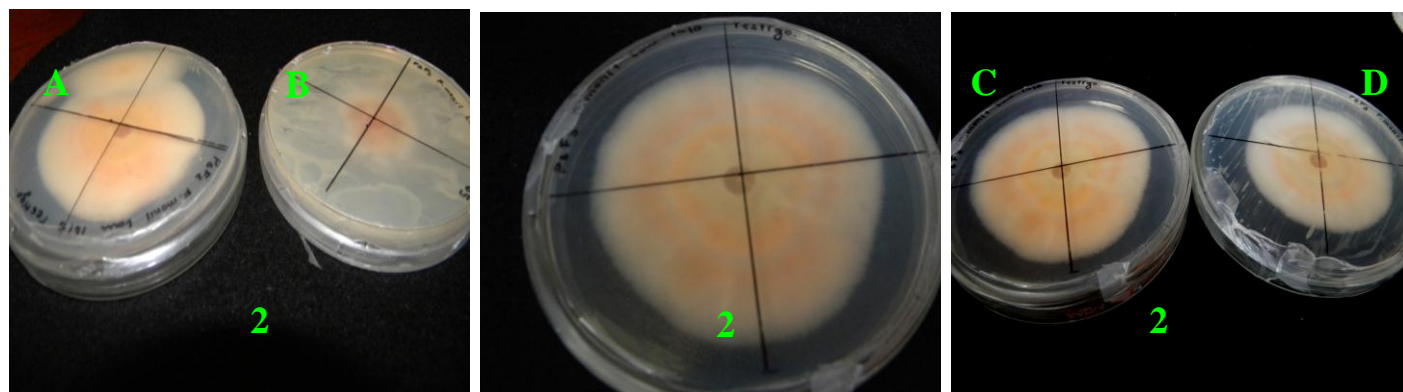


Figura 5.7 Inhibición de *P. fluorescens* sobre *F. moniliforme*, primera prueba de antagonismo 1. Tratamiento PsF2, A. Testigo, B. *F. moniliforme*; 2. Tratamiento PsF3, C y D, Testigo, E. *F. moniliforme*.



Análisis estadístico ANOVA

En ninguno de los tratamientos se encontraron diferencias significativas ya que tanto en la prueba frente a *F. oxysporum* ($p=0,2290$) como en la de *F. moniliforme* ($p=0,6178$) el grado de significancia resultó mayor a 0,05 lo que indica que las medias obtenidas en los diferentes tratamientos fueron muy similares (Anexo 6). Esto biológicamente se traduce en que las tres cepas bacterianas, a pesar de que fueron aisladas en diferentes plantaciones de papa, tienen un efecto inhibitorio muy similar sobre el crecimiento de *F. oxysporum* y *F. moniliforme*.

Segunda prueba de antagonismo

Después de 8 días de incubación se obtuvieron diferencias de crecimiento entre ambos hongos (Anexo 5). Los siguientes resultados muestran el porcentaje de inhibición por parte de las tres cepas bacterianas sobre *F. oxysporum* y *F. moniliforme* (tabla 5.5 y figura 5.8).

Tabla 5.5 Efecto inhibitorio de *P. fluorescens*, segunda prueba de antagonismo

Cepa bacteriana	Hongo	% Inhibición
PsF1, PsF2, PsF3	<i>F. oxysporum</i>	21.33
	<i>F. moniliforme</i>	24.35



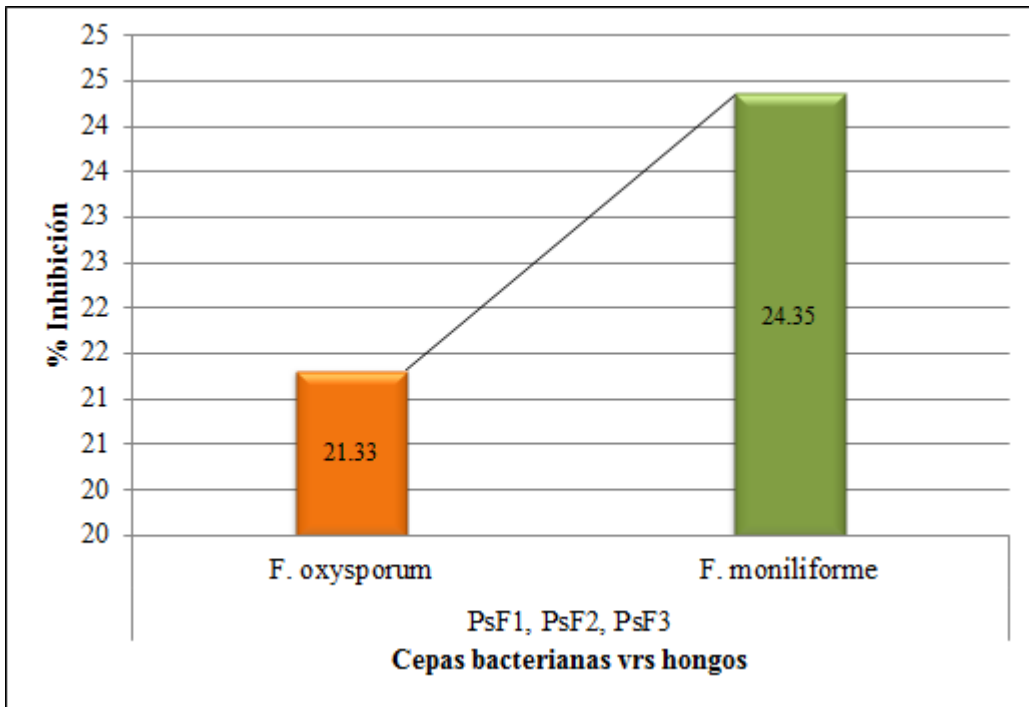


Figura 5.8 Inhibición de *P. fluorescens* sobre dos especies de *Fusarium* sp.

El mayor porcentaje de inhibición por parte de las tres cepas se obtuvo sobre *F. moniliforme* con una diferencia mínima al obtenido sobre *F. oxysporum*.

A partir del día 4 fue posible observar que el crecimiento del hongo ya no era simétrico sino que tendía a crecer más hacia los lados (figura 5.9).



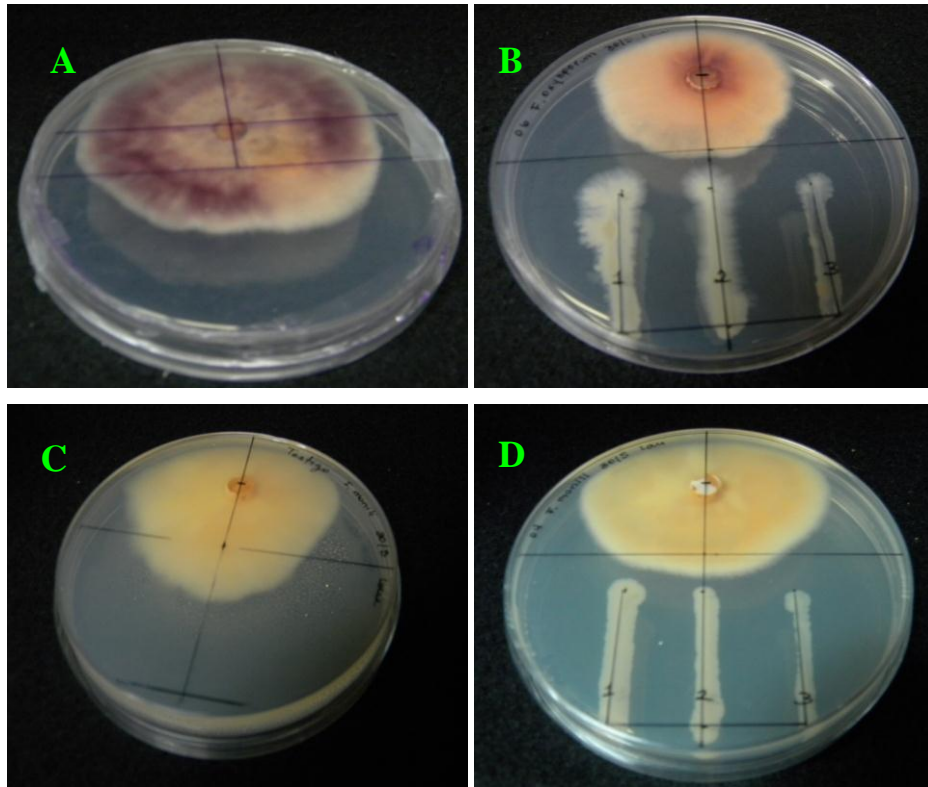


Figura 5. 9 Inhibición de *P. fluorescens*, segunda prueba de antagonismo. A. Testigo *F. oxysporum*, B. *F. oxysporum* vrs PsF1, PsF2 y PsF3, C. Testigo *F. moniliforme*, D. *F. moniliforme* vrs PsF1, PsF2 y PsF3.

g. Prueba de compatibilidad a fungicidas.

En los tres tratamientos se observó un crecimiento confluyente y muy similar de las cepas bacterianas en todo el medio de cultivo. No se observó en ninguno de los casos inhibición del crecimiento bacteriano por los fungicidas utilizados en la prueba.



Capítulo VI. DISCUSIÓN

I. Trabajo en laboratorio

a. Aislamiento primario

Se obtuvieron buenos resultados únicamente a partir de las muestras de suelo ya que de las muestras de raíz no se logró el aislamiento de ninguna cepa correspondiente a *P. fluorescens* a pesar de que esta es rizosférica. Una de las razones de porqué se obtuvieron estos resultados puede estar vinculado con que las semillas utilizadas en estas plantaciones pudieron ser sometidas a un proceso de curado o que el suelo de siembra se trató con agroquímicos (fungicidas, bactericidas o nematicidas).

Las cepas obtenidas de las muestras de suelo presentaron mayor emisión de fluorescencia, lo que es característico de varias especies dentro del género *Pseudomonas*. Estas fueron cultivadas en Agar *Pseudomonas* F (King B) ya que su composición permite la producción de un pigmento verde-amarillo (fluoresceína), lo que permite a las colonias crecidas ser observadas bajo luz UV. En este medio pueden producir fluoresceína tres especies: *P. aeuruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida*.

b. Aislamiento secundario

Los resultados obtenidos en las muestras de raíz evidenciaron bacterias con morfologías muy diferentes entre sí, al ser observadas se iba teniendo sospecha de que estas bacterias no pertenecían al género *Pseudomonas* ya que estas últimas presentan una morfología circular, con borde entero y elevación convexa.



c. Pruebas para verificar la presencia de *P. fluorescens*

Para determinar las especies existentes, se aplicó la prueba Api 20E obteniéndose una alta probabilidad de que la bacteria correspondiera a *P. fluorescens*. Como prueba confirmatoria se utilizó el sistema automatizado VITEK con la cual se obtuvo que las tres cepas correspondían a *P. fluorescens*.

Api 20E

Este un sistema estandarizado que permite la identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos. Incluye 21 tests bioquímicos miniaturizados; cada microtubo contiene un substrato deshidratado y este se inocula con la suspensión bacteriana. Las reacciones producidas se traducen en cambios de colores espontáneos o revelados por la adición de reactivos (bioMérieux® S.A, 2006).

VITEK

El sistema VITEK es utilizado en el ámbito de microbiología clínica y controles industriales. Al ser un sistema automatizado aporta mayor seguridad, suprimiendo las manipulaciones repetidas, y permite obtener resultados fiables más rápidamente que con las técnicas manuales. Está constituido por un inoculador/sellador, un incubador/lector, un ordenador y una impresora. El inoculador/sellador permite la inoculación de las tarjetas en pocos minutos. El incubador/lector asegura simultáneamente la incubación y la lectura de las tarjetas para una capacidad que varía de 32 a 480 tarjetas según el modelo. El ordenador equipado con los programas de VITEK efectúa un control permanente de las operaciones en curso, memoriza los valores, trata e interpreta los resultados (bioMérieux® S.A, 2006).



d. Pruebas de antagonismo

Los resultados obtenidos en ambas pruebas demostraron que las cepas bacterianas de *P. fluorescens* aisladas de las diferentes plantaciones de papa suprimen el crecimiento de los hongos *F. oxysporum* y *F. moniliforme*, observándose diferentes porcentajes de inhibición en cada uno de los tratamientos evaluados.

La cepa PsF1 ejerció un mayor efecto inhibitorio sobre *F. oxysporum* (39,67%). En el caso de la PsF2, resultó en la mayor inhibición de *F. moniliforme* (17,47%). La cepa PsF3 presentó los porcentajes de inhibición más bajos para ambos hongos.

A pesar de las variaciones en los porcentajes de inhibición no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que se establece que las tres cepas bacterianas ejercen un efecto muy similar sobre el crecimiento de estas dos especies de hongos.

Estudios anteriores realizados con diferentes cepas bacterianas de esta especie sobre *F. oxysporum* dieron resultados similares a los obtenidos, ya que se identificaron otras cepas que inhibían entre un 20-40%, sin embargo también se logró aislar cepas que inhibían hasta casi un 100% el crecimiento de este hongo. Estos resultados pudieron variar con respecto a los obtenidos en este ensayo, ya que las cepas fueron incubadas con 48 horas de anterioridad lo que iba a permitir que estas produjeran metabolitos antes de la inoculación de los patógenos y en el momento de inocular estos últimos, ya existiría una barrera de inhibición que impediría el crecimiento del mismo (Trujillo *et al*, 2009). Por el contrario, en esta investigación las bacterias fueron incubadas de forma inmediata luego de montar la prueba.



La capacidad inhibitoria de estas cepas podría estar relacionada con la producción de antibióticos. Trujillo *et al* (2009) señalan que bacterias *Pseudomonas* son capaces de suprimir organismos patógenos presentes en la rizósfera a través de la producción de 2,4 dimetilfluroglucinol, ácido cianhídrico, pirrolnitrina, fenazina, antibióticos difusivos y sideróforos. La producción de este último metabolito es influenciado por la baja cantidad de hierro y estudios posteriores en Cuba han demostrado que en medios King B (Agar *Pseudomonas* F) bacterias autóctonas de esta especie comienzan la producción de este metabolito a las 10 horas de ser cultivadas (Trujillo *et al*, 2009). Existe una fuerte sospecha de que la síntesis de este metabolito es el responsable de la acción antifúngica ya que estudios realizados con cepas mutantes incapaces de producir sideróforos han resultado incompetentes para suprimir el crecimiento de ciertos patógenos. Además de su capacidad para producir metabolitos que inhiben a organismos patógenos se han realizado pruebas a través de las cuales se cree que esta bacteria tiene la capacidad de inducir resistencia en las plantas (Santoyo *et al*, 2009).

Los bajos porcentajes de inhibición obtenidos en este ensayo también pudieron ser el resultado de utilizar medio PDA para realizar las pruebas de antagonismo ya que este medio, gracias a su complejidad, puede contener trazas de hierro que impiden la producción de sideróforos y por lo tanto, de ser este el mecanismo utilizado por la cepa, no se logró suprimir efectivamente al patógeno (Venner *et al*, 2009).

En cultivos de papa se han aislado cepas con una alta capacidad de síntesis de sideróforos del tipo pseudobactina. Cuando este metabolito es excretado al medio de cultivo se une al hierro y lo suministra a la célula bacteriana. En microambientes como la rizósfera la síntesis de sideróforos le confiere una ventaja competitiva por espacio y nutrientes a la bacteria lo que se traduce en una restricción de organismos dañinos (Santoyo *et al*, 2009).

En cultivos de maíz y arroz también se han realizado aislamientos de bacterias antagónicas como *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. cepacia* que han resultado en un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. moniliforme* (Hebbar *et al*, 1992).



Pruebas de antagonismo realizadas en medio PDA con cepas de *P. fluorescens* aisladas en plantaciones de arroz resultaron en altos porcentajes de inhibición (60-70%) contrario a los resultados obtenidos en este ensayo que resultaron en porcentajes menores (10-17%). La acción supresora de la bacteria se atribuyó a la producción de antibióticos, principalmente de fenazina, y su difusión por el medio de cultivo (Kazempour *et al*, 2009).

Los resultados obtenidos en la prueba 2 de antagonismo evidenciaron una mayor inhibición de las tres cepas bacterianas (en conjunto) sobre *F. moniliforme*, sin embargo la diferencia con relación al porcentaje de inhibición sobre *F. oxysporum* fue muy pequeña (alrededor de un 3%).

e. Prueba de compatibilidad a fungicidas

Se obtuvieron resultados muy similares en los tres tratamientos evaluados. El crecimiento de la bacteria fue confluyente en todo el medio de cultivo y gracias a su textura lechosa no fue posible realizar un conteo de las colonias, pero quedó ampliamente evidenciada la compatibilidad de las bacterias aisladas con cada uno de los compuestos evaluados.

Se puede establecer que los fungicidas: Previcur® N 722 SL, Crizeb™ 50 SC, Amistar®50 WG podrían ser utilizados en conjunto con esta cepa bacteriana ya que no lograron inhibir el crecimiento de las mismas, sin embargo son necesarias más pruebas para poder confirmar la resistencia de estas cepas.

Estudios realizados sobre el control de *Phythium ultimum* donde se evaluaron tres tratamientos: Previcur® N, cepas de *P. fluorescens* y una combinación de ambos; dieron resultados satisfactorios al aplicar el manejo integrado superando el efecto por parte de la dosis comercial del fungicida (Vicente, 2003).



Capítulo VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

A pesar de que *P. fluorescens* es una bacteria rizosférica no se obtuvieron resultados satisfactorios en el aislamiento de esta en las muestras de raíz, posiblemente porque en las plantaciones muestreadas, las semillas de papa utilizadas o el suelo han sido tratados con fungicidas, bactericidas o nematicidas.

Las tres cepas aisladas de *P. fluorescens* evidenciaron un efecto inhibitorio sobre las dos especies de hongos al observar diferencias de crecimiento en el diámetro de cada repetición en comparación con el testigo en la prueba 2 de antagonismo. De las tres cepas PsF1 inhibió mayormente a *F. oxysporum* (39, 67%) y PsF2 a *F. moniliforme* (17, 47%).

No se obtuvieron diferencias significativas entre las medias de los diferentes tratamientos al realizar la prueba 1 de antagonismo entre las tres cepas aisladas contra *F. oxysporum* y *F. moniliforme*, por lo que se concluye que tienen el mismo efecto inhibitorio sobre los hongos evaluados.

En comparación con otros estudios realizados donde se lograron porcentajes de inhibición hasta casi del 100%, los porcentajes obtenidos resultaron bajos. Esto podría atribuirse al medio de cultivo utilizado para realizar las pruebas (PDA), ya que este debido a su composición puede generar cambios en los mecanismos utilizados por *P. fluorescens* contra estos patógenos.

Ninguno de los fungicidas valorados inhibieron el crecimiento de las tres cepas aisladas por lo tanto es posible utilizarlos como un manejo integrado contra *Fusarium* sp, sin embargo se deben realizar más pruebas confirmatorias.



RECOMENDACIONES

Para obtener mejores resultados sobre aislamientos de esta cepa, con el objetivo de probar su eficiencia antagonista, es preferible realizar muestreos en lugares donde se tenga conocimiento previo de qué tipo de aplicaciones químicas le han proporcionado al cultivo.

Las pruebas de antagonismo deben realizarse cuidadosamente, en especial durante la siembra del hongo al medio de cultivo ya que se deben evitar el esparcimiento de esporas para que no se invalide la prueba.

Es recomendable utilizar medios que tengan bajo contenido de hierro al realizar pruebas de antagonismo que involucren cepas de *P. fluorecens* ya que estudios realizados han determinado que es más eficiente cuando no hay presencia de este metal en el medio donde se encuentra.

Es necesario realizar más pruebas con relación a la compatibilidad que presenta esta bacteria frente a diferentes fungicidas utilizados para el control de *Fusarium sp* evaluando diferentes concentraciones del químico.

Se podrían realizar más pruebas para determinar cuál de estos tres fungicidas presentan mayor compatibilidad con las cepas aisladas.



Capítulo VIII. BIBLIOGRAFÍA

BERNAIL, A; MARTINEZ, I; DÍAZ, M; HERRERA L; MARTÍNEZ, B. s.f. Utilización de bacterias antagonistas como alternativa ecológica en el control de patógenos fúngicos foliares en tomate bajo cultivo protegido. Revista del ministerio de educación superior de Cuba. 34(3): 37-40.

BIOMÉRIEUX® S.A. 2006. Manual de empleo Api 20E. Francia.

BRAVO, L; BERMUDEZ, K; MONTES, R. 2000. Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. Revista Manejo integrado de plagas, Costa Rica. N° 57.

CASTRO, S; CUADRADO, G. 2009. Costa Rica: La expansión del monocultivo de piña en detrimento de los derechos humanos (en línea). Globalhoy n°22. Consultado 28 mayo. 2011. Disponible en http://www.gloobal.net/iepala/gloobal/fichas/ficha.php?entidad=Textos&id=11541&opción=documento#ficha_gloobal.

CHÁVEZ, N. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (cobb) Thorn. Tesis Magister Scientiae en Agricultura Ecológica, Turrialba, CR. 98p.

FERNÁNDEZ, O; VEGA, L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integrado de plagas. 62: 96-100.

GARCÉS DE GRANADA, E; OROZCO DE AMEZQUITA, M; BAUTISTA, G; VALENCIA, H. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta biológica Colombiana. 1(6): 7-25.

HERBAR, K; DAVEY, A; DART, P. 1992. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: Isolation and identification. *Soil Biology and Biochemistry*. 24(10): 979-987.

HERNANDEZ, A; BAUTISTA, S; VELAZQUEZ DEL VALLE, M; HERNANDEZ, A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología, A.C.* 001 (25): 66-74.

HUMERES, C. 2004. Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativa de *Trichoderma spp.* Sobre aislados de hongos basidiomicetes asociados a la muerte de brazos en Kiwi. Tesis Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile. 43p.

INTA. 2002. Enfermedades y plagas en maíz (en línea). Buenos Aires, Argentina. Consultado 30 marzo. 2011. Disponible en [http://www.inta.gov.ar/barrow/images/fotos_cultivos_nati/maíz/enfermedades_maiz/Fusariosis%20en%20espiga%20\(Fusarium%20moniliforme\).jpg](http://www.inta.gov.ar/barrow/images/fotos_cultivos_nati/maíz/enfermedades_maiz/Fusariosis%20en%20espiga%20(Fusarium%20moniliforme).jpg)

KAZEMPOUR, M; ANVARY, M. 2009. Cloning of phenazine carboxylic acid genes of *Fusarium moniliforme* antagonists bacteria in *Echerichia coli* DH5 α . *Agricultura Trópica et Subtrópica*. 42(4): 157-161.

LEEMAN, M; VAN PELT, A; DEN OUDEN, M; HEINSBROEK, R; BAKKER, M; SCHIPPERS, B. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to Fusarium wilt, using a novel bioassay. *European Journal of Plant Pathology*. 101: 655-664.

LEEMAN, M; VAN PELT, A; DEN OUDEN, M; CORNELISSEN, A; MATAMALA, P; BAKKER, A; SCHIPPERS, B. 1996. Suppression of fusarium wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas spp.* and root-colonizing fungi. . *European Journal of Plant Pathology*. 102: 21-31.

- MAG, MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA. DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN AGRÍCOLA. 1991. Aspectos técnicos sobre 45 cultivos agrícolas de Costa Rica, San José, Costa Rica. 560 p.
- MONZÓN, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en . Nicaragua. Manejo integrado de plagas. 63: 95-103.
- OYOQUE, G. 2008. Inducción de resistencia en jitomate (*Solanum lycopersicum*. L) con extractos de bacterias patógenas. Tesis Maestro en ciencias en producción agrícola sustentable. Jiquilpan, Michoacán. 64p.
- PAL, K; GARDENER, B. 2006. Biological control of plant pathogens. (en línea). The Plant health instructor. Consultado 16 dic. 2010. Disponible en <http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Documents/PHI-BiologicalControl.pdf>.
- PEROTTI, E; MENÉNDEZ, L; GAIA, O; PIDELLO, A. 2005. Supervivencia de *Pseudomonas fluorescens* en suelos con diferente contenido de materia orgánica. Revista Argentina de microbiología. 37: 102-105.
- PORRAS, A. 2000. Evaluación de la actividad *in vitro* del género *Hypocrea* contra 2 hongos fitopatógenos de importancia agrícola (*Fusarium sp* y *Mycena citricolor*). Tesis para optar por el bachillerato en Biotecnología. Cartago, Costa Rica. 97p.
- QUINTERO, E; URDANETA, L. 1997. Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control del hongo *Macrophoma sp.*, agente causal de la pudrición apical del fruto del Guayabo (*Psidium guajava* L). Revista Facultad de Agronomía (Luz). 14:233-244.

- RAMÍREZ, F; CHAVERRI, F; DE LA CRUZ, E; WESSELING, C; CASTILLO, L; BRAVO, V. 2009. Importación de plaguicidas en Costa Rica Periodo 1977-2006 (en línea). Serie informes técnicos IRET. Consultado 30 marzo. 2011. Disponible en <http://cep.unep.org/repcar/monitoreo-costero/costa-rica/informes-de-costa-rica-1/importacion-de-plaguicidas-en-costa-rica>.
- RODRIGO, A. 2005. Control biológico de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *fusarium solani* en tomates bajo invernaderos (en línea). Facultad de Ciencias agronómicas, Universidad de Chile. Consultado 30 marzo. 2011. Disponible en http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/14.html.
- SANTOYO, G, VALENCIA, E, OROZCO, M; PEÑA, J; FARIAS, R. 2009. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* zum80 hacia hongos fitopatógenos. Terra Latinoamericana. 28: 53-60.
- SANZ, J; PRATT, L; PÉREZ, M. 1997. Uso de los plaguicidas en la Agroindustria de Costa Rica (en línea). INCAE. Consultado 30 abril. 2011. Disponible en <http://www.incae.edu/es/clacds/publicaciones/pdf/cen708.pdf>
- TRUJILLO, I; DÍAZ, A; HERNÁNDEZ, A; HEYDRICH, M. 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. Revista protección vegetal. 22 (1): 41-46.
- VENNER, C; MARTIN, M. 2009. Aislamiento y selección de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*physalis peruviana* l.) con capacidad antagónica frente a *fusarium* sp. Trabajo de grado para optar al título de microbiólogo agrícola y veterinario y microbiólogo industrial. Bogotá, Colombia. 61p.

VICENTE, 2003. Control integrado de *Pythium ultimum* en semillas de pepino. (en línea). Ciudad Real, España. Consultado 13 de junio. 2011. Disponible en <http://www.uclm.es/profesorado/porrasysoriano/trabajos/MercedesVicente.pps>.

WESSELING, C; ARAGÓN,A; CASTILLO, L; CORRIOLS, M; CHAVERRI, F; CRUZ,E; KEIFER, M; MONGE, P; PARTANEN, T; RUEPERT, C; VAN WENDEL, B. 2003. Consideraciones sobre plaguicidas peligrosos en América Latina. Manejo integrado de plagas y agroecología. 68: 7-18.

ZAPATA, R. 2002. Química de la acidez del suelo (en línea). Consultado 26 mayo. 2011. Disponible en <http://www.bdigital.unal.edu.co/1735/7/9583367125.7.pdf>.



Capítulo IX. ANEXOS

Anexo 1. Api 20E: Modo de empleo

Preparación del inóculo.

- Se preparó solución salina al 0,85% (15 tubos de ensayo con 5 ml cada uno).
- Con un asa bacteriológica se tomó una colonia de cultivo bacteriano a la cual se le realizaría la prueba Api 20E. Cada cultivo presentaba 24 horas de crecimiento.
- Se realizó una suspensión bacteriana homogenizando las bacterias en el medio. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.

Inoculación de la galería.

- Se introdujo la suspensión bacteriana en los tubos de la galería con la ayuda de una micropipeta de 1000µl (para evitar la formación de burbujas en el fondo de los tubos, se colocó la punta de la micropipeta sobre la pared de la cúpula inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia adelante):

-Para las pruebas 1 CIT 1, 1 VP 1, y 1 GEL 1, se llenó el tubo y la cúpula.

-Para las otras pruebas, se llenó únicamente los tubos (no las cúpulas).

-Para las pruebas: ADH, LDC, ODC, H₂S, URE se creó una atmósfera anaerobia llenando la cúpula con aceite de parafina.

- Se cerró la cámara de incubación, y se incubó a 36° C por 24 horas.



LECTURA E INTERPRETACIÓN

Lectura de la galería

- Después de la incubación se utilizó la Tabla de lectura para interpretar los resultados.
- En el caso de que 3 o más ensayos resultaban positivos, se anotaban todas las reacciones espontáneas y después se revelaban los ensayos que necesitaban la adición de reactivos:

-Prueba TDA: se agregó una gota del reactivo TDA. Un color marrón rojizo indicaba una reacción positiva.

-Prueba IND: se agregó una gota del reactivo JAMES. Un color rosado que se difuminaba en toda la cúpula indicaba una reacción positiva.

-Prueba VP: se agregó una gota del reactivo VP 1 y VP 2 y se esperó por 10 minutos para ver su coloración. Un color rosa o rojo indicaba una reacción positiva (si aparecía una coloración rosa después de los 10 minutos se consideraba negativa).

IMPORTANTE: La prueba de investigación sobre la producción de Indol se realizó en último lugar, pues esta libera gases que podían alterar la interpretación de las otras pruebas de la galería y no se colocaba la tapa de la cámara de incubación de nuevo.

- Si el número de las pruebas positivas antes de añadir los reactivos era inferior a 3:

-La galería se reincubó por 24 horas más.

-Se revelaban los ensayos que necesitaban reactivos.



Interpretación

La identificación se obtuvo a partir del perfil numérico:

- En la hoja de resultados, los test están separados en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1, 2 o 4. Como la galería se compone de 20 ensayos sumando al interior de cada grupo los valores que corresponden a reacciones positivas, se obtuvo un perfil numérico de 7 cifras. La reacción oxidasa (se realizó aparte) se le asignó un valor de 4 si resultaba positiva.
- Identificación: esta se realizó con la ayuda del catálogo analítico donde se localizó cada perfil numérico obtenido.



Anexo 2. Suelo según su grado de acidez

Tabla 9.1 Clasificación del suelo según su grado de acidez.

Valor	Clasificación
< 3.5	Ultra ácido
3.5-4.4	Extremadamente ácido
4.5-5.0	Muy fuertemente ácido
5.1-5.5	Fuertemente ácido
5.6-6.0	Moderadamente ácido
6.1-6.5	Ligeramente ácido
6.6-7.3	Neutro
7.4-7.8	Ligeramente alcalino
7.9-8.4	Moderadamente alcalino
8.5-9.0	Fuertemente alcalino
>9.0	Muy fuertemente alcalino



Anexo 3. Pruebas Api 20E que resultaron positivas para posibles *Pseudomonas fluorescens*

Plantación 1. Muestra de suelo.

api® 20 E

07223 C REF: Plant 1 placa 3 10⁻⁵

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origem / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+										
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	ODC	LCIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	LVP	LGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂	N ₂	MOB	McC	OF-O	OF-F			
2		2		0		6		0		4		4																	

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy : Prueba oxidasa
dio positiva.

Ident. / Ταυτοποίηση : 2206044
Ps fluo/putida
Ps aeruginosa

Imprimé en France / Printed in France

Plantación 2. Muestra de suelo.

api® 20 E

07223 C REF: Plant 2 placa 2-2
10⁻⁴

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origem / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+										
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4			
ONPG	ADH	LDC	ODC	LCIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	LVP	LGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO ₂	N ₂	MOB	McC	OF-O	OF-F			
2		2		0		6		0		6		6																	

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy : Prueba oxidasa
dio positiva

Ident. / Ταυτοποίηση : 2206046
Ps fluo/putida Ps aeruginosa

Imprimé en France / Printed in France



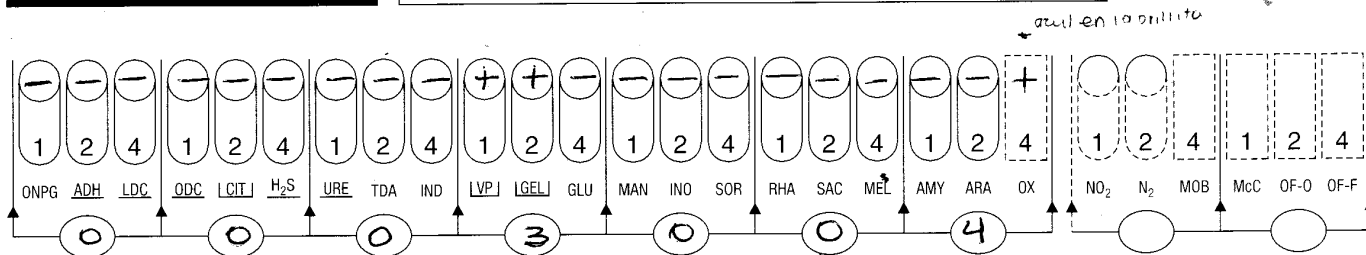
Plantación 3. Muestra de suelo.

api® 20 E



REF.: Plant 3 Pbla 3 10-4 _____ / _____ / _____

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :



Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

*Prueba oxidasa
 dio' positiva*

Ident. / Ταυτοποίηση : 00030004
Ps fluorescens



Anexo 4. Informe del análisis realizado con el sistema VITEK®

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
CENTRO DE INVESTIGACION EN ENFERMEDADES TROPICALES
2060 Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José

BACTERIOLOGIA
Tel. (506) 2511 4275. Fax (506) 2253 0066

REPORTE DE ANALISIS

SOLICITANTE:	Laura Ulloa
ANALISIS:	Identificación bacteriana
TIPO DE MUESTRA:	Aislamientos en placas
FECHA DE RECIBIDO:	26-04-2011
FECHA DE ANALISIS:	26-04-2011
FECHA DE REPORTE:	09-05-2011

RESULTADOS

Muestra	Morfología	Identificación más probable*
Plant 1	Bacilo Gram-negativo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Plant 2	Bacilo Gram-negativo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Plant 3	Bacilo Gram-negativo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

* Sistema automatizado Vitek (BioMérieux)

Dr. Norman Rojas
Laboratorio de Bacteriología
CIET, Facultad de Microbiología
norman.rojas@ucr.ac.cr



Anexo 5. Resumen de los datos obtenidos en las pruebas de antagonismo

Tabla 9.2 Promedio de los datos obtenidos por repetición en la prueba 1 de antagonismo desde el día 0.

Cepa Bacteriana	Repeticiones (cm)						
	Hongo	Testigo (o6)	o1	o2	o3	o4	o5
PsF1	<i>F. oxysporum</i>	2.79	1.97	2.00	2.25	2.02	1.83
	<i>F. moniliforme</i>	2.03	1.89	2.23	1.95	NR	2.01
PsF2	<i>F. oxysporum</i>	2.11	2.00	2.05	NR	NR	2.11
	<i>F. moniliforme</i>	2.25	1.83	NR	1.80	1.81	1.89
PsF3	<i>F. oxysporum</i>	2.08	1.98	1.95	NR	1.94	NR
	<i>F. moniliforme</i>	2.13	2.09	1.97	1.94	1.87	1.80

NR: datos no representativos, por contaminación o mal crecimiento del hongo.

Tabla 9.3 Promedio de los datos obtenidos por repetición en la prueba 2 de antagonismo desde el día 0.

OBSERVACIONES		Repetición (cm)									
Hongo	Testigo (11)	o1	o2	o3	o4	o5	o6	o7	o8	o9	1o
<i>F. oxysporum</i>	3.79	2.99	3.13	3.31	3.03	NR	3.02	2.95	3.12	3.21	2.91
<i>F. moniliforme</i>	3.87	3.23	2.97	3.09	3.07	3.02	3.10	2.89	2.98	NR	3.03

NR: datos no representativos, por contaminación o mal crecimiento del hongo.



Anexo 6. Análisis estadístico correspondiente a las pruebas de antagonismo

Tabla 9.4 ANOVA. *P. fluorecens* vrs *F. oxysporum*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	P
Tratamientos	2	2.51548	1.25774	1.63	0.2290
Error	15	11.5806	0.77204		
Total	17	14.0960			

Tratamiento	Medias	Tamaño de la muestra	Grupo Desviación estandar
1	2.1433	6	0.3445
2	1.3783	6	1.0684
3	1.3250	6	1.0275
Total	1.6156	18	0.8787

Tabla 9.5 ANOVA. *P. fluorecens* vrs *F. moniliforme*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	P
Tratamientos	2	0.44808	0.22404	0.50	0.6178
Error	15	6.75642	0.45043		
Total	17	7.20449			

Tratamiento	Medias	Tamaño de la muestra	Grupo Desviación estandar
1	1.6850	6	0.8334
2	1.5967	6	0.8004
3	1.9667	6	0.1263
Total	1.7494	18	0.6711

