



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CALIDAD SANITARIA Y MICROORGANISMOS  
ANTAGÓNICOS A *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.)  
Wei EN CÁLICES FRESCOS DE JAMAICA (*Hibiscus  
sabdariffa* L.)

BALTAZAR RENDÓN ESPÍRITU

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

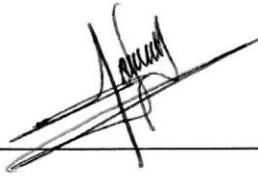
La presente tesis titulada: CALIDAD SANITARIA Y ORGANISMOS ANTAGÓNICOS A *Corynespora casiiicola*. EN CÁLICES FRESCOS DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) realizada por el alumno: **BALTAZAR RENDÓN ESPÍRITU** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobado por el mismo.

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

DIRECTOR



DE TESIS

DR. GABRIEL LEYVA RUELAS

ASESOR



DR. JAVIER HERNANDEZ MORALES

ASESOR



DR. GILBERTO RENDÓN SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre 2014.

**CALIDAD SANITARIA Y MICROORGANISMOS ANTAGÓNICOS A *Corynespora cassiicola*. EN CÁLICES FRESCOS DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

**Baltazar Rendón Espíritu, MC.**

**Colegio de Postgraduados, 2014.**

**RESUMEN GENERAL**

Se analizaron microbiológicamente 30 muestras de cálices frescos de Jamaica, variedades “Criolla de Ayutla” y “Coneja”, de acuerdo a las normas oficiales mexicanas **NOM-112-SSA1-1994 y NOM-114-SSA1-1994**, para determinar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella*, y a su vez la cuantificación de coliformes totales y fecales presentes en el filoplano del cáliz. Se encontraron unidades formadoras de colonias de coliformes totales y fecales en las muestras, variando la densidad entre muestra y muestra, no se encontró la presencia de *Salmonella* ni de *Escherichia coli*. Por otro lado, se evaluaron *In vitro* un total de 64 aislamientos bacterianos obtenidos del filoplano del cáliz fresco de Jamaica para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento de *Corynespora cassiicola* patógeno foliar y de cálices de la Jamaica. Ensayos cualitativos en confrontación dual, resultaron en la selección de 6 aislamientos bacterianos con el mayor potencial antagónico para *Corynespora cassiicola*. Los aislamientos se identificaron molecularmente mediante secuenciación parcial del gen 16s ADNr. Las cepas con mayor grado de antagonismo fueron identificados dentro de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. La caracterización en la producción de metabolitos potencialmente involucrados en la actividad antagónica mostró que las cepas expresan actividad lipolítica, proteolítica, solubilización de fosfato mineral y producción de sideróforos. Este representa el primer estudio de bacterias nativas del filoplano del cáliz de Jamaica.

**HEALTH QUALITY AND MICROORGANISMS ANTAGONISTS TO *Corynespora cassiicola* IN FRESH CHALICES OF ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

**Baltazar Rendón Espíritu, MC.**

**Colegio de Postgraduados, 2014.**

**GENERAL ABSTRACT**

We did a microbiological analysis on 30 samples of fresh calyxes of roselle flower of the varieties “Criolla de Ayutla” and “Coneja”, according to the Mexican official norms **NOM-112-SSA1-1994 y NOM-114-SSA1-1994**, to determine the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella*, and to quantify total and fecal coliforms in the calyx phylloplane. We found forming units of colonies of total and fecal coliforms in the samples, which density varies across samples, and we did not find the presence of neither *Salmonella* nor *Escherichia coli*. We did an in vitro evaluation of 64 bacterial isolates from the phylloplane of the fresh calyx of Jamaica to determine their capacity to inhibit the growth of *Corynespora cassiicola*, a roselle’s pathogen. Dual confrontation qualitative test yielded to a selection of 6 bacterial strains with the greatest antagonistic potential for such a fungus. Bacterial strains were molecularly identified using partial sequencing of the 16s ADNr gen. Strains with the greatest degree of antagonism belong to the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. The characterization of the production of metabolites potentially involved in the antagonism activity showed that the strains showed *In vitro* lipolytic and proteolytic activity, mineral phosphate solubilization, and production of siderophores. This research represents the first study on native bacteria of the calyx phylloplane of the roselle flower.

Esta investigación fue financiada con fondos del proyecto SAGARPA-CONACYT-163972 “Validación de variedades de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento y tolerantes a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable”

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en esencia por todo lo que me ha pasado, la estancia que tuve la oportunidad de vivir mientras realizaba mis estudios de maestría fue de las más enriquecedora; y por eso agradezco primeramente a ese ser supremo que siempre estuvo a mi lado, sobre mí y dentro de mi corazón, porque aún dentro del campo de la ciencia creo en Dios.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Colegio de Postgraduados por albergarme durante dos años y haber podido absorber ese conocimiento fitopatológico.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo por toda la confianza que depositó en mí, por su apoyo incondicional y disponibilidad, por su entereza y calma para encarrilarme; muchas gracias 'Doc', aparte de ser un excelente maestro lo considero un amigo.

Al Dr. Javier Hernández Morales, por abrirme las puertas al colegio y darme el empujón hacia la fitopatología, gracias por haberme apoyado y brindado su confianza al incluirme en su equipo de trabajo; y también gracias por los jalones de oreja, sé que fueron por la estimación que me tiene, que es recíproca.

Al Dr. Gabriel Leyva Ruelas, por abrirme las puertas de Chapingo, mi alma mater, por la dedicación y apoyo que recibí mientras realizaba esta tesis.

Al Dr. Gilberto Rendón Sánchez, por sus valiosas aportaciones al desarrollo de este documento.

Al Sr. Carlos Martínez López, por el apoyo en el desarrollo de la investigación en el laboratorio.

A la M.C. Viviana Sánchez Aldana, quien fue pilar esencial en mi investigación, a parte de una excelente colega, una entrañable amiga.

A la M.C. Ana María Ayala Torres, compañera y cómplice de laboratorio, las discusiones mutuas de investigaciones hicieron que este trabajo saliera a flote. Amiga del alma.

A la M.C. Naybi Muñoz, por su desinteresado apoyo, por darme la mano cuando lo necesité y estar conmigo apoyándome, una bendición haberla conocido.

A Itzel Rendón, quien es un monumento a mi entereza y pieza fundamental de esta tesis, muchas gracias por todo el apoyo en este proceso.

A Isis Jaimez e Irvin Rojas por el apoyo brindado, por sus opiniones y aportaciones para mejorar este documento.

## **DEDICATORIAS**

### **A mis padres:**

Ema y Miguel, gracias por siempre estar al pendiente de mí, de darme ánimos cuando los necesito, de levantarme cuando estoy caído, de estar ahí siempre riendo juntos.

### **A mis hermanos:**

Iliana, Miguel e Itzel, gracias porque estamos unidos, y por comprender tanto como yo lo importante que es la familia, por estar ahí siempre en las buenas y en las malas, por apoyarme siempre, por regañarme a veces, por consolarme otras.

### **A mi familia de sangre:**

Sin duda no los pude elegir, pero doy gracias al cielo por habérmelos sacado en la rifa, son la mejor familia que pueda tener, la más unida, la más alegre, la más carismática, a todos gracias por que también saben el valor de pertenecer a una bonita familia como la nuestra, en la que nos reímos de nuestras desgracias y nos ayudamos a salir de ellas. Gracias por estar en mi corazón siempre y gracias por darme ese gran espacio en el suyo.

### **A la familia que elegí:**

Amigos, este espacio es para ustedes, engalánense de presumirlo, porque con todo el corazón les agradezco que de alguna u otra forma estuvieron y están conmigo, dándonos lata mutuamente. Gracias por esos momentos que se quedan grabados en mi memoria por siempre, en esa carpeta azul con clip amarillo, con esa nota que dice “los quiero”. Ustedes saben quiénes son.

### **A los que ya no están:**

Gracias, esos recuerdos quedarán grabados a lado de esa misma carpeta azul, en una carpeta roja también con un clip amarillo, en la misma sección, en aquella llamada “dulces memorias”.



## INDICE

INDICE DE CUADROS .....	11
INDICE DE FIGURAS .....	13
I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	15
1.1 DESCRIPCIÓN DE LA JAMAICA (Hibiscus sabdariffa L.) .....	15
1.2 PANORAMA ECONÓMICO DE LA JAMAICA .....	16
1.2.1 PRODUCCIÓN MUNDIAL .....	16
1.2.2 PRODUCCIÓN NACIONAL .....	17
1.2.3 PRODUCCIÓN DEL ESTADO DE GUERRERO .....	18
1.2.4 PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA JAMAICA .....	18
1.3 PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO DE JAMAICA .....	18
1.3.1 MERCADO .....	19
1.3.2 PLAGAS Y ENFERMEDADES .....	20
1.4 OBJETIVOS .....	20
1.4.1 OBJETIVO GENERAL .....	20
1.4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
1.5 HIPÓTESIS .....	21
II. CAPÍTULO I. “DETECCIÓN DE Salmonella Y Escherichia coli EN EL FILOPLANO DEL CÁLIZ FRESCO DE JAMAICA (Hibiscus sabdariffa L.)” .....	22
2.1 INTRODUCCIÓN .....	22
2.1.1 Escherichia coli .....	23
2.1.2 Salmonella.....	24
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
2.2.1 COLECTA DE LAS MUESTRAS VEGETALES. ....	25
2.2.2 RELACIÓN DE TRATAMIENTOS. ....	26

2.2.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	28
2.2.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS.....	29
2.2.4.1 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES.....	29
2.2.4.2 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES FECALES.....	29
2.2.5 DETECCIÓN DE <i>Escherichia Coli</i> .....	30
2.2.6 DETECCIÓN DE <i>Salmonella</i> .....	32
2.2.6.1 PRE-ENRIQUECIMIENTO .....	32
2.2.6.2 ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO.....	32
2.2.6.3 AISLAMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES.....	33
2.2.6.4 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	33
2.3 RESULTADOS.....	34
2.4 DISCUSIÓN.....	50
<b>III. CAPÍTULO II. “POBLACIÓN BACTERIANA NATIVA EN EL FILOPLANO DEL CÁLIZ DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) CON POTENCIAL ANTAGONISTA CONTRA <i>Corynespora cassiicola</i>” .....</b>	<b>53</b>
3.1 INTRODUCCIÓN .....	53
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	59
3.2.1 ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL .....	59
3.2.2 EXTRACCIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS TOTALES.....	59
3.2.3 EXTRACCIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS DEL GÉNERO <i>Pseudomonas</i> ASOCIADAS A CÁLICES FRESCOS DE JAMAICA.....	60
3.2.4 EXTRACCIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS DEL GÉNERO <i>Bacillus</i> ASOCIADAS A CÁLICES FRESCOS DE JAMAICA. ....	60
3.2.5 PURIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS .....	62
3.2.6 ANTAGONISMOS <i>In vitro</i> DE LAS BACTERIAS ASOCIADAS A CÁLICES FRESCOS DE JAMAICA CONTRA <i>Corynespora cassiicola</i> .....	63

<b>3.2.7 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN 16s ADNr DE LAS CEPAS BACTERIANAS.....</b>	<b>65</b>
<b>3.2.8 CARACTERIZACIÓN DE ANTAGONISMO <i>In vitro</i>. ....</b>	<b>66</b>
<b>3.2.9 PRESERVACIÓN DE BACTERIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>3.3 RESULTADOS .....</b>	<b>68</b>
<b>3.4 DISCUSIÓN .....</b>	<b>72</b>
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>77</b>
<b>V. LITERATURA CITADA. ....</b>	<b>79</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica de la Jamaica.....	15
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación científica de <i>Escherichia coli</i> .....	24
<b>Cuadro 3.</b> Clasificación científica de <i>Salmonella</i> . .....	25
<b>Cuadro 4.</b> Tratamientos realizados para el análisis microbiológico de las muestras de cálices frescos de Jamaica. ....	26
<b>Cuadro 5.</b> Listado y origen de las muestras de Jamaica variedad “Criolla de Ayutla”. .....	27
<b>Cuadro 6.</b> Listado y origen de las muestras de Jamaica variedad “Coneja”. .....	27
<b>Cuadro 7.</b> Combinación de pruebas IMViC para <i>Escherichia coli</i> . .....	32
<b>Cuadro 8.</b> Presencia de coliformes totales en cálices frescos de Jamaica variedad “Criolla de Ayutla”. .....	35
<b>Cuadro 9.</b> Estudio de Tukey para Coliformes Totales en la variedad “Criolla de Ayutla”. .....	36
<b>Cuadro 10.</b> Presencia de coliformes fecales en cálices frescos de Jamaica variedad “Criolla de Ayutla”. .....	37
<b>Cuadro 11.</b> Estudio de Tukey para Coliformes Fecales en la Variedad “Criolla de Ayutla”. .....	38
<b>Cuadro 12.</b> Presencia de coliformes totales en cálices enteros de la variedad “Coneja”. .....	39
<b>Cuadro 13.</b> Estudio de Tukey para Coliformes Totales en la variedad “Coneja”.....	40
<b>Cuadro 14.</b> Presencia de Coliformes Fecales en cálices frescos de Jamaica de la variedad “Coneja”. .....	42

<b>Cuadro 15.</b> Estudio de Tukey para Coliformes Fecales en la variedad “Coneja”.	43
<b>Cuadro 16.</b> Crecimiento de colonias sospechosas de <i>E. coli</i> en medio EMB del tratamiento de homogenizado con cáliz entero (Tratamiento 1).	45
<b>Tabla 17.</b> Colonias sospechosas de <i>E. coli</i> en medio EMB del tratamiento de homogenizado con trituración del cáliz (Tratamiento 2).	45
<b>Tabla 18.</b> Resultados de las pruebas IMViC.	47
<b>Cuadro 19.</b> Extracción de poblaciones bacterianas totales. <i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i> en 3 variedades de Jamaica (Criolla de Ayutla, China roja y Sudán).	62
<b>Cuadro 20.</b> Halos de inhibición de 6 cepas bacterianas aisladas del cáliz de Jamaica con el mayor grado de antagonismo <i>In vitro</i> contra <i>C. cassicola</i> .	68
<b>Cuadro 21.</b> Identificación de las bacterias antagonistas a <i>Corynespora cassicola</i> mediante la amplificación y secuenciación del gen 16s ADNr.	69
<b>Cuadro 22.</b> Caracterización en la producción de metabolitos <i>In vitro</i> de las cepas antagonistas a <i>C. cassicola</i> .	72

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cálices de Jamaica frescos de la variedad “criolla de Ayutla” en agua peptonada al 1%.....	28
<b>Figura 2.</b> Cálices de Jamaica frescos triturados de la variedad “coneja” en agua peptonada al 1% .....	28
<b>FIGURA 3.</b> Tubos positivos para coliformes totales en la fase presuntiva.....	29
<b>FIGURA 4.</b> Tubos de Caldo bilis verde brillante para confirmación de coliformes totales y tubos con medio EC para confirmación de coliformes fecales. ....	30
<b>Figura 5.</b> Proceso de siembra e incubación de las bacterias en los medios selectivos. ....	34
<b>Figura 6.</b> Medios de cultivo para pruebas bioquímicas. A) TSI B) LIA C) Urea .....	35
<b>Figura 7.</b> Placa con crecimiento de colonias verdes con brillo metálico sospechosas de <i>E. coli</i> en medio de cultivo EMB. ....	46
<b>Figura 8.</b> Tinción de Gram negativa y morfología de las células sospechosas de <i>Escherichia coli</i> vistas al microscopio compuesto (40X), aisladas de cálices frescos de jamaica .....	46
<b>Figura 9.</b> Pruebas IMViC: A) Rojo de Metilo B) Indol C) Voges Proskauer D) Citratos E) Testigo .....	47

<b>Figura 10.</b> Tinción de Gram negativa y morfología de las células sospechosas de <i>Salmonella</i> vistas al microscopio compuesto (40X), aisladas de cálices frescos de jamaica .....	48
<b>Figura 11.</b> Resultados negativos de pruebas bioquímicas: A) LIA B) TSI C) TESTIGO .....	49
<b>Figura 12.</b> Agitación de la suspensión madre de cálices de 3 variedades de Jamaica (Criolla de Ayutla, China roja y Sudán). .....	61
<b>Figura 13.</b> Purificación de las bacterias por la técnica de punto en medio BDK y Agar Nutritivo. ....	62
<b>FIGURA 14.</b> Antagonismo <i>In vitro</i> de bacterias nativas del cáliz de Jamaica frente a <i>Corynespora cassiicola</i> en medio Waksman agar. ....	64

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1 DESCRIPCIÓN DE LA JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

La Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta malvácea anual que puede alcanzar de 1 a 3 metros de altura. La flor cuenta con 4 o 5 pétalos y tiene una forma cónica. Se reproduce por semilla, sus raíces son radicales y superficiales. Es una planta con un fotoperiodo alto (mayor de 11-12 horas luz).

El color y el tamaño de la flor varía según la variedad, actualmente en México se cuentan con diferentes variedades que van desde blanca (Alma blanca) hasta rojo negráceo (Sudan), (SIAP, 2008).

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de la Jamaica.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Dilleniidae
Orden:	Malvales
Familia:	Malvaceae
Subfamilia:	Malvoideae
Género:	Hibiscus
Especie:	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (1753)

El origen de la Jamaica se ubica entre India y Malasia, donde es comúnmente cultivada; fue llevada a África y ha sido distribuida en los trópicos y subtrópicos de ambos hemisferios (SIAP, 2008).

La Jamaica es una de las plantas con presencia de compuestos antimicrobianos, en cálices deshidratados (Wong *et al.*, 2007).



Las propiedades antimicrobianas presentes en las plantas se ven influenciadas por varios factores como genotipo, el ambiente, época de cosecha, el almacenamiento, procedimiento de extracción de sustancias, ubicación geográfica y la altitud entre otros (Brandi *et al.*, 2006).

Existen una gama de fitoquímicos presentes en los cálices de Jamaica con propiedad antimicrobianas, en general los polifenoles (Tajkarimi *et al.*, 2010), entre ellos algunos ácidos fenólicos (Beuchat, 2001). Además de flavonoides (Cushnie y Lamb, 2005) y proantocianidinas como catequinas y epicatequinas (Kuetze *et al.*, 2008).

## **1.2 PANORAMA ECONÓMICO DE LA JAMAICA**

### **1.2.1 PRODUCCIÓN MUNDIAL**

La producción mundial de la Jamaica alcanzó cerca de las 100,000 toneladas (t) en el año de 1999 (SIAP/SIACON, 2009). Los principales países productores son China, Sudán, Taiwán, Tailandia e India. (FAO, 2009); en este contexto México ocupa el séptimo lugar.

Actualmente los países que más demandan este producto son Japón, Estados Unidos, Francia y Alemania, quienes tienen un consumo per cápita de 2.5 kg de Jamaica al año y es muy probable que con los descubrimientos de sus propiedades curativas aumenten los mercados para este producto (FAO, 2009).

Particularmente, las exportaciones mexicanas de Jamaica en todas sus presentaciones aumentaron 94.5 % del año 2000 al 2005, debido a la demanda internacional y a una mejor cotización del precio de este cultivo. Las exportaciones de Jamaica en el año 2000 ascendieron a 16.6 millones de dólares y para el 2005

llegaron a los 32.4 millones de dólares. En México existen empresas exportadoras de Jamaica en flor (cálices), jarabes y licores, quienes envían sus productos principalmente a Estados Unidos de América (SIAP/SIACON, 2009).

### **1.2.2 PRODUCCIÓN NACIONAL**

En México el consumo de Jamaica es de alrededor de 14,000 t al año, de las cuales aproximadamente el 50% es importada para satisfacer esta demanda. Los países que exportan mayores volúmenes de Jamaica a nuestro país son China y Sudán (SAGARPA, 2010).

Durante el año 2009, la superficie cosechada promedio a nivel nacional fue de 19,000 ha en 11 estados de la república mexicana, registrándose una tasa de crecimiento anual del 67%. Del total de la superficie, 99.9% corresponde al sistema de temporal, mientras que el 1% a riego (SIAP/SIACON, 2009).

México, es reconocido entre los principales países productores de Jamaica, el 95% de la producción se comercializa en una presentación de cálices deshidratados, y el resto es ofertado en presentaciones de extracto y mermelada (SAGARPA, 2009)

Los principales estados productores son Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Nayarit. La producción e industrialización de la Jamaica, genera 2, 470,000 jornales, con un rendimiento por hectárea de 300 kg a una tonelada según la zona de cultivo. El valor de la producción se calcula en más de 100 millones de pesos (SAGARPA, 2010).

### **1.2.3 PRODUCCIÓN DEL ESTADO DE GUERRERO**

Durante los años 2001 a 2005, el estado de Guerrero se ha mantenido como el mayor productor de Jamaica en México (SIAP/SIACON, 2009). La superficie cultivada en el 2008 fue de 14,883 ha, en la región de “Costa Chica” la mayor superficie, se localiza en los municipios de Acapulco, Juan R. Escudero, Tecoaapa, Ayutla, Florencio Villarreal, San Marcos, San Luis Acatlán, Cuajinicuilapa y Azoyú. (SAGARPA, 2009).

### **1.2.4 PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA JAMAICA**

En México existen dos normas mexicanas que hacen referencia al cultivo de la Jamaica: La primera es la norma mexicana (NMX-F-601-NORMEX-2002), en ella se establecen las especificaciones de calidad y requisitos de etiquetado que debe cumplir el producto denominado “té y sus variedades” que se comercializan en territorio nacional. Y la recientemente aprobada norma mexicana **(NMX-FF-115-SCFI-2010)** que constituye la definición y la clasificación que se utiliza para la flor (cáliz) deshidratada proveniente de la planta de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), en donde se establecen las características de calidad y pureza que deben cumplir los cálices de Jamaica para consumo humano que se comercializa en el territorio nacional, así como los métodos de evaluación.

### **1.3 PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO DE JAMAICA**

La inestabilidad del mercado y la incidencia de plagas y enfermedades, son los principales problemas que afectan a la Jamaica.

### 1.3.1 MERCADO

El precio de este producto está siendo afectado con el ingreso de Jamaica de otros países productores, como: China y Sudán; la competencia internacional ha dejado rezagados a los productores nacionales que cuentan con tecnología incipiente para el desarrollo de sus cultivos, además de las cada vez más estrictas regulaciones internacionales para la exportación de productos inocuos.

La importancia de que un producto sea inocuo en la competencia internacional de productos agropecuarios es alta, debido entre otras cosas, a la creciente incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con microorganismos patógenos, como: *Salmonella* sp., *Escherichia coli* y coliformes fecales que pueden provocar enfermedades de tipo gastrointestinal (Francis & O'Beime, 1999), consecuencia de las malas prácticas agrícolas o de manejo que se aplicaron en su proceso productivo.

La calidad microbiológica es un elemento de evaluación de los requisitos microbiológicos que debe tener un producto, tanto desde el punto de vista sanitario como comercial. En todo Control Microbiológico de Calidad destacan dos aspectos:

- Calidad Higiénico-Sanitaria: que no se distribuyan microorganismos patógenos para la salud humana.
- Calidad Comercial: Presencia de microorganismos, que alteren el producto haciéndolo no comestible (aunque no sean patógenos).

### **1.3.2 PLAGAS Y ENFERMEDADES**

Las principales plagas que atacan a la planta son la hormiga arriera (*Atta* spp.) y los pulgones o milecillas (*Aphidae* spp.). El cultivo es muy susceptible a enfermedades de tipo fungosas, en especial en el follaje, tallo y raíces, como es el caso de *Cercospora malvencis* en follaje, y *Pythium perniciosum* H., *Sclerotium rolfsii* S., *Fusarium coeruleum* L., y *Phytophthora parasítica* D. (Dempsey, 1975), en tallo y raíz (Hallimatul *et al.*, 2007).

En los últimos años la incidencia de *Corynespora cassicola* en asociación con otros hongos, ha supuesto una nueva problemática de mayor relevancia al cultivo; el patógeno infecta tanto hojas como cálices frescos, la principal parte comercial de la planta. Se han estimado pérdidas de hasta el 100% en algunas localidades (comunicación personal).

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 OBJETIVO GENERAL**

Detectar la presencia de bacterias enteropatógenas, y de bacterias antagonistas a *Corynespora* en el filoplano del cáliz fresco de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

#### **1.4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Cuantificar poblaciones de coliformes totales y fecales presentes en cálices frescos de Jamaica.

Detectar presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en cálices frescos de Jamaica.

Explorar e identificar poblaciones bacterianas nativas del filoplano del cáliz fresco de Jamaica con potencial antagónico a *Corynespora cassiicola*.

## **1.5 HIPÓTESIS**

El filoplano de los cálices frescos de Jamaica pueden contener bacterias enteropatógenas como *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* y otros coliformes dado que están expuestas a un manejo postcosecha no inocuo.

En el filoplano del cáliz fresco de Jamaica se encuentran bacterias nativas con alto potencial antagonista a *Corynespora cassiicola* puesto que compiten con el hongo por el mismo nicho ecológico.

## **II. CAPÍTULO I. “DETECCIÓN DE *Salmonella* Y *Escherichia coli* EN EL FILOPLANO DEL CÁLIZ FRESCO DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)”**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

*Salmonella* y *Escherichia coli* (*E. coli*) enterohemorrágica son causa de importantes enfermedades transmitidas por alimentos, que han provocado un problema de salud pública a nivel mundial (Arora, 1997).

Por lo general, se ha considerado que los alimentos con un bajo contenido de humedad (tal es el caso de la Jamaica que se comercializa deshidratada), presentan un bajo riesgo de transmisión de enfermedades. En los alimentos con bajo contenido de humedad la actividad de agua (humedad disponible) es demasiado baja para sustentar el crecimiento microbiano. Sin embargo, en el contexto de los cálices frescos en la Jamaica, se ha determinado que poseen un alto contenido de agua (FAO, 2008).

Probablemente existen múltiples fuentes posibles de contaminación por *Salmonella* y *Escherichia coli* entero-hemorrágicas, o coliformes totales en las diferentes formas de manejo del cáliz fresco de la Jamaica.

Sin embargo, es importante resaltar el hecho de que las propiedades antimicrobianas que contienen los extractos de Jamaica en sus diferentes formas de extracción, pueden ser un factor de relevancia en la presencia o no de estas poblaciones de bacterias patógenas a humanos. Así mismo, también es de resaltar las propiedades antimicrobianas de los cálices deshidratados, como comúnmente se comercializa, los cuales se han revelado en diversos estudios,

aunque hay una variable distinta, y es el contenido de humedad disponible, para su medición y/o detección de posibles cepas de estas bacterias en el filoplano del cáliz, que puedan provocar un riesgo de salud, y a su vez una barrera de mercado en su distribución.

### **2.1.1 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, género *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. (Gutiérrez, 2000).

*E. coli* se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas. Sin embargo algunas de ellas, como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. La bacteria se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, y hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas (FAO, 2008).

*E. coli* se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas o serológicas, en el cuadro 2 se muestra su clasificación científica.



**Cuadro 2.** Clasificación científica de *Escherichia coli*

<b>Clasificación científica</b>	
<b>Dominio</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	Enterobacteriales
<b>Familia</b>	Enterobacteriaceae
<b>Género</b>	Escherichia
<b>Especie</b>	E. coli ((E. freundii))

### **2.1.2 Salmonella**

*Salmonella* es un género de bacterias que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, formado por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula (excepto la especie *S. typhi*) ni esporas. Son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S). Emplean glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa ni tienen metabolismo fermentativo. (Méndez, 2006)

El grupo *Salmonella*, comprende más de 2000 variedades (serotipos). Prácticamente todos los serotipos de *Salmonella* podrían ser capaces de producir una gastroenteritis en las personas, entre 6 a 48 horas después de la ingestión del microorganismo. El que se produzca la enfermedad va a depender de la cantidad de bacterias (densidad poblacional) presentes en el alimento, así como de condiciones propias del consumidor (edad, estado inmunológico y otros), (Insunza, 1998).

La bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas o serológicas, en el cuadro 3 se muestra la clasificación científica a la que pertenece *Salmonella*.

**Cuadro 3.** Clasificación científica de *Salmonella*.

<b>Clasificación científica</b>	
<b>Reino</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	Enterobacteriales
<b>Familia</b>	Enterobacteriaceae
<b>Género</b>	Salmonella

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 COLECTA DE LAS MUESTRAS VEGETALES.**

Se colectaron 30 muestras de flor de Jamaica fresca de la variedad “Criolla” y “Coneja”, de las localidades de Ejido de cotzaltzin, Cotzaltzin, San Antonio, Tonalá, Crucero de Tonalá, El Mezón, Pozolapa, Cerro gordo, Tutepec, La hacienda y Tlalapa, en el municipio de Ayutla de los Libres, Guerrero, el 09 de diciembre de 2012. Las muestras se tomaron asépticamente y al azar, utilizando bolsas de plástico estériles (Marca Ziploc® de 20 x 20 cms.), y se transportaron a temperatura de refrigeración (5° C) al laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma Chapingo, en Texcoco, Estado de México, México, para su análisis microbiológico.

## 2.2.2 RELACIÓN DE TRATAMIENTOS.

El experimento consistió en 2 tratamientos (variedades; “criolla de Ayutla” y “coneja”) con 15 repeticiones cada uno. La procedencia de cada variedad se observa en los cuadros 5 y 6. Para la homogenización la variedad “criolla” (tratamiento 1), se utilizaron cálices frescos enteros en agua peptonada (1%) y para la variedad “coneja” (tratamiento 2) los cálices fueron triturados en agua peptonada (1%) (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Tratamientos realizados para el análisis microbiológico de las muestras de cálices frescos de Jamaica.

<b>TRATAMIENTO 1</b> <b>Var. Criolla de Ayutla</b>	HOMOGENIZADO CON CÁLIZ ENTERO FRESCO EN AGUA PEPTONADA AL 1%
<b>TRATAMIENTO 2</b> <b>Var. Coneja</b>	HOMOGENIZADO CON TRITURACIÓN DEL CÁLIZ FRESCO EN AGUA PEPTONADA AL 1%

El proceso de análisis se basó en el descrito en las normas oficiales mexicanas:

**NOM-112-SSA1-1994 y NOM-114-SSA1-1994.**

**Cuadro 5.** Listado y origen de las muestras de Jamaica variedad “Criolla de Ayutla”.

<b>MUESTRA</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
1	Ejido de <u>Cotzaltzin</u>
2	<u>Cotzaltzin</u> 1
3	San Antonio 1
4	Tonalá 1
5	<u>Zempazulco</u> 1
6	Tonalá 3
7	Crucero de Tonalá 1
8	<u>Tutepec</u> 1
9	Crucero de Tonalá 3
10	La Hacienda 1
11	El <u>Mezón</u> 1
12	San Antonio 2
13	El <u>Mezón</u> 3
14	San Antonio 3
15	<u>Tlalapa</u> 2

**Cuadro 6.** Listado y origen de las muestras de Jamaica variedad “Coneja”.

<b>MUESTRA</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
16	<u>Zempazulco</u> 2
17	Tonalá 2
18	El <u>Mezón</u> 2
19	La Hacienda 2
20	Crucero de Tonalá 2
21	<u>Tutepec</u> 2
22	Cerro Gordo 1
23	Cerro Gordo 2
24	<u>Pozolapa</u> 1
25	<u>Pozolapa</u> 2
26	<u>Pozolapa</u> 3
27	San Miguel 1
28	San Miguel 2
29	<u>Tlalapa</u> 1
30	<u>Cotzaltzin</u> 2

### 2.2.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Se pesaron asépticamente 25 g de cálices frescos enteros de Jamaica de la variedad “criolla de Ayutla” y se colocaron en un frasco con 225 mL de agua peptonada estéril al 1% (Figura 1), el pH final fue de 5.29. De la misma manera se procedió con los cálices de la variedad “coneja”, excepto que las muestras se trituraron a baja velocidad en una licuadora (Figura 1), y resultando en un pH final de 3.1.



**Figura 1.** Cálices de Jamaica frescos de la variedad “criolla de Ayutla” en agua peptonada al 1%



**Figura 2.** Cálices de Jamaica frescos triturados de la variedad “coneja” en agua peptonada al 1%

## **2.2.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS**

### **2.2.4.1 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES.**

De los homogenizados de ambas variedades se realizaron tres diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , y  $10^{-3}$ ). Posteriormente para la prueba presuntiva se sembraron tubos con caldo lauril sulfato triptosa, con campanas “durham” para detectar la presencia (producción) de gas (tubos positivos). La incubación se realizó a  $37^{\circ}$  C por 48 h. De los tubos positivos de la fase anterior se realizó la etapa de confirmación, la cual consistió en sembrar, con asa bacteriológica tubos con caldo bilis verde brillante fueron e incubados a  $37^{\circ}$  C por 48 h. Después de esta fase se calculó el NMP  $\text{mL}^{-1}$  en las tablas correspondientes para coliformes totales.



**FIGURA 3.** Tubos positivos para coliformes totales en la fase presuntiva.

### **2.2.4.2 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES FECALES**

De los tubos positivos de la fase presuntiva para coliformes totales, se sembraron tubos con caldo EC y campanas “Durham” (Figura 4). Los cultivos se incubaron a

44.5° C por 48 h en un baño con circulación de agua (GCA Corporation Mod. 66850). Después de ese tiempo se calculó en tablas el NMP mL<sup>-1</sup> para coliformes fecales.



**FIGURA 4.** Tubos de Caldo bilis verde brillante para confirmación de coliformes totales y tubos con medio EC para confirmación de coliformes fecales.

### **2.2.5 DETECCIÓN DE *Escherichia Coli*.**

De los tubos positivos de confirmación para coliformes fecales se sembraron placas con agar Eosina Azul de Metileno (EMB), que se incubaron a 37° C por 24 h. De las colonias típicas (colonias verdes con brillo metálico) para coliformes se sometieron a tinción de Gram para determinar la morfología y el tipo de Gram. Finalmente, la identificación de *E. coli* se realizó mediante las pruebas IMViC (Cuadro 7), que incluyen:

**Indol:** Se determina si la bacteria posee una enzima (triptofanasa). La triptofanasa hidroliza el triptófano en indol y alanina. El indol se detecta empleando un reactivo

específico (Reactivo de Kovacs). El triptófano forma parte de las peptonas del medio.

**Rojo de metilo:** Detecta la fermentación ácido-mixta. Se acumulan ácidos (acético, fórmico, etc.), relativamente fuertes y bajan el pH del medio hasta 4-5. Dicho cambio de pH se detecta añadiendo un indicador (rojo de metilo) al cultivo. Se inocula el medio Klark Lubs y luego se le añade el rojo de metilo.

**Voges Proskauer:** Detecta la fermentación butanodiólica. En esta fermentación se producen menor cantidad de ácidos que en la fermentación ácido-mixta, y una gran cantidad de butanodiol. Mediante un reactivo, (alfa-naftol y KOH al 40%), se detecta la presencia de un precursor del butanodiol (acetilmetilcarbinol o acetoina). La acetoina en presencia de oxígeno se oxida a diacetilo. El diacetilo origina una coloración roja al reaccionar con los restos guanídicos de algunos aminoácidos de la peptona del medio.

**Citrato de Simmons:** se determina la utilización del citrato como única fuente de carbono y energía. La prueba emplea un medio definido con citrato como única fuente carbonatada (se detecta turbidez). Alternativamente se utiliza el medio de Simmons: utiliza un medio sólido con citrato sódico y un indicador ácido-base (azul de bromotimol). En este caso se detecta la alcalinización del medio por el consumo del citrato.

Las pruebas anteriores (IMViC) se emplean fundamentalmente para la identificación de Enterobacterias (bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos con metabolismo fermentador). Dependiendo de las condiciones, las enterobacterias, pueden realizar un metabolismo aerobio, realizar una respiración



anaerobia y distintas fermentaciones (<http://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-imvic.htm>).

**Cuadro 7.** Combinación de pruebas IMViC para *Escherichia coli*.

Indol	+
Rojo de metilo	+
Voges proskauer	-
Citratos	-

Fuente: NOM-112-SSA1-1994

## **2.2.6 DETECCIÓN DE *Salmonella*.**

### **2.2.6.1 PRE-ENRIQUECIMIENTO**

El pre-enriquecimiento se define como el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.

El pre-enriquecimiento se llevó en primera instancia al hacer la homogenización de los cálices en sus diferentes tratamientos con agua peptonada al 1%.

### **2.2.6.2 ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO.**

A partir de los frascos de la fase de pre-enriquecimiento se inocularon (1 mL) dos tubos con caldo selenito cistina y dos de caldo tetracionato suplementado con yodo yoduro se incubaron a 37° C por 48 h.

### 2.2.6.3 AISLAMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES.

A partir de los tubos de Caldo Selenito Cistina y Caldo Tetrationato se sembraron placas con medio Agar XLD, Agar Entérico Hektoen (AEH), Agar Sulfito Bismuto (ASB) y Agar Salmonella Shigella (ASS) (Figura 5). Las placas se incubaron a 37° C por 24 h. Posteriormente, las colonias sospechosas para *Salmonella* se sometieron a tinción de Gram. En base a estas características se seleccionaron 6 cepas y fueron sometidas a diferentes pruebas bioquímicas.

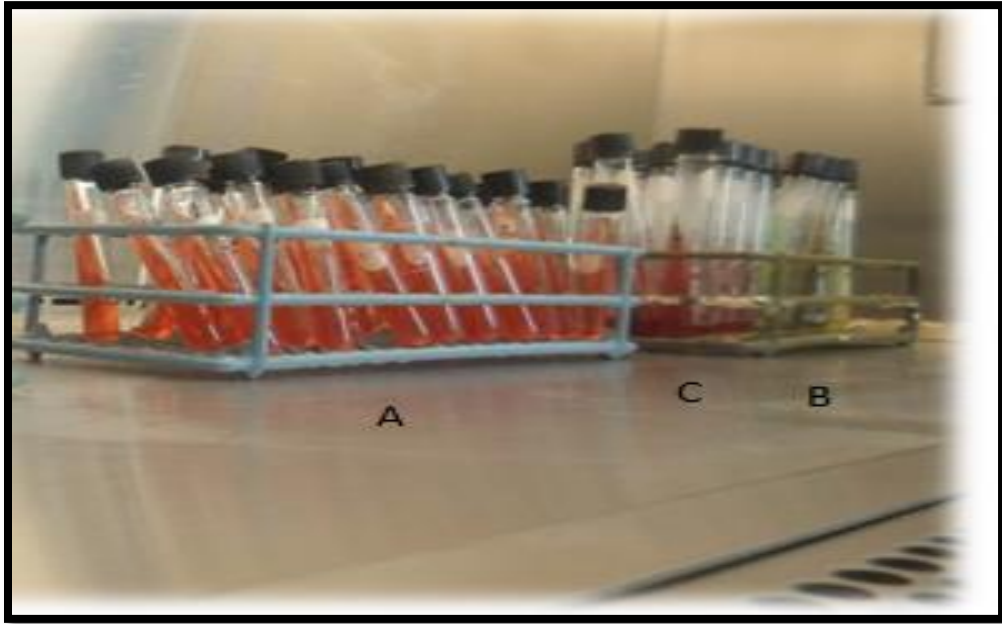


Figura 5. Proceso de siembra e incubación de las bacterias en los medios selectivos.

### 2.2.6.4 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.

Para la identificación de *Salmonella* se prepararon tubos por duplicado de los siguientes medios de cultivo: Triple Sugar Iron (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA), se

sembraron mediante estría y punción, y se incubaron a 37° C por 24 h (Figura 6). Los tubos con caldo urea se incubaron por 12 h a 37° C.



**Figura 6.** Medios de cultivo para pruebas bioquímicas. A) TSI B) LIA C) Urea

## **2.3 RESULTADOS**

### **PRESENCIA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN MUESTRAS DE CÁLCES FRESCOS DE JAMAICA.**

Después de realizar el análisis de NMP para determinar la presencia de coliformes fecales y totales en los cálices frescos de Jamaica, se obtuvieron los siguientes resultados:

Los resultados para la cuantificación de coliformes totales en cálices enteros de Jamaica variedad criolla de Ayutla se muestra se muestra en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Presencia de coliformes totales en cálices frescos de Jamaica variedad “Criolla de Ayutla”.

Muestra	NMP* / g o ml
1	43
2	<3
3	<3
4	14
5	4
6	3
7	4
8	4
9	3
10	>2 400
11	1 100
12	240
13	240
14	>2 400
15	4

\*NPM, número más probable, coliformes por gramo o mililitro; confianza del 95%.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa SAS de los datos obtenidos para determinar las diferencias entre las muestras. El valor de alfa ( $\alpha$ ) es menor a 0.05 lo que indica que existen diferencias entre las muestras

procesadas, por lo que se realizó un estudio de Tukey, como se muestra en el cuadro 9.

**Cuadro 9.** Estudio de Tukey para Coliformes Totales en la variedad “Criolla de Ayutla”.

<b>Grupos</b>	<b>Valores</b>	<b>Tratamientos</b>
<b>A</b>	2400	10
<b>A</b>	2400	14
<b>B</b>	1100	11
<b>C</b>	240	13
<b>C</b>	240	12
<b>D</b>	43	1
<b>E</b>	14	4
<b>F</b>	4	7
<b>F</b>	4	5
<b>F</b>	4	8
<b>F</b>	4	15
<b>G</b>	3	2
<b>G</b>	3	9
<b>G</b>	3	6
<b>G</b>	3	3

La prueba de Tukey definió 7 grupos diferentes de muestras, de los cuales el grupo A y B (A: muestras 10 y 14, B: muestra 11) se encuentran dentro de un rango de 1100 a más de 2400 coliformes totales, y los demás grupos del C al G están en el rango de 3 a 240. Se puede observar que la mayoría (1-9, 12,13, y 15) de las muestras de Jamaica de la variedad “criolla de Ayutla” tienen un nivel bajo de coliformes totales, por lo tanto aceptable según la NOM-112-SSA1-1994, y no representan un riesgo para la salud humana.

Las muestras 10, 11 y 14, tiene un resultado considerablemente alto de 1 100 coliformes por g en adelante, lo que representa un riesgo importante de contaminación por coliformes totales.

A continuación se muestra cuadro 10 la cuantificación de coliformes fecales en cálices enteros de Jamaica variedad “Criolla de Ayutla”:

**Cuadro 10.** Presencia de coliformes fecales en cálices frescos de Jamaica variedad “Criolla de Ayutla”.

Muestra	NMP* / g o ml
1	43
2	<3
3	<3
4	4
5	4

6	3
7	4
8	4
9	3
10	>2 400
11	1 100
12	240
13	9
14	>2 400
15	4

\*NPM, número más probable, coliformes por gramo o mililitro.

Se realizó un análisis de varianza y prueba de “Tukey” (Cuadro 11) para agrupar las muestras de acuerdo a sus semejanzas en cantidad de coliformes fecales por g o mL.

**Cuadro 11.** Estudio de Tukey para Coliformes Fecales en la Variedad “Criolla de Ayutla”.

Grupos	Valores	Tratamientos
A	2400	10
A	2400	14
B	1100	11
C	240	12

<b>D</b>	43	1
<b>E</b>	9	13
<b>F</b>	4	7
<b>F</b>	4	8
<b>F</b>	4	5
<b>F</b>	4	4
<b>F</b>	4	15
<b>G</b>	3	2
<b>G</b>	3	9
<b>G</b>	3	6
<b>G</b>	3	3

La prueba de Tukey definió 7 grupos diferentes de muestras, de los cuales el grupo A y B (A: muestras 10 y 14, B: muestra 11) se encuentran dentro de un rango de 1100 a más de 2400 coliformes total, y los demás grupos del C al G están en el rango de 3 a 240. Se observa una situación similar que en el cuadro 10. Las muestras 10, 11 y 14 representan un riesgo de contaminación por coliformes fecales de acuerdo con la NOM-112-SSA1-1994.

A continuación en el cuadro 12 se muestran los resultados de la cuantificación coliformes totales en cálices enteros de la variedad "Coneja".



**Cuadro 12.** Presencia de coliformes totales en cálices enteros de la variedad “Coneja”.

Muestra	NMP* por g o ml
16	93
17	15
18	1 100
19	15
20	3
21	4
22	3
23	<3
24	8
25	4
26	3
27	4
28	<3
29	<3
30	<3

\*NPM, número más probable, coliformes por gramo o mililitro.

Del mismo modo que en los casos anteriores se realizó un análisis de varianza con y prueba de “Tukey” para agrupar las muestras de acuerdo a sus semejanzas en cantidad de coliformes fecales por g o mL.

**Cuadro 13.** Estudio de Tukey para Coliformes Totales en la variedad “Coneja”.

<b>GRUPOS</b>	<b>VALORES</b>	<b>TRATAMIENTOS</b>
<b>A</b>	1100	18
<b>B</b>	93	16
<b>C</b>	15	17
<b>C</b>	15	19
<b>D</b>	8	24
<b>E</b>	4	21
<b>E</b>	4	27
<b>E</b>	4	25
<b>F</b>	3	22
<b>F</b>	3	20
<b>F</b>	3	26
<b>F</b>	3	23
<b>F</b>	3	28
<b>F</b>	3	29
<b>F</b>	3	30

La prueba de Tukey definió 6 grupos (A, B, C, D, E y F) diferentes de muestras, de los cuales solamente el grupo A (solamente la muestra 18) tiene una diferencia considerable respecto a las otras 6 y que representa un peligro serio de contaminación de coliformes totales (1100 coliformes totales por g o mL), los demás grupos del B al F no representan un peligro, al colocarse en un rango de 3

a 93 coliformes totales por g o mL. Se puede observar cómo se comportaron las muestras 16 a 30 de la variedad “coneja”, todas con mucha semejanza, no representando ningún riesgo para la salud humana según la NOM-112-SSA1-1994; salvo la muestra 18 que de acuerdo a la tabla del número más probable tiene una cantidad de 1100 coliformes totales por g, lo que representa un riesgo para la salud.

En el cuadro 14 se muestran los resultados de las muestras 16 a 30 y contienen la cuantificación de coliformes fecales en cálices enteros de Jamaica de la variedad coneja:

**Cuadro 14.** Presencia de Coliformes Fecales en cálices frescos de Jamaica de la variedad “Coneja”.

Muestra	NMP por g o ml
16	93
17	15
18	1 100
19	7
20	3
21	4
22	3
23	<3

24	7
25	---
26	3
27	4
28	<3
29	<3
30	<3

\*NPM, número más probable, coliformes por gramo o mililitro.

El análisis determinó que al igual que los otros tres cuadros hay una variabilidad significativa entre las muestras analizadas, y se realizó la prueba de Tukey para agrupar dichas muestras en conjuntos de muestras similares, como se observa en el cuadro 15:

**Cuadro 15.** Estudio de Tukey para Coliformes Fecales en la variedad “Coneja”.

GRUPOS	VALORES	TRATAMIENTOS
A	1100	18
B	93	16
C	15	17
D	7	19
D	7	24
E	4	21
E	4	27
F	3	22

<b>F</b>	3	20
<b>F</b>	3	29
<b>F</b>	3	26
<b>F</b>	3	23
<b>F</b>	3	28
<b>F</b>	3	30
<b>G</b>	0	25

Se observan 7 grupos (A, B , C, D, E, F y G) diferentes entre las 15 muestras procesadas, 6 de ellos (B-G) no representan un riesgo al estar dentro del rango 0 a 93 coliformes totales por g o mL, sin embargo, el grupo A que contiene solamente a la muestra 18 representa un riesgo importante de contaminación por coliformes fecales al presentar 1100 por g o mL. La muestra 18 representa un riesgo de salud al contener 1100 coliformes fecales por g de acuerdo a la tabla del número más probable y la NOM-112-SSA1-1994, el resto de las muestras están dentro del nivel permitido y no significan ningún riesgo.

### **RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA *Escherichia coli*.**

De las placas con medio EMB inoculadas, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 16 para el tratamiento 1 (Homogenizado con cálices enteros) y en el cuadro 17 (Homogenizado con cálices triturados).

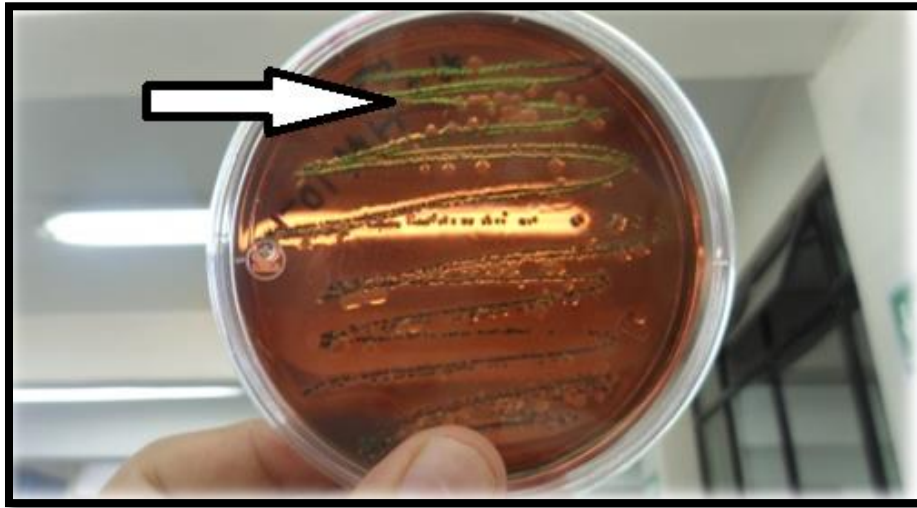
**Cuadro 16.** Crecimiento de colonias sospechosas de *E. coli* en medio EMB del tratamiento de homogenizado con cáliz entero (Tratamiento 1).

MUESTRA	DILUCION	EMB
1	10 <sup>-1</sup>	+
		+
		+
8	10 <sup>-1</sup>	+
		+
	10 <sup>-2</sup>	+
10	10 <sup>-1</sup>	+
		+
		+
11	10 <sup>-1</sup>	+
		+
		+
12	10 <sup>-1</sup>	+
		+
		+

**Tabla 17.** Colonias sospechosas de *E. coli* en medio EMB del tratamiento de homogenizado con trituración del cáliz (Tratamiento 2).

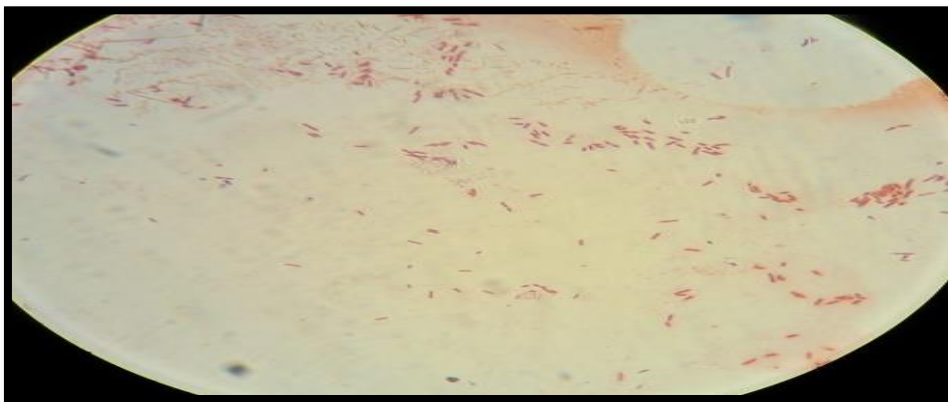
MUESTRA	DILUCIONES	EMB
16	10 <sup>-1</sup>	+
		+
		+
17	10 <sup>-2</sup>	+
		+
	10 <sup>-1</sup>	+
18	10 <sup>-1</sup>	+
		+
		+
19	10 <sup>-2</sup>	+
		+
	10 <sup>-1</sup>	+
24	10 <sup>-1</sup>	+
		+

Del total de placas con medio EMB, se identificaron colonias sospechosas de *E. coli* en las muestras 1, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19 y 24. En la figura 10 se observan las características de crecimiento de colonias sospechosas para *E. coli* en el medio de cultivo EMB.



**Figura 7.** Placa con crecimiento de colonias verdes con brillo metálico sospechosas de *E. coli* en medio de cultivo EMB.

A partir de las tinciones de Gram se concluye la forma bacilar alargada (forma de barra) y un Gram negativo (Figura 8) y se procedió a las pruebas IMViC.

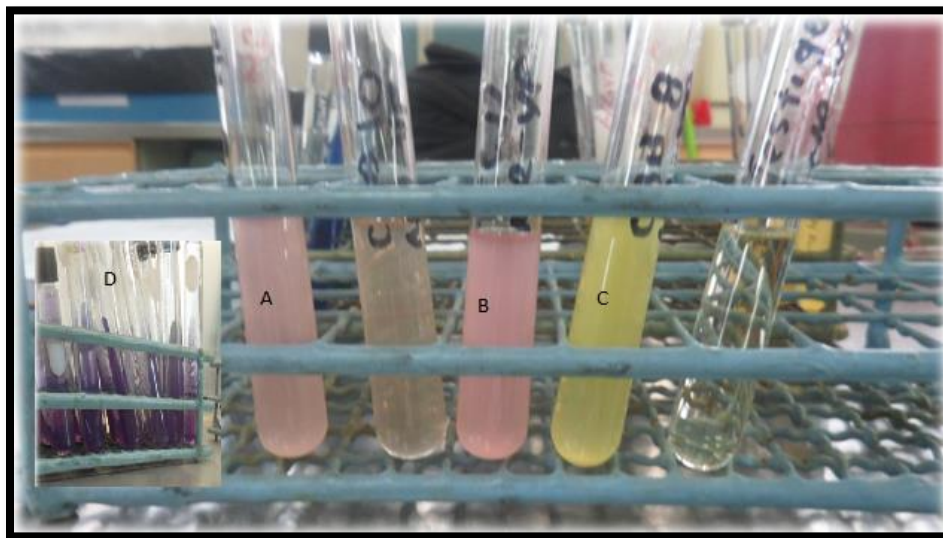


**Figura 8.** Tinción de Gram negativa y morfología de las células sospechosas de *Escherichia coli* vistas al microscopio compuesto (40X), aisladas de cálices frescos de jamaica

Los resultados de la caracterización en las pruebas IMViC (figura 9) fueron negativas para la identificación de *E. coli*, en el cuadro 18 se muestran los resultados.

**Tabla 18.** Resultados de las pruebas IMViC.

<b>Indol</b>	+
<b>Rojo de metilo</b>	+
<b>Voges proskauer</b>	+
<b>Citratos</b>	+



**Figura 9.** Pruebas IMViC: A) Rojo de Metilo B) Indol C) Voges Proskauer D) Citratos E) Testigo

De acuerdo con Roger Stanier en su libro de “Microbiología”, la identificación positiva para *E. coli* mediante la caracterización con los medios IMViC debe ser: Indol (+), Rojo de metilo (+), Voges proskauer (-) y Citratos (-), que son una indicación indirecta de la forma de fermentación de azúcares. Los resultados obtenidos en la caracterización de las cepas sospechosas de *E. coli* aisladas de los cálices frescos de Jamaica en ambas variedades mostraron una respuesta

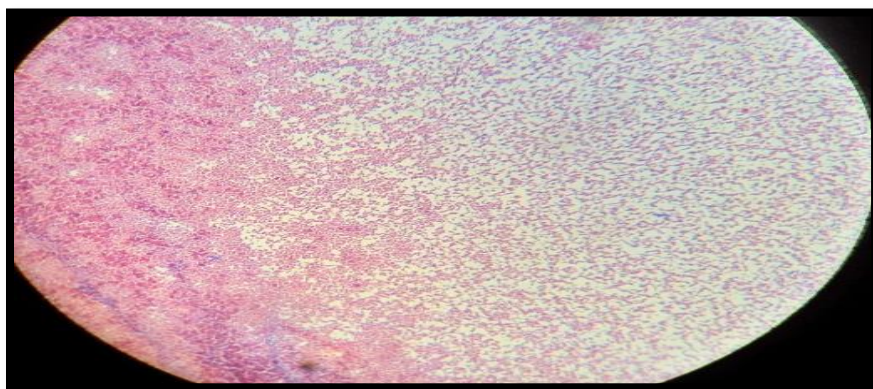


positiva para Voges Proskauer y Citratos; por lo anterior, las colonias aisladas de todas las muestras analizadas no corresponden a *Escherichia coli*, sino a otras bacterias del grupo de los coliformes, que comparten algunas características similares. Sin embargo, a partir de los resultados anteriores, podemos inferir que si existen las condiciones necesarias para el desarrollo de *E. coli* en el filoplano de los cálices de estas dos variedades y posiblemente en otras más, ya que fue posible aislar bacterias similares de ellas.

### **RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA *Salmonella*.**

De todos los medios diferenciales que se utilizaron solamente se obtuvo crecimiento de colonias con morfología típicas de *Salmonella* en los medios Sulfito Bismuto y Salmonella Shigella.

Estas colonias se caracterizaron mediante la prueba de tinción de Gram, dando como resultado que todas fueron Gram negativas y las células redondeadas y muy pequeñas (Figura 10), resultados que no concuerdan con la morfología descrita para *Salmonella*.



**Figura 10.** Tinción de Gram negativa y morfología de las células sospechosas de *Salmonella* vistas al microscopio compuesto (40X), aisladas de cálices frescos de jamaica

Sin embargo, aún con estos resultados, se procedió entonces a realizar las pruebas bioquímicas confirmativas para *Salmonella*, y el resultado fue negativo.



**Figura 11.** Resultados negativos de pruebas bioquímicas: A) LIA B) TSI C) TESTIGO

Los tubos con el medio LIA no cambiaron a ningún color, se mantuvieron en color púrpura.

Los tubos con el medio TSI cambiaron a color amarillo y rojo.

Los tubos con el medio Caldo urea, se mantuvieron en color rojo y otros tubos cambiaron a color amarillo.

De acuerdo a los resultados de tinción de Gram y observaciones de la morfología de las colonias en microscopio, y de los resultados de las pruebas bioquímicas se concluye que las bacterias analizadas no corresponden a ninguna del género *Salmonella*.

## 2.4 DISCUSIÓN.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el 86.7% de las muestras hay una baja cantidad de coliformes totales y fecales, las cuales no representan un riesgo para la salud humana de acuerdo con la norma NOM-112-SSA1-1994.

El otro 13.3% (Muestras 10, 11, 14 y 18, que corresponden a los sitios de muestreo de La Hacienda (10), El Mezón (11 y 18) y San Antonio (14)) si representa un riesgo, obteniendo valores de 1100 coliformes totales o fecales por g en adelante.

La muestra 10 se colectó en la localidad de La Hacienda, la muestra 11 y 18 en la comunidad de El Mezón, la muestra 14 en la comunidad de San Antonio.

Investigaciones previas han demostrado que los cálices deshidratados de Jamaica, que es la forma más común de comercialización, puede inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas, entre las que se encuentran los coliformes totales y fecales, por la presencia de etanol, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, pro antocianidinas, flavonoles, flavones, isoflavonas y antocianinas (Morales *et al.*, 2013); Sin embargo, también es cierto que los cálices frescos contienen un alto contenido de humedad, situación que es favorable para el crecimiento y supervivencia de bacterias del grupo de los coliformes y también de *Salmonella* (FAO, 2012).

No se encontraron indicios de la presencia de *Escherichia coli* ni de *Salmonella* en los cálices frescos de Jamaica de las variedad de criolla de Ayutla y Coneja, aunque hubo crecimiento de otras bacterias del grupo coliforme, esto podría

indicar que el filoplano de los cálices de Jamaica fresca pueden constituir un sustrato adecuado para el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella*.

Los cálices frescos de Jamaica constituyen un sustrato adecuado para albergar una carga microbiana, tanto nativa, como, adquirida; ya que es posible el aislamiento de coliformes totales y fecales a partir del filoplano de los cálices.

Un mal manejo postcosecha puede ser un factor determinante para la adquisición de carga microbiana nociva y de riesgo para la salud humana, tal es el caso de bacterias pertenecientes al grupo de los coliformes o de *Salmonella* (FAO, 2012).

La puesta en marcha de Buenas Prácticas de Manejo y de Buenas Prácticas Agrícolas, ayudará a disminuir la carga microbiana nociva para la salud humana, al no poner en contacto el producto con zonas de riesgo de infección (FAO, 2012).

El pH es un factor fundamental en los extractos de plantas, debido a que puede afectar de manera directa a la actividad antimicrobiana de estas (Brandi et al., 2006). Abu-Tarboush (1994), concluyó que el grado de inhibición que presentan los extractos de Jamaica se debe principalmente a su bajo pH, además de otros compuestos inhibidores presentes, pero aún no se han confirmado con claridad. Sin embargo, la presencia de estos inhibidores puede ser afectada por el pH. Un ejemplo, de lo anterior son las antocianinas, las cuales son estables a pH inferior a 3 (Brouillard, 1982). Por otro lado, muchas bacterias no soportan pH inferior a 3, tal es el caso de *Salmonella* que su intervalo de pH para su crecimiento se encuentra entre 4.1 y 9.0 (Francis & O'Beirne, 1999; Cheng-Hsun et al., 2002).

Las suspensiones madre de los tratamientos dieron niveles de pH por arriba de 3, Tratamiento 1 de cálices enteros con agua peptonada de la variedad "Criolla de Ayutla" tuvo un pH de 5.29 y el tratamiento 2 de cálices triturados con agua

peptonada de la variedad "Coneja" un pH de 3.1. Por lo anterior, podemos inferir en que la cantidad de humedad en los cálices y los niveles de pH en los cálices frescos son benéficos para el crecimiento de Microorganismos nativos y adquiridos en el filoplano del cáliz fresco de Jamaica, incluyendo coliformes, *Escherichia coli* y *Salmonella*; y que las formas de postcosecha son de importancia para contaminar el producto con microorganismos dañinos para la salud.

Los resultados de este estudio, resalta la necesidad de profundizar en la investigación y determinar la supervivencia de estas poblaciones bacterianas patógenas al humano en el cáliz fresco de la Jamaica, determinar cuantitativa y cualitativamente los compuestos antimicrobianos presentes en los cálices con estas condiciones de humedad, además de estudios en los que se evalúen las diferentes técnicas de manejos postcosecha de estos cálices y determinar el grado de contaminación presente en cada uno de ellos.

### III. CAPÍTULO II. “POBLACIÓN BACTERIANA NATIVA EN EL FILOPLANO DEL CÁLIZ DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) CON POTENCIAL ANTAGONISTA CONTRA *Corynespora cassiicola*”

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, una de las principales limitantes para el óptimo cultivo y comercialización de la Jamaica son las plagas y enfermedades. Se ha documentado que la Jamaica es susceptible a diversos patógenos, tanto en hojas, raíz, tallo, semilla y fruto con diversos niveles de daño: entre los que destacan *Phytophthora parasítica* (pudrición del tallo); *Botrytis cinérea* (pudrición de la raíz); *Phoma sabdariffa* (síntoma llamado “hoja fleck”); *Rhizoctonia solani* (pudrición de semilla); *Sclerotium rolfsii* (podredumbre del tallo); *Cercospora hibisci* (mancha foliar) (McClintock, 2004); *Fusarium oxysporum* (marchitez vascular) (Hallimatul *et al*, 2007).

En los últimos 2 años, en la zona productora de Jamaica del estado de Guerrero, se ha presentado con alta incidencia y severidad una enfermedad en los cálices del cultivo de Jamaica. Esta enfermedad, ha sido denominada por los productores locales como “manchado de los cálices”, la cual se caracteriza por manifestar síntomas de manchas café-oscuras en los cálices frescos, imposibilitando su cosecha y comercialización en el mercado. Resultados de investigaciones recientes han demostrado que el agente causal de esta enfermedad es el hongo *Corynespora cassiicola* (datos no publicados).

*Corynespora cassiicola* (Berk & Curt.) Wei ha sido reportado comúnmente como un hongo fitopatógeno foliar con un amplio rango de hospedantes dentro de áreas

tropicales y subtropicales (Farre et al., 1980; Holliday 1980; Romruensukharom et al., 2005); además de ser un fitopatógeno, en algunos hospedantes también se ha reportado como endófito o saprófito (Collado 1999; Hyde et al., 2001; Survanarayanan et al., 2002; Lumvong et al., 2003; Gong et al., 2007; Lee et al., 2004; Promputtha et al., 2007;). Aunque la enfermedad que se le atribuye es típicamente folia, también puede causar pudriciones en frutos, tallos y raíces (Jones et al., 1991). Los síntomas de las enfermedades atribuidas a *C. cassiicola* incluyen necrosis, frecuentemente rodeado de un halo amarillo, debido a la producción de una toxina hospedante-específico llamada cassiicolina (Kurt, 2004; Barthe et al., 2007). Es una Ascomycota perteneciente a Dothideomycetes (Schoch et al., 2009), se encuentra en más de 300 especies de plantas, entre ellas albacá, frijol, pepino, papaya, soya, camote y jitomate, causando importantes pérdidas económicas (Base de datos de 2011, <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>). En EEUU ha sido reportado en ornamentales (El-Gholl and Shubert 1990; El-Gholl et al., 1997); En India en ornamentales (Silva et al., 2000); cucurbitáceas (Tsay and Kuo 1991; Yudin and Schlub, 1998), Jitomate (Schlub and Yudin 2002) y Chile (Kwon et al., 2001). En Brasil en ornamentales (Leite and Barreto 2000; Pohitronieri, 2003; Da Silva et al., 2005).

La primera vez que se estudió este patógeno fue en el árbol de caucho en 1936, causando la enfermedad denominada “caída de hoja”, y que se encuentra entre las principales enfermedades de este cultivo. A partir de entonces comenzó a extenderse rápidamente en la mayoría de los países productores de caucho, causando epidemias esporádicas graves e importantes (Newsam, 1960).

Aunque se ha reportado que *C. cassiicola*, es un patógeno, se ha demostrado que las capacidades tróficas de este hongo son muy diversas, reportando formas como endotróficas y saprófitas. En el árbol de caucho, *C. cassiicola* es conocido como un patógeno necrotrófico que ataca a la planta mediante la producción de un compuesto fitotóxico, dando origen a síntomas que varían dependiendo del hospedante y la raza específica del hongo; lo anterior indica que existe variabilidad genética en este patógeno, lo que origina que las medidas de control a base de fungicidas genere poblaciones resistentes del hongo con mayor facilidad (Breton et al., 2000).

La enfermedad producida por la infección de *C. cassiicola* está relacionada a la producción de la toxina cassicolina; una proteína glicosilada rica en cisteína (Déon et al., 2012) compuesta de 27 aminoácidos con una estructura compacta unida por tres puentes de disulfuro (Breton et al, 2000). El modo de acción de la toxina se mantiene desconocido, aunque está demostrado que se expresa en la fase temprana de la infección (Déon et al, 2012).

La Jamaica es un cultivo altamente soluble y por lo tanto absorbente, lo que lo hace sensible a la utilización de productos químicos para el combate de fitopatógenos, ya que se considera que la contaminación química haría de la Jamaica un producto altamente nocivo para la salud humana por su forma de consumo. En los últimos años se ha incrementado el interés de los técnicos, agricultores, instancias gubernamentales y de la sociedad en general sobre la utilización de control biológico de plagas y enfermedades, como una alternativa de bajo impacto ambiental y una herramienta segura para los productores y los consumidores (Salas, 2003).



El control biológico se define como “la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad productora de enfermedad de un patógeno llevada a cabo por uno o más organismos diferentes al hombre”. La “actividad productora de enfermedad” incluye el crecimiento, infectividad, agresividad, virulencia y otras características del patógeno, o de los procesos que determinan la infección, el desarrollo de síntomas y la reproducción (Cook and Baker, 1983).

El control biológico, en su origen, se fundamentó en la relación efectiva entre el enemigo natural y su víctima (hospedero o presa), de ahí que sea esencial la identificación correcta de las especies involucradas en esta relación. La interacción en el biocontrol se presenta debido a una relación mutualista con la planta, mediante la cual le confieren protección contra factores bióticos y abióticos adversos (Carrol, 1990; Schulz and Boyle, 2006).

Es también fundamental determinar el lugar de origen de la plaga o enfermedad en estudio, ya que los enemigos naturales más efectivos de la misma se encuentran generalmente en el centro de origen de la enfermedad como poblaciones nativas de la planta (Van den Bosch et al., 1982). Por lo anterior, la búsqueda de microorganismos nativos en diferentes nichos ecológicos, cada vez adquiere mayor atención y relevancia para el desarrollo de modelos de control biológico; ya que son considerados microorganismos adaptados a un medio ambiente, y consecuentemente, de mayor eficacia en la interacción con la planta y el patógeno.

Los cultivos agrícolas, en cualquier sistema de producción, se ven amenazados constantemente por plagas y enfermedades, lo anterior implica la generación de medidas de control para su óptimo manejo; en la mayoría de los casos estas

medidas implican el uso de productos químicos, los cuales han contribuido de forma masiva a la degradación de los recursos naturales, la contaminación del medio ambiente, y la toxicidad a los consumidores (Salas, 2003).

Si se desea revertir la tendencia del uso masivo de productos químicos, sintéticos, es necesario utilizar métodos alternativos no contaminantes como lo es el control biológico, con ello disminuiría el impacto que implica la utilización de productos químicos en el medio ambiente. Cuando se usa en una forma adecuada un programa de control biológico, puede resultar efectivo y económico, y no ocasiona aumentos de las plagas de niveles inferiores a niveles superiores; no incrementa la contaminación ambiental ni deja residuos en el medio; no representa una amenaza a los trabajadores que manejan los materiales biológicos, ni a los consumidores de los productos alimenticios. Actualmente, cada vez aumenta la demanda de productos alimenticios libres de residuos de insecticidas, por lo que el uso de agentes de Control Biológico es una alternativa idónea para producir alimentos con estas características.

Diversas investigaciones se han realizado con microorganismos bacterianos para su uso en sistemas de control biológico; en este contexto, especies incluidas en los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, se han destacado por su versatilidad como eficientes agentes de biocontrol (Carrol, 1990; Schulz and Boyle, 2006).

El género *Bacillus* incluye una importante variedad de especies Gram positivas, no patogénicas, con propiedades antagonistas. Producen un amplio rango de proteínas y metabolitos, los cuales son altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades (Berg and Hallman, 2006). Los mecanismos de acción de *Bacillus* spp. incluyen competencia por espacio y nutrientes (Handelsmann and

Stabb, 1996), antibiosis (Loeffler et al., 1986) e inducción de resistencia (Kloepper and Ryu, 2006). La capacidad de *Bacillus* spp. de formar esporas que sobreviven y permanecen metabólicamente activas bajo condiciones adversas (Rodgers, 1989), las hace apropiadas para la formulación de productos viables y estables para el control biológico. *B. subtilis* es uno de los más eficientes agentes de biocontrol, el cual exhibe actividad antagonista contra varios hongos y bacterias patogénicos. Este antagonismo se ha atribuido a la producción de antibióticos y a la capacidad de colonización en la planta (Loeffles et al., 1986; Bochow and Gantcheva, 1995).

El género *Pseudomonas* ha sido estudiado como importantes agentes de biocontrol por su capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos patógenos, como bacterias, hongos, nematodos y virus, mismos que podrían llegar a reducir considerablemente el rendimiento en los cultivos establecidos tanto en invernadero como en campo. Estos organismos ejercen ciertos mecanismos de acción antagonista que involucran la producción de metabolitos, como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y antibióticos (Loper, 1988; Hamdan et al., 1991, Mazzola et al., 1992; Thomashow and Weller, 1995; Haas and Défago, 2005; Berg and Hallman, 2006). Además se ha comprobado que en algunos casos inducen un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos patógenos del suelo (Weller and Cooke, 1983; Kloepper and Ryu, 2006).

Por lo anterior, *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. constituyen poblaciones microbianas con alto potencial para ser utilizados como agentes de biocontrol. La presente investigación tiene como objetivo aislar e identificar poblaciones microbianas nativas y buscar en forma selectiva poblaciones de *Pseudomonas* y *Bacillus* en el

filoplano de los cálices frescos de Jamaica con potencia antagonista contra *C. cassicola*.

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL**

En enero de 2013, se obtuvieron muestras de cálices frescos y sanos de Jamaica de las variedades “China Roja”, “Criolla de Ayutla” y “Sudán”, en las comunidades de Tutepec y San Miguel en el municipio de Ayutla de los libres, Guerrero. Los cálices fueron recolectados de manera aséptica y transportadas en bolsas de plástico (Marca Ziploc® de 20 x 20 cm) a temperatura de refrigeración (4° C), para su análisis en el laboratorio de bacteriología del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, en Texcoco, Estado de México.

### **3.2.2 EXTRACCIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS TOTALES.**

La extracción de las poblaciones bacterianas totales se realizó a partir de cálices completos frescos. Se preparó una suspensión madre en 60 mL de agua destilada estéril con un cáliz entero de Jamaica, evitando cortar el cáliz para no inducir la liberación de compuestos fenólicos en la solución que pudieran interferir en el crecimiento bacteriano (García et al., 2006). Las suspensiones se agitaron durante 10 minutos en un agitador orbital (Figura 12) y de cada suspensión se realizaron tres diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) de cada dilución se inocularon (200  $\mu$ L) en microplacas con 98 pocillos (Shiva, 2007) con 200  $\mu$ L de medio de cultivo caldo soja triptona (TSB), que contiene g<sup>-1</sup> : bacto tryptona 17 g, bacto soytone 3.0 g, glucosa 2.5 g, cloruro sódico 5.0 g, fosfato dipotásico de hidrógeno 2.5 g

Las microplacas se incubaron durante 72 horas a una temperatura de 28° C y posteriormente se inocularon 10 µL de cada dilución a placas Petri con medio agar nutritivo (AN); Las placas se incubaron a 28° C por 48 horas. El crecimiento bacteriano fue purificado y preservado.

### **3.2.3 EXTRACCIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS DEL GÉNERO *Pseudomonas* ASOCIADAS A CÁLCICES FRESCOS DE JAMAICA.**

Para la extracción de bacterias cultivables pertenecientes al género *Pseudomonas*, se utilizó el mismo método descrito anteriormente para las poblaciones totales, sustituyendo el medio TSB por el medio 1/3 B de King (1/3 BDK) ( $\text{g}^{-1}$ ): Proteosa peptona 20.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g, Glycerol 15 mL, suplementado con cicloheximida, ampicilina y cloranfenicol (Landa, et al., 2006).

Las microplacas se incubaron durante 72 h a una temperatura de 28° C. Posteriormente, se transfirieron 10 µL de cada dilución a medio BDK agar, sin antibiótico e incubados por 48 h a 28° C. El crecimiento bacteriano fue cuantificado y purificado para su preservación.

### **3.2.4 EXTRACCIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS DEL GÉNERO *Bacillus* ASOCIADAS A CÁLCICES FRESCOS DE JAMAICA.**

La extracción de poblaciones bacterianas del género *Bacillus* se realizó en una suspensión del cáliz entero en 60 mL de buffer fosfatos (solución amortiguadora). Posteriormente, las soluciones fueron sometidas a agitación por 10 minutos (Figura 12). Después, los tubos con la suspensión madre se sometieron a 60°C de calor durante 10 minutos en “baño maría”, para estimular la liberación de

endoesporas de bacterias pertenecientes al género *Bacillus*. Se tomaron 100 µL de cada solución y se sembraron en medio de cultivo BDK agar y se incubaron a 28° C por 24-48 h.



**Figura 12.** Agitación de la suspensión madre de cálices de 3 variedades de Jamaica (Criolla de Ayutla, China roja y Sudán).

Para la extracción de todas las poblaciones bacterianas anteriormente mencionadas se utilizaron cálices de tres variedades (Criolla de Ayutla, China roja y Sudán) y cada una de ellas con 3 diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) a partir de la solución madre (cuadro 19).

**Cuadro 19.** Extracción de poblaciones bacterianas totales. *Pseudomonas* y *Bacillus* en 3 variedades de Jamaica (Criolla de Ayutla, China roja y Sudán).

Población bacteriana	Medio/Técnica Selectiva	Medios de transferencia para purificación
Bacterias Totales	Medio TSB	Agar Nutritivo

<b>Pseudomonas</b>	Medio 1/3 BDK suplementado con cicloheximida, ampicilina y cloranfenicol	BDK agar
<b>Bacillus</b>	Baño María (60° C/10 min)	BDK agar

### 3.2.5 PURIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS

A partir del cultivo en placa de la dilución  $10^{-3}$  de cada población, se cuantificaron y se seleccionaron colonias bacterianas con base en sus diferencias morfológicas (forma, color, velocidad de crecimiento). Lo anterior permitió la agrupación de 61 morfotipos bacterianos diferentes, los cuales se transfirieron a placas del mismo medio de cultivo mediante la técnica de punto para su purificación (Figura 13).



. **Figura 13.** Purificación de las bacterias por la técnica de punto en medio BDK y Agar Nutritivo.

### **3.2.6 ANTAGONISMOS *In vitro* DE LAS BACTERIAS ASOCIADAS A CÁLCICES FRESCOS DE JAMAICA CONTRA *Corynespora cassiicola*.**

Se evaluó el antagonismo *In vitro* de los 64 morfotipos seleccionados de los cálices frescos de Jamaica contra el hongo patógeno *Corynespora cassiicola*. La cepa del hongo fue aislado de plantas con síntomas del manchado de cálices en el estado de Guerrero. La patogenicidad de la cepa del hongo se evaluó mediante inoculaciones artificiales en cálices y hojas en plantas de Jamaica bajo condiciones de invernadero. El antagonismo de las bacterias *In vitro* se realizó mediante confrontación dual en el medio de cultivo "Waksman" agar g L<sup>-1</sup>: agar 20 g, glucosa 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, peptona 5.0 g, pH 6.8),

Las bacterias se incubaron por 48 h a 28° C en microplacas de 96 pocillos con 300 µL de caldo nutritivo. Se preparó una suspensión de conidios de *Corynespora cassiicola* a una concentración de 37,000 conidios por mL<sup>-1</sup>, utilizando la cámara de Neubauer para su conteo.

Para la primera confrontación dual, se utilizaron placas Petri de 120 x 120 mm; inoculando 300 µL de la suspensión de conidios del hongo, y distribuyendo en toda la superficie del medio con una asa de Digralsky. Las placas se mantuvieron por 3 h para poder permitir la completa absorción de la suspensión de conidios del hongo en el medio de cultivo, antes de la inoculación de las bacterias.

64 bacterias fueron inoculadas simultáneamente con ayuda de un inoculador multipunto (Boekel®, microplate replicator 98 puntos). Las placas se incubaron a 28° C por 48-72 h. El ensayo de confrontación dual se realizó con tres



repeticiones. Posteriormente se seleccionaron las bacterias que mostraron inhibición del crecimiento micelial del hongo (Figura 14).



**FIGURA 14.** Antagonismo *In vitro* de bacterias nativas del cáliz de Jamaica frente a *Corynespora cassiicola* en medio Waksman agar.

De esta primera confrontación dual con los 64 morfotipos bacterianos diferentes se seleccionaron un total de 38 bacterias que estuvieron involucradas en la zona de inhibición. Con estas 38 bacterias, se realizó otra evaluación de antagonismo *In vitro* con el mismo protocolo, pero cada cepa bacteriana se sembró en punto con una separación de 2.4 cm entre ellas. Posterior al periodo de incubación, el grado de antagonismo se determinó midiendo el halo de inhibición (mm), permitiendo la selección de 6 cepas bacterianas con los valores más altos de antagonismo *In vitro* contra *Corynespora cassiicola*.

Las 6 cepas bacterianas seleccionadas se evaluaron en otra fase de antagonismo *In vitro* contra *C. cassiicola*, utilizando solamente el sobrenadante de metabolitos de las bacterias. Para lo anterior, las bacterias se inocularon en tubos con 200  $\mu$ L de caldo nutritivo y se incubaron por 48 h a 28° C, posteriormente, se

centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 minutos. 20 µL del sobrenadante se utilizaron para la confrontación dual contra el hongo *Corynespora cassiicola* en medio Waksman agar. El grado de antagonismo se determinó midiendo el halo de inhibición (mm).

### **3.2.7 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN 16s ADNr DE LAS CEPAS BACTERIANAS.**

Las bacterias antagonistas fueron identificadas mediante la amplificación del gen 16S ADNr con los iniciadores universales 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT (Baker *et al.*, 2003).

La PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µL, usando 1 µL de los iniciadores a una concentración de 50 µM; amortiguador para PCR a concentración final de 1 X; MgCl<sub>2</sub>, a 1.8 mm; dTP's a 200 µM (Thermo Scientific, Lituania); 1.5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen, Brasil) y 1 µL de ADN. Las condiciones de PCR consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, alineamiento a 54 °C durante 45 segundos y extensión a 70 °C por 1 minuto; y 8 minutos a 70 °C para la extensión final.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler modelo Nexus gradient (Eppendorf, Alemania). Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % y visualizando en un fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad, California, E. U. A.)

La secuenciación de los productos de PCR amplificados se realizó en Macrogen (Korea), y se compararon con la base de datos del GenBank del NCBI (National

Center for Biotechnology Information) usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.29+ (Altschul *et al.*, 1997).

### **3.2.8 CARACTERIZACIÓN DE ANTAGONISMO *In vitro*.**

Las 6 cepas antagonistas con el mejor grado de antagonismo fueron caracterizadas para la producción de enzimas y metabolitos secundarios que potencialmente pudieran estar involucrados en el antagonismo *In vitro* contra *Corynespora cassiicola*.

### **PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)**

Para medir la producción de ácido indol acético se utilizó el método descrito por Sawar y Kremer (1995). El cultivo bacteriano se realizó en medio Caldo Soja Triptona (TSB) en microplacas de 96 pocillos. Las bacterias fueron inoculadas e incubadas por 24 h a una temperatura de 28° C. Posteriormente, se agregaron 3 µL de reactivo de Kovac; Un cambio a una coloración roja en el caldo de cultivo indicó la producción de AIA por las bacterias.

### **ACTIVIDAD LIPOLÍTICA**

Para medir la actividad lipolítica se utilizó el medio Tween 80 agar (Sigma, St. Louis, Mo) pH 6.8 (Chernin *et al.* 1995). Se utilizaron placas Petri de 120 mm x 120 mm, las bacterias se sembraron en punto con palillos estériles, y se incubaron por 10 días a una temperatura de 30°C. La formación de un halo turbio alrededor de la colonia inoculada, fue indicativo de la actividad lipolítica.

## **ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA**

La actividad proteolítica se determinó mediante el protocolo descrito por Chernin *et al.*, (1995): 50 mL de leche descremada estéril mezclada con 50 mL de 1/5 de caldo soja triptona (TSB) y 4 g de agar en placas Petri de 120 mm x 120 mm. Las bacterias se sembraron en punto con palillos estériles y se incubaron por 72 h a una temperatura de 28° C.

La formación de un halo hialino alrededor de la colonia bacteriana indicó la actividad proteolítica.

## **PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS**

Para determinar la producción de sideróforos se utilizó el protocolo desarrollado por Schwyn y Nelands (1987), el cual consiste en trabajar bajo condiciones limitantes de hierro.

Se utilizó el medio CAS agar en placas Petri de 120 mm x 120 mm. Las bacterias se sembraron por punto con palillos estériles y se incubaron a 28° C por 5 días. La formación de un halo amarillo en el punto de inoculación indica la producción de sideróforos.

## **SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS MINERALES**

La capacidad de solubilizar fosfatos minerales, se determinó con el medio TCP (g L<sup>-1</sup>): (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 4 g, glucosa 10 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, MgSO<sub>4</sub> 1, agar 20 g, con un pH ajustado a 7.2) (Abou *et al.*, 2007).

Se utilizaron placas Petri de 120 mm x 120 mm, las bacterias se inocularon en punto con ayuda de palillos estériles y se incubaron a 28° C durante 5 días. La

formación de un halo hialino alrededor de la colonia bacteriana indicó la solubilización del fosfato mineral.

### 3.2.9 PRESERVACIÓN DE BACTERIAS

Las colonias bacterianas fueron preservadas para futuras investigaciones por liofilización y en cultivo criogénico en caldo nutritivo y glicerol al 40% (1:1) a -20° C.

### 3.3 RESULTADOS

#### **ANTAGONISMO *In vitro* CONTRA *C. cassiicola*.**

A partir de los resultados de la confrontación dual *In vitro* contra *C. cassiicola*, de 64 bacterias aisladas del cáliz de 3 variedades de Jamaica (Criolla de Ayutla, China roja y Sudán), se detectaron un total de 15 bacterias implicadas en el antagonismo y la formación de halos de inhibición miceliar del hongo. De estas 15, se seleccionaron únicamente aquellas que producían individualmente un halo de inhibición > 1 cm, lo cual resultó en la selección de 6 cepas bacterianas con el mayor grado de antagonismo *In vitro* contra *C. cassiicola*. El antagonismo de estas 6 cepas fue evaluado mediante la inoculación de masa bacteriana y por la producción de metabolitos en caldo nutritivo. Los resultados de inhibición *In vitro* de las 6 cepas seleccionadas se muestran en el cuadro 20.

**Cuadro 20.** Halos de inhibición de 6 cepas bacterianas aisladas del cáliz de Jamaica con el mayor grado de antagonismo *In vitro* contra *C. cassiicola*.

---

CÓDIGO DE	HALO DE INHIBICIÓN CON	HALO DE INHIBICIÓN CON
-----------	------------------------	------------------------

---

BACTERIA	METABOLITOS SECUNDARIOS (cm)	MASA BACTERIANA (cm)
38	1.6	2.3
32	2.9	2.3
44	3.6	3.3
H1	3.0	6
H2	2.5	6.6
H3	2.3	6.6

### AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN 16s ADNr

Con los indicadores 8F y 1492R, mediante PCR se obtuvo una ampliación de un fragmento de 1500 pares de bases del gen 16S ADNr. LA secuenciación de este fragmento y la comparación de estas secuencias en el banco de genes del NCBI, identificaron las cepas antagonistas con un 99% de identidad. Los resultados de la identificación mostraron que de las 6 cepas con el mayor grado de antagonismo contra *C. cassiicola* son: 66.6 (4 cepas) *Bacillus subtilis*; 16.7% (1 cepa) *Bacillus amyloliquefaciens* y 16.7% (1 cepa) *Pseudomonas* sp. (Cuadro 21).

**Cuadro 21.** Identificación de las bacterias antagonistas a *Corynespora cassiicola* mediante la amplificación y secuenciación del gen 16s ADNr.

Código	Nombre
<b>32</b>	Pseudomonas sp.
<b>38</b>	Bacillus amyloliquefaciens
<b>44</b>	Bacillus subtilis
<b>H1</b>	Bacillus <i>subtillis</i>
<b>H2</b>	Bacillus <i>subtillis</i>
<b>H3</b>	Bacillus <i>subtillis</i>

Estos resultados identifican a 2 géneros bacterianos (*Bacillus* y *Pseudomonas*) que se encuentran habitando en forma nativa cálices frescos en 3 variedades de

Jamaica, los cuales han sido intensamente investigados como agentes de biocontrol con una alta eficiencia en diferentes interacciones bacteria-planta-patógeno.

## **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE METABOLITOS**

### **ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)**

De las 6 bacterias antagonistas, únicamente la bacteria 38 (*Pseudomonas* sp.), tuvo la capacidad de producir AIA. Estos resultados concuerdan con las características citadas para diversas especies del género *Pseudomonas*, refiriendo a la capacidad que tiene de metabolizar el triptófano, lo cual le confiere una característica importante de considerar como agente de control biológico de enfermedades (Carreño et al., 2000).

### **ACTIVIDAD LIPOLÍTICA**

La bacteria 38 (*Pseudomonas* sp.) y 32 (*Bacillus amyloliquefaciens*) presentaron actividad lipolítica. Se sugiere que estas bacterias tienen capacidad antagónica, ya que podrían competir con el patógeno al alimentarse de lípidos o degradando las membranas celulares de estos (Coca, et al., 2001).

Los lípidos presentes en el medio de cultivo, son componentes que se encuentran en la estructura de las membranas celulares (lecitina y lípidos), la cual es necesaria para las células vivas (Rivera and García, 2007).

### **ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA**

Las 6 cepas antagonistas mostraron actividad proteolítica, lo cual les confiere la capacidad de poder degradar paredes celulares por la acción de proteasas, expresando así actividad antagonista hacia patógenos fúngicos (Bonants et al., 1995).

## **SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS**

De las 6 cepas bacterianas, únicamente la bacteria 38 (*Pseudomona* sp.) mostró la capacidad de solubilizar fosfatos *In vitro*; característica que indica el potencial de incrementar la disponibilidad de fósforo en la interacción con su hospedante y que le confiere una alta capacidad de competencia por este elemento con otros microorganismos.

## **PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS**

Las 6 cepas caracterizadas produjeron sideróforos *In vitro*. La síntesis de sideróforos por microorganismos bacterianos es de un enorme interés por su relación en la promoción del crecimiento vegetal y suprimir el crecimiento de patógenos de raíz (Kloepper *et al.*, 1980; Loper and Schroth, 1986).

La producción de sideróforos les confiere una alta capacidad de competencia, secuestran el hierro del ambiente y disminuye la disponibilidad de este para patógenos que ocupan el mismo nicho ecológico y desplaza a la demás microbiota (Kloepper *et al.*, 1980; Farías *et al.*, 1990, 1997).

Los resultados de la caracterización, en la producción de metabolitos involucrados en el antagonismo *In vitro* de las 6 cepas se muestran en el Cuadro 22.

**Cuadro 22.** Caracterización en la producción de metabolitos *In vitro* de las cepas antagonistas a *C. cassicola*.



CÓDIGO	Especie	FLOURESCENCIA	GRAM	AIA	ACTIVIDAD LIPOLITICA	ACTIVIDAD PROTEOLITICA	SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS	SIDERÓFOROS
38	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	-	+	+	+	+	+
32	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i>	-	+	-	+	+	-	+
44	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	+	-	+
H1	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	+	-	+
H2	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	+	-	+
H3	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-	+	-	+

### 3.4 DISCUSIÓN

En esta investigación se seleccionaron 6 cepas bacterianas aisladas del filoplano de cálices frescos de 3 variedades de Jamaica, las cuales mostraron el mayor grado de antagonismo *in vitro* contra el patógeno foliar *Corynespora cassiicola*. Se caracterizaron para la producción de metabolitos potencialmente involucrados en el antagonismo y se identificaron mediante la secuenciación del gen 16S ADNr. En el 66.6% (4 cepas) se identificó a *Bacillus subtilis*; el 16.7% (1 cepa) *Bacillus amyloliquefasciens* y 16.7% (1 cepa) *Pseudomonas sp*

Diversas investigaciones previas han documentado que *Pseudomonas* y *Bacillus* son géneros de bacterias que poseen características con alto potencial para ser utilizados como agentes de biocontrol y eficaces contra diversos hongos fitopatógenos.

Un gran número de especies de *Bacillus* se han utilizado como agentes de biocontrol en diversas especies de plantas. Son considerados microorganismos seguros para la salud de humanos y medio ambiente, son habitantes naturales del suelo y en diversos medio ambientes como la rizosfera, endosfera, o filósfera e

incluso semillas (Correa et al., 2009; Liu et al., 2009). Poseen un alto grado de diversidad metabólica, los cuales son ecológicamente relevantes ya que les permite habitar diversos nichos en diferentes agroecosistemas (McSpadden-Gardener, 2004; Vargas-Ayala et al., 2004). Su actividad como agente de biocontrol se ha asociado a la promoción del crecimiento y nutrición de la planta huésped, estimulación de los mecanismos de defensa de las plantas (Choudhary and Johri, 2009), producción de antibióticos (Kinsinger et al., 2003; Bais et al., 2004; Liu, et al., 2009), producción de lipopéptidos antimicrobianos y bacteriocinas (Biazini et al., 2005; Cazorla et al., 2007) e inducción de resistencia sistémica en la planta (Choudhary et al., 2007; Choudhary and Johri, 2009).

Los resultados de esta investigación, identificaron al antagonista *Bacillus subtilis* como el más abundante en el filoplano de los cálices de Jamaica, obteniendo los mejores promedios de inhibición *in vitro* contra *C. cassiicola* (5.6 cm) y a *Bacillus amyloliquefaciens* con un promedio de 2.9 cm. Es de resaltar que tanto *B. subtilis* como *B. amyloliquefaciens* son dos especies con alta versatilidad metabólica, la cual ha sido revelada mediante la secuenciación del genoma completo de algunos de los representantes utilizados como agentes de biocontrol; en los cuales, resaltan la presencia de genes que contribuyen al establecimiento de una interacción altamente específica con las plantas y a un alto potencial para la producción de metabolitos secundarios, principalmente antibióticos y péptidos antimicrobianos, bacteriocinas y la síntesis de diversos compuestos esenciales en la colonización y antagonismo (Stein, 2005; Chen et al., 2007).

Lo anterior podría explicar que en esta investigación, *Bacillus amyloliquefaciens* mostró actividad lipolítica, proteolítica y producción de sideróforos; mientras que *Bacillus subtilis*, mostró actividad proteolítica y sideróforos; ambos con menos expresiones de actividad metabólica en el antagonismo *In vitro* que *Pseudomonas* sp. quien produjo el 100% de las actividades metabólicas evaluadas. Sin embargo, ambas especies de *Bacillus* fueron los de mayor grado de antagonismo contra *Corynespora cassiicola*, destacando *Bacillus subtilis* con el mayor potencial de inhibición. Lo anterior puede ser debido a que el antagonismo fue expresado por la producción de antibióticos, péptidos antimicrobianos u otro metabolito no caracterizado en esta evaluación.

*Pseudomonas* sp. obtuvo un promedio de 2.6 cm de radio del halo de inhibición

Las especies del género *Pseudomonas* han sido objeto de estudio en múltiples interacciones con diferentes especies de plantas y cultivos agrícolas. Se caracterizan por ser bacterias aeróbicas, Gram-negativas, cosmopolitas en suelos agrícolas y de alta especialización y capacidad de adaptación para colonizar la rizósfera y el filoplano. Poseen atributos como promotores de crecimiento, requerimientos nutricionales muy simples y de crecer rápidamente en condiciones *in vitro*, lo cual facilita su producción en forma masiva. De acuerdo a nuestros resultados en la caracterización de la producción de metabolitos, la cepa aislada del filoplano de cálices de Jamaica, mostró un amplio espectro de antagonismo (actividad proteolítica, lipolítica, solubiliza fosfatos y producción de sideróforos), además de ser la única de las 6 cepas que produjo ácido indol acético.

Muchas especies bacterianas utilizadas en el control biológico tienen la capacidad de producir fitohormonas, como ejemplo: ácido giberélico, citoquininas y ácido indolacético (AIA). El AIA es una de las más comúnmente asociadas a muchas especies de bacterias de los géneros *Pseudomonas* y está estrechamente ligada a la inducción de un sistema de respuestas de defensa en la planta conocida como Resistencia sistémica Inducida y/o promoción del crecimiento en las plantas (Van Loon et al., 1998; Sorensen and Sessitch, 2007). Lo anterior resalta la importancia de esta cepa nativa del filoplano de los cálices de Jamaica como un buen candidato con potencial como agente de biocontrol de *Corynespora cassiicola* en el cultivo de Jamaica, mediante el mecanismo de inducción de resistencia a través de la producción de AIA. Se ha citado que especies dentro del género *Pseudomonas* son capaces de producir esta auxina (Patten and Glick, 1996), metabolizando el triptófano (Díaz et al., 2005; García et al., 2007), al mismo tiempo que participa en las rutas de síntesis de fitohormonas, teniendo funciones fungistáticas (Aoki et al., 2005).

Entre otras características destacables encontradas en este estudio, *Pseudomonas* sp. tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos que solubilizan fosfatos. Los ácidos orgánicos incrementan la disponibilidad de micronutrientes, como Fe, Zn y Mn, en el suelo al disminuir el pH en la rizósfera o por la quelación de estos micronutrientes (Paredes y Espinosa, 2010).

Muchos aislados de *Pseudomonas* fluorescentes producen sideróforos, tales como pyochelina, pyoverdina, pseudobactina y ferribactina, los cuales han demostrado ser altamente eficientes para la adquisición de hierro, micronutriente esencial para

el desarrollo de los microorganismos; y como consecuencia de esta interacción poder ejercer así su capacidad de control biológico contra una amplia gama de patógenos (Raaijmakers et al., 1995).

Diversos estudios han documentado la versatilidad y eficiencia de *Bacillus* y *Pseudomonas* como agentes de biocontrol.

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* y *Bacillus* son frecuentemente antagónicas a insectos, hongos y nematodos, produciendo metabolitos específicos (Knaak et al., 2007; Snook et al., 2009).

Las pseudomicinas producidas por las bacterias del género *Pseudomonas* son metabolitos capaces de contrarrestar a microorganismos patógenos (Strobel and Rodríguez, 2005), inhibiendo el crecimiento y deteriorando su desarrollo (Cook, 1993).

Por otro lado, el género *Bacillus* es sin duda un agente protagónico en el control biológico, sus características morfológicas y fisiológicas han hecho de este género un agente exitoso en la naturaleza (Chatterjee et al., 2007; Carreras et al., 2008), pudiendo contrarrestar de manera efectiva patologías vegetales causadas por hongos (Sosa et al., 2006; Reinoso, 2007).

*Bacillus* tiene muchas formas antagónicas que contrarrestan agentes patógenos, como son: antibiosis, competencia de nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o resistencia (Kloepper et al, 2004). Sin embargo, la antibiosis, ha sido el motivo más extenso de estudio, cuya síntesis ha generando antibióticos tales como: bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina (Pal and

Gardener, 2006; Leelasuphakul et al., 2008), bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina (Bernal, 2002).

Se han reportado pruebas de *In vitro* ante *Fusarium* utilizando bacterias del género *Bacillus*, *B. subtilis*, *B. sp.*, y *B. amyloliquefaciens* con resultados eficientes y prometedores en la confrontación, esto gracias a la capacidad de estas bacterias de secretar lipopéptidos, el cual inhibe el crecimiento micelial y la esporulación, al actuar sobre la permeabilidad de la membrana y la composición lipídica de la célula (Wang, et al., 2006; Romero, et al., 2007).

*Pseudomonas* sp. combate de forma eficiente a Oomycetes como *Pythium* spp. en Loto (*Lotus corniculatus* L. ) mostrando alto nivel de antagonismo y promoviendo el crecimiento vegetal (Pérez et al., 2000); *Bacillus amyloliquefaciens* es un organismo potencial para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* (Zhao et al., 2014) y *Bacillus subtilis* combate de forma eficiente a *Colletotrichum gloesporioides* en chile (*Capsicum annuum* L.) (Ashwini et al., 2013).

En conclusión en el filoplano de cálices de Jamaica, es posible aislar bacterias nativas con potencial como agente de biocontrol. Las bacterias aisladas y seleccionadas en este estudio, mostraron un alto número de mecanismos de antagonismo, por lo que deben ser considerados para futuros análisis como potenciales agentes de biocontrol contra *Corynespora cassiicola* en el cultivo de Jamaica.

#### **IV. CONCLUSIONES**

Las conclusiones de la presente investigación son:

1) En los cálices frescos de Jamaica de las variedades “Criolla de Ayutla y Coneja”, no se encontraron indicios de la presencia de *Escherichia coli* ni de *Salmonella*, aunque si se detectaron colonias de coliformes totales o fecales en el 13.3% de las muestras, variando en densidad entre el total de las muestras analizadas.

2) En los sitios de muestreo de “La Hacienda”, “El Mezón” y “San Antonio”, los valores de coliformes totales o fecales por gramo, se encuentran por arriba del límite permitido por la norma NOM-SSA-112-1994, lo cual representa un riesgo de salud humana.

3) En el filoplano de cálices de Jamaica, existen poblaciones nativas de bacterias con alto potencial antagonista *In vitro* contra el patógeno fungoso *Corynespora cassiicola*

4) *Bacillus* y *Pseudomonas*, son los géneros con el mejor perfil como antagonistas contra *C. cassiicola* entre las bacterias cultivables del filoplano de cálices de Jamaica

5) De las cepas antagonistas, *Bacillus subtilis* es la bacteria más predominante en los cálices frescos de Jamaica, con el mayor grado de inhibición *In vitro* y potencial antagonista contra *C. cassiicola*; seguido de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas* sp.

6) *Pseudomonas* sp. fue la única que produjo ácido indol acético, lo cual merece una investigación más profunda como potencial promotor de crecimiento e

inductor de resistencia en Jamaica contra este y otros patógenos foliares y del suelo.

## V. LITERATURA CITADA.

- Abou, E. A., Abou, A. H. E, Mady, M. A and Moussa, S. A. M. 2007. Enhancing growth, productively and quality od squash plant using phosphate dissolving microorganisms (Biophos-phor®) combined with boron foliar spray. Research J. of Agric. and Biol. Sciences. 3: 274-286.
- Abu-TArboush H. M. 1994. Antibacterial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and it's relation to pH. Egyptian Journal of Food Science 22: 317-322.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.
- Arora DS, Bhardwaj SK. 1997. Antimicrobial activity of tea (*Cammelia sinnensis*) and coffee (*Coffea Arabica*) against wood rotting fungi. J basic Microbiol. 12: 159-165.
- Ashwini N. y Srividya S. 2013. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloesporioides* OGC1. Vol. 4 Issue 2: 127-136.
- Bais, H.P., Fall, R. y Vivanco, J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology 134: 307-319.



- Baker, G. C., J. J. Smith, and D. A. Cowan. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Meth.* 55: 541–555.
- Barthe P, Pujade-Renaud V, Breton F, Gargani D, Thai R, Roumestand C, de Lamotte F (2007) Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. *J Mol Biol* 367:89-101
- Biazini, D., Motta, A.S., Morrissy, J.A.C., Terra, R.M., Souto, A.A. y Brandelli, A. 2005. Antibacterial activity of cerein 8A, an antimicrobial peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology* 8: 125-131.
- Brandi G., Amagliani G., Schiavano G. F., De santi M., and Sisti M. 2006. Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on food borne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection* 69: 2274-2279.
- Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. In: *Anthocyanins as food colors* P. Markakis (Ed.), New York: Academic Press. 1-38.
- Carrol, GC. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1): 2-9.
- Cazorla, F.M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B.J.J., de Vicente, A. y Blomberg, G. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1950-1959.

- Chen, X-H., Koumoutsi A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K. y Schneider, I. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology* 25: 1007-1014.
- Chernin, L., Z. Ismailov, S. Haran, and I. Chet. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.
- Choudhary, D.K. y Johri, B.N. 2009. Interaction of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research* 164: 493-513.
- Choudhary, D.K., Prakash, A. y Johri, B.N. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanisms of action. *Indian Journal of Microbiology* 47: 289-297.
- Collado J, Platas G, Gonzalez I, and Pelaez F. 1999. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol* 144:525-532
- Cook, R.J. y Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens, St. Paul, Minnesota, 539 pgs.
- Correa, O.S., Montecchia, M.S., Berti, M.F., Ferrari, M.C.F., Pucheu, N.M., Kerber, N.L. y García A.F. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 41: 185-194.

- Da Silva JL, Soares DJ, Barreto RW. 2005. Eye-spot of *Rudbeckia laciniata* caused by *Corynespora cassiicola* in Brazil. *Brit Soc Plant Pathol, New Dis Rep No.* 12
- Déon M, et al., 2012. Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Sci* 185–186: 227–237.
- El-Gholl NE, Schubert TS. 1990. *Corynespora* leaf spot of *Tabebuia*. Fla Dept Agric & Consumer Serv. Division of Plant Industry. *Plant Pathol Circ No* 328
- El-Gholl NE, Schubert TS, Coile NC. 1997. Diseases and disorders of plants in Florida. Bulletin No. 14 Supplement No 1. Fla Dept of Agric and Cons Serv, pp 90-91
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. *Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: meeting report*. Microbiological Risk Assessment Series No. 14, Rome, 2008.
- FAO [Food and Agriculture Organization of the United Nations]. *Prevención y control de Salmonella y la E. coli enterohemorrágica en los frutos secos*. Empresas Inocuidad de alimentos. Serie sobre enseñanza aprendida. Vol. 2. 2012.
- Farr DF, Rossman AY, Palm ME, McCray EB. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Retrieved May 24, 2008, from <http://nt.arsgrin.gov/fungaldatabases/>
- F. Breton, C. Sanier, J. d'Auzac. 2000. Role of cassiicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of *Hevea*, *J. Rubber Res.* 3 115–128.

- Francis G. A. and O'Beirne T. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 34: 1-22.
- García V. M. N., Rojas G., Zepeda L. G, Avilés M., Fuentes M., Herrera A., Jimenez E. 2006. Antifungal and antibacterial activity of four selected Mexican medicinal plants *pharmaceutical biology* 44:297-300.
- Gond SK, Verma VC, Kumar A, Kumar V, Kharwar RN. 2007. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos Correae* (Rutaceae) from Varanasi (India). *World J Microbiol Biotechnol* 23:1371-1375.
- Guetsky, R., Shtienberg, D; Elad, Y; Dinoor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91(7):621-627.
- Halimatul SMN, Amin I, Mohd.-Esa N, Nawalyah AG, Siti Muskinah M. 2007. Protein quality of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds. *ASEAN Food Journal*. 14(2):131-40.
- Hallman, J.; Sikora, RA. 1996. Toxicity of fungal endophytic secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 102:155-162.
- Holliday P. 1980. *Fungus Diseases of Tropical Crops*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Hyde KD, McKenzie EHC, Dalisay TU. 2001. Saprobiic fungi on bamboo culms. *Fungal Divers* 7:35-48

- Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA. 1991. Compendium of Tomato Diseases. APS Press, St. Paul, MN, 100.
- Kinsinger, R.F., Shirk, M.C. y Fall, R. 2003. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of Bacteriology* 185: 5627-56-31.
- Kurt S (2004) Host-specific toxin production by the tomato target leaf spot pathogen *Corynespora cassiicola*. *Turk J Agric and Fores* 28:389-395
- Kwon JH, Kang SW, Kim JS, Park CS. 2001. First report of *Corynespora* leaf spot in pepper caused by *Corynespora cassiicola* in Korea. *Plant Pathol J* 17:180-183
- Landa, B. B., O. V. Mavrodi, K. L. Schroeder, R. Allende-Molar, y D. M. Weller. 2006. Enrichment and genotypic diversity of *phlD*-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after.
- Lakshmanan P, Jeyarajan R, Vidhyasekaran P. 1990. A boll rot of cotton caused by *Corynespora cassiicola* in Tamil Nadu, India. *Phytoparasitica* 18:171-174
- Lee S, Melnik V, Taylor JE, Crous PW. 2004. Diversity of saprobic hyphomycetes on Proteaceae and Restionaceae from South Africa. *Fung Diversity* 17:91-114
- Leite RS, Barreto RW. 2000. Petal spotting of hydrangea flowers caused by *Corynespora cassiicola*: old pathogen new disease. *Mycologist* 14:80-83
- Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Kang, Z. y Gong, Y. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control* 49: 277-285.

- Lumyong P, Photita W, McKenzie EHC, Hyde KD, Lumyong S. 2003. Saprobic fungi on dead wild banana. *Mycotaxon* 85:345-346
- McClintock N.C. & Tahir IME. 2004. *Hibiscus sabdariffa* L. In: Grubben GJH, Denton OA, editors. *Vegetables/Legumes*. Wageningen, Netherlands: PROTA; 12: 143-146
- Méndez, N. Mossos; D. Mogollón; R. Poutou; S. Máttar. 2006. Epidemiological relationships among strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from humans, poultry and food. *Universitas Scientiarum - Revista de la Facultad de Ciencias*. Vol. 11, No. 1, 5-13.
- McSpadden-Gardener, B.B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In agricultural systems. *Phytopathology* 94: 1252-1258.
- Morales C., M., J. Hernández, M., G. Leyva, R., Y. Salinas M., L. Soto R. y J. Castro R. 2013. Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes. *Journal of Medicinal Plants Research* 7: 2319-2322.
- Newsam. 1960, Plant Pathology Division Report, in: Plant Pathology Division Report, Rubber Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia. 63–70.
- NOM-112-SSA1-1994.
- NOM-114-SSA1-1994.
- Park, CS; Paulitz, TC; Baker, R. 1988. Biocontrol of fusarium wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 78(2):190-194.

- Pérez, C., De la Fuente, L. Arias, A., y Altier, N. 2000. Uso de *Pseudomonas* Fluorescentes nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus* L. *Agrociencia*. Vol. IV. 1: 41-47.
- Philip S, Ramakrishnan CK, Menon MR. 1972. Leaf blight of *Coccinia indica* (Wight & Arn.) caused by *Corynespora cassiicola*. *Agric Res J Kerala* 10:196
- Pierson, EA; Weller, DM. 1994. Use of mixtures of fluorescent pseudomonas to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology* 84:940-947.
- Pocasangre, L.E., 2002. Mejoramiento biológico de vitro plantas de banano mediante la utilización de hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador *Rodophulus similis*. Turrialba CR. 27-30.
- Poltronieri LS, Duarte MLR, Alfenas AC, Trindade DR, Albuquerque FC. 2003. Three new pathogens infecting Antilles Cherry in the state of Para. *Fitopatol Brasil* 28:424-426
- Promptutha I, Lumyong A, Dhanasekaran V, McKenzie EHC, Hyde KD, Jeewon R. 2007. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Micro Ecol* 53:579-590
- Raaijmakers, J.M., Weller, D.M. y Thomashow, L.S. 1997. Frequency of antibiotic producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 881-887.
- Romruensukharom P, Tragoonrung S, Vanavichit A, Toojinda T. 2005. Genetic variability of *Corynespora cassiicola* populations in Thailand. *J Rub Res* 8:38-49

- Sawar, M., and R. J. Kremer. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 282-285.
- Salas A. M y Salazar S.E. 2003. Importancia del uso adecuado de agentes de control biológico. *Acta universitaria*, Vol. 13. Núm. 1. Universidad de Guanajuato. 25-35 p.
- Schlub RL, Yudin L. 2002. Eggplant, pepper, and tomato production guide for Guam. Guam Cooperative Extension Publication, 188 pp
- Schwyn, B., and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Annal. Biochem.* 160: 47-56.
- Shiva, R. C. M. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 184 p.
- Silva WPK, Wijesundera RLC, Karunanayake EH, Jayasinghe CK, Priyanka UMS. 2000. New hosts of *Corynespora cassiicola* in Sri Lanka. *Plant Dis* 84:202
- Simone GW. 2000. Diseases of *Cattleya* Lindl. spp. APSnet: Common Names of Plant Diseases. <http://www.apsnet.org/online/common/names/cattleya.asp>
- Simone GW. 2000. Diseases of *Pointsettia* (*Euphorbia pulcherrina*). APSnet: Common Names of Plant Diseases. <http://www.apsnet.org/online/common/names/poinsett.asp>
- Sorensen, J. y Sessitch, A. 2007. Plant-associated bacteria---Lifestyle and molecular interactions. En: van Elsas, J.D., Janson J.K. y Trevors J.D. (eds.) *Modern Soil Microbiology* -second edition, CRC Press, Boca Ratón, FL. USA, pgs. 211-236.



- Spatafora. 2009. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes, *Stud. Mycol.* 64: 1–15.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56: 845-857.
- Suryanarayanan TS, Murali TS, Venkatesan G (2002) Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Can J Bot* 80:818-826
- Tsay JG, Kuo CH. 1991. The occurrence of *Corynespora* blight of cucumber in Taiwan. *Plant Prot Bull* 33:227-229
- Van den Bosch; Messenger R.S., y Gutiérrez A.P. 1982. An Introduction to biological control. Plenum Press. 450.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., y Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-486.
- Vargas-Ayala, R., Rodríguez-Kaban, R., Morgan-Jones, G., McInroy, J.A. y Kloepper, J.W. 2004. Shifts in soil microflora induced by velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in cropping systems to control root knot nematodes. *Biological Control* 17: 11-22.
- Wong S.K., Lim Y. Y., Chan E.W.C. 2010. Evaluation of Antioxidant, Anti-tyrosinase and Antibacteria Activities of Selected *Hibiscus* Species. *Ethnobotanical Leaflets*. 14: 781-96.
- Yudin L, Schlub RL. 1998. Guam Cucurbit Guide. Guam Cooperative Extension Publication, 64 Pp

Zhao P.; Quan C.; Wang J.; y Fan S. 2014. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. Spinaciae. Epub. 54(5)448-56.

## **PÁGINAS WEB**

United States Departamento Of Agriculture (USDA) (2014). Consultado el 09 de Julio de 2014 en <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>

Universidad de Granada, España (UGR) (2014). Consultado el 09 de Julio de 2014 en <http://www.ugr.es/-pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-imvic.htm/>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2009, 2008). Consultado el 01 de julio de 2014 en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>

Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON). (2008). Consultado el 01 de julio de 2014 en [http://www.siap.gob.mx/optestadisticasiacon2012parcialasiacon-  
zip/](http://www.siap.gob.mx/optestadisticasiacon2012parcialasiacon-<br/>zip/)

Food and Agricultura Organization of the United Nations (FAO). (2009, 2008).

Consultado el 01 de Julio de 2014 en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx/>

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

(SAGARPA). (2008, 2009). Consultado el 01 de Julio de 2014 en

<http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>

Universidad de California en Davis (UCD). (2012). Consultado el 10 de septiembre de

2014 en <http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/163175.pdf/>