

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD
DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA EL
CULTIVO DE *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Dana Gabriela Mejía Santizo
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2014

EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD
DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA EL
CULTIVO DE *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*

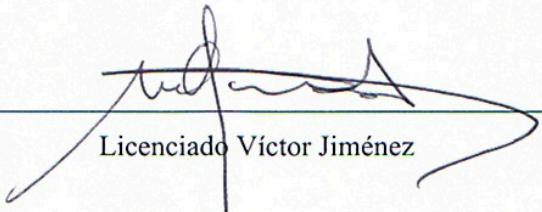
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD
DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA EL
CULTIVO DE *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*

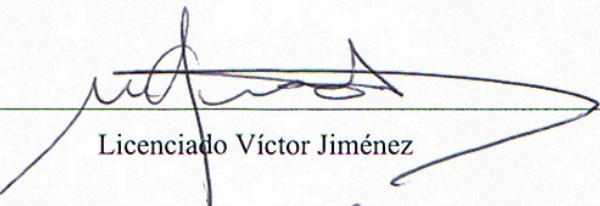
Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Dana Gabriela Mejía Santizo
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

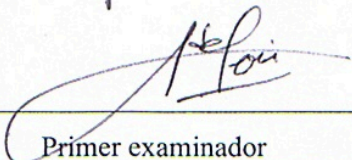
Guatemala
2014

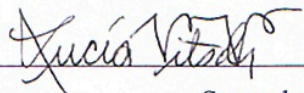
Vo.Bo. :

(f) 
Licenciado Víctor Jiménez

Tribunal Examinador:

(f) 
Licenciado Víctor Jiménez

(f) 
Primer examinador
Licenciado Luis Roberto de León Fajardo

(f) 
Segundo examinador
M.Sc. Lucía Nitsch Velásquez

Fecha de aprobación: Guatemala 17 de junio de 2014

PREFACIO

<<La vida no es lo que uno vivió, sino lo que recuerda, y cómo la recuerda para contarla>> García Márquez

En primer lugar quiero agradecer a Dios y San Judas Tadeo que siempre me dieron las fuerzas para seguir adelante. En segundo lugar quiero agradecer a mi mamá, que ha sido mi total inspiración para nunca rendirme y seguir siempre adelante, dando lo mejor de mí. Ella ha sido mi pilar y mi consuelo, mi heroína, un ejemplo a seguir, gracias por todo mami, por siempre apoyarme en las alegrías y en las tristezas.

También quiero agradecer a las siguientes entidades: al Departamento de Bioquímica y Microbiología, en especial a la Licenciada Lucía Nitsch por su valioso apoyo y consejos; A la Licenciada Margarita Palmieri por brindarme las cepas bacterianas y sus consejos; al Licenciado Víctor Jiménez por su apoyo en la elaboración y desarrollo de ideas del proyecto; al Laboratorio Vizcaino S.A., en especial al Señor Pablo Ordoñez por la donación de reactivos; a la Licenciada Vilma Robles de Industria Farmacéutica S.A. por su amable donación de reactivos; a la Dra. Pamela Pennington y Dra. Krisztina Fulop Ríos por sus valiosos consejos y a Roberto Fernández por su apoyo en el laboratorio. Sin el apoyo de todas estas valiosas personas, no se hubiera podido llevar a cabo el trabajo de laboratorio.

ÍNDICE

Lista de cuadros	viii
Lista de figuras	ix
Resumen	xi
I Introducción	1
II. Objetivos	3
III. Justificación	4
IV. Marco teórico	
A. Marco conceptual	6
B. Antecedentes	21
V. Metodología	24
VI. Resultados	36
VII. Análisis de resultados	39
VIII. Conclusiones	57
IX. Recomendaciones	58
X. Referencias	59
XI. Anexos	64

LISTA DE CUADROS

1. Composición nutricional por cada 100 gramos de tomate fresco	8
2. Área cosechada, Producción y Rendimiento del cultivo de tomate en Guatemala	23
3. Cuadro variables	26
4. Porcentaje de productividad de los medios semiselectivos mCNS, Cmm, D2ANX, SCM, SCMF, BCT y EPPO para la recuperación de <i>Cmm</i>	36
5. Selectividad de los medios mCNS, Cmm, D2ANX, SCM, SCMF, BCT y EPPO para tres bacterias competidoras <i>E. carotovora</i> , <i>X. campestris</i> y <i>P. fluorescens</i>	37
6. Medios semiselectivos para <i>Cmm</i> seleccionados según su productividad y selectividad	37
7. Comparación del desempeño de medios semiselectivos en las pruebas de productividad y selectividad	38
8. Pruebas confirmatorias para <i>Cmm</i>	69
9. Prueba de crecimiento de <i>Cmm</i> en tres variantes de los medios semiselectivos	70
10. Recomendaciones para trabajar en laboratorio de Microbiología	70

LISTA DE FIGURAS

1. Planta de tomate	7
2. Síntomas ocasionados por el Chancro del tomate	12
3. Marchitamiento y curvamiento unilateral de la planta del tomate debido al Chancro del tomate	13
4. Marchitez de hojas inferiores y superiores de la planta del tomate	13
5. Lesiones necróticas en la planta de tomate	14
6. Decoloración de haces vasculares y chancros en tallo de planta de tomate	14
7. Comparación de un tallo sano con un tallo infectado con <i>Cmm</i> en donde se observa decoloración marrón y cavidades	15
8. Lesiones en fruto de la planta del tomate	15
9. Ciclo de infección por <i>Cmm</i> en plantas de tomate para producir la enfermedad del Chancro del tomate	17
10. Morfología de <i>Cmm</i> en los medios semiselectivos utilizados para su aislamiento	20
11. Distribución a nivel mundial de los brotes más recientes del Chancro bacteriano del tomate	21
12. Distribución de la producción de tomate a nivel nacional	22
13. Morfología de <i>Cmm</i> en medios semiselectivos mCNS, <i>Cmm</i> , D2ANX, SCM, SCMF, BCT y EPPO	36
14. Tinción Gram para <i>Cmm</i> proporcionada por el Laboratorio de Protección Vegetal	64
15. Curva de calibración de estándares de McFarland y ecuación de la recta	64
16. Pigmentos carotenoides producidos por <i>Cmm</i>	65

17. Mezcla de mucílago de tomate junto con agua pura para promover la fermentación y desprendimiento de las semillas	65
18. Semillas de tomate en período de incubación para la infestación con las bacterias <i>Cmm</i> , <i>E. carotovora</i> , <i>X. campestris</i> y <i>P. fluorescens</i>	66
19. Extracto de semillas infestadas con <i>Cmm</i>	66
20. Listado de abreviaturas	67
21. Estructura Cicloheximida	67
22. Estructura Polimixin B sulfato	68
23. Estructura Trimethoprim	68
24. Estructura Ácido nalidíxico	68
25. Estructura Ácido nicotínico	69
26. Estructura Nistatina	69

RESUMEN

El cultivo del tomate es uno de los más importantes a nivel mundial debido a su contenido nutricional, alto consumo de su fruto y derivados, lo que representa un alto ingreso económico para el país productor. Sin embargo este cultivo se ve afectado por diferentes patógenos, entre ellos se encuentra *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm)*, que ocasiona la enfermedad más importante denominada el chancro del tomate. Existen diferentes medidas de control para evitar que los cultivos sean infectados por dicha bacteria, siendo la más importante el iniciar el cultivo con semillas libres de patógeno. Es por ello que deben realizarse análisis de las semillas adquiridas antes de sembrarlas, para evitar nuevos brotes y la pérdida total del cultivo. Para estos análisis se utilizan diferentes métodos, siendo los más utilizados los métodos microbiológicos. Estos métodos emplean medios de cultivo semiselectivos que permiten la recuperación de la bacteria a partir de muestras de semillas, lo cual proporciona un método accesible para los agricultores, determinando si las semillas se encontraban infectadas o no. Actualmente, a nivel mundial, no existe un protocolo unánime que proponga qué medio o medios permitan una buena recuperación y alta selectividad para *Cmm*. Es por ello que este trabajo tiene como objetivo proponer un medio o la combinación de tres medios de cultivo que permitan la recuperación de *Cmm* a partir de semillas infestadas, con el fin de proporcionar a los agricultores un método de diagnóstico accesible y confiable.

I. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) se originó en la región sudamericana, específicamente en la región andina del continente americano (Rodríguez *et al*, 1997). Su cultivo posee gran relevancia a nivel mundial, debido al alto consumo de su fruto y de productos derivados del mismo (Rodríguez *et al*, 1997), representando un ingreso económico de gran importancia (Nuez, 1995). Se puede asumir que su popularidad se debe a su valor nutricional, sin embargo Allen Steven realizó un estudio en el cual demostró que el contenido de vitamina A y C que posee el tomate lo situaban en la posición 16 y 13 respectivamente de 33 frutas y hortalizas (Rodríguez *et al*, 1997). Debido a que el consumo de tomate es en grandes cantidades, sus valores nutricionales pueden cubrir hasta el 20 y 40% de las cantidades requeridas de vitamina A y C (Gaviola, sin año). Es por esto que el cultivo del tomate es importante a nivel económico y nutricional.

El cultivo del tomate ocupa el segundo lugar en importancia a nivel mundial (Gaviola, sin año). Según la FAO en el año 2011 se emplearon aproximadamente 4,7 millones de hectáreas para su cultivo a nivel mundial con una producción de 159 millones de toneladas (FAO, 2013). Sin embargo, este cultivo es muy susceptible al ataque de organismos patógenos como hongos, insectos, virus, nemátodos y microorganismos (Rodríguez *et al*, 1997), los cuales reducen la calidad y productividad del cultivo (Talibi *et al*, 2011).

La enfermedad más importante que sufre este cultivo es el chancro del tomate, ocasionada por la bacteria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm)* (Talibi *et al*, 2011; Hassan y Buchenauer, 2008; Hadas *et al*, 2005). Esta enfermedad es de fácil transmisión y afecta cultivos controlados y en campo abierto (Talibi *et al*, 2011). Las semillas de tomate actúan como el inóculo primario para iniciar la infección con *Cmm* (Hadas *et al*, 2005; Talibi *et al*, 2011). Asimismo, los trasplantes infectados pueden iniciar la infección (Talibi *et al*, 2011), es decir que una vez el microorganismo se encuentra presente y estable en una plantación, puede ser muy contagioso (Hassan y Buchenauer, 2008). Esto se debe a que el microorganismo puede permanecer vivo en plantaciones, en restos de tomates infectados y suelo por largos períodos de tiempo (Hassan y Buchenauer, 2008; EPPO, 2005; Talibi *et al*, 2011), logrando su dispersión por la manipulación de las plantas por humanos (Talibi *et al*, 2011; EPPO, 2005).

La enfermedad del chancro del tomate es devastadora para las plantaciones, ya que puede llegar a afectar en la calidad y rendimiento de producción (Hassan y Buchenauer, 2008), así como lograr la completa destrucción del cultivo (Talibi *et al*, 2011). Se han realizado esfuerzos por controlar dicha enfermedad, utilizando agentes químicos los cuales únicamente logran eliminar el patógeno de la superficie del cultivo, dejando intacto a *Cmm* en la superficie de la semilla (Talibi *et al*, 2011).

Una vez infectado el fruto del tomate con *Cmm*, se pueden observar diferentes síntomas, los cuales dependerán de: la cantidad de inóculo de *Cmm*, edad de la planta, condiciones ambientales del cultivo (Carlton *et al*, 1998) y del tipo de infección, ya sea sistémica o localizada (De León *et al*, 2011). En plantas jóvenes los síntomas suelen observarse rápidamente, debido a la infección sistémica que presentan (Carlton *et al*, 1998). Esta infección puede propagarse creando grandes brotes de chancro con características pandémicas. Es por ello que a la primera aparición de síntomas de chancro en el tomate, los frutos infectados y los que se encuentran a su alrededor deben destruirse (EPPO, 2005), ocasionando grandes pérdidas económicas a nivel mundial (De León *et al*, 2011).

Desde el año 2000 se han reportado varios brotes de chancro del tomate a nivel mundial, específicamente en los países de Chile, Israel, Turquía, España, Indonesia, Korea, Australia y recientemente Italia, los cuales fueron ocasionados en su mayoría por semillas contaminadas (De León *et al*, 2011).

En Guatemala el cultivo de tomate ha tomado gran importancia por representar un fuerte ingreso económico para los campesinos (Archila, 2011). Sin embargo en agosto de 2011 en Guatemala se reportó un brote de chancro del tomate debido a la utilización de semillas contaminadas con la bacteria *Cmm*, lo cual ocasionó pérdidas económicas para sus productores y para el país (Ortiz, 2011).

Uno de los aportes de este trabajo, fue la determinación de la productividad y selectividad de los medios más utilizados para determinar la presencia de *Cmm* en muestras de semillas de tomate. Se encontró que los medios SCM y BCT obtuvieron el mejor desempeño en productividad y selectividad, respectivamente. Mientras que el medio SCMF mostró un buen rendimiento en ambos criterios de evaluación

II. OBJETIVOS

A. General

Determinar cuál o cuáles de los medios de cultivo utilizados actualmente (mCNS, D₂ANX, SCM, SCMF, Cmm, EPPO y BCT) permite una mejor recuperación y diferenciación de *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* a partir de semillas de tomate.

B. Específicos

1. Evaluar y comparar los parámetros de desempeño (especificidad y productividad) de los medios de cultivo mCNS, D₂ANX, SCM, SCMF, Cmm, EPPO, BCT, de acuerdo a la norma ISO 11133, disponibles actualmente para el aislamiento y/o recuento de *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*.

2. Determinar la mejor combinación de los medios de cultivo mCNS, D₂ANX, SCM, SCMF, Cmm, EPPO, BCT que permita lograr la mejor recuperación de *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* a partir de semillas de tomate.

3. Determinar el patrón de crecimiento de *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* a partir de semillas de tomate.

4. Generar información para mejorar las fórmulas de los medios de cultivo semiselectivos favoreciendo el crecimiento de *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*

III. JUSTIFICACIÓN

El cultivo del tomate posee gran importancia debido al consumo de su fruto o de productos derivados del mismo (Rodríguez *et al*, 1997), lo que le confiere el segundo lugar en importancia a nivel mundial (Gaviola, sin año). Cabe mencionar que su importancia también radica en su contenido nutricional (Rodríguez *et al*, 1997) y en el aporte económico que brinda a los agricultores.

En el año 2011 se emplearon aproximadamente 4,7 millones de hectáreas para cultivar tomate, logrando una producción mundial de 159 millones de toneladas (FAO, 2013). Mientras que en Guatemala, en el mismo año se emplearon aproximadamente 8,822 hectáreas para su cultivo, produciendo 305,426.88 toneladas de tomate, con un rendimiento de 34.62 toneladas/hectárea (FAO, 2013;MAGA, 2011), permitiendo un ingreso económico para Guatemala de 23,203,911.00US\$ (MAGA, 2011).

Sin embargo la producción de tomate se ve afectado a nivel mundial y a nivel nacional por el microorganismo *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm)*, el cual ocasiona la enfermedad más importante que puede sufrir este cultivo conocida como el chancro del tomate (Talibi *et al*, 2011; Hassan y Buchenauer, 2008; Hadas *et al*, 2005). Es importante mencionar que una vez infectadas las semillas debe eliminarse el producto para evitar mayor dispersión de la enfermedad. Desde el año 2000 se han reportado varios brotes de chancro del tomate a nivel mundial, los cuales fueron ocasionados en su mayoría por semillas contaminadas (De León *et al*, 2011). En Guatemala, según la Asociación Nacional de Productores de Invernadero (ANAPI), el chancro del tomate fue detectado por primera vez en el país en el año 2009, ocasionando una pérdida de Q20 millones. En septiembre 2010, se reportó nuevamente un brote de chancro del tomate, el cual ocasionó la pérdida de 400,000 plántulas de tomate contaminadas con *Cmm* (Bolaños, 2010). Según ANAPI los daños ocasionaron la pérdida de Q4 millones y el atraso en las ventas pudo representar la pérdida de hasta Q15 millones (Bolaños, 2010). El último brote de chancro del tomate fue reportado por ANAPI en agosto de 2011, el cual se debió a la utilización de semillas contaminadas con la bacteria *Cmm* (Ortiz, 2011).

Se han tratado de obtener semillas libres de patógeno y plantas libres de enfermedad, sin embargo no se ha logrado hasta la actualidad. El único tratamiento actual, es tratar de erradicar el patógeno de la semillas (Hassan y Buchenauer, 2008). Por lo que se sugiere realizar la indexación de plantas de tomate y poner en práctica sistemas de cuarentena que regulen las semillas de exportación para asegurar que se encuentran libres de *Cmm* o que el nivel de *Cmm* se encuentra en un rango aceptable (De León *et al*, 2011).

Debido a la necesidad de monitorear las semillas por parte del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) que son importadas a Guatemala por la empresa Sanidad y Nutrición Animal

Centroamericana S.A. (SANUCASA) distribuidora de la empresa Monsanto (empresa Estadounidense) en Guatemala (Bolaños, 2010), es primordial establecer un control de las mismas antes de que sean utilizadas para iniciar cultivos de tomate. Este control es importante ya que es la base para mantener cultivos libres de la bacteria y lo recomendable para llevar a cabo este proceso es contar con medios de cultivo semiselectivos que permitan el aislamiento de *Cmm*.

Por lo tanto, el empleo de medios de cultivo para la recuperación de bacterias es un proceso esencial para el control de calidad de las semillas de tomate, ya que estos medios permitirán determinar si existe presencia de *Cmm* en semillas, y si se encuentra presente, determinar la carga microbiana de las mismas.

En esta investigación se propone analizar los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de *Cmm* (mCNS, D₂ANX, SCM, SCMF, *Cmm*, EPPO y BCT) y determinar cual o cuales de ellos permitirán una mejor recuperación de la bacteria a partir de semillas de tomate. Asimismo, es importante mencionar que a pesar de la existencia de métodos moleculares y serológicos que permiten la detección de *Cmm* en semillas de tomate debido a su sensibilidad, no son métodos accesibles para la actualidad de nuestro país. Esto se debe a que no todas las personas cuentan con el equipo y material para desarrollar el método o no cuentan con los recursos económicos para realizar el análisis, por lo que se limita el acceso.

Es por ello, que al poder determinar el medio o los medios de cultivo que permitan una mejor recuperación de *Cmm*, se podrá recomendar la implementación y uso de los mismos para llevar a cabo el control de calidad de las semillas adquiridas, para poder detectar la presencia de *Cmm* y asegurar que los nuevos cultivos de tomate se encuentren libres de la bacteria fitopatógena, evitando así nuevos brotes del chancro del tomate en Guatemala, utilizando un método más accesible y de menor costo.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Marco conceptual

1. Cultivo del tomate

a. **Descripción general.** El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es originario de la región andina del continente americano (Rodríguez *et al*, 1997), la cual es una región montañosa, que se extiende a lo largo de Perú, Ecuador y Chile (Jones *et al*, 2001). El origen de su domesticación inició en México por las culturas que habitaban dicha región, sin embargo todavía pueden encontrarse especies silvestres así como domesticadas (Jones *et al*, 2001).

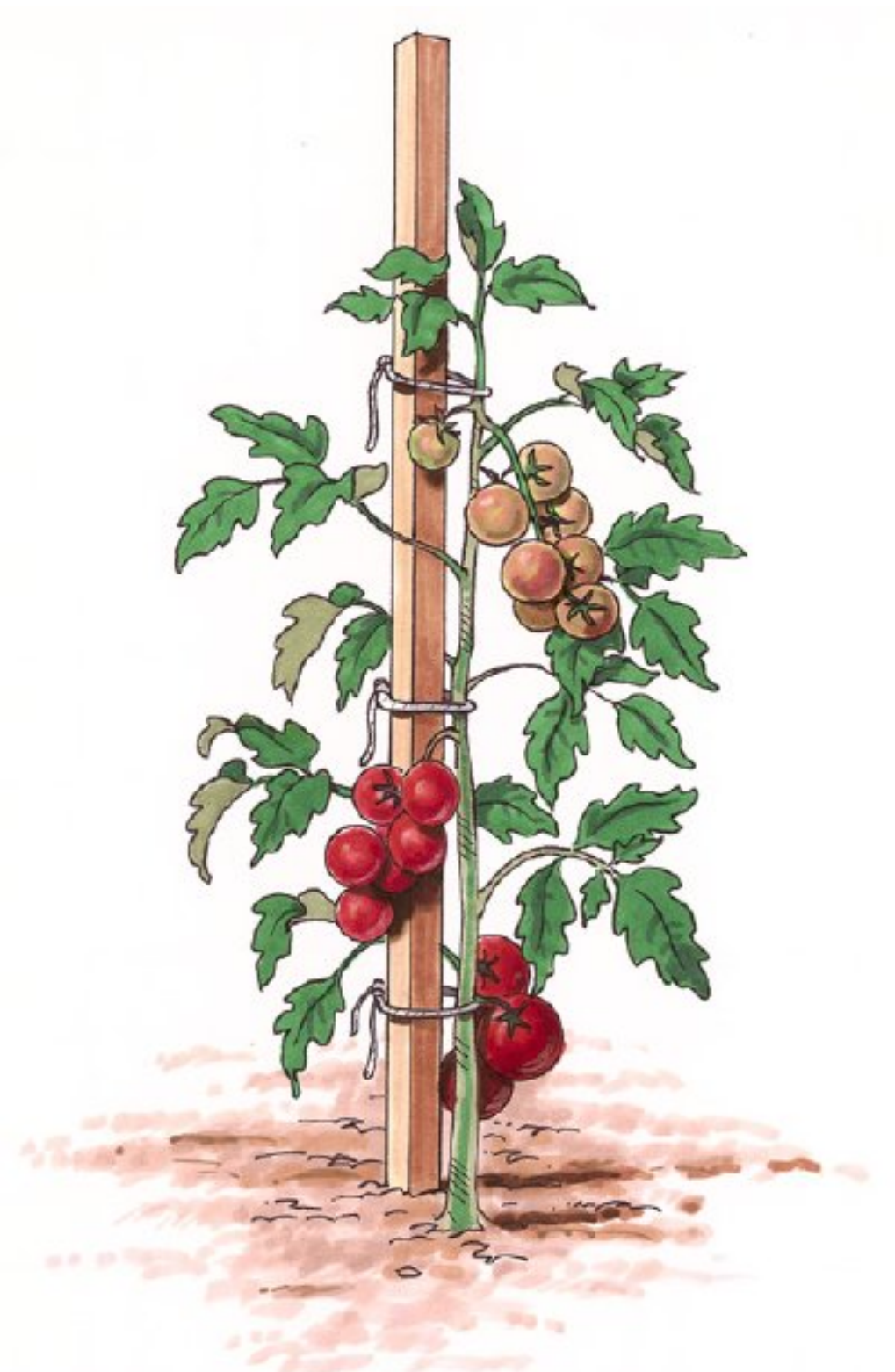
El tomate suele sembrarse en clima cálidos, sin embargo la producción y la calidad de la misma fluctúa acorde al clima (Corpeño, 2004), ya que se pueden propiciar enfermedades, es por ello que las buenas prácticas agrícolas son necesarias para asegurar una alta producción de buena calidad (Corpeño, 2004).

b. **Descripción botánica.** El tomate es una planta polianual, y no anual como se cree, esto se debe a que puede cultivarse más una vez al año, según las condiciones climáticas en donde se produzca (Anderlini, 1976). La planta del tomate posee tallos ramificados, con hojas compuestas imparipinnadas, alargadas, alternas, con siete a nueve e inclusive once foliolos (Villela, 1993). La altura de la planta depende de su crecimiento, por lo que puede llegar a medir de 40 cm hasta 2.50 metros (Villela, 1993).

Las inflorescencias del tomate se distribuyen en racimos simples, bifurcados o ramificados (Anderlini, 1976). En la parte inferior de la planta se encuentran racimos simples, mientras que en la parte superior se encuentran inflorescencias en racimos ramificados (Anderlini, 1976).

El fruto del tomate se clasifica como baya, la cual puede variar de color, desde verde, amarillo, rosado o rojo (Villela, 1993). El color del fruto se debe a los pigmentos licopina que confiere color rojo y carotina que confiere color amarillo, la combinación de dichos pigmentos le dará la coloración característica al fruto (Anderlini, 1976). Sin embargo, las condiciones de luz a la que esté expuesta la planta, puede condicionar el color de la baya (Anderlini, 1976). La baya está compuesta por piel, pulpa, placenta y semillas, las cuales varían su forma durante el desarrollo del fruto (Anderlini, 1976).

Figura 1 Planta de tomate



Fuente: Colston, 2013

c. **Importancia económica y nutricional.** El tomate es la hortaliza que ocupa el segundo lugar en importancia a nivel mundial, únicamente antecedido por la papa (Gaviola, sin año; Dueñas *et al*, 2008). Según estadísticas de la FAO en el año 2011 se produjeron a nivel mundial 159 millones de toneladas de tomate utilizando 4,7 millones de hectáreas para su cultivo (FAO, 2013).

Debido al alto consumo de tomate, sus valores nutricionales pueden llegar a cubrir hasta el 20 y 40% de las cantidades requeridas de vitamina A y C (Gaviola, sin año). Es por ello que es importante a nivel nutricional. Se sabe también que el tomate activa la secreción gástrica para aumentar el sabor agradable de otros alimentos, permitiendo al mismo tiempo asimilar de mejor forma los nutrientes de otros alimentos (López, 1976). Posee un alto contenido en aminoácidos y ácidos orgánicos (Anderlini, 1976). A continuación se detalla el contenido nutricional de dicha hortaliza:

Cuadro 1 Composición nutricional por cada 100 gramos de tomate fresco

Compuesto	Cantidad	Compuesto	Cantidad
Calorías	21	Celulosa	0.6%
Agua	94.3 g	Vitamina E	0.03mg
Carbohidratos	3.3g	Vitamina K	0.05mg
Grasas	0.1g	Vitamina PP	0.06mg
Proteínas	0.9g	Potasio	0.3%
Fibra	0.8g	Azufre	0.014%
Sodio	9mg	Magnesio	0.013%
Calcio	7mg	Zinc	0.2mg
Fósforo	19mg	Cobalto	0.2mg
Hierro	0.7mg	Manganeso	0.1mg
Vitamina A	1100 U.I.	Fluor	0.01mg
Tiamina	0.05mg	Yodo	0.01mg
Riboflavina	0.02mg	Niacina	0.6mg
Ácido ascórbico			20mg

Fuente: (FAO, 2006; Gaviola, sin año)

d. **Requerimientos del cultivo.** El tomate puede adaptarse a diferentes climas con excepción de lugares muy fríos (Rodríguez *et al*, 2001). Por otro lado, se deben evitar lugares con fuertes vientos porque evitan el buen crecimiento de la planta y el desprendimiento de las flores (Rodríguez *et al*, 2001). Para realizar un buen cultivo de tomate, se deben tomar en cuenta tres factores importantes que son luz, temperatura y humedad, ya que pueden afectar el crecimiento del tomate. Estos factores se describen a continuación:

1) Luz : La luminosidad es importante para el proceso de fotosíntesis de la planta y para el fotoperíodo de la misma, ya que éste es necesario para la maduración de los frutos (Rodríguez *et al*, 2011). Además, ayuda al crecimiento de los tejidos de la planta (Rodríguez *et al*, 2011).

2) Temperatura: Este factor es muy importante, ya que la temperatura influye en los procesos vitales de la planta como es la fotosíntesis, transpiración, entre otras (Rodríguez *et al*, 2011). Las temperaturas óptimas para un buen crecimiento del tomate, son variadas y dependen del ciclo de vida de éste, son: Temperatura nocturna de 15-18°C, Temperatura diurna de 24-25°C, Temperatura ideal para floración 21°C, Temperatura ideal para desarrollo vegetativo de 22-23°C y Temperatura en que detiene su desarrollo vegetativo 12°C (Rodríguez *et al*, 2011).

3) Humedad: La humedad influye en el crecimiento y desarrollo vegetativo de la planta del tomate, así como la transpiración y el posible desarrollo de enfermedades, por lo que es recomendable que la humedad no sea mayor a 50% (Rodríguez *et al*, 2011).

4) Suelos: Otro factor importante para el crecimiento del tomate, es el suelo en el cual se siembra éste. El tomate puede crecer en gran variedad de suelos, con preferencia en terrenos profundos y buen drenaje (Rodríguez *et al*, 2011). Sin embargo, si se desea una producción abundante se deben tomar en cuenta las siguientes características del suelo:

a) pH del suelo: El pH ideal para el cultivo es neutro, por lo que se debe tratar para evitar que esté más ácido o más básico. Si el suelo se encuentra en un pH ácido se debe tratar con Dolomita o cal apagada, mientras que si se encuentra en un pH básico se debe tratar con azufre (Rodríguez *et al*, 2011).

b) Nutrientes: Se debe conocer si el suelo se encuentra pobre o rico en diferentes nutrientes, si se encuentra pobre, se debe enriquecer el mismo. Los nutrientes que pueden agregarse son: Nitrógeno; Fósforo (siendo elemental para el terreno); Potasio (para los frutos); Sodio; Magnesio (Ayuda al color del fruto); Calcio y Hierro (Rodríguez *et al*, 2011).

e. Enfermedades y plagas comunes en el cultivo de tomate. Las enfermedades de la planta y fruto del tomate afectan su productividad (McColloch *et al*, 1979). Estas enfermedades se encuentran relacionadas al estado de la planta, el estado del tiempo y la manipulación por parte del ser humano (McColloch *et al*, 1979). Para que un fruto se infecte con diferentes microorganismos, como

hongos, bacterias, virus, necesita sufrir alguna lesión física la cual permitirá la entrada de éstos para ocasionar la infección y la enfermedad característica de cada microorganismo patógeno (McColloch *et al*, 1979).

El cultivo del tomate puede padecer muchas enfermedades y plagas, las cuales pueden ser ocasionadas por insectos, ácaros, nemátodos, bacterias, hongos, virus, e inclusive por factores fisiológicos o accidentales de las plantas (Rodríguez *et al*, 2001). Sin embargo, una de las enfermedades que más daño ocasiona y provoca grandes pérdidas económicas es el Chancro del tomate ocasionado por la bacteria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (*Cmm*) (Jones *et al*, 2001; De León *et al*, 2006).

2. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*

a. Descripción morfológica. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* pertenece al reino Procariota, de la División II *Firmicutes*, Clase I *Firmibacteria*, del género *Clavibacter* (EPPO, 2012). Esta bacteria es aerobia, Gram positivo-lo que indica que no produce esporas (EPPO, 2012; Jones *et al*, 2001). *Cmm* puede presentar diferentes formas, las cuales dependerán de las condiciones de crecimiento en donde se encuentre, siendo forma de bastón la predominante en plantas (Jones *et al*, 2001). Las formas que puede adoptar son de coco o bastón, y de un tamaño pequeño (Jones *et al*, 2001). Estas bacterias se reproducen por fisión binaria (Jones *et al*, 2001). En la pared de peptidoglicano poseen ácido 2,4-diaminobutírico, ácidos grasos ramificados con insaturaciones en los carbonos 15-17, siendo el ácido antepentadecenoico el más importante (Jones *et al*, 2001). Las colonias bacterianas crecen con diferente aspecto dependiendo del medio semiselectivo en donde se encuentren, siendo de color amarillo, lisas, con bordes prolijos y de aspecto mantecoso (Jones *et al*, 2001).

3. Chancro del tomate. El Chancro bacteriano del tomate afecta dicho cultivo a nivel mundial, siendo la principal enfermedad ocasionada por bacterias, debido a las grandes pérdidas económicas que puede ocasionar (Jones *et al*, 2001; CATIE, 1990). Esta enfermedad se describió por primera vez en 1909 por E.F. Smith en Estados Unidos (Jones *et al*, 2001). Los brotes de esta enfermedad son esporádicos, los cuales suelen deberse a semillas contaminadas o trasplantes infectados (Jones *et al*, 2001).

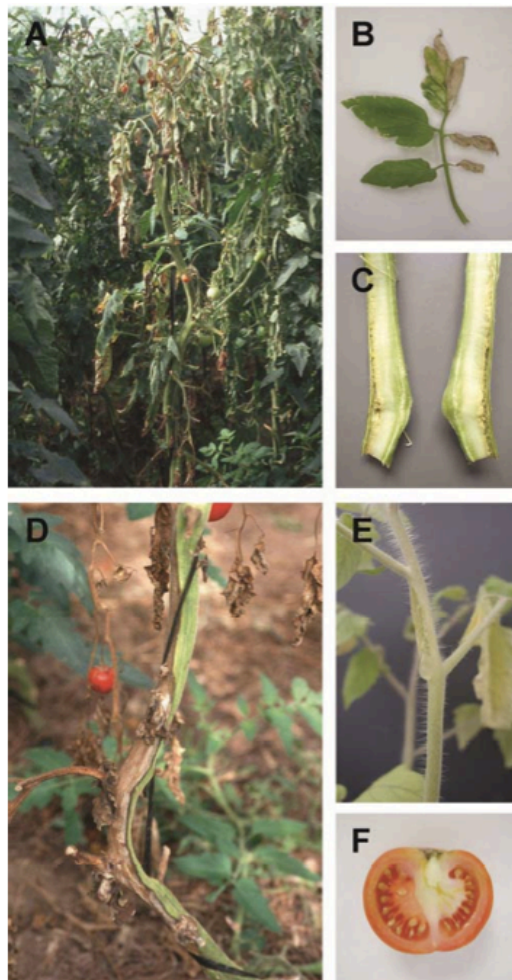
a. Biología. Las semillas infectadas por *Cmm* suelen ser la fuente primaria de infección, las cuales pueden llevar a la producción de plántulas infectadas (EPPO, sin año; Rodríguez *et al*, 2001). Usualmente la infección por semillas suele ocurrir cuando éstas poseen el patógeno en su cutícula externa, y en raras ocasiones se dan brotes por semillas que posean el patógeno internamente (Rodríguez *et al*, 2001). Otra fuente de infección, son plántulas que se utilizan para trasplantes, las cuales se encuentran infectadas y pueden dispersar la enfermedad en el campo y diseminar la bacteria a más plantas por medio

de lesiones físicas en las plantas (Rodríguez *et al*, 2001). Se sabe que las infecciones por semillas son del 1% (Rodríguez *et al*, 2001; EPPO, 1996) mientras que por trasplantes son del 50% (Rodríguez *et al*, 2001). Es importante mencionar que la diseminación de la enfermedad puede ser favorecida por la irrigación y por los métodos y prácticas de cultivo (EPPO, 1996). Debido a estos medios de inoculación, la bacteria puede ingresar a la planta por medio del tejido dañado, estomas y raíces (EPPO, 1996).

Las plantas más susceptibles a infecciones y a sufrir la enfermedad, son las plantas jóvenes, sin embargo, cualquier estadio del desarrollo vegetativo puede ser susceptible a la enfermedad (EPPO, 1996). Una vez ha ingresado la bacteria en la planta, existe un tiempo de latencia en el cual no presentará síntomas (EPPO, 1996). La bacteria se alojará en el xilema formando cavidades, las cuales contendrán secreciones y masas bacterianas (EPPO, 1996). Asimismo, *Cmm* producirá una sustancia tóxica con propiedades biológicas (EPPO, sin año), la cual es un compuesto antibacterial. Se han realizado estudios para comprobar la actividad anti-bacterial de las sustancias producidas por *Cmm* y se han encontrado diferentes compuestos activos, los cuales no se han identificado (Holtmark *et al*, 2007). Por otra parte se han realizado estudios en los cuales han determinado que metabolitos producidos por *Cmm* pueden inhibir el crecimiento *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* el cual ocasiona la necrosis bacteriana de la papa (Holtmark *et al*, 2007).

b. Síntomas. Las plantas de tomate afectadas por la bacteria *Cmm* pueden presentar diferentes síntomas, los cuales van a depender de las condiciones del cultivo y de si la infección es sistemática o localizada (De León *et al*, 2011) (Ver Figura No. 1). Cuando se produce una infección sistemática la bacteria ingresa e invade los haces vasculares de la planta marchitándola (De León *et al*, 2011). Si tomates cultivados en invernadero se infectan, los tallos se abren y se pueden observar gotas con masa bacteriana (De León *et al*, 2011). Las semillas del fruto pueden ser infectadas con la bacteria *Cmm* a través de los tejidos vasculares de la planta (De León *et al*, 2011). Cuando la infección es localizada se suelen observar necrosis en los bordes de las hojas, manchas en frutos y manchas blancas en tallos (De León *et al*, 2011).

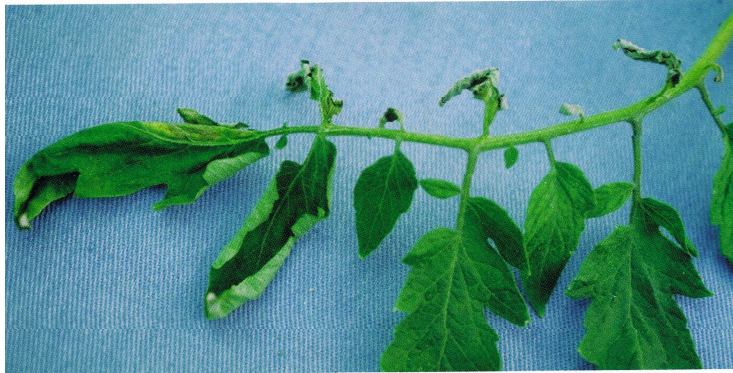
Figura 2 Síntomas que sufre la planta del tomate debido al Chancro del tomate causado por infección sistémica. **A)** Marchitez en toda la planta, **B)** Marchitamiento unilateral, **C)** Decoloración amarillo-café por invasión de *Cmm* en los haces vasculares, **D)** Chancros en el tallo, **E)** Gotas de masa bacteriana proveniente de heridas en tallos, **F)** Fruto infectado de las semillas por medio de haces vasculares



Fuente: (De León *et al*, 2011).

Los primeros síntomas que presenta la planta es el marchitamiento sistemático como se puede observar en la Figura 2. Éste empieza por las hojas inferiores de la planta. Las hojas más cercanas al suelo sufren curvamiento hacia abajo (Jones *et al*, 2001; Gabor y Wiebe, 1997). Usualmente el marchitamiento es unilateral en las plantas, ya sean jóvenes o viejas, (Rodríguez *et al*, 2001; Gabor y Wiebe, 1997) y éstas pueden presentar estrías de colores que se extienden en las nervaduras de las hojas, pecíolos y tallos (Gabor y Wiebe, 1997), siendo las estrías las que pueden abrirse para formar los chancros a una temperatura de 37°C (Gabor y Wiebe, 1997; Jones *et al*, 2001). Los márgenes de las hojas de los folíolos suelen pandearse hacia arriba (Jones *et al*, 2001).

Figura 3 Marchitamiento y curvamiento unilateral de la planta del tomate debido al Chancro del Tomate



Fuente:(Gabor y Wiebe, 1997)

Los peciolo y hojas infectadas usualmente permanecen unidas al tallo, a pesar de su marchitez y modificaciones en su fisiología (Ver Figura 3) (Jones *et al*, 2001; Gabor y Wiebe, 1997). La marchitez comienza por las hojas inferiores y llega de último a las hojas superiores, sin embargo, si la infección ocurrió por las flores, la enfermedad se desarrollará de la parte superior a inferior y podrá matar la planta (Jones *et al*, 2001). Las hojas también sufrirán una decoloración en los bordes de color amarilla lo cual recibe el nombre de “necrosis marginal”, este síntoma se observa en la Figura 4. El tallo de la planta pueden desarrollar raíces adventicias y en ocasiones los nudos mostrarán una coloración blanca (Jones *et al*, 2001).

Figura 4 Marchitez de hojas inferiores y superiores de la planta del tomate



Fuente: (Dirección General de Alimentación, 2010)

Figura 5 Lesiones necróticas en la planta de tomate: **A)** Necrosis marginal en hojas, **B)** Lesiones necróticas en pedúnculos y cáliz



Fuente: (ASTA, sin año)

En el interior de los tallos, específicamente en los haces vasculares (floema y xilema) se puede observar una decoloración amarilla o café, la cual se convertirá en color marrón rojizo (Gabor y Wiebe, 1997; Jones *et al*, 2001) y la médula del tallo tomará un color amarillo, y su consistencia será harinosa y hueca (Ver Figura 5 y 6) (Gabor y Wiebe, 1997). Asimismo, en el tallo se pueden observar formaciones de chancros (llaga o úlcera ocasionada por *Cmm*) (Gabor y Wiebe, 1997). En las hojas se puede observar una coloración verde claro a blanca en forma de manchas, formándose alrededor de ellas anillos de tejido necrótico, asimismo, las hojas pueden tomar un color amarillento con las nervaciones oscuras (Jones *et al*, 2001).

Figura 6 Decoloración de haces vasculares (izquierda) y chancros en tallo de planta de tomate (derecha)



Fuente: (Gabor y Wiebe, 1997)

Figura 7 Comparación de un tallo sano (parte superior) con un tallo infectado con *Cmm* en donde se observa decoloración marrón y cavidades



Fuente: (ASTA, sin año)

Las lesiones en el fruto son manchas café elevadas con un borde blanco, las cuales simulan un “ojo de pájaro” como se observa en la Figura 7. El interior del fruto presenta una coloración amarilla-café en el tejido vascular, en el cáliz y cerca del tejido donde se encuentran las semillas (Gabor y Wiebe, 1997; Jones *et al*, 2001) y con posible desarrollo de cavidades internas (Gabor y Wiebe, 1997).

Figura 8 Lesiones en fruto de la planta del tomate: **A)** Tejido vascular de coloración amarilla infectando semillas, **B)** Manchas café con borde blanco en forma de “ojo de pájaro”



Fuente: (Dirección General de Alimentación, 2010)

c. **Condiciones que propician el desarrollo de la enfermedad.** Las infecciones de la planta pueden ocurrir por heridas físicas, estomas o raíces (Gabor y Wiebe, 1997), además por restos de plantas contaminadas o por bacterias que se encuentran en el suelo (Gabor y Wiebe, 1997). Las infecciones secundarias ocurren por el agua y manipulación del terreno (Gabor y Wiebe, 1997), además una humedad relativa mayor a 80%, temperaturas de 18-24°C, poca luz y grandes concentraciones de nutrientes en el suelo, favorecen el desarrollo de la enfermedad (Gabor y Wiebe, 1997). En Guatemala los cultivos de tomate presentan mayor producción en altitudes entre 0 y 1,500 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura entre 16 y 25°C (Grupo Disagro, 2004).

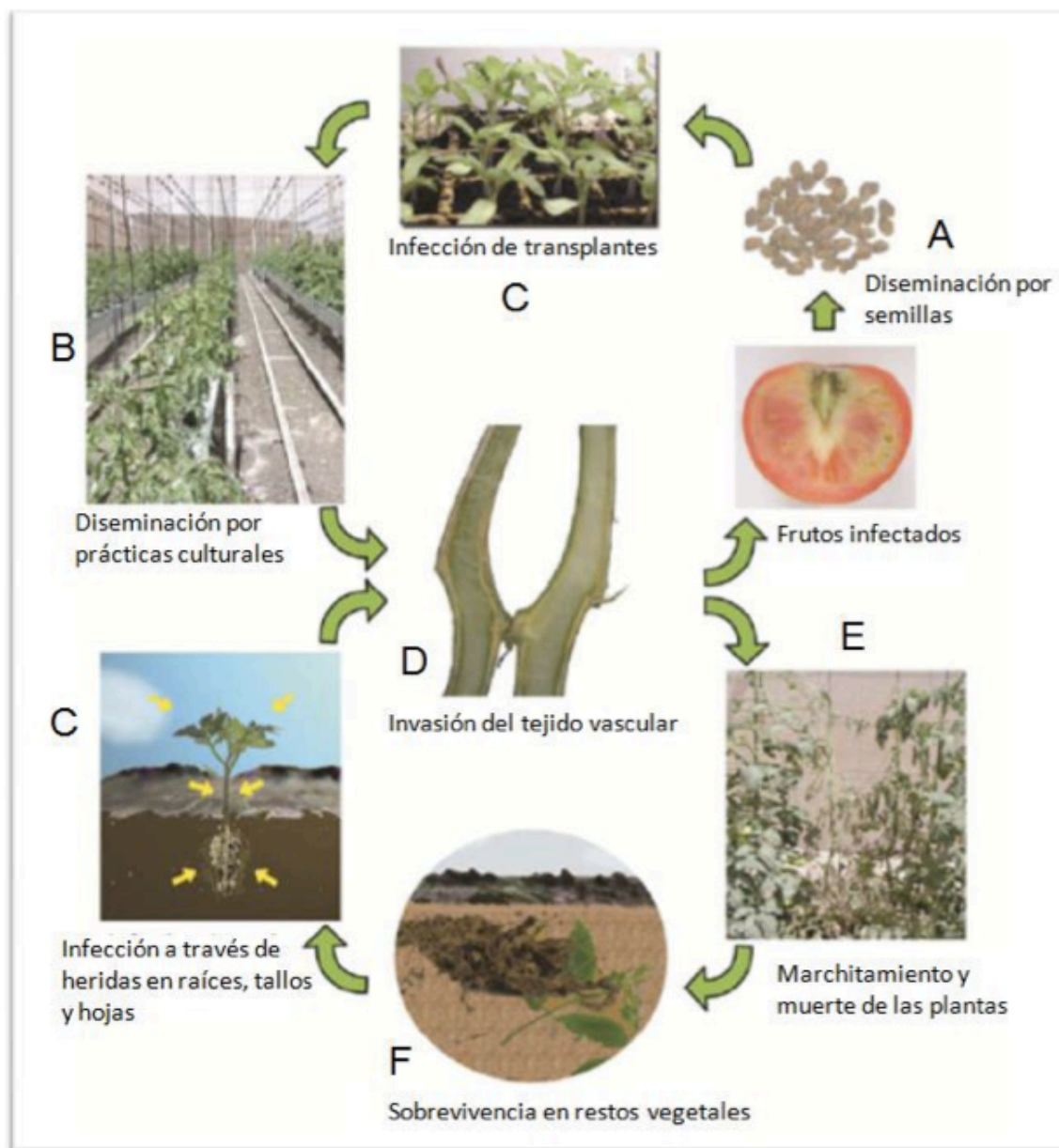
d. **Epidemiología.** Como ya se mencionó la bacteria puede sobrevivir en el suelo, restos de plantas, hierbas y semillas de un período de cultivo a otro, siendo estos las fuentes del inóculo (Jones *et al*, 2001; Gabor y Wiebe, 1997). Debido a que estos componentes se encuentran en el terreno de cultivo, al manipularlo pueden surgir las infecciones secundarias (Jones *et al*, 2001). Las plantas de tomate que se encuentran amarradas a estacas de madera pueden mostrar síntomas en el tallo, al igual que las plantas trasplantadas entre tres y seis semanas. Esto dificulta la detección de la enfermedad y puede promover una mayor infección de plantas cercanas (Jones *et al*, 2001). En lo que respecta a las plantas que crecieron de semillas infectadas, éstas pueden morir o ser asintomáticas (Jones *et al*, 2001). En los ciclos de infección secundarios las plantas pueden presentar los síntomas característicos de la enfermedad, sin embargo, si la infección se torna sistemática podría ocasionar la muerte de la planta (Jones *et al*, 2001).

e. **Ciclo de la enfermedad.** *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* puede presentarse en tres ambientes en su ciclo de vida, los cuales son: 1) semillas, 2) viveros para producir plantas y 3) áreas de producción de tomate (De León *et al*, 2011). Cuando *Cmm* se encuentra en las semillas pueden llegar a infestar el fruto o infectar las semillas del fruto, lo que permitirá la diseminación hacia áreas libres del patógeno (De León *et al*, 2011). Se ha encontrado de 10^2 a 10^4 UFC/semilla de tomate, por lo que se cree que esta cantidad es la necesaria para transmitir la bacteria a plantas, además de la inoculación mecánica (De León *et al*, 2011). En los viveros la transmisión de la enfermedad se da por la manipulación de las plántulas o por métodos de irrigación (De León *et al*, 2011) debido a que restos de plantas situados en suelos pueden poseer bacterias vivas las cuales pueden actuar como fuentes de inóculo (De León *et al*, 2011). Las plántulas infectadas sistemáticamente pueden llegar a ocasionar infecciones secundarias, ya que una vez trasladada la plántula del vivero al invernadero, podría ocasionar la infección de plantas libres de patógeno, lo que desencadenaría una infección secundaria (De León *et al*, 2011).

Se puede resumir que el ciclo de la infección comienza con semillas contaminadas con *Cmm*, las cuales se utilizan para producir plántulas en viveros en las que se disemina la enfermedad; las plántulas infectadas al ser transportadas a un invernadero o a campo abierto, dispersarán la bacteria en plantas sanas por la

manipulación de las mismas, esto creará la infección de los haces vasculares, provocando los primeros síntomas de la enfermedad como marchitez e inclusive la muerte. Los restos de estas plantas infectadas permitirán que la bacteria siga viviendo en ellas por tiempo prolongado. Cuando el terreno en donde se encontraban estos restos de planta contaminada sea manipulado podrá infectar más plantas sanas a través de raíces, estomas u hojas, lo cual llevará a la infección sistemática de plantas que producirán frutos con semillas infectadas y esto permitirá el inicio nuevamente del ciclo de la enfermedad del Chancro bacteriano (Ver Figura 8 (De León *et al*, 2011)).

Figura 9 Ciclo de infección por *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* en plantas de tomate para producir la enfermedad del Chancro del tomate



Fuente: (Croce, 2012)

f. **Control.** El método de control principal es obtener semillas libres y plántulas libres del patógeno, en especial semillas. Esto permite realizar un cultivo más seguro y es más eficiente que trabajar con semillas tratadas ya que éstas pueden sufrir daño e inclusive seguir conteniendo la bacteria (United States Department of Agriculture, 1972). Es importante que las semillas utilizadas estén certificadas para evitar contaminación (United States Department of Agriculture, 1972).

Es importante que a pesar de trabajar con semillas certificadas, se realicen pruebas de control para asegurarse que efectivamente las semillas no están contaminadas con la bacteria *Cmm* (United States Department of Agriculture, 1972; Jones *et al*, 2011). Para este proceso se debe tomar un alto número de semillas (muestras de 10,000 semillas) para que la muestra sea significativa, lavarlas y obtener el agua, esperando que sea una muestra concentrada para sembrarla en diferentes medios semiselectivos y así poder determinar si existe o no presencia de *Cmm* en las semillas (Jones *et al*, 2011). Si se cuenta con colonias bacterianas dudosas, se debe utilizar una planta indicadora para corroborar que sea *Cmm* y no contaminación por otra bacteria (Jones *et al*, 2011).

Si la semilla se encontrara contaminada con *Cmm*, se debe tratar con algunas de las siguientes opciones: solución de ácido acético, tratamiento de fermentación (United States Department of Agriculture, 1972), solución de ácido clorhídrico, hipoclorito cálcico o con agua caliente, para desinfectarlas (Jones *et al*, 2011), siempre tomando en cuenta que el rendimiento de las semillas puede verse afectado por dichos tratamientos, en especial el tratamiento térmico (United States Department of Agriculture, 1972). También es importante esterilizar el suelo y los utensilios con los cuales se trabajará para sembrar semillas o trasplantes, para evitar contaminación en viveros e invernaderos (Jones *et al*, 2011).

g. **Regulaciones de cuarentena.** Diferentes organizaciones de Estados Unidos como la Organización de Agricultura y alimentos (FAO por sus siglas en inglés), la Convención Internacional para la Protección de Plantas (IPPC por sus siglas en inglés) y la Organización Regional para la Protección de Plantas (RPPOs por sus siglas en Inglés), han creado normas y medidas que se deben seguir para asegurar la importación y obtención de material vegetal y semillas libres de bacteria para evitar así posibles contaminaciones con *Cmm* (De León *et al*, 2011). Hasta la fecha la bacteria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* está catalogada como un organismo en cuarentena tipo A2 por la Organización Europea para la Protección de Plantas (EPPO por sus siglas en inglés), lo que significa que se encuentra presente en algunas partes de la región de los Estados Unidos (De León *et al*, 2011). Es por ello que tomate producido en países del tercer mundo deben contar con certificados que autentifiquen que su producto se encuentra libre de *Cmm*, para evitar nuevos brotes y evitar que regiones libres de éste se contaminen (De León *et al*, 2011).

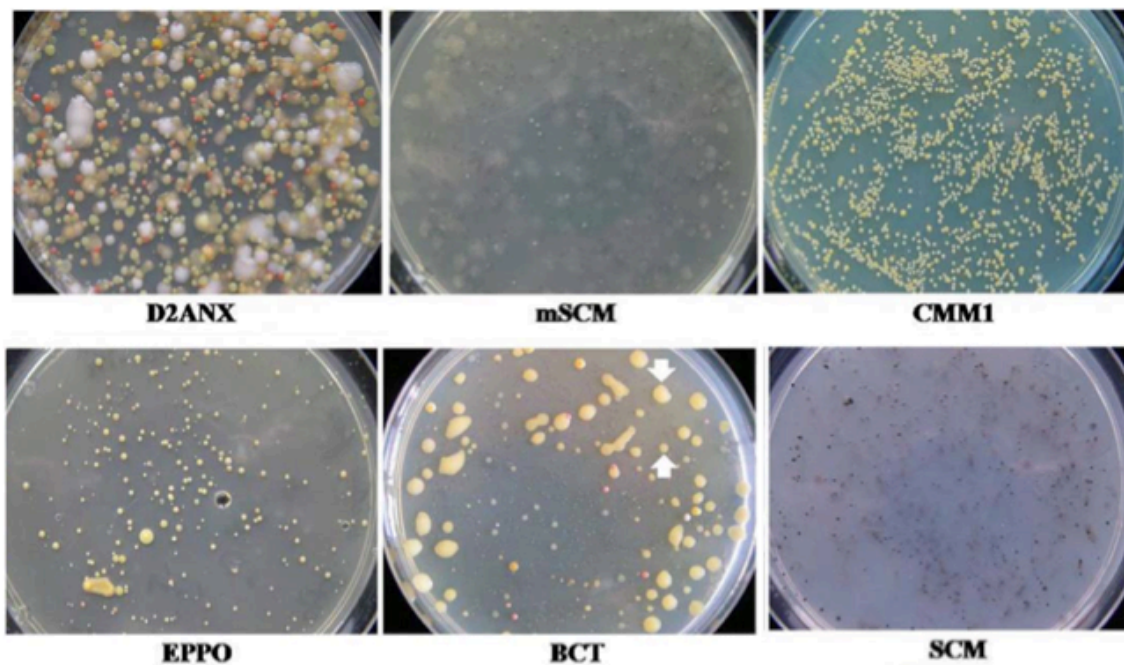
h. Detección de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* en semillas

El control de las semillas de tomate es importante para asegurar que se encuentran libres del patógeno y cumplir con las normas de fitosanidad y de cuarentena (De León *et al.*, 2011). Esto es importante ya que las semillas de tomate contaminadas no difieren en apariencia en comparación con semillas sanas, por lo tanto es necesario realizar análisis a las mismas (De León *et al.*, 2011). En la actualidad se realizan diferentes ensayos serológicos (Inmunofluorescencia), microbiológicos (medios de cultivo semiselectivos) y moleculares (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para detectar presencia de *Cmm* en semillas, sin embargo ninguno de ellos ha logrado ser del todo confiable debido a que se toman muestras representativas de lotes de semillas, debido a que analizar todas las semillas sería un trabajo muy arduo y poco práctico (De León *et al.*, 2011).

1) Prueba a semillas de tomate por medios de cultivo semiselectivos. Para realizar esta prueba, se debe preparar un extracto de las semillas el cual se debe realizar con una muestra de 10,000 semillas con una probabilidad del 95% de detectar un nivel del 0.03% de contaminación por cada lote de semillas (De León *et al.*, 2011). El extracto de las semillas enteras se debe realizar sumergiéndolas en una solución amortiguadora y tratarlas con un homogeneizador, sin embargo en ocasiones es mejor trabajar con la molienda de las semillas para recuperar cualquier contaminación interna (De León *et al.*, 2011). Una vez obtenido el extracto de las semillas, éste se debe sembrar en medios semiselectivos (De León *et al.*, 2011). En la actualidad existe una variedad de medios para aislar *Cmm*, entre ellos se encuentran los medios más utilizados que son: SCM, mSCM, D2ANX, KBTS y CNS (De León *et al.*, 2011). Estos medios semiselectivos utilizan como fuente de carbono moléculas de azúcar como sacarosa o glucosa; y antibióticos que permiten que éste sea selectivo para *Cmm* y que inhiban el crecimiento de bacterias no deseadas (Croce, 2012).

La morfología de *Cmm* a observar en cada medio puede variar de color, usualmente siempre se espera obtener un blanco que llega hasta amarillo brillante y en algunos casos color verde oscuro (Ftayeh *et al.*, 2011). Es importante mencionar que la morfología será redonda, con tendencia a ser irregular o fluida en su borde (EPPO, 2005). A continuación en la Figura 9 se muestran imágenes de la morfología de la bacteria *Cmm* en algunos medios semiselectivos más utilizados para su aislamiento y recuperación.

Figura 10 Morfología de *Cmm* en los medios semiselectivos utilizados para su aislamiento



(Fuente: Ftayeh *et al*, 2011)

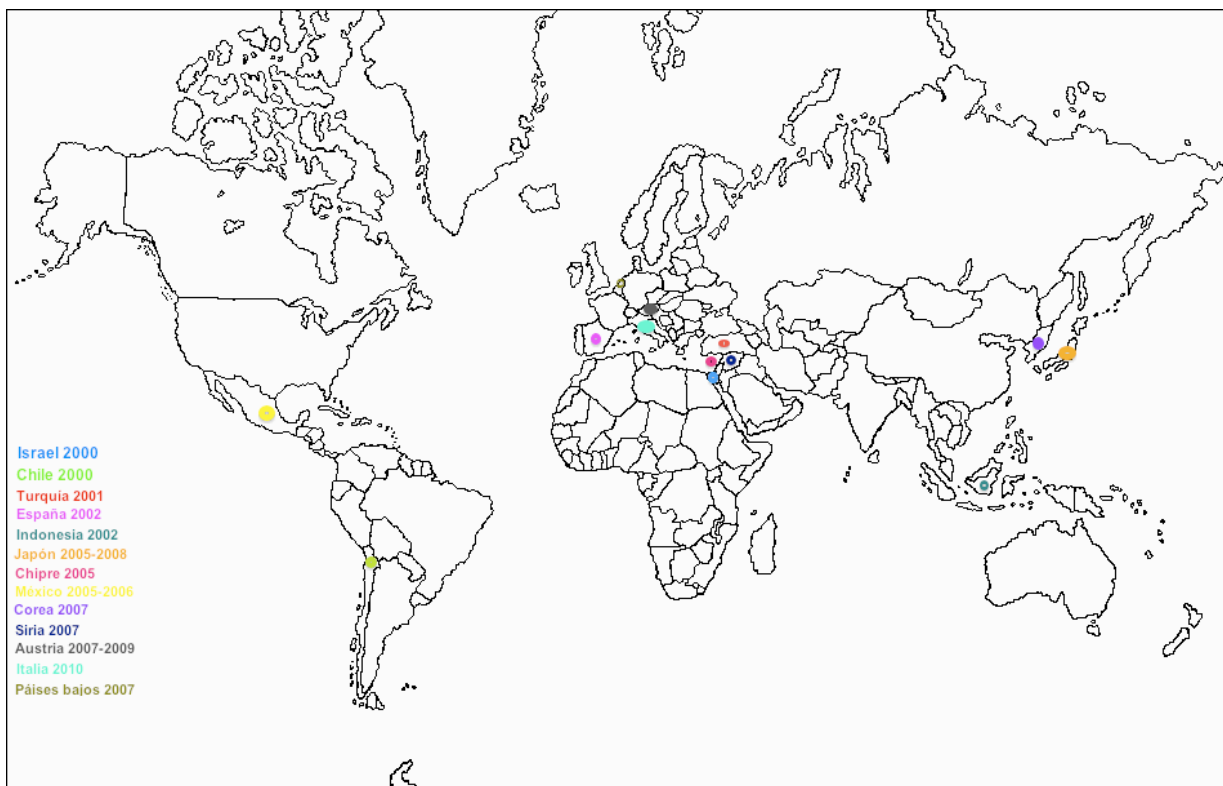
2) Métodos serológicos. Los métodos serológicos suelen utilizarse para confirmar que las bacterias aisladas en los medios de cultivo semiselectivos son efectivamente *Cmm* (De León *et al*, 2011), sin embargo también puede realizarse con un extracto directo de las semillas. El método más utilizado para este proceso es la inmunofluorescencia, el cual por medio de anticuerpos policlonales, se detecta el antígeno característico de la bacteria y con fluorescencia se puede determinar si hay presencia de *Cmm* o no en las semillas (De León *et al*, 2011).

3) Métodos moleculares. El método molecular más utilizado es el PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) que permite detectar la presencia de *Cmm* en las semillas (De León *et al*, 2011). Para este proceso se necesita el extracto de semillas. En esta técnica se utilizan cebadores que son específicos para la región intergénica 16S-23S ADN ribosomal, la cual se busca amplificar para poder afirmar la presencia de *Cmm* en las muestras (De León *et al*, 2011). Es importante mencionar que pueden existir falsos negativos ya que los cebadores utilizados puede que no reconozcan las cepas de *Cmm* y además la presencia de inhibidores que se encuentran en las semillas evita que sea detectada *Cmm*. Esta técnica no es más sensible que técnicas serológicas y microbiológicas (De León *et al*, 2011).

B. Antecedentes

1. **Brotos a nivel mundial.** Durante años han existido grandes brotes en diferentes países del mundo, los cuales podrían ayudar a explicar la epidemiología de la enfermedad del Chancro bacteriano del tomate (De León *et al*, 2011). En Israel, en donde la bacteria *Cmm* se encuentra presente desde 1963, tuvieron recientemente un brote severo en el año 2000 y desde esa fecha se puede encontrar la enfermedad en varios invernaderos (De León *et al*, 2011), asimismo, en ese año se dio un brote en Chile debido a semillas infectadas (De León *et al*, 2011). En el año 2001 se dio un brote en Turquía debido a semillas o trasplantes contaminados, lo cual ocasionó grandes pérdidas económicas (De León *et al*, 2011). En España e Indonesia se reportó un brote en 2002 debido a semillas contaminadas, ocasionando grandes pérdidas (De León *et al*, 2011). Otro brote reciente registrado fue en Japón en los años de 2005 y 2008 (De León *et al*, 2011). A partir del año 2005 se han dado brotes en Chipre, México, Corea, Siria, Austria y el más reciente fue en Italia en 2010, debido a semillas infectadas (De León *et al*, 2011) (En la figura 11 se puede observar la distribución de los brotes más recientes de la enfermedad a nivel mundial).

Figura 11 Distribución a nivel mundial de los brotes más recientes del Chancro bacteriano del tomate



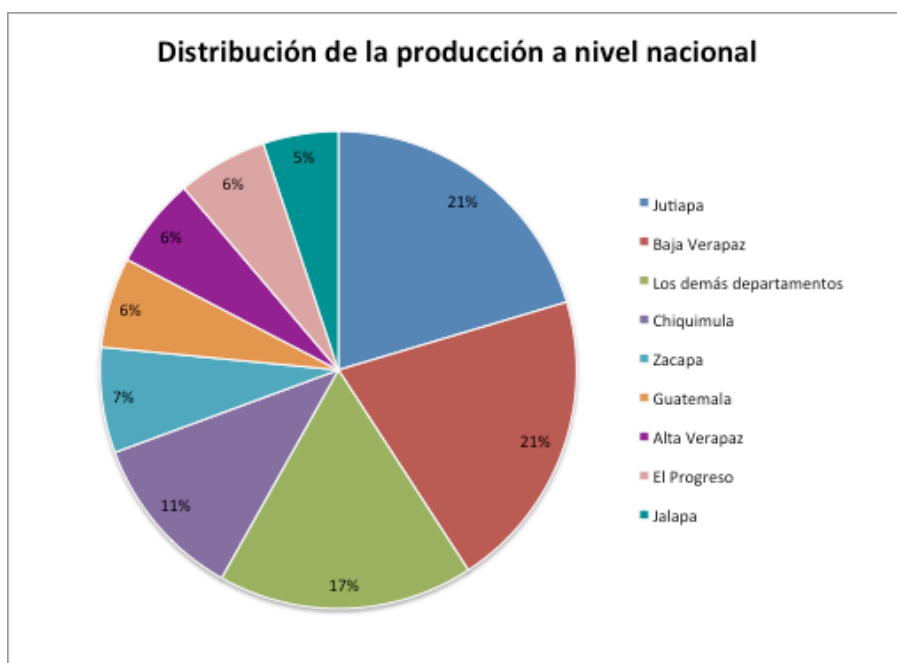
Fuente: De León *et al*, 2011

2. **Brotos en Guatemala.** En Guatemala se trabaja con tres grandes grupos de tomate: 1)destinados a exportación, 2)consumo interno y 3)para procesamiento industrial (Grupo Disagro, 2004. El cultivo de tomate es de suma importancia debido al fuerte ingreso económico que representa para campesinos y para el país (Archila, 2011). Este cultivo ocupa el séptimo lugar en importancia en Guatemala en lo que respecta a las hortalizas y además en el año 2010 permitió 2,678,400 empleos directos en el campo, lo que equivale 9,566 empleos permanentes (MAGA, 2011),

En el año 2003 se realizó un censo a nivel nacional para conocer qué departamentos son los mayores productores de tomate, siendo Jutiapa (20%) y Baja Verapaz (20%) los que encabezan este listado. En la figura 10 se puede observar la distribución de la producción nacional de tomate (MAGA, 2011). También se encontró que “el 72.1% de la superficie cultivada se encuentra concentrada en siete departamentos: Jutiapa 20.2%, Baja Verapaz 17.3%, Chiquimula 8.9%, Guatemala 7.1%, Alta Verapaz 6.5%, El Progreso 6.1% y Jalapa 6%” (MAGA, 2011).

En Guatemala en el año 2011 se emplearon aproximadamente 8,822 hectáreas para el cultivo del tomate, produciendo 305,426.88 toneladas de tomate, con un rendimiento de 34.62 toneladas/hectárea (FAO, 2013;MAGA, 2011), permitiendo un ingreso económico para Guatemala de 23,203,911.00US\$ (MAGA, 2011). En el cuadro 2 se puede observar como desde el año 2006 se ha mantenido en un rango muy cercano la cantidad de hectáreas cosechadas, al igual que para la producción de toneladas de tomate.

Figura 12 Distribución de la producción de tomate a nivel nacional



(MAGA, 2011)

Cuadro 2 Área cosechada, Producción y Rendimiento del cultivo de tomate en Guatemala

Año calendario	Área cosechada (Hectáreas)	Producción (Toneladas Métricas)	Rendimiento (Toneladas/ Hectárea)
2006	7,056.75	304,564.82	43.16
2007	10,123.51	355,452.44	35.11
2008	10,203.88	368,963.07	36.16
2009	8,386.75	304,814.07	36.34
2010 p/	8,666.31	300,913.18	34.72
2011 e/	8,822.30	305,426.88	34.62

p/ Cifras preliminares. e/ Cifras estimadas

(MAGA, 2011)

En agosto de 2011 se reportó en Guatemala un brote de chancro del tomate debido a la utilización de semillas contaminadas con la bacteria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, lo cual ocasionó grandes pérdidas económicas para sus productores y para el país (Ortiz, 2011), además de crear incertidumbre en si el producto de exportación se encuentra libre del patógeno.

V. METODOLOGÍA

A. Recursos humanos

1. Tesista. Dana Gabriela Mejía Santizo.

2. Asesor principal. Licenciado Víctor Hugo Jiménez con formación académica en la Universidad de San Carlos de Guatemala para optar al título de Licenciatura en Química Biológica y en la Universidad del Valle de Guatemala para optar al título de Maestría en Ciencia y Tecnología en Alimentos. Actualmente, es el Coordinador de Gestión de la Calidad en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala, en donde tiene a su cargo el montaje y mantenimiento del Sistema de Calidad y la implementación del sistema y control de la documentación del Sistema de Calidad.

3. Leonel Marroquín. Estudiante de la Licenciatura en Ciencias Agrícolas con Énfasis en Gerencia Agrícola de la Universidad Rafael Landívar. Actualmente trabaja como Técnico de Campo e Invernaderos del Laboratorio de Protección Vegetal y Asistente de Invernaderos I del Proyecto UVG USDA FFP10, ambos trabajos de la Universidad del Valle de Guatemala. En la tesis colaborará con la extracción de semillas de tomate del fruto fresco

B. Enfoque de investigación

Cuantitativo

C. Tipo de investigación

Se realizará un diseño de investigación descriptivo, debido a que no se manipularán variables ni existirá asignación al azar de la muestra. En este estudio únicamente se pretende describir el crecimiento bacteriano de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* en los medios de cultivo mCNS, D2ANX, SCM, SCMF, Cmm, EPPO y BCT; y determinar el porcentaje de recuperación y porcentaje de selectividad de los medios antes mencionados. Asimismo, se describirá la morfología de la bacteria en los medios de prueba, tomando en cuenta el color, la textura, el borde de la colonia bacteriana y elevación.

D. Diseño de investigación

Se realizará un diseño no experimental transeccional descriptivo, ya que se recolectarán datos en un solo momento sobre el porcentaje de recuperación y porcentaje de selectividad de los medios de cultivo a estudiar. Describiré las variables de interés (porcentaje de recuperación y porcentaje de selectividad) y analizaré los porcentajes obtenidos para ambas variables.

E. Población

Los frutos de tomate fresco se adquirirán en la tienda de verdura particular ubicada en la Avenida del Cementerio Las Flores, zona 7 de Mixco. Se comprarán 100 tomates para extraer las semillas, asumiendo que por cada tomate hay 200 semillas disponibles (Marroquín, 2013). Según los factores descritos en el marco teórico, es posible que las semillas se encuentren contaminadas con bacterias (no específicamente *Cmm*), por lo que se realizará una limpieza de las mismas.

F. Contexto de la investigación

El trabajo se realizará en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, Ciudad, en el año 2013 y en el Laboratorio de Protección Vegetal (LPV).

G. Muestra

1. **Tipo de muestra.** El tipo de muestra es no probabilística, debido a que no se analizará un lote de semillas o una muestra de producción de semillas de tomate, únicamente se desea estudiar las características de selectividad y recuperación de los medios mCNS, D2ANX, SCM, SCMF, Cmm, EPPO y BCT para *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*.

2. **Cálculo de muestra.** Según EPPO (2005) la muestra estándar propuesta por la ISTA es de 10,000 semillas, siendo la muestra mínima lotes de 2,000 semillas. Por ello se elegirá trabajar con lotes de 2,000 semillas para realizar la infestación de las mismas y analizar el porcentaje de recuperación y la selectividad de los medios mCNS, D2ANX, SCM, SCMF, Cmm, EPPO y BCT para *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*.

3. **Selección de muestra.** Se escogerán 100 tomates frescos, esto quiere decir que deben presentar un color rojo intenso y brillante, sin manchas o signos de pudrición. Su textura debe ser blanda. Se excluirán todos los tomates que no se encuentren maduros (que cumplan con las características antes descritas) y dañados. Para las semillas se tomará como criterio de inclusión las que presenten un tonalidades de color café. Mientras que se excluirán las semillas de color blanco o dañadas.

4. **Preservación y conservación de muestra.** Una vez extraídas las semillas, se almacenarán en lotes de 2,000 semillas en sobres de papel kraft para evitar que acumulen humedad.

H. Cuadro de variables

Cuadro 3 Cuadro de variables

Variable	Naturaleza	Nivel de medición	Relación	Definición conceptual	Dimensión	Indicador	Escala
Porcentaje de recuperación	Cuantitativa	Ordinal	Independiente	Es la recuperación de un microorganismo que se espera logre crecer en el medio de cultivo de estudio (Méndez <i>et al</i> , sin año)	No aplica	Ver fórmula de porcentaje de recuperación*	Recuperación $\geq 70\%$ es aceptable (Méndez <i>et al</i> , sin año)
Selectividad	Cuantitativa	Ordinal	Independiente	Es la inhibición de los microorganismos no deseados (Méndez <i>et al</i> , sin año)	No aplica	Ver fórmula de selectividad**	La selectividad del medio selectivo para microorganismos no deseados debe ser al menos 2 (Instituto de Salud Pública, 2008).

*La fórmula para el porcentaje de recuperación que se utilizará es la siguiente:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{\text{UFC Cmm medio prueba}}{\text{UFC Cmm medio NBY}} \times 100$$

(Ftayeh *et al*, 2011; Méndez *et al*, sin año)

**La fórmula para la selectividad que se utilizará es la siguiente:

$$\text{Selectividad}(S_F) = D_0 - D_S$$

(Instituto de Salud Pública, 2008).

En donde D_0 es la dilución más alta que presenta crecimiento de 10 colonias como mínimo en el medio de referencia. Mientras que D_S es la dilución más alta que presenta un crecimiento comparable en el medio evaluado. Estos datos se expresan en logaritmos decimales (Instituto de Salud Pública, 2008).

I. Hipótesis de investigación

El porcentaje de recuperación depende de la selectividad del medio de cultivo.

J. Hipótesis de trabajo

1. Existen diferencias en cuanto al porcentaje de recuperación de *Cmm* según el medio de cultivo utilizado.

$$\text{Medio 1} \neq \text{Medio 2} \neq \text{Medio 3} \neq \text{Medio 4} \neq \text{Medio 5} \neq \text{Medio 6} \neq \text{Medio 7}$$

2. Existen diferencias en cuanto al porcentaje de selectividad para *Cmm* según el medio de cultivo utilizado.

$$\text{Medio 1} \neq \text{Medio 2} \neq \text{Medio 3} \neq \text{Medio 4} \neq \text{Medio 5} \neq \text{Medio 6} \neq \text{Medio 7}$$

K. Hipótesis nula

1. No existen diferencias en cuanto al porcentaje de recuperación de *Cmm* según el medio de cultivo utilizado.

$$\text{Medio 1} = \text{Medio 2} = \text{Medio 3} = \text{Medio 4} = \text{Medio 5} = \text{Medio 6} = \text{Medio 7}$$

2. No existen diferencias en cuanto al porcentaje de selectividad para *Cmm* según el medio de cultivo utilizado.

$$\text{Medio 1} = \text{Medio 2} = \text{Medio 3} = \text{Medio 4} = \text{Medio 5} = \text{Medio 6} = \text{Medio 7}$$

L. Hipótesis alternativa

No aplica

M. Descripción de la presentación y análisis de resultados

Se realizará un análisis descriptivo de los resultados, por lo cual no se contará con hipótesis estadística. Para obtener el porcentaje de recuperación se sembrará el cultivo puro de *Cmm* en los medios a estudiar, los cuales son siete, y en el medio control NBY el cual es un medio nutritivo que permite el crecimiento de *Cmm*. Este proceso se realizará en triplicado para cada medio. Después de la incubación de las placas, se contarán las bacterias con ayuda del Contador de Placas. Con estos datos se obtendrá el porcentaje de recuperación para cada réplica utilizando la ecuación propuesta por Ftayeh *et al* (2011) la cual se puede observar en el Cuadro No. 8. Se realizará un promedio del porcentaje para cada medio, y así obtener un promedio del porcentaje de recuperación para cada medio. Este porcentaje se comparará con el obtenido

para el medio control. Además, se tomará el criterio que todo porcentaje de recuperación $\geq 70\%$ será aceptable. Sin embargo se buscarán los tres porcentajes más altos, como indicador de una buena recuperación de la bacteria.

Para el análisis de la selectividad se sembrarán las tres bacterias competidoras por separado, *Erwinia spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Xanthomonas campestris* en los siete medios de estudio y en el medio control NBY. Se seleccionaron estas bacterias debido a que son fitopatógenas. Este proceso se realizará en duplicado para cada medio. Con ayuda del contador de placas se determinará el número de bacterias que crecieron en cada medio. Utilizando la ecuación propuesta por el Instituto de Salud Pública (2008), basada en la norma ISO 11133-2:2002 se obtendrá la selectividad de cada réplica. Se obtendrá un promedio de la selectividad para cada medio. Este dato se comparará con el obtenido para el medio control NBY. Además, se decidió tomar un valor de selectividad de al menos 2 como aceptable, ya que mientras más inhibición exista en los medios de las bacterias competidoras, mayor será la selectividad para *Cmm*.

Una vez obtenidos los porcentajes de recuperación y el valor de selectividad, se comparará que medios de cultivo estudiados obtuvieron el mayor valor para ambas variables, para seleccionar los tres medios con los mejores datos de las variables de interés y poder realizar el análisis de crecimiento de *Cmm* a partir de extractos de semillas contaminadas con dicha bacteria y las bacterias competidoras.

La descripción de crecimiento consistirá en describir si *Cmm* logra crecer en los medios de estudio. Para ello se sembrará el extracto de semillas contaminadas únicamente con *Cmm* y extracto de semillas contaminadas con *Cmm* y bacterias competidoras. Con ayuda del contador de placas se determinará el número de bacterias *Cmm* que lograron crecer en los medios. A pesar que se contarán las bacterias que crecieron en los medios, únicamente se describirá el comportamiento de crecimiento, es decir se observará si creció o no en los tres medios. Con este proceso se logrará identificar si los medios con mejor porcentaje de recuperación y selectividad permiten el crecimiento de *Cmm* a partir de extracto de semillas de tomate.

N. Objeto

Se incluirán en el estudio todas las semillas de tomate extraídas que presenten una coloración café en el epispermo. Se excluirán del estudio todas las semillas que presenten una coloración blanca en el epispermo.

O. Procedimiento

Protocolo proporcionado por comunicación oral de Jiménez, 2013

4. Determinación del número de células del cultivo inicial de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm)

a. Preparación de cultivo *Cmm*. La cepa fue proporcionada por la Licenciada Margarita Palmieri, la cual se encontraba en el laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Esta cepa se encontraba en medio D2ANX. Se tomó con un asa estéril una colonia en medio D2ANX para realizar un subcultivo de la cepa original en agar BHI (BHIA) incubándola por 3 días a 30°C. Luego se tomó una colonia que creció en BHIA (Gross y Vidaver, 1979) y se sembró en 5mL de caldo BHI, incubando 24 horas a 30°C con agitación constante a 225rpm hasta obtener un caldo turbio. Se tomó una alícuota de 2mL del caldo de cultivo de *Cmm* y se centrifugó por 10 minutos a 3000rpm a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1mL de buffer PBS 1X (NaCl 13.7mM, 0.27mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 0.2mM KH₂PO₄). Se tomó una alícuota de 250µL de la bacteria resuspendida y se diluyó en buffer PBS 1X 1:4 con volumen final 1000µL.

Adaptado de Hindler *et al*, 1992

b. Preparación estándares de McFarland. Se preparó 100mL de Ácido sulfúrico 1% y 100ml de Cloruro de Bario 1.175%. Para preparar los 10 estándares de McFarland se mezcló en diferentes proporciones las dos soluciones previamente preparadas (Ácido sulfúrico 1% y BaCl₂ 1.175%). Se agregaron los volúmenes que se describen a continuación en la siguiente tabla:

Estándar no.	Volumen (mL)		No. De bacteria/mL (10 ⁸)
	BaCl ₂ (1.175%)	H ₂ SO ₄ (1%)	
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.90	3
2	0.2	9.80	6
3	0.3	9.70	9
4	0.4	9.60	12
5	0.5	9.50	15
6	0.6	9.40	18
7	0.7	9.30	21
8	0.8	9.20	24
9	0.9	9.10	27
10	1.0	9.00	30

Se midió la absorbancia de cada estándar a una longitud de onda de 625nm y con ello se realizó una curva de calibración graficando la absorbancia vs. el número de bacterias/mL, obteniendo la ecuación de la recta. Se midió la absorbancia de las bacterias resuspendidas previamente a 625nm y con la ecuación de la recta se calculó el número de bacterias/mL del cultivo de *Cmm*.

5. Preparación de medios semiselectivos CNS, D2ANX, SCM, SCMF, Cmm, EPPO y BCT

Protocolo adaptado de Gross y Vidaver, 1979/ Xu *et al*, 2011

a. **Medio NBY.** Para preparar 1Litro de medio se pesó lo siguiente: 8g caldo nutritivo, 5g extracto de levadura, 2g K_2HPO_4 , 0.5g KH_2PO_4 , 0.25g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5g glucosa y 15g agar. Se mezclaron los componentes, disolviéndolos en agua destilada. Se autoclaveó a 121°C por 15min. El pH final debía ser 7.2 después de autoclavar.

Protocolo adaptado de Hadas *et al*, 2005

b. **Medio mCNS.** Para preparar 1Litro de medio se pesó lo siguiente: 5g peptona, 3g extracto de levadura, 2g K_2HPO_4 , 0.5g KH_2PO_4 , 0.25g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5g LiCl y 15g agar. Se mezclaron los componentes, disolviéndolos en agua destilada. Se autoclaveó a 121°C por 15min. Al medio enfriado a 45°C se agregó lo siguiente: 30mg ácido nalidíxico, 50mg cicloheximida, 38mg polimixine B. El pH final debía ser 7.4 después de autoclavar.

Protocolo adaptado de Hadas *et al*, 2005/ Xu *et al*, 2011

c. **Medio D2ANX.** Para preparar 1Litro de medio se pesó lo siguiente: 10g glucosa, 4g caseína hidrolizada, 2g extracto de levadura, 1g NH_4Cl , 0.3g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.2g trizma base, 1.0g ácido bórico y 15g agar. Se mezclaron los componentes, disolviéndolos en agua destilada. Se autoclaveó a 121°C por 15min. Al medio enfriado a 50°C se agregó lo siguiente: 0.03g ácido nalidíxico, 0.01g cicloheximida y 0.01g polimixine B. El pH final debía ser 7.4 después de autoclavar.

Protocolo adaptado de ISF, 2011

d. **Medio SCM.** Para preparar 1Litro de medio se pesó lo siguiente: 10g sucrosa, 0.1g extracto de levadura, 2g K_2HPO_4 , 0.5g KH_2PO_4 , 0.25g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5g ácido bórico y 18g agar. Se mezclaron los componentes, disolviéndolos en agua destilada. Se autoclaveó a 121°C por 15min. Al medio enfriado a 50°C se agregó lo siguiente: 1mL telurito de potasio (Solución de Chapman 1%), 100mg ácido nicotínico, 30mg ácido nalidíxico, 100mg nistatina. El pH final debía ser 7.3 después de autoclavar.

Protocolo adaptado de ISF, 2011

e. **Medio SCMF.** Para preparar 1Litro de medio se pesó lo siguiente: 10g sucrosa, 2g extracto de levadura, 2g K_2HPO_4 , 0.5g KH_2PO_4 , 0.25g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5g ácido bórico y 18g agar. Se mezclaron los componentes, disolviéndolos en agua destilada. Se autoclaveó a 121°C por 15min. Al medio enfriado a 50°C se agregó lo siguiente: 1mL telurito de potasio (Solución de Chapman 1%), 100mg ácido nicotínico, 20mg ácido nalidíxico, 100mg nistatina y 80 mg trimethoprim. El pH final debía ser 7.3 después de autoclavar.

Protocolo adaptado de Naktuinbouw, 2010

f. **Medio Cmm.** Para preparar 1Litro de medio se pesó lo siguiente: 10g sucrosa, 3.32g trizma base, 11.44g Tris-HCl, 2g extracto de levadura, 0.25g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5g LiCl, 1g NH_4Cl , 4g caseína hidrolizada y 15g agar. Se mezclaron los componentes, disolviéndolos en agua destilada. Se autoclaveó a 121°C por 15min. Al medio enfriado a 45°C se agregó lo siguiente: 10mg polimixine B, 28mg ácido nalidíxico, 100mg nistatina. El pH final debía ser 7.7 después de autoclavar.

Protocolo adaptado de EPPO, 2005

g. **Medio EPPO.** Para preparar 500mL de medio se pesó lo siguiente: 2.5g proteosa peptona, 2.5g triptona, 5g manosa, 0.75g ácido bórico y 7.5g agar. Se mezclaron los componentes, disolviéndolos en agua destilada. Se autoclaveó a 121°C por 15min. Al medio enfriado a 60°C se agregó lo siguiente: 50mg ácido nicotínico, 15mg ácido nalidíxico, 25mg polimixine B, 100mg cicloheximida.

Protocolo adaptado de Ftayeh *et al*, 2011

h. **Medio BCT.** Para preparar 1Litro de medio se pesó lo siguiente: 2.5g manitol, 2g extracto de levadura, 1g K_2HPO_4 , 0.1g KH_2PO_4 , 0.05g NaCl, 0.1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.015g $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.015g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.6g ácido bórico, 0.1g extracto de levadura y 15g agar. Se mezclaron los componentes, disolviéndolos en agua destilada. Se autoclaveó a 121°C por 15min. Al medio enfriado a 50°C se agregó lo siguiente: 20mg ácido nalidíxico, 100mg trimethoprim, 20mg polimixine B. El pH final debía ser 7.0-7.1 después de autoclavar.

6. Prueba de productividad (porcentaje de recuperación) de los medios mCNS, D2ANX, SCM, SCMF, Cmm, EPPO y BCT para *Cmm*

Protocolo proporcionado por comunicación oral de Jiménez, 2013

a. **Siembra de *Cmm* en medios mCNS, D2ANX, SCM, SCMF, Cmm, EPPO y BCT.** Una vez que se conocía la cantidad de células/mL del cultivo de *Cmm*, se realizaron diluciones seriadas 1:100 ó 1:10 según fuera necesario hasta obtener 10^3 células/mL, utilizando buffer PBS 1X con

volumen final 1000 μ L. Esta dilución se sembró en triplicado en los siete medios de prueba y en el medio control NBY. Las placas se incubaron de 4-8 días a 30°C, revisando las placas al 3ero, 4to., 6to y 8tavo. día (Hadas *et al*, 2005). Se contaron las bacterias recuperadas en cada medio con ayuda del contador de placas. Se analizó que medio de cultivo semiselectivo permitió una mejor recuperación de *Cmm*, calculando el porcentaje de recuperación por medio de la ecuación propuesta por Ftayeh *et al* (2011) y Méndez *et al* (sin año), además de describir la morfología.

7. Prueba de selectividad de los medios CNS, D2ANX, SCM, SCMF, Cmm, EPPO y BCT

Protocolo proporcionado por comunicación oral de Jiménez, 2013

a. **Obtención del cultivo de cepas bacterianas competidoras.** Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Erwinia carotovora*, *Pseudomona fluorescens* y *Xanthomonas campestris*, debido a que son bacterias fitopatógenas. Estas cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Con un asa estéril se tomó una colonia de la bacteria competidora y se transfirió a caldo BHI. Se dejaron incubando 24 horas a 30°C con agitación constante a 225rpm hasta obtener un caldo turbio. Se tomó una alícuota de 2mL del caldo de cultivo de bacteria competidora y se centrifugó por 10 minutos a 3000rpm a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1mL de buffer PBS 1X (NaCl 13.7mM, 0.27mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 0.2mM KH₂PO₄). Se tomó una alícuota de 250 μ L de la bacteria y se diluyó en buffer PBS 1X 1:4 con volumen final 1000 μ L. Se cuantificó el número de células bacterianas/mL utilizando el mismo procedimiento previamente descrito para *Cmm* utilizando los estándares de McFarland. Este procedimiento se realizó con cada cepa bacteriana competidora.

Protocolo proporcionado por comunicación oral de Jiménez, 2013

b. **Prueba de selectividad.** Una vez conocida la cantidad de células/mL de cada bacteria, se realizaron diluciones seriadas 1:100 y 1:10 (según sea el caso) con volumen final de 1000 μ L, hasta llegar a 10⁵ células/mL, utilizando buffer PBS 1X para diluir. Se escogieron 4 diluciones altas (10⁸-10⁵), las cuales se sembraron en duplicado en los siete medios semiselectivos de prueba y en el medio control NBY. Las placas se incubaron de 2-6 días a 30°C. Se revisaron las placas al 2do., 3er. y 6to. día. Se contaron las bacterias recuperadas en cada medio con ayuda del contador de placas y se calculó la selectividad (Instituto de Salud Pública, 2008). Cada bacteria competidora se sembró por separado en los medios de prueba.

8. Obtención de semillas de tomate

Protocolo proporcionado por comunicación oral de Leonel Marroquín, 2013

a. **Obtención de semillas.** Se consiguieron 100 tomates de cocina maduros y se les realizó un corte transversal en el tomate. Con una cuchara limpia se extrajo el mucílago junto con la semillas, el cual se colocó en un recipiente de vidrio y se agregó un volumen igual de agua destilada y se tapó el recipiente. Se dejó reposar por 24 horas o hasta observar el desprendimiento del mucílago de las semillas. Luego se colocó el mucílago con las semillas en un colador para lavar las semillas con agua del chorro. Las semillas lavadas se colocaron en un limpiador de cocina y se dejaron secar 24 horas, se descartaron las semillas blancas y se almacenaron en sobres de papel kraft.

9. Limpieza de semillas de tomate

Protocolo adaptado de Chaudhry *et al*, 2010

a. **Limpieza.** Se realizó una bolsita de “te” con gasa para guardar las semillas dentro y se lavó con 1mL cloro (5.25% hipoclorito de sodio) y 8mL de agua destilada en un beaker por 10 minutos agitando con un magneto, luego se lavó en un beaker tres veces con agua destilada estéril por 5 minutos cada vez estéril. Se roció las semillas con etanol 95% y se dejó reposar en éstas por 15-20 segundos. Se lavó nuevamente las semillas tres veces con agua destilada estéril. Este proceso se realizó dentro de la camapana de flujo laminar. Se secaron las semillas con servilletas estériles y se almacenaron en una caja Petri estéril a temperatura ambiente hasta su infección.

10. Infestación de semillas de tomate con *Cmm*

Protocolo adaptado de Hadas *et al*, 2005

a. **Infestación con *Cmm*.** Se tomó con un asa estéril una colonia de *Cmm* en una placa para sembrarla en BHIA, incubándola por 72 horas a 30°C. Se tomó con un asa estéril una colonia aislada de *Cmm* y se resuspendió en agua destilada estéril, ajustando la densidad óptica (OD) a 0.67 a 480nm, para obtener una cantidad de 10^8 células/mL con volumen final de 200mL. Se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a 10^5 células/mL con volumen final 200mL. Se infestó dos lotes de 2,000 semillas de tomate con 10^5 células/mL. Se colocaron las semillas en un beaker estéril y se cubrieron con la solución de *Cmm*, éstas se dejaron reposando 1-2 horas. Luego se dejaron secar en papel filtro en una campana de flujo laminar por 2 días. Las semillas se colocaron en sobres de papel kraft en una desecadora a temperatura ambiente hasta su utilización.

11. Infestación de semillas con bacterias competidoras

Protocolo adaptado de Hadas *et al*, 2005

a. Infestación con *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora*, *Xanthomonas campestris*. Se tomó con un asa estéril una colonia de bacteria competidora en una placa para resembrarla en BHIA, incubándola por 24 horas a 30°C. Se tomó con un asa estéril una colonia aislada de *Cmm* y se resuspendió en agua destilada estéril, ajustando la densidad óptica (OD) a 0.67 a 480nm, para obtener una cantidad de 10^8 células/mL con volumen final de 200mL. Se infestó un lote de 2,000 semillas de tomate con 10^8 células/mL. Se colocaron las semillas en un beaker estéril y se cubrieron con la solución de la bacteria, éstas se dejaron reposando 1-2 horas. Luego se dejaron secar en papel filtro en una campana de flujo laminar por 2 días. Las semillas se colocaron en sobres de papel kraft en una desecadora a temperatura ambiente hasta su utilización. Se realizó el mismo procedimiento para cada bacteria competidora.

12. Mezcla de semillas infectadas

Protocolo proporcionado por comunicación oral de Jiménez, 2013

a. Proporción diferente de semillas infestadas. Se tomó 200 semillas infestadas con *Cmm* 10^5 células/mL, 600 semillas infestadas con *E. carotovora*, 600 semillas con *P. fluorescens* y 600 semillas con *X. Campestris* con 10^8 células/mL, las cuales se mezclaron en un Erlenmeyer estéril para obtener una proporción del 10% para *Cmm* y del 30% para cada bacteria competidora, con una muestra de 2,000 semillas de tomate.

13. Preparación extracto de semillas

Protocolo adaptado de Hadas *et al*, 2005

a. Extracto semillas infestadas con *Cmm*. Al lote de 2,000 semillas infestado se le agregó 28mL de Buffer PBS 1X estéril (NaCl 13.7mM, 0.27mM KCl, 1mM Na_2HPO_4 , 0.2mM KH_2PO_4) suplementado con agar 0.1%. La mezcla se colocó en una bolsa plástica para toma de muestra de agua potable. Se suspendieron las semillas en dicha solución por 16 horas a 4°C. Se agitó por 2-3 horas a temperatura ambiente la suspensión. Se maceró la muestra en stomacher por 5 min a velocidad normal. Se sembró 100µL de extracto en los tres medios de prueba en triplicado. Se tomaron 10mL del extracto de las semillas colocándolo en un tubo cónico de 15mL, se centrifugó a 6000g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1mL de PBS 1X estéril. Se realizó 2 diluciones seriadas del extracto concentrado 1:10 utilizando buffer PBS 1X estéril volumen final 1mL. Se sembró 100µL del extracto concentrado y de las 2 diluciones seriadas en los tres medios de prueba en triplicado. Se realizó el mismo procedimiento para la mezcla de semillas, con la excepción de que no se diluyó el extracto concentrado, sino que solamente se sembró 100µL de extracto sin concentrar y concentrado en triplicado. Se observó si hubo crecimiento de *Cmm* en los medios. Las bacterias que se sospechaban que eran *Cmm* se confirmaron por pruebas bioquímicas.

14. Pruebas confirmatorias para *Cmm*

Protocolo tomado de EPPO, 2005/ Dye y Kemp, 1977/ Burokiené *et al*, 2005

a. **Tinción de Gram.** Se realizaron frotis de bacteria con un crecimiento de 72 horas en portaobjetos, los cuales se tiñeron según el método de Gram (Dye y Kemp, 1977). Se esperaba que la bacteria fuera Gram positiva (EPPO, 2005).

b. **Presencia de catalasa.** Se tomó con un asa estéril una muestra de bacteria con un crecimiento de 72 horas y se mezcló con una gota de peróxido de hidrógeno 3%. La formación de burbujas indica una reacción positiva (Burokiené *et al*, 2005; Dye y Kemp, 1977). Se espera una reacción positiva para *Cmm* (EPPO, 2005).

c. **Presencia de Oxidasa.** Se tomó con un asa estéril una muestra de bacteria, la cual se transfirió a un papel filtro impregnado con reactivo de Kovacs 1% (Burokiené *et al*, 2005). Se espera que *Cmm* sea oxidasa negativa (EPPO, 2005).

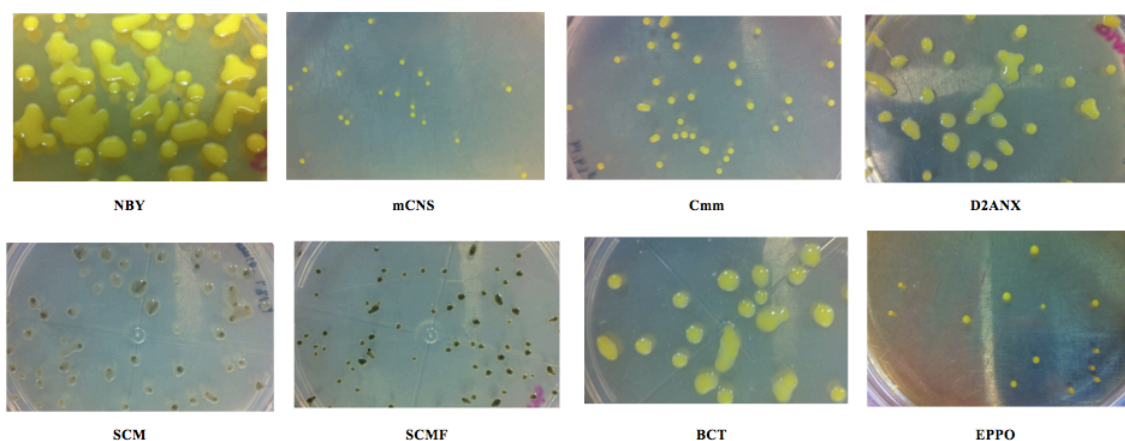
VI. RESULTADOS

Cuadro 4 porcentaje de productividad de los medios semiselectivos mCNS, Cmm, D2ANX, SCM, SCMF, BCT y EPPO* para la recuperación de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*

Medio	Porcentaje productividad (%)
mCNS	19
Cmm	46
D2ANX	46
SCM	80
SCMF	78
BCT	33
EPPO*	14

Se puede observar que los medios con mayor porcentaje de productividad fueron SCM (80%) y SCMF (78%). Los medios Cmm y D2ANX obtuvieron el mismo porcentaje de productividad (46%). Los medios con el menor porcentaje de productividad fueron BCT (33%), mCNS (19%) y EPPO* (14%). Según el criterio de productividad se deberían aceptar únicamente los medios con un porcentaje $\geq 70\%$, por lo tanto sólo se aceptaría a SCM y SCMF. Las siglas EPPO* significan que se utilizó la fórmula modificada que contenía sistema buffer de fosfatos y extracto de levadura.

Figura 13 morfología de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* en los medios semiselectivos mCNS, Cmm, D2ANX, SCM, SCMF, BCT y EPPO*



Se puede observar que en el medio de control NBY y en los medios semiselectivos mCNS, Cmm, D2ANX, BCT y EPPO*, el color de la colonia es amarillo brillante. Mientras que en los medios semiselectivos SCM y SCMF el color de la colonia es verde musgo claro y verde musgo oscuro. En los medios NBY, D2ANX, SCM, SCMF y BCT se observa que la colonia bacteriana es de mayor tamaño, lisas y con borde irregular o borde fluido, mientras que en los medios mCNS, Cmm y EPPO* se observa un borde regular y una colonia más pequeña. En todos los medios *Cmm* tiene un aspecto mantecoso.

Cuadro 5 selectividad de los medios mCNS, Cmm, D2ANX, SCM, SCMF, BCT y EPPO* para tres bacterias competidoras *E. carotovora*, *X. campestris* y *P. fluorescens*

Medio	Selectividad de medios (Sf)		
	<i>E. carotovora</i>	<i>X. campestris</i>	<i>P. fluorescens</i>
mCNS	3	3	3
Cmm	0	0	0
D2ANX	0	0	0
SCM	0	0	0
SCMF	3	3	0
BCT	3	3	3
EPPO*	0	0	3

Se puede observar que los medios con mayor selectividad para evitar el crecimiento de *E. carotovora* son BCT, SCMF y mCNS. Los medios con mayor selectividad para evitar el crecimiento de *X. campestris* son BCT, SCMF y mCNS. Los medios con mayor selectividad para evitar el crecimiento de *P. fluorescens* son BCT, EPPO* y mCNS. Según el criterio de selectividad se deberían aceptar los medios con valor mínimo de 2, por lo que los medios BCT, SCMF y mCNS serían los más selectivos. Las siglas EPPO* significan que se utilizó la fórmula modificada que contenía sistema buffer de fosfatos y extracto de levadura.

Cuadro 6 medios semiselectivos para *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* seleccionados según su productividad y selectividad

Medio seleccionado	Criterio de selección
SCM	Mayor porcentaje de productividad
SCMF	Alto porcentaje de productividad y alta selectividad
BCT	Mayor selectividad

El medio SCM posee el mayor porcentaje de productividad (80%), mientras que el medio SCMF posee un alto porcentaje de productividad (78%) y alta selectividad para dos de tres bacterias competidoras. El medio BCT posee la mayor selectividad para las tres bacterias competidoras y un porcentaje de productividad intermedio (33%).

Cuadro 7 Comparación del desempeño de los medios semiselectivos para *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* en las pruebas de productividad y selectividad

Mejor rendimiento Productividad	Mejor rendimiento Selectividad	Mejor desempeño ambas pruebas	Observaciones
SCM	BCT		Los tres medios seleccionados por su mejor desempeño en las pruebas fueron: SCMF por su alta productividad y selectividad; SCM por el mejor rendimiento en productividad y BCT por mejor rendimiento en selectividad.
SCMF	mCNS		
D2ANX	SCMF		
Cmm	EPPO	SCMF	
BCT	SCM		
mCNS	D2ANX		
EPPO*	Cmm		

Para la prueba de productividad se muestra en orden descendente los medios de cultivo según el desempeño que presentaron en la recuperación de *Cmm*, es decir de mayor a menor porcentaje de productividad. Para la prueba de selectividad se muestran los tres medios (BCT, mCNS, SCMF) con mayor selectividad, seguido de los medios con menor selectividad. Asimismo, se muestra el medio (SCMF) con el mejor desempeño en ambas pruebas.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm) es una bacteria de suma importancia debido a que infecta semillas y plantas de tomate, ocasionando así, grandes brotes de la enfermedad del Chancro del Tomate, el cual puede llegar a dañar plantaciones completas, provocando grandes pérdidas económicas. Es por ello que existen diferentes métodos para analizar las semillas de tomate que son adquiridas por los agricultores, siendo los más utilizados los métodos microbiológicos. Estos métodos utilizan medios de cultivo semiselectivos que permiten la recuperación de la bacteria a partir de muestras de semillas, lo cual brinda un método accesible para determinar si éstas estaban o no infectadas con *Cmm*.

En la actualidad existen diferentes medios de cultivo semiselectivos diseñados para este proceso, sin embargo no se encuentra establecido un protocolo unificado que proponga qué medio o medios permitan una buena recuperación y alta selectividad para *Cmm*. Es por ello que el propósito del trabajo realizado buscaba proponer un medio o la combinación de tres medios de cultivo que permitieran la recuperación de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* a partir de semillas de tomate infestadas.

La bacteria con la cual se trabajó (*Cmm*) fue proporcionada por la Licenciada Margarita Palmieri, encontrándose la cepa en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Antes de empezar a trabajar con dicha cepa de *Cmm* se realizaron diferentes pruebas confirmatorias para corroborar que fuera *Cmm*. En primer lugar, se realizó una tinción Gram de un cultivo de la bacteria de 72 horas de crecimiento en agar BHI (Brain Heart Infusion por sus siglas en inglés) y se obtuvo una morfología de bacilo (o bastón) pequeño con tinción Gram positivo (ver Figura 14 en anexos), lo que concuerda con la literatura reportada (Jones *et al*, 2001). Además, se observó la morfología de la bacteria y se corroboró que eran de color amarillo brillante, lisas, con borde fluido y aspecto mantecoso (Jones *et al*, 2001).

Se realizaron tres pruebas bioquímicas para determinar las características del metabolismo de *Cmm*. La primera prueba realizada fue la presencia de catalasa, en esta prueba se quería identificar si la bacteria poseía o no la enzima catalasa, la cual permite hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, es por ello que una prueba positiva produce burbujas (Fernández *et al*, 2010). Al realizar la prueba con un cultivo de *Cmm* de 72 horas se pudo observar la formación de burbujas, lo que indica un resultado positivo para la presencia de esta enzima. La segunda prueba realizada fue la presencia de oxidasa, en esta prueba se deseaba identificar si la bacteria poseía la citocromo oxidasa, la cual está involucrada en la oxidación del citocromo y la reducción del oxígeno molecular (Fernández *et al*, 2010). Esta prueba dio un resultado negativo. La última prueba bioquímica fue la hidrólisis del almidón de papa en la cual se determina si la bacteria posee la exoenzima amilasa (Alarcón, 2001). Para realizarla se sembró la bacteria

en agar YNA (Yeast extract-nutrient agar por sus siglas en inglés) y a los 7 días se agregó lugol al medio para observar en donde había almidón y en donde no, ya que como el yodo forma un complejo de color azul con el almidón permite determinar en qué parte no hay almidón (Alarcón, 2001). En la placa con *Cmm* se logró observar un halo más claro alrededor de las colonias de *Cmm* lo que indicó que sí hubo hidrólisis del almidón. Los resultados de estas pruebas concordaron con lo reportado por EPPO (2005) (ver Cuadro 8 en anexos)

Una vez confirmada que la bacteria era *Cmm*, se realizaron subcultivos de la cepa proporcionada. Originalmente se había decidido utilizar Agar Nutritivo como medio de propagación y conservación, pero se decidió utilizar caldo y agar BHI debido a que es un medio de cultivo que proporciona mayor cantidad de nutrientes y permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos (Acumedia, 2011; Himedia, 2011; Becton Dickinson GmbH, 2013). La fuente de nitrógeno, vitaminas y carbono es la infusión de cerebro-corazón y una mezcla de peptonas, mientras que la fuente de carbohidratos del medio es la dextrosa. Este medio posee un sistema buffer de fosfatos para mantener el pH estable (Acumedia, 2011; Himedia, 2011; Becton Dickinson GmbH, 2013). Además de poseer muchos nutrientes, se han realizado estudios en los cuales se demuestra que el medio BHI ha permitido conservar ceparios a temperatura ambiente por más de 12 años así como la reconstitución de las cepas almacenadas por ese lapso de tiempo (Weng *et al*, 2003). Esto indica que efectivamente es un medio que permite el crecimiento de cepas bacterianas bajo estrés o de lento crecimiento como *Cmm*.

Para poder determinar qué medio o medios permitían una buena recuperación de *Cmm*, se debían realizar dos pruebas, las cuales eran pruebas de productividad y selectividad, en las cuales se necesitaba sembrar una cantidad conocida de bacteria en los medios de prueba. Es por ello que se decidió elaborar una serie de diez estándares de McFarland, ya que éstos se basan en la turbidometría y permiten conocer de forma aproximada la cantidad de bacterias suspendidas en una solución (Hindler *et al*, 1992). Este proceso puede realizarse de dos formas, una en la cual se compara visualmente el estándar con la solución bacteriana y dependiendo del criterio de la persona se puede asumir la cantidad aproximada de bacterias suspendidas (Hindler *et al*, 1992). La otra forma de comparación es más certera, ya que se realiza una lectura de la absorbancia de los estándares a una longitud de onda de 625nm y se construye una curva de calibración con los datos teóricos de no. de bacteria/mL vs. la absorbancia (Hindler *et al*, 1992).

Para el propósito de este trabajo, se realizó una curva de calibración de los estándares de McFarland, para luego poder determinar la cantidad de bacterias en la solución bacteriana de trabajo y determinar con qué dilución se deseaba trabajar (ver Figura 15 en anexos), previo a realizar la siembra de las mismas en los medios de prueba. Cabe mencionar que se decidió utilizar este método por conveniencia debido a que *Cmm* es de lento crecimiento por lo que si se hubiera empleado el método convencional que es realizar diluciones

del cultivo inicial y sembrar en placa, se hubiera tenido que esperar aproximadamente 3-4 días para poder realizar el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), siendo éste un procedimiento lento en comparación con los estándares de McFarland.

Una vez obtenida la curva de calibración, se determinó la ecuación de la recta con ayuda de la hoja de cálculo Excel (ver Figura 15 en anexos). Con dicha ecuación se pudo determinar la cantidad de bacterias/mL en los cultivos realizados de las bacterias de interés. El proceso consistió en realizar una lectura de la absorbancia de la muestra (variable “y”), la cual se introdujo en la ecuación de la recta para obtener las bacterias/mL (variable “x”). Es importante mencionar que aunque este método puede ser más rápido y más confiable que el realizar la comparación visual del estándar con el cultivo de la bacteria, la absorbancia no corresponde con la luz que es absorbida por la solución, sino que la absorbancia que se mide corresponde a la luz que se dispersa debido a la presencia de las células bacterianas en la solución (Matlock *et al*, 2014). Por lo que esto podría afectar la lectura de la absorbancia, dando así, lecturas que varían de un espectro a otro (Matlock *et al*, 2014). Es por ello que se utilizó el mismo espectrofotómetro UV-Vis para realizar todas las mediciones de los cultivos para evitar que hubiera mucha variación en las lecturas. Otro punto importante que no debe descartarse al momento que se realizaron las mediciones de absorbancia del cultivo de las bacterias, es que éste se encontraba en la fase estacionaria de crecimiento y es probable que hubieran células que se encontraban muertas al momento de realizar mediciones de la suspensión de bacterias, lo cual podía aumentar la absorbancia de la muestra. Este era un factor que no se podía controlar, ya que el espectrofotómetro UV-Vis no puede discernir entre células vivas o muertas, por lo que se asumió que la lectura obtenida correspondía en su mayoría a la dispersión del haz de luz por una mayor cantidad de células vivas que muertas, ya que el cultivo con el que se trabaja antes de realizar la siembra en los medios semiselectivos tenía de 16-18 horas de crecimiento, siendo bastante fresco.

Previo a la realización de las pruebas se debían elaborar los medios semiselectivos. Es importante mencionar que en la actualidad existe una variedad de medios semiselectivos para el crecimiento de *Cmm* los cuales son utilizados para determinar si semillas de tomate se encuentran infectadas o no con dicha bacteria. En este estudio se decidió utilizar siete medios semiselectivos para *Cmm*, los cuales fueron mCNS, Cmm, D2ANX, SCM, SCMF, BCT y EPPO (ver Figura 20 en anexos para significado de abreviaturas). Hay que destacar que el medio BCT ha sido propuesto recientemente por Ftayeh *et al*. (2011) como un medio selectivo, de alta eficiencia y selectividad, ya que en el estudio realizado demuestra que logró inhibir el crecimiento de bacterias saprófitas que se encuentran en el tomate y permitió la recuperación y diferenciación de *Cmm* de muestras infestadas con mayor cantidad de bacterias saprófitas y en menor proporción *Cmm* (Ftayeh *et al*, 2011); por lo que se esperaba que este medio posea un alto porcentaje de recuperación y alta selectividad.

Para la realización de los medios semiselectivos se necesitó de una serie de reactivos, ya que estos medios se elaboraron a partir de sus componentes en el laboratorio, debido a que estos medios no se venden ya formulados. Estos medios están conformados por diferentes componentes que proveen nutrientes a la bacteria de interés, así como antibióticos que permiten que sean selectivos e inhiban el crecimiento de microorganismos no deseados como hongos u otras bacterias que pueden encontrarse en la muestra de interés. Uno de los principales componentes de los medios eran las peptonas las cuales son proteínas hidrolizadas que son utilizadas como fuente de nitrógeno por la bacteria para sintetizar aminoácidos, purinas, pirimidinas y lípidos (Atlas, 2010; Mehrotra, 2009), el medio mCNS utilizaba peptona de carne, mientras que los medios Cmm y D2ANX utilizaban caseína como una fuente de nitrógeno o aminoácidos (Atlas, 2010). El medio EPPO utilizaba proteosa peptona que es una peptona preparada a partir de una mezcla de peptonas con un alto contenido de nitrógeno y NaCl, así como triptona que es caseína hidrolizada con un alto contenido de nitrógeno (Atlas, 2010). Es importante mencionar que al principio se utilizaba proteosa peptona para la elaboración del medio EPPO, sin embargo debido a que era un reactivo limitante éste se terminó y ya no se contaba con dicho recurso, por lo que se procedió a utilizar peptona de carne para su preparación, por lo que es probable que el contenido de nitrógeno disponible en el medio disminuyera y esto afectara en parte el crecimiento de *Cmm*.

Otro componente principal de todos los medios era el extracto de levadura el cual es una fuente de aminoácidos, nitrógeno y vitaminas para *Cmm* (Atlas, 2010; Mehrotra, 2009). Estos medios también poseían un sistema buffer que permitía mantener un pH estable para el crecimiento de la bacteria de interés (Atlas, 2010). La fuente de carbohidratos y energía era una variedad de azúcares: sucrosa (Cmm, SCM, SCMF), glucosa (D2ANX), manitol (BCT) y manosa (EPPO) (Acumedia, 2011). Es importante mencionar que el medio mCNS no contaba con un azúcar en su formulación. El sulfato de magnesio que se encontraba presente en todos los medios con excepción de EPPO, era la fuente de azufre del medio, el cual ayuda a la síntesis de aminoácidos (como cisteína), carbohidratos y vitaminas del complejo B. Además, este componente es fuente de magnesio para la bacteria para actuar como cofactor de enzimas y ayudar en la estabilización de la membrana celular y los ribosomas (Mehrotra, 2009). Es posible que *Cmm* no pudiera reducir el sulfato y debido a esto, es que los medios tenían en su fórmula peptona y/o extracto de levadura para brindarle a la bacteria el aminoácido cisteína para que la bacteria pudiera crecer (Mehrotra, 2009).

El medio BCT poseía sulfato de hierro el cual proporciona el hierro ya que éste actúa como cofactor de enzimas, transportador de electrones para proteínas y es componente de citocromos (Mehrotra, 2009). Este medio también poseía sulfato de manganeso el cual proporciona manganeso que es importante en el proceso de catálisis enzimática en el transporte de grupos fosfato (Mehrotra, 2009). Asimismo, este medio contenía cloruro de sodio como fuente de micronutrientes, es decir fuente de sodio (Mehrotra, 2009). Los medios mCNS y Cmm poseían cloruro de litio el cual inhibe el crecimiento de bacilos Gram negativo

(Vandevenne y Escolá, 2002). Otro componente era cloruro de amonio el cual se utilizó como fuente de nitrógeno en los medios Cmm y D2ANX (Liboa *et al*, 2014).

Además de los medios semiselectivos, también se preparó el medio de comparación que era NBY, este medio tenía en su composición extracto de levadura, sistema buffer, sulfato de magnesio y glucosa, los cuales brindaban los nutrientes antes descritos. También se debía agregar caldo nutritivo el cual tenía nutrientes como peptona que brindaban nitrógeno (Atlas, 2010). Todos los medios que se prepararon contenían agar el cual permite la solidificación del medio al enfriarse a 38°C (Atlas, 2010). Esto les confiere una consistencia sólida a los medios y permite que se realicen siembras en la superficie de éste.

A los medios semiselectivos también se les debía agregar una serie de antibióticos los cuales tienen diferentes propiedades que permiten que en los medios crezca únicamente el microorganismo de interés, en este caso *Cmm*. Entre los diferentes antibióticos se encontraba la cicloheximida que tiene como fin inhibir el crecimiento de hongos saprofitos como levaduras y mohos (BD Diagnostic Systems, 2003). El antibiótico polimixin B sulfato es un componente con características catiónicas, el cual se une a los componentes aniónicos de la membrana externa de las bacterias, este mecanismo daña la membrana de la bacteria, ocasionando un efecto similar a los detergentes (Landman *et al*, 2008). El ácido nalidixico es un antibiótico que inhibe de forma indirecta la síntesis de proteínas ya que se une al ADN de la bacteria, evitando que las enzimas encargadas del proceso de replicación y transcripción no puedan unirse al ADN (Sugino *et al*, 1977). El ácido nicotínico conocido también como vitamina B₃ puede cumplir dos funciones en los medios de cultivo, en bajas concentraciones puede utilizarse como vitamina para el crecimiento de la bacteria ya que es un componente de una coenzima involucrada en el proceso de respiración (Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, 1999) o en altas concentraciones como inhibidor de crecimiento (Koser y Kasai, 1947), en los medios semiselectivos este compuesto cumple como un inhibidor del crecimiento. Otro antibiótico utilizado fue la nistatina la cual se une a los esteroides que conforman la pared celular de los hongos, ocasionándoles poros y aumentando la permeabilidad de ésta, lo que lleva a la inhibición del crecimiento de las hifas del hongo, así como la muerte (Ghannoum y Rice, 1999). El antibiótico trimethoprim posee actividad antimicrobiana, su modo de acción involucra el bloqueo de la producción de la forma activa del ácido fólico conocido como tetrahidrofolato debido a que actúa como un inhibidor competitivo de la enzima dihidrofolato reductasa (Gleckman *et al*, 1981). El último componente que actuaba como inhibidor del crecimiento era la solución de Chapman que está conformada por telurito de potasio. Esta solución tenía como fin inhibir el crecimiento de microorganismos Gram negativo pero en su mayoría inhibe microorganismos Gram positivo (Atlas, 2010; Fleming y Young, 1940). Es importante mencionar que sólo dos medios semiselectivos contaban con dicho componente, SCM y SCMF, lo que conlleva que la bacteria posea diferente coloración en el medio. Esto se debe a que la bacteria posee la enzima telurito-reductasa que cataliza la reducción del telurito de potasio a telurito metálico, es por ello que

la coloración de *Cmm* en dichos medios es verde musgo claro a oscuro, con el centro más oscuro debido a que se forma un precipitado negro en la colonia bacteriana (Gini, 2007).

Estos componentes de los medios semiselectivos con acción inhibitoria de crecimiento se debían agregar después de autoclaveado el medio de cultivo, ya que al ser termolábiles, se podían dañar sus propiedades o destruir las moléculas si se calentaban a alta presión y temperatura, es por ello que las soluciones se esterilizaron por medio de filtrado y se agregaron al medio de cultivo una vez que éste alcanzaba la temperatura de 45°-50°C. También se debe mencionar que las soluciones de antibióticos se preparaban cada mes para evitar que las moléculas sufrieran descomposición en la solución y que se mantuviera su actividad.

Al momento de preparar los medios de cultivo semiselectivos se debía tomar ciertos cuidados. Ya que estos contaban con una variedad de sales, se decidió realizar soluciones de trabajo para evitar que al momento de realizar los medios se tuviera que pesar cada componente y que hubiera mucha variación entre los pesos, lo cual podría llevar a una variación en la concentración deseada. Como diluyente de los medios se utilizó agua destilada, a la cual se agrega en primer lugar las soluciones de trabajo antes mencionadas. Seguido se debía agregar los nutrientes (como peptona, extracto de levadura, carbohidratos) a la preparación. Una vez se contaba con todos los componentes se debía calentar la solución para poder agregar el agar, ya que si se añadía en la solución fría, éste tendía a formar agregados los cuales podían sufrir junto con los componentes que no estuvieran disueltos, la reacción tipo Maillard que es el oscurecimiento no enzimático del medio al momento de autoclaverse (CABRI, 1998). Una vez disuelto el agar, se verificaba el pH y se procedía a autoclavar los medios para esterilizarlos. Seguido a ello se agregaban las soluciones de antibiótico y telurito de potasio.

Una vez vertido los medios en placas Petri estériles, éstos se almacenaban a 4°C por una semana y como tiempo máximo dos semanas, antes de ser utilizados. Esto se debe a que el tiempo de vida de un medio de cultivo con antibióticos es menor ya que posee compuestos que pueden dañarse por ser lábiles. Además, no se recomienda almacenarlos por más de 4 semanas ya que la refrigeración tiende a deshidratarlos, así como evitar la exposición a la luz solar y el calor, ya que esto puede provocar la oxidación o el daño de los antibióticos, provocando un mal desempeño bacteriano y hasta contaminación del medio (CABRI, 1998).

En los medios de cultivo semiselectivos se esperaba que *Cmm* tuviera una coloración amarilla, de apariencia mantecosa, borde liso y fluido. Sin embargo, en los medios SCM y SCMF se espera que tengan una coloración verde musgo con el centro de la colonia más oscuro (debido al telurito de potasio).

Una vez preparados los medios semiselectivos, se realizó una prueba de crecimiento para determinar que estuvieran bien elaborados. Para ello se realizó un cultivo de *Cmm* y de las tres bacterias competidoras, para luego sembrarlas en los medios de prueba. *Cmm* se sembró junto con las tres bacterias competidoras, todas

a una concentración aproximada de 10^8 células bacterianas/mL. A los 6 días de sembradas se observaron los medios y se notó que la mezcla había crecido en NBY, D2ANX, SCM y SCMF. Estas bacterias presentaron una coloración blanca en NBY y D2ANX, mientras que fueron de color verde en SCM y SCMF. Debido a estos resultados, se pensó que las bacterias estaban siendo inhibidas por los antibióticos en los medios que no crecieron, o que el cultivo utilizado no era lo suficientemente viable, debido a que tenía 5 días en caldo BHI, por lo que era posible que hubiera una mayor cantidad de células muertas.

Ya que se había realizado una prueba de crecimiento en los medios de prueba, se decidió empezar con la prueba de productividad. Para ello se debía sembrar *Cmm* en triplicado en los siete medios de prueba y en el medio de comparación, buscando obtener un aproximado de 100-200 colonias en cada medio para poder realizar el cálculo de productividad propuesto por Ftayeh *et al* (2011) la cual se puede observar en el Cuadro 3. Se buscaba obtener un porcentaje de 70% o mayor para poder aceptar a un medio como altamente productivo, eso quiere decir que se podía recuperar la mayor cantidad de bacterias sembradas.

Se realizó la primera prueba, para ello se sembró *Cmm* en triplicado a una concentración de 10^2 células bacterianas/mL porque se quería obtener aproximadamente 100 unidades formadoras de colonias en el medio. A los 6 días se observaron las placas y se determinó que únicamente había crecimiento en NBY con colonias amarillas y mucosas, y en SCM y SCMF con colonias verdes musgo pequeñas. En dicha siembra se obtuvieron menos de 50 UFC en los tres medios, por lo que no era la cantidad deseada para realizar el cálculo. Estas placas se observaron a los 10 días y no hubo crecimiento en los otros medios, únicamente en los mencionados anteriormente.

Ya que no se obtuvo la cantidad de UFC necesarias para la prueba y no creció *Cmm* en todos los medios, se procedió a realizar una prueba para identificar la solución que permitiría obtener la cantidad de UFC deseadas. Para ello se sembró en el medio de comparación NBY tres diluciones diferentes 10^8 , 10^7 y 10^6 bacterias/mL en duplicado. Al observar las placas a los tres días de sembradas, se obtuvo un crecimiento confluyente, lo cual no permitió obtener la cantidad de colonias bacterianas deseadas. Es por ello que se repitió el procedimiento, pero esta vez se sembraron en duplicado en medio NBY las diluciones 10^5 , 10^4 y 10^3 bacterias/mL. Se observaron las placas a los 6 días de sembradas y en la dilución 10^5 el crecimiento fue confluyente, mientras que en la dilución 10^4 se obtuvo un promedio de 92 UFC y en la dilución 10^3 se obtuvo un promedio de 8 UFC. Según estos resultados la dilución que permite recuperar una cantidad de colonias aceptable para el cálculo de productividad era 10^4 , sin embargo hay que mencionar que el cultivo utilizado para la siembra tenía 6 días por lo tanto es posible que hubiera una mayor cantidad de células muertas y por ello se obtuvo una menor cantidad de colonias en la dilución 10^4 .

Debido a que se pausó el trabajo aproximadamente un mes, se volvió a regenerar el cultivo de *Cmm* sembrándola en primer lugar en caldo BHI. Esta siembra se dejó incubando con agitación para promover un

crecimiento más rápido de la bacteria. esto se puede lograr con la agitación ya que hay una mayor aireación de las células, esto quiere decir que hay mayor disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio para que sea utilizado por las bacterias (Bates *et al*, 2011; Chauhan, 2006). Otro factor importante de crecer el cultivo con agitación es que se facilita el intercambio de nutrientes (Bates *et al*, 2011; Chauhan, 2006). Este primer cultivo de *Cmm* no logró crecer en un lapso de tres días, por lo tanto se siguió incubando. A los 6 días de inoculado el caldo, se logró observar un crecimiento confluyente de *Cmm*. Este cultivo se sembró en agar BHI y se dejó incubando a 30°C para poder obtener colonias aisladas. Es importante mencionar que en el laboratorio no se contaba con una incubadora que pudiera llegar a 28°C que es la temperatura recomendada y que cumpliera con la capacidad de almacenamiento deseada. Es por ello que se decidió incubar a 30°C, ya que según la literatura se puede incubar a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y además es un microorganismo mesófilo (Whitman *et al*, 2012). Se debe destacar que todos los cultivos realizados de *Cmm* se incubaron a 30°C, por lo cual la bacteria se aclimató a dicha temperatura y pudo crecer normalmente.

Debido a que en las pruebas anteriores para determinar la productividad, no se logró crecimiento en todos los medios, por lo que se procedió a analizar la fórmula de los mismos. Se encontró que al medio D2ANX no se le había agregado un componente que era esencial para el sistema buffer del medio, el cual era ácido bórico. Asimismo, se determinó que la fórmula proporcionada por EPPO (2005) para el medio del mismo nombre, no contaba con un sistema buffer ni extracto de levadura, por lo que se creyó que esto pudo afectar el crecimiento de la bacteria, además de que se había realizado aproximadamente 40 cajas de cada medio y se almacenaron por más de un mes, lo cual pudo deshidratarlos.

Debido a estos inconvenientes se decidió realizar nuevamente la preparación de los medios pero en tres variantes diferentes. La primera variante era realizar los siete medios de prueba sin antibióticos para comprobar que fueran lo suficientemente nutritivos para *Cmm*. La segunda variante era realizar los medios con antibióticos (se utilizará esta abreviatura para referirse a los antibióticos: abx) en la concentración propuesta por la literatura, tomando en cuenta que a D2ANX se le agregó ácido bórico para el sistema buffer. La tercera variante consistió en agregar la mitad de la concentración de antibióticos a los medios. Es importante mencionar que el medio EPPO se preparó con tres variaciones: la receta original sin sistema buffer ni extracto de levadura, la receta original más un sistema buffer y la receta original más un sistema buffer y extracto de levadura. Para determinar que sistema buffer podía ser el más apropiado, se analizaron las fórmulas de los demás medios semiselectivos y se observó que la mayoría utilizaba un sistema buffer de fosfatos (K_2HPO_4 y KH_2PO_4), por lo tanto se decidió utilizarlo. Además, se observó que la mayoría de medios contenía una cantidad de 200mg de extracto de levadura, por lo que se decidió utilizar dicha cantidad. Estas tres variantes del medio EPPO se prepararon sin antibiótico, con antibiótico y con la mitad de la concentración de antibiótico. Las tres variantes de cada medio se prepararon a partir de una solución madre del medio, para que fueran comparables los resultados. Se utilizó un cultivo fresco de *Cmm* (20 horas de incubación con agitación) con crecimiento confluyente. Ya que no se contaba en ese momento con

un espectrofotómetro, no se determinó la cantidad de células bacterianas/mL, sin embargo se decidió sembrar sin dilución y una dilución 1:100 del cultivo diluido en buffer PBS 1X, debido a que sólo se necesitaba comprobar el crecimiento de la bacteria en todos los medios.

Se observaron las placas a los dos días de sembradas y se pudo notar que todas las placas con excepción de EPPO en sus tres variantes con Abx, presentaban un crecimiento confluyente. Se observaron nuevamente al 4to. día de sembradas y se pudo notar que la mayoría de las placas presentaron crecimiento de *Cmm*, tanto en el cultivo puro como en la dilución (ver Cuadro 9 en anexos). El único medio que no presentó crecimiento fue EPPO con Abx y sin sistema buffer ni extracto de levadura, en el cual se sembró la dilución de *Cmm*. Es importante mencionar que en los medios sin antibiótico todas las colonias bacterianas presentaron un color amarillo intenso con apariencia viscosa. Mientras que al agregar antibiótico, en los medios NBY, mCNS, *Cmm*, D2ANX, BCT y EPPO, se mantuvo la coloración amarilla sólo que en variedad de tonos claros a intensos. En el medio SCM se observó una coloración grisácea clara y en el medio SCMF una coloración verde musgo. Todas las colonias poseían apariencia viscosa.

Con esta prueba se pudo identificar que el medio EPPO abx sin buffer ni extracto de levadura, no permitía un buen crecimiento de la bacteria en comparación con EPPO abx con buffer y extracto de levadura (ver Cuadro 9 en anexos). También se observó que la formulación de EPPO abx con buffer permitió el crecimiento de la bacteria, pero menor cantidad (aproximadamente 100 UFC) que EPPO abx buffer y extracto de levadura. Es por ello que se decidió utilizar la fórmula de EPPO mejorada con un sistema buffer y extracto de levadura, ya que permitiría mayor y mejor crecimiento de *Cmm* (esta fórmula se identificó como EPPO*).

Una vez que se corroboró que la bacteria *Cmm* podía crecer en los medios semiselectivos, se elaboraron nuevamente los medios, ya que éstos debían prepararse pocos días antes de sembrar para evitar deshidratación y daño en sus componentes que les confieren la característica de selectivos.

Se realizó nuevamente una siembra de *Cmm* en los medios de prueba en triplicado en dos diluciones diferentes 10^4 y 10^2 bacterias/mL para la prueba de productividad. Se eligió la primera dilución mencionada debido a que en una prueba anterior de siembra de *Cmm* en medio NBY, se había obtenido un promedio de 92 UFC, por lo que se creyó prudente volver a sembrarla, ya que era posible que se volviera a obtener esta cantidad. Además, se eligió la segunda dilución debido a que según la teoría era posible obtener un aproximado de 100 UFC en los medios semiselectivos de prueba. Al observar las placas de la dilución 10^4 al tercer día de siembra, se notó crecimiento en todos los medios de prueba con excepción de EPPO*. Al 6to. día de siembra se procedió a contar las colonias de la dilución 10^4 en los medios y se obtuvo un rango de 200-400 UFC, las cuales eran de tamaño pequeño. En la dilución 10^2 , no hubo crecimiento en los medios de prueba al 4to. día, únicamente en el medio NBY, obteniendo un promedio de 3 UFC. Al 6to. día de

siembra se contaron las colonias de la dilución 10^2 y se obtuvo un rango de 1-9 UFC, las cuales eran de mayor tamaño, sin embargo en el medio EPPO* el crecimiento comenzó hasta el 8avo. día. Ya que no se logró obtener la cantidad de UFC deseadas para realizar el cálculo de productividad, se repitió el procedimiento de siembra, sólo que esta vez se sembró la dilución 10^3 bacterias/mL. Se realizó el conteo de las placas al 4to. día y se obtuvo aproximadamente 150-200 UFC, además, las colonias variaban mucho de una placa a otra, por lo que se descartó dicha siembra.

Se realizó nuevamente el procedimiento de siembra, solo que esta vez el cultivo utilizado se dejó incubando sin agitación por 18 horas. Al momento de determinar el no. células bacterianas, se notó que habían llegado a un crecimiento de 10^5 células bacterianas/mL, por lo que el cultivo se encontraba en la fase de crecimiento y no había llegado a la fase estacionaria. Se procedió a sembrar la dilución 10^3 bacterias/mL en los medios de prueba. Al realizar el conteo al 4to. día de siembra se observó un crecimiento confluyente en todos los medios. Se cree que esto pudo deberse a que *Cmm* se encontraba todavía en fase de crecimiento y había una mayor cantidad de células bacterianas vivas, y por ello tuvieron una mayor capacidad de crecimiento, en comparación con los cultivos con los que se trabajó en las primeras pruebas, los cuales llegaron a fase estacionaria (10^8 - 10^9 bacterias/mL) y poseían células bacterianas que estaban empezando a morir, disminuyendo la población de bacterias capaces de seguir reproduciéndose.

Por lo que se pensó que si se realizaba la siembra con un cultivo en fase de crecimiento se lograría obtener un crecimiento confluyente en la placa, mientras que si se realizaba la siembra con un cultivo en fase estacionaria se obtendría una menor cantidad de colonias, las cuales podrían contarse. Para ello se realizó una prueba en la cual se incubó *Cmm* en la incubadora y con agitación, por un lapso de 20 horas. Ya que se esperaba que en la incubadora se tendría un menor crecimiento en comparación con el cultivo colocado en el agitador, debido a la falta de aireación. Este procedimiento se realizó con el propósito de comprender el crecimiento de *Cmm* con dos crecimientos diferentes del cultivo inicial.

Al momento de determinar el no. células bacterianas, se notó que había llegado a un crecimiento de 10^8 células bacterianas/mL en el cultivo que creció en la incubadora y 10^9 células bacterianas/mL en el cultivo que creció con agitación. Se cree que como el cultivo de *Cmm* se regeneró varias veces, la bacteria logró aumentar su metabolismo, por lo tanto podía crecer más rápido, ya sea con o sin agitación. Se realizó la siembra de las bacterias a diferentes diluciones 10^4 , 10^3 y 10^2 células bacterianas/mL. El conteo de las placas determinó que la dilución 10^3 era la indicada para realizar la prueba, ya que en 10^4 eran muy numerosas para contar y en 10^2 se obtuvieron menos de 10 UFC. Ambos cultivos, tuvieron el mismo patrón, esto se debió a que los dos llegaron a una alta cantidad de células.

Se debe mencionar que existe una discrepancia entre la cantidad recuperada de colonias bacterianas en el medio respecto a la dilución que se está sembrando, es decir que en teoría se siembran muchas células, pero se obtienen muy pocas. Uno de los factores que podría influir en dicha discrepancia es que *Cmm* produce los pigmentos carotenoides (ver Figura 16 en anexos), los cuales le confieren una coloración amarilla (Whitman *et al*, 2012; Goto, 1992). Esta coloración puede variar por la edad del cultivo, la exposición a la luz, el medio en el cual creció la bacteria y el período de incubación del cultivo (Whitman *et al*, 2012). Además, la cantidad y calidad del pigmento va a depender de la disposición de la vitamina tiamina en el medio, si *Cmm* tiene un alto contenido de esta vitamina podrá tener una coloración amarilla intenso (Whitman *et al*, 2012; Goto, 1992). También se conoce que los carotenoides son fotoprotectores debido a su capacidad para captar la luz, se han realizado estudios en donde estos componentes pueden absorber la luz a diferentes longitudes de onda (Andersson *et al*, 1991; Gitelson *et al*, 2000; Zang *et al*, 1997). Por lo que es probable que al momento de medir la absorbancia de las bacterias en solución, sus pigmentos interfirieran y aumentaran la absorbancia, dando un resultado erróneo sobre la cantidad de bacterias disponibles.

Una vez que se corroboró que la dilución 10^3 de *Cmm* era la indicada para la prueba de productividad, se procedió a sembrar dicha dilución en los siete medios de prueba y en el medio de comparación NBY. Las placas se observaron al 3er., 4to., 6to. y 8avo. día de haber sido sembradas. Se logró observar que al 3er día únicamente había crecimiento en NBY, mientras que al día siguiente (4to. día) *Cmm* creció en la mayoría de los medios con excepción de mCNS y EPPO*. Es importante mencionar que la literatura indica que *Cmm* llega a crecer en un lapso de 4-11 días (Hadas *et al*, 2005) en los medios de prueba, por lo tanto se corroboró que el crecimiento de *Cmm* era satisfactorio. Se debe mencionar que en el medio mCNS la bacteria creció hasta el 6to. día, mientras que en EPPO* hasta el 8avo día, siendo las colonias muy pequeñas en comparación con los otros medios de cultivo. Este se puede deber a la fuente de carbono, ya que el microorganismo va a crecer a diferente velocidad dependiendo de su capacidad para metabolizar la fuente de carbono (Mehrotra, 2009). Por lo que es probable en el medio EPPO* le fuera más difícil metabolizar el carbohidrato presente y en el medio mCNS al no haber una fuente de carbono directa, la bacteria tenía que utilizar otras rutas metabólicas para poder crecer.

Como se puede observar en la Figura 13 (sección de resultados) *Cmm* presentó en la mayoría de medios una coloración amarillo intenso. En los medios mCNS, Cmm y EPPO* las colonias fueron de menor tamaño, circulares, borde liso, convexas, aspecto mantecoso y de color amarillo brillante; estos tres medios no permitieron que las colonias crecieran por lo que es probable que los antibióticos inhibieran en parte su crecimiento. En los medios NBY, D2ANX y BCT las colonias fueron de mayor tamaño debido a que al inicio las colonias eran pequeñas pero conforme el cultivo envejecía las colonias seguían aumentando su tamaño, lo que provocaba que éstas se unieran con las colonias circundantes, dando lugar a colonias de mayor tamaño, con borde liso e irregular, convexas, aspecto mantecoso y de color amarillo brillante; cabe

mencionar que en NBY las colonias podían presentar un mayor tamaño, debido a la ausencia de antibióticos que limitaran su crecimiento. En los medios SCM y SCMF se obtuvieron colonias de mayor tamaño, debido a que ocurría el mismo patrón de crecimiento que en los medios NBY, D2ANX y BCT. Estas colonias presentaron un borde liso e irregular, convexas, aspecto mantecoso, de color verde musgo claro a oscuro, siendo el centro de la colonia más oscuro y los bordes más claros, esta coloración se debió al telurito de potasio en el medio.

Con el conteo de UFC de cada medio semiselectivo, se obtuvo el porcentaje de productividad. Como se observa en el Cuadro 4 (sección de resultados), el medio SCMF obtuvo el porcentaje más alto de productividad (80%), lo que indica que se puede recuperar la mayoría de las bacterias que se sembraron. El medio SCM posee el segundo porcentaje más alto (78%), el cual es muy cercano a SCMF, el hecho de que estos dos medios posean los porcentajes más altos se podría deber a la similitud en su fórmula, ya que los nutrientes básicos son los mismos y lo único que cambia son los antibióticos y su concentración.

Los medios Cmm y D2ANX obtuvieron el mismo porcentaje de productividad (46%) lo que indica una similitud en el crecimiento de *Cmm* en ambos medios. El cuarto lugar de productividad fue para el medio BCT (33%). Los medios con el menor porcentaje de productividad fueron mCNS (19%) y EPPO* (14%), lo que coincide con el lento crecimiento de la bacteria. Según el criterio de evaluación de productividad establecido, se deberían aceptar únicamente los medios con porcentaje $\geq 70\%$, por lo tanto los medios SCM y SCMF son los únicos que cumplen con dicho criterio.

Para realizar la segunda prueba a los medios semiselectivos, se necesitó tres bacterias fitopatógenas, las cuales fueron *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* y *Xanthomonas campestris*. Estas cepas bacterianas también fueron proporcionadas por la Licenciada Margarita Palmieri, las cuales se encontraban en el Laboratorio de Protección Vegetal. Una vez que se contó con las bacterias, se procedió a realizar un subcultivo en caldo BHI y posteriormente en agar BHI, para mantener activo el cultivo de cada una. Es importante mencionar que las tres bacterias presentan un crecimiento rápido, logrando un cultivo confluyente en 24 horas.

La segunda prueba era la de selectividad de los medios, esto quiere decir que se determinaría que tanto inhiben el crecimiento de bacterias que no son de interés. Para la prueba se decidió utilizar las bacterias antes mencionadas por su fitopatogenicidad, ya que las muestras que se analizan para determinar la presencia de *Cmm* pueden estar infectadas con otras bacterias que no son de interés y por ello se quería comprobar que tan selectivos pueden ser los siete medios para inhibir el crecimiento de otras bacterias fitopatógenas.

Se realizó una primera prueba de crecimiento de las bacterias competidoras en los medios de prueba a bajas concentraciones con el objetivo de comprobar que los medios pueden inhibir el crecimiento de bajas concentraciones de bacterias. Para ello se utilizó la dilución 10^3 , 10^2 y 10^1 células bacterianas/mL de cada cepa, éstas se sembraron por separado en los siete medios, en duplicado. Las placas se observaron a las 24 horas de siembra y en el medio NBY para las tres bacterias y diluciones se obtuvo un crecimiento confluyente. A los tres días se observó que en el medio D2ANX había logrado crecer *X.campestris* en la dilución 10^3 , con un promedio de 18 UFC, logrando inhibición. Se realizó una observación a los 7 días de siembra y no hubo crecimiento en ninguno de los medios para las tres bacterias, por lo que los medios lograron inhibir las bacterias a una baja concentración.

Para realizar la prueba de selectividad se debía sembrar en los medios las bacterias competidoras a altas concentraciones, para luego realizar el cálculo propuesto por Instituto de Salud Pública (2008), en el cual se deseaba obtener un resultado de al menos 2 para poder aceptar al medio como selectivo. Por lo que se decidió sembrar las diluciones 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5 células bacterianas/mL de cada una de las tres bacterias.

La primera bacteria en sembrarse fue *E.carotovora* en las diluciones antes mencionadas. Se observaron los medios a las 24 horas y únicamente había crecido de manera confluyente en NBY. A los 3 días de siembra presentó crecimiento confluyente D2ANX en las primeras tres diluciones y en la dilución 10^5 un promedio de 270 UFC. Asimismo, los medios SCM y EPPO* presentaron un crecimiento confluyente en las 4 diluciones, sin embargo EPPO* no presentó crecimiento en la dilución 10^5 , logrando inhibir el crecimiento de la bacteria a una concentración no tan alta. En los otros medios no se logró observar crecimiento.

A los 6 días de siembra se observaron nuevamente las placas. Se determinó que en los medios D2ANX y SCM presentaron un crecimiento confluyente. En D2ANX las colonias eran pequeñas de color blanco, mientras que en SCM eran de color gris claro y el tamaño de la colonia era similar a la punta de un alfiler. El medio EPPO* logró inhibir la bacteria en la dilución 10^5 ya que no hubo crecimiento, sin embargo en las otras diluciones el crecimiento fue confluyente, observándose colonias pequeñas de color blanco. El medio Cmm logró inhibir a *E. carotovora* en las dos diluciones más bajas, sin embargo en las dos diluciones más altas permitió el crecimiento, obteniéndose un promedio de 40 UFC para la dilución 10^8 con una coloración blanca mate, colonias circulares con borde liso. En los medios mCNS, SCMF y BCT no hubo crecimiento de la bacteria, logrando la inhibición en su totalidad. Con estos datos se procedió a calcular la selectividad de los medios para dicha bacteria. Como se observa en el Cuadro 5 (sección de resultados), los medios Cmm, D2ANX, SCM y EPPO* poseen una selectividad de 0, mientras que los medios mCNS, SCMF y BCT poseen una selectividad de 3, lo cual cumple con el criterio de aceptación.

La segunda bacteria en sembrarse fue *Xanthomonas campestris* en las diluciones antes mencionadas. Se observaron los medios a las 24 horas y únicamente había crecido de manera confluyente en NBY. Al 4to. día de siembra la bacteria había crecido de manera confluyente en SCM y EPPO* en las cuatro diluciones. Mientras que en D2ANX se obtuvo un crecimiento confluyente en las dos diluciones más altas y en las diluciones más bajas menos de 100 UFC. En el medio Cmm se obtuvo un crecimiento de 7 UFC en la dilución más alta y de 1 UFC en la dilución 10^6 , sin embargo en la dilución más baja y en 10^7 no hubo crecimiento. En los medios mCNS, SCMF y BCT no hubo crecimiento.

A los 6 días de siembra se observaron nuevamente las placas. Se determinó que en los medios D2ANX, SCM y EPPO* presentaron un crecimiento confluyente. En D2ANX y EPPO* las bacterias eran de tamaño pequeño a mediano, de color blanco. Mientras que en SCM eran de color gris claro y el tamaño de la colonia era similar a la punta de un alfiler. El medio Cmm logró inhibir a *X. campestris* en la dilución más baja, sin embargo hubo crecimiento en las otras diluciones en un rango de 2-20 UFC, las colonias eran de color blanco mate, de tamaño mediano a grande, con borde liso y planoconvexas. En los medios mCNS, SCMF y BCT no hubo crecimiento de la bacteria, logrando la inhibición en su totalidad. Con estos datos se calculó la selectividad de los medios para dicha bacteria. Como se observa en el Cuadro 5 (sección de resultados), los medios Cmm, D2ANX, SCM y EPPO* poseen una selectividad de 0, mientras que los medios mCNS, SCMF y BCT poseen una selectividad de 3, lo cual cumple con el criterio de aceptación.

La tercera bacteria en sembrarse fue *Pseudomonas fluorescens* en las diluciones antes mencionadas. Este cultivo tuvo que regenerarse con anticipación, ya que se encontraba muy lento su metabolismo y tardó aproximadamente 3-4 días en crecer, cuando antes lo hacía en 24-48 horas. Se realizó la siembra cuando la bacteria logró crecer en 48 horas. Se observaron los medios a las 24 horas de siembra y en el medio NBY en la dilución más baja no creció, mientras que en las otras tres diluciones sí creció de manera confluyente. Al 4to. día de siembra la bacteria había crecido de manera confluyente en los medios SCM y Cmm. En el medio D2ANX crecieron de manera confluyente en las tres diluciones más altas, con excepción en la dilución más baja. En los medios mCNS, SCMF, BCT y EPPO* no hubo crecimiento.

El último conteo se realizó a los 8 días, ya que se observó que la bacteria había crecido lentamente en el medio de comparación, por lo que se decidió esperar dos días más. Se determinó que en los medios Cmm, D2ANX y SCM presentaron un crecimiento confluyente. En dichos medios la bacteria creció en todo el medio y no se podían distinguir colonias, además en los primeros dos presentaban una coloración blanca y en el tercero gris claro. En SCMF hubo inhibición en las diluciones 10^5 , 10^6 y 10^7 , sin embargo en la dilución 10^8 , en una sola placa crecieron dos colonias circulares de color verde musgo, borde liso y convexa. A pesar de que crecieron dos colonias, este resultado es despreciable debido a que se logró la inhibición de la bacteria, ya que el recuperar 2 colonias a partir de una dilución tan alta, podría tomarse como la ausencia de crecimiento. Además, hay que mencionar que antes de realizar la siembra se manipuló

el cultivo de *Cmm*, por lo que es posible que se encontraran células de dicha bacteria en alguna superficie o en la bata de laboratorio, por lo que podría ser contaminación con *Cmm*, debido a que las colonias obtenidas eran muy similares a *Cmm*. En mCNS, BCT y EPPO* no hubo crecimiento de la bacteria, logrando la inhibición en su totalidad. Con estos datos se calculó la selectividad de los medios para dicha bacteria. Como se observa en el Cuadro 5 (sección de resultados), los medios Cmm, D2ANX, SCM y SCMF poseen una selectividad de 0, mientras que los medios mCNS, BCT y EPPO* poseen una selectividad de 3, lo cual cumple con el criterio de aceptación.

Con los resultados de ambas pruebas, productividad y selectividad, se eligieron los tres medios con el mejor desempeño. Como se observa en el Cuadro 6 (sección de resultados), los tres medios elegidos fueron SCM, SCMF y BCT. Se eligió a SCM porque a pesar de no ser selectivo, obtuvo el mayor porcentaje de selectividad, esto se debe a que al momento de analizar muestras de tomate o semillas, lo más importante es recuperar a *Cmm*. Como segundo medio se eligió a SCMF debido a su alto porcentaje de productividad y alta selectividad, porque a pesar de que hubo crecimiento de *P. fluorescens*, éste es despreciable y además tuvo alta selectividad con dos bacterias, por lo que presenta un buen resultado para ambas características. Por último se escogió a BCT porque a pesar de su baja productividad, presentó la mayor selectividad. En conclusión se escogieron los medios que tuvieron el mejor rendimiento en cada prueba y un medio que combinara un buen rendimiento en ambas (ver Cuadro 7).

Una vez se eligieron los tres medios con el mejor rendimiento, se procedió a probar su capacidad para recuperar *Cmm* a partir de semillas de tomate infestadas. Para ello se tuvo que obtener semillas de tomate. El procedimiento consistió en comprar tomates, a los cuales se les extrajo el mucílago que contenía las semillas. Se asumió que estas semillas se encontraban libres de *Cmm*, ya que los tomates no presentaban ningún signo de enfermedad, además de que el mucílago protege a las semillas. Una vez extraído el mucílago, se colocó en un frasco de vidrio con agua potable para que el mucílago se desprendiera de la semilla por fermentación (ver Figura 17 en anexos). Esto se puede lograr porque hay una inoculación natural de microorganismos que promueven reacciones enzimáticas que facilitan este proceso de fermentación y desprendimiento del mucílago (León y Withers, 1986). Este proceso puede tomar un lapso de 2 a 3 días, o cuando se nota que las semillas se encuentran en el fondo y el mucílago en la parte superior flotando. A pesar que las semillas se dejan remojando por ese lapso de tiempo a temperatura ambiente, no hay germinación de la semillas debido a que se poseen enzimas que inhiben este proceso, por lo tanto no se daña la semilla (León y Withers, 1986). Una vez que se había desprendido el mucílago se lavaron las semillas y se secaron encima de una toalla de tela por una semana a temperatura ambiente. Luego se descartaron todas las semillas que eran muy pequeñas y de color blanco, guardando únicamente las semillas de color café claro a oscuro en sobres de papel kraft en paquetes de 2,000 semillas hasta su utilización.

Antes de trabajar con las semillas de tomate extraídas, se realizó un protocolo de limpieza, en el que se utilizó cloro y alcohol para eliminar a los microorganismos en la superficie de las semillas, es decir para lograr la esterilización de la superficie de las semillas (Miller y Lewis, 2014; Mineo, 1990). Seguido a esto se eliminaron estos dos componentes de las semillas con agua estéril para evitar que se dañaran las semillas con los productos de limpieza y se utilizaba agua estéril para no añadir ningún contaminante a las semillas. Una vez limpiadas, se almacenaron en una caja Petri estéril hasta su utilización.

Seguido a la limpieza de las semillas, éstas se infestaron con las tres bacterias de prueba y *Cmm*. Para este proceso se realizó un cultivo en placa de las cuatro bacterias y así obtener colonias aisladas. Se preparó una dilución de 10^8 células/mL de *Cmm*, tomando una colonia de la placa para resuspenderla en agua estéril. Se llegó a dicha cantidad por medio de la comparación de la suspensión con el estándar de McFarland, debido a que no se encontraba disponible un espectrofotómetro para medir la absorbancia de la suspensión. Una vez se obtuvo la cantidad deseada, se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a 10^5 células/mL. En esta suspensión se colocaron las semillas de tomate y se incubaron con agitación eventual por un lapso de 2 horas (ver Figura 18 en anexos). Se realizó el mismo procedimiento para infestar las semillas por separado con *E. carotovora*, *X. campestris* y *P. fluorescens*, con la excepción de que la suspensión utilizada fue 10^8 células/mL. Una vez que se cumplió el tiempo de incubación, se procedieron a secar en papel filtro y se almacenaron en sobres de papel kraft estériles. Estos sobres se colocaron dentro de una bolsa con silica gel para evitar que creciera moho en las semillas y éstas se conservaran sin humedad y en buen estado (Hadas *et al*, 2005).

Se realizó un proceso de infestación, esto significa que se buscaba que las bacterias se adhirieran a la superficie de las semillas, ya que para que infectar a las semillas se hubieran tenido que extraer de plantas de tomate que presentaran la enfermedad, en las que por los haces vasculares la bacteria hubiera llegado a las semillas, sin embargo en este caso no se realizó ese procedimiento, únicamente se buscó una infestación superficial. Además, las semillas se almacenaron antes de realizar un extracto de las mismas, para simular el tiempo en el cual se encuentran en almacenamiento hasta que se les realiza una prueba para determinar contaminación con patógenos.

Para determinar si los tres medios previamente seleccionados (SCM, SCMF y BCT) permitían recuperar a *Cmm* a partir de semillas infestadas, se debía realizar un extracto. La muestra a utilizar fueron lotes de 2,000 semillas de tomate, ya que esta es la muestra mínima para detectar al patógeno (EPPO, 2005). Se realizaron dos extractos: uno de semillas infestadas con *Cmm* y otro de una mezcla de semillas infestadas con *Cmm* y las tres bacterias competidoras en una proporción 10:30 % respectivamente, la cual se denominará “la mezcla”. Esta proporción fue utilizada ya que se quería contar con una pequeña cantidad de semillas con *Cmm* infestadas a una baja concentración (10^5 células/mL) en comparación con una mayor

cantidad de semillas infestadas con las bacterias competidoras a una alta concentración (10^8 células/mL), con el propósito de comprobar si los medios permiten la recuperación de *Cmm* y que sean selectivos al inhibir el crecimiento de las bacterias competidoras.

Los lotes de semillas se dejaron incubando por un lapso de 16 horas en buffer PBS 1X agar 0.1% con el fin de rehidratar a las bacterias. Después de la incubación se agitaron los dos lotes por 2 horas para promover la separación de las bacterias de la superficie de las semillas. Luego se maceraron en el stomacher para terminar de extraer las bacterias de las semillas (ver Figura 19 en anexos).

El extracto de semillas obtenido de *Cmm* se sembró en los tres medios de prueba en triplicado, luego se procedió a centrifugar una porción del mismo para concentrar las bacterias que se encontraran en éste, con el fin de aumentar la probabilidad de recuperar a *Cmm* a partir de las semillas. Este extracto se sembró concentrado y en dos diluciones en los tres medios seleccionados, por si la carga bacteriana era muy grande y así poder distinguir colonias individuales. También se realizó una siembra del extracto de la mezcla en dos versiones: una recién extraído de las semillas y otro concentrado, con la misma finalidad antes descrita, en los tres medios. Debido a la limitación de reactivos y tiempo, el extracto concentrado de la mezcla no se diluyó.

Se analizaron las placas al décimo día de siembra y no se observó crecimiento de *Cmm* en ninguno de los medios seleccionados en la siembra del extracto de *Cmm*. Esto se pudo deber por diferentes variables, entre ellas es posible que al momento de infestar las semillas con una concentración de 10^5 células/mL, se perdieran muchas células en la solución y no se logaran adherir muchas células viables en la superficie de las semillas y al momento de obtener el extracto, también se perdieran en solución y la cantidad sembrada fuera mínima, por lo que es probable que los antibióticos inhibieran por completo a las pocas células viables.

Otro factor puede ser que la bacteria murió durante el proceso de almacenamiento de las semillas infestadas, ya que éstas se almacenaron en un ambiente libre de humedad, lo cual pudo dañarlas debido a que sin agua en el medio no pueden llevar a cabo su metabolismo normal (McEldowney y Fletcher, 1988). Sin embargo la falta de humedad no tuvo que haberles afectado, ya que al estar adheridas a las semillas tenían una fuente de nutrientes que podía protegerlas y evitar que perdieran su viabilidad (McEldowney y Fletcher, 1988). Por otra parte, puede ser que esta bacteria al pertenecer a la clase Actinobacteria que se caracteriza por un crecimiento lento en medios de cultivo (Whitman *et al*, 2012), necesitara mayor días de incubación, debido a que su metabolismo se ralentizó y necesitaba más tiempo para poder empezar a metabolizar la fuente de energía del medio. Además, es importante mencionar que los antibióticos del medio inhiben el crecimiento de *Cmm* por lo que es probable que esto también influyera en el crecimiento de la bacteria.

En las placas que contenían el extracto de la mezcla, tampoco se logró observar crecimiento de *Cmm* ni de las bacterias competidoras. Es probable que sucediera la misma situación en la cual al infestar y realizar el extracto se perdieran muchas células y al final las semillas no se infestaran con la carga bacteriana deseada.

La inhibición de las bacterias competidoras es un factor positivo, ya que los medios sí actuaron selectivamente y no permitieron el crecimiento de bacterias que no son de interés a pesar que las semillas se habían infestado con una carga bacteriana alta (10^8 células/mL).

Se puede concluir que los medios seleccionados fueron altamente selectivos ya que inhibieron el crecimiento de bacterias fitopatógenas que no eran de interés, sin embargo no se logró recuperar colonias de *Cmm* en los medios, por lo cual su productividad fue nula.

VIII. CONCLUSIONES

- La modificación del medio de cultivo EPPO, agregando extracto de levadura y un sistema buffer a la fórmula, aumentó la velocidad de crecimiento de *Cmm* en un 20%.
- Los medios SCM y SCMF permitieron una mayor recuperación de *Cmm*, ya que obtuvieron el mayor porcentaje de productividad. Mientras que los medios mCNS y EPPO obtuvieron el menor porcentaje de productividad, además de un crecimiento muy lento en comparación con los otros medios de prueba.
- Los medios mCNS, SCMF y BCT obtuvieron la mayor selectividad, inhibiendo el crecimiento de las bacterias competidoras. Mientras que los medios Cmm, D2ANX, SCM y EPPO no lograron inhibir el crecimiento de las bacterias competidoras, siendo su selectividad nula.
- Por su mejor desempeño en las pruebas de productividad y selectividad, se eligieron los medios SCM, SCMF y BCT para la prueba de recuperación de *Cmm* a partir de semillas de tomate infestadas. Siendo SCM el medio con mayor porcentaje de productividad y BCT el de mayor selectividad, mientras que SCMF obtuvo buen desempeño en ambas pruebas.
- No se logró recuperar colonias de *Cmm* en los tres medios seleccionados, SCM, SCMF y BCT, a partir de los extractos de semillas de tomate infestadas, en un lapso de tiempo de 10 días de incubación, obteniendo una productividad nula; asimismo, no se recuperaron colonias de las tres bacterias competidoras (*P. fluorescens*, *X. campestris* y *E. carotovora*) a partir de extractos de semillas de tomate infestadas con las mismas.
- Los factores que pudieron influir en no lograr la recuperación de células bacterianas a partir de los extractos de semillas pueden ser: la poca adherencia de las células en el proceso de infestación; la pérdida de células durante la elaboración del extracto; la falta de humedad en el almacenamiento de las semillas y la inexistencia de células viables.
- Los medios SCM, SCMF y BCT presentaron el mejor desempeño en las pruebas de productividad y selectividad, sin embargo no se logró comprobar dichas características al momento de sembrar los extractos de semillas de tomate, debido a posibles fallos en el proceso de infestación de las mismas.

IX. RECOMENDACIONES

- Es recomendable realizar la prueba de selectividad con una mayor cantidad de cepas bacterianas fitopatógenas o saprófitas aisladas de plantas y suelo guatemalteco, para evaluar que tanto pueden inhibir el crecimiento los medios semiselectivos de dichas bacterias.
- Realizar el proceso de infestación utilizando vacío para aumentar la probabilidad de que las células bacterianas se adhieran a la superficie de las semillas de tomate.
- Se recomienda infestar lotes de semillas de tomate con diferentes concentraciones de *Cmm* en triplicado para sembrar los extractos en los tres medios de prueba y así determinar la concentración mínima que permite recuperar colonias en los tres medios de prueba seleccionados, SCM, SCMF y BCT.
- Se recomienda hacer una cuantificación de células viables por semilla de tomate después de la infestación artificial, para determinar el número promedio que podría encontrarse en cada una, con el fin de analizar la efectividad del proceso de infestación.
- Se recomienda sembrar el extracto de las semillas de tomate en un medio nutritivo, como NBY, para observar si hay bacterias viables que pueden crecer y determinar el tiempo en el cual crecen en el medio de comparación.
- Es recomendable sembrar semillas de tomate de forma directa sobre un medio nutritivo y los tres medios seleccionados, para favorecer la recuperación de células bacterianas.
- Se recomienda utilizar la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para confirmar la presencia de *Cmm* en los extractos de semillas, como método complementario a los medios de cultivo.
- Se recomienda realizar una extracción de los pigmentos producidos por *Cmm* para medir la absorbancia de los mismos a diferentes longitudes de onda y así determinar si absorben en la longitud de onda utilizada para determinar la cantidad de células/mL, para descartar que estos pigmentos influyeran en la absorbancia de la muestra.

X. REFERENCIAS

- Acumedia. 2011. Brain-Heart Infusion Agar (7115). NEOGEN Corporation. Recuperado 15 de abril de 2014. Disponible en: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7115_PI.pdf
- Acumedia. 2011. Dextrose (7203). NEOGEN Corporation. Recuperado 16 de abril de 2014. Disponible en: http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7203_PI.pdf
- Archila, Astrid D. 2011. *Diseño de un sistema de costos históricos en una empresa productora de tomate*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Pág. 5
- Alarcón, Luis. 2001. Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Instituto de Ciencias Biomédicas. Reprint. Pág. 35
- Anderlini, R. 1976. *El cultivo del tomate*. Tercera edición. Ediciones Mundi-Prensa. Pág. 21-35
- Andersson, P.; T. Gillbro, L. Ferguson y R. Cogdell. 1991. << Absortion spectral shifts of carotenoids related to médium polarizability >>. *Photochemistry and Photobiology*. Vol 54(3): 353-360
- Atlas, Ronald. 2010. Handbook of Microbiological Media. Fourth Edition. CRC Press. Pág. 1-9, 1948
- Bates, M.K.; D.S. Phillips y J. O'Bryan. 2011. Shaker Agitation Rate and Orbit Affect Growth of Cultured Bacteria. Thermo Fisher Scientific Inc. Recuperado 20 de abril de 2014. Disponible en: <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/LPG/LED/LED%20Documents/Application%20&%20T echnical%20Notes/Shakers/Shakers/D02594~.pdf>
- Becton Dickinson GmbH. 2013. BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar. BD. Recuperado 15 de abril de 2014. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>
- BD Diagnostic Systems. 2003. BD™ Mycosel™ Agar. Recuperado 16 de abril de 2014. Disponible en: <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/PA-254417.pdf>
- Bolaños, R.M. 2010. <<Bacteria causa pérdidas en tomate de exportación>>. Prensa Libre [Guatemala]. Recuperado 11 de octubre de 2013. Disponible en: http://www.prensalibre.com/economia/Bacteria-causa-perdidas-tomate-exportacion_0_335366465.html
- Burokiené, D; P. Sobiczewski y S. Berczynski. 2005. Phenotypic characterization of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* isolates from Lithuania. The Polish Phytopathological Society. Vol 38:63-77
- CABRI. 1998. Laboratory Procedures for Microorganisms. DSMZ, CBS, BCCM. Recuperado 19 de abril de 2014. Disponible en: <http://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M203Ap1.html>
- Campos, A. Sin año. *Situación de la producción mundial y nacional de tomates. Manejo integrado de plagas y enfermedades del tomate*. Recuperado 10 de marzo de 2013. Disponible en: <http://www.inia.cl/medios/biblioteca/serieactas/NR27111.pdf>
- Carlton W.M.; E.J. Braun y M.L. Gleason. 1998. <<Ingress of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* into Tomato Leaves Through Hydathodes>>. *The American Phytopathological Society*. Vol 88(6): 525-529
- Chauhan, A. 2006. Microbes: Health and Environment. Volume 3 of Microbiology series. I.K. International Pvt Ltd. Pág 368

ChemSpider. 2013. Polymyxin B sulfate. Recuperado 14 octubre de 2013. Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2340876.html>

ChemSpider. 2013. Trimethoprim. Recuperado 14 de octubre de 2013. Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5376.html?rid=086293a4-94af-463d-a40f-387e4efbb77e>

ChemSpider. 2013. Niacin. Recuperado 14 de octubre de 2013. Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.913.html?rid=f482805d-ac6d-4257-ac2b-e4183ead6257>

ChemSpider. 2013. Nalidixic acid. Recuperado 14 de octubre de 2013. Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4268.html?rid=9700f410-1670-4e58-a58b-18df23888fd6>

ChemSpider. 2013. Nystatin. Recuperado 14 de octubre de 2013. Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.23078586.html?rid=d586818a-c9d6-489d-a2eb-216b3301d550>

Chaudhry, Zubeda; S. Abbas, A. Yasmin, H. RAshid, H. Ahmed y M. A. Anjum. 2010. <<Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. moneymaker >>. *Pak. J. Bot.* Vol 42(1): 155-163

Colston, C. 2013. Staking Vegetables. Howstuffworks. Recuperado 13 octubre de 2013. Disponible en: <http://home.howstuffworks.com/staking-vegetables.htm>

Comunicación oral por Leonel Marroquín. 2013. *Protocolo para extracción de semillas de tomate*. Universidad del Valle de Guatemala

Comunicación oral por Lic. Víctor Jiménez. 2013. *Protocolo para preparación de pruebas para Cmm*. Universidad del Valle de Guatemala.

Corpeño, B. 2004. *Manual del cultivo de tomate*. Centro de Inversión, Desarrollo y Exportación de Agronegocios. Pág. 2-38

Croce, V. 2012. *Desarrollo de nuevos métodos moleculares para la detección de la bacteria fitopatogena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis**. Universidad de la República. Uruguay. Pág. 15

De León, Leandro; F. Siverio y A. Rodríguez. 2011. <<*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: Healthy Seeds Are Still the Goal.>> *The American Phytopathological Society*. Vol 95(11): 1328-1339

De León, L; F. Siverio y A. Rodríguez. 2006. <<Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation>>. *Journal of Microbiological Methods*. Vol 67: 141-149

Dueñas, F; Y. Martínez; M. Álvarez, C. Moya, B. Peteira, Y. Arias, M. Diez, P. Hanson y T. Shagarodsky. 2008. *Caracterización agromorfológica y evaluación de la resistencia al TYLCV en nuevos genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como apoyo al programa de mejoramiento genético*. Cultivos Tropicales. Vol 29(1): 53-60

Dye, D.W. y W.J. Kemp. 1977. A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. *Journal of Agricultural Research*. Vol 20: 563-582

EPPO. 1996. *Data Sheets on Quarantine Pests *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis**. EPPO and CABI. Pág. 1-5

- European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2012. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. EPPO. Pág. 1-35
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2005. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. Bulletin 35: 275-283
- FAO. 2006. *Tomate (Lycopersicon esculentum)*. Recuperado 17 de marzo de 2013. Disponible en: http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/TOMATE.HTM
- Fernández, Ana; C. García, J. Saéz y S. Valdezate. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. EIMC. Pág. 1-52
- Fleming, A. y M. Y. Young. 1940. <<The inhibitory action of potassium tellurite on coliform bacteria>>. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. Vol 51. Issue 1: 29-35
- Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2013. *FAOSTAT*. Recuperado 10 de marzo de 2013. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Ftayeh, R.; A. Tiedemann y K. Rudolph. 2011. <<A new selective médium for isolation of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* from tomato plants and seed.>> *The American Phytopathological Society*. Vol 101(11):1355-1364
- Gaviola, Julio C. Sin año. *Manual de producción de semillas hortícolas*. Cosme Argerich. Pág. 1-5
- Ghannoum, M.A. y L.B. Rice. 1999. <<Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance>>. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol 12(4): 501-517
- Gini, G. 2007. Manual de procedimientos para la identificación de las bacterias con importancia clínica. Editorial Universitaria Colección Monografías. Universidad de San Carlos de Guatemala. Pág. 162
- Gitelson, Y.; O. Chivkunova y M. Merzlyak. 2000. << The spectral contribution carotenoids to light absorption and reflectance in Green leaves >>. *Agriculture and Forestry*. January 10-12. Vol 2: 1-7
- Gleckman, R.; N. Blagg y D.W. Joubert. 1981. <<Trimethoprim: mechanisms of action, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions, and therapeutic indications>>. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. Vol 1. Issue 1: 14-20
- Goto, M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press. Pág. 24-25
- Grupo Disagro. 2004. *Plan de manejo para el cultivo del tomate*. Publicaciones: Tomate. Pág. 1-12
- Hadas, R; G. Kritzman; F. Klietman; T. Gefen y S. Manulis. 2005. <<Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* in tomato seeds.>> *Plant Pathology*. Vol 54: 643-649
- Hassan M.A.E. y H. Buchenauer. 2008. <<Enhanced control of bacterial wilt of tomato by DL-3-aminobutyric acid and the fluorescent *Pseudomonas* isolate CW₂>> *Journal of Plant Diseases and Protection*. Vol 115(5): 199-207
- Hindler, J. *et al.* 1992. Preparation of routine media and reagents used in antimicrobial susceptibility testing. Part 1. McFarland Standards. Section-5. In H.D. Isenberg (ed), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Himedia. 2011. Brain Heart Infusion Agar. Technical Data. Himedia Laboratories. Recuperado 15 de abril de 2014. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/M211.pdf>

Holtmark, I; D. Mantzilas; V. Eijsink y M.B. Brurberg. 2007. <<The tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: producer of several antimicrobial substances.>> *Journal of Applied Microbiology*. 102: 416-423

Instituto de Salud Pública. 2008. Procedimiento control de calidad evaluación de medios de cultivo de acuerdo a ISO 11133-2:2002. Gobierno de Chile. Pág. 1-25

International Seed Federation ISF. 2011. *Method for the Detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis on Tomato seed*. Pág. 1-10

Jones, J.B.; J. Jones, R.E. Stall y T. Zitter. 2001. *Plagas y enfermedades del tomate*. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi-Prensa. Pág. 25-26

Koser, S. y G. Kasai. 1947. << The effect of large amounts of nicotinic acid and nicotinamide on bacterial growth>>. *Journal of Bacteriology*. Vol 53(6): 743-753

Landman, David; C. Georgescu, D.A. Martin y J. Quale. 2008. << Polymyxins Revisited >>. *Clin. Microbiol. Rev.* Vol 21(3): 449-465

León, J. y L. Withers. 1986. Guidelines for Seed Exchange and Plant Introduction in Tropical Crops. Food & Agriculture Org. Pág. 70

Liboa, M.A.; M.E. Guérin y L. Pegoraro. 2014. Influencia de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, en el crecimiento de *Rhodotorula sp.* de origen lácteo. Universidad Tecnológica Nacional. Recuperado 16 de abril de 2014. Disponible en: http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytaal_frm/CyTAL_2012/TF/TF021.pdf

MAGA. 2011. *El Agro en cifras*. Guatemala. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación Dirección de Planeamiento. Pág. 32

Matlock, Brian; R. Beringer, D. Ash, M. Allen y A. Page. 2014. << Analyzing Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers >>. ThermoFisher Scientific. Recuperado 15 de abril de 2014. Disponible en: http://www.nanodrop.com/library/ASM_TS_NanoDrop_e.pdf

McColloch, L.; H. Cook y W. Wright. 1979. *Enfermedades de Tomates, Pimientos y Berenjenas para el Mercado. Servicio de Investigaciones Agrícolas Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América*. Centro Regional de Ayuda Técnica. Pág. 1-2

McEldowney, S. y M. Fletcher. 1988. << The effect of temperatura and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces >>. *Letters in Applied Microbiology*. Vol 7. Issue 4: 83-86

Mehrotra, R.S. 2009. Principles of Microbiology. Tata McGraw-Hill Education. Pág 71-77

Méndez, M.; M. Quintos y A. Herrera. Sin año. *Control de Calidad de Medios de Cultivo*. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. Instituto Politécnico Nacional. Pág. 1-5

Miller, S. y M. Lewis. 2014. Hot wáter and chlorine treatment of vegetable seeds to eradicate bacterial plant pathogens. Plant Pathology. The Ohio State University. Recuperado 24 de abril de 2014. Disponible en: <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/pdf/3085.pdf>

Mineo, L. 1990. Chapter 9: Plant Tissue Culture Techniques. Lafayette College. Recuperado 24 de abril de 2014. Disponible en: <http://www.ableweb.org/volumes/vol-11/9-mineo.pdf>

Naktuinbouw. 2010. *Detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in seeds of tomato*. Protocol SPN-B004. Pág. 1-16

Nuez, F. 1995. *El cultivo del tomate. Edición Ilustrada*. Mundi-Prensa Libros. Pág. 15

Ortiz, Agustín. 2011. <<Asocian a semilla bacteria de tomate>>. Prensa Libre [Guatemala]. Recuperado 11 de marzo de 2013. Disponible en: http://www.prensalibre.com/economia/Asocian-semilla-bacteria-tomate_0_600539946.html

Rodríguez, R.; J. Tabares y J. Medina. 2001. *Cultivo Moderno del Tomate*. Segunda edición. Ediciones Mundi-Prensa. Pág. 19-23, 140-142

Rodríguez, Rafael; J.M. Tabares, J.A. Medina. 1997. *Cultivo Moderno del Tomate*. Segunda edición. Mundi-Prensa Libros. Pág. 13-14

Sigma. 2006. Product Information Cycloheximide. Pág. 1

Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. 1999. Diccionario de ciencias hortícolas. Mundi-Prensa Libros. Pág. 29

Sugino, Akio; C. Peebles, K. Kreuzer y N. Cozzarelli. 1977. << Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of *Escherichia coli nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme >>. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol 74(11): 4767-4771

Talibi, I; N. Amkraz; L. Askarne, F. Msanda, B. Saadi, E.H. Boudyach, H. Boubaker, B. Bouizgarne y A.B. Aoumar. 2011. <<Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker.>> *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol 5(17)

United States Department of Agriculture. 1972. *Tomato Diseases and Their Control*. Agriculture Handbook no. 203. Pág. 10-16

Vandevenne, C. y M Escolá. 2002. Métodos de análisis microbiológicos de alimentos. Ediciones Díaz de Santos. Pág. 189

Weng, Zulia; I. Álvarez, O. Díaz y M. Rodríguez. 2003. <<Recobrado de *Salmonella sp.* conservada por método simple a temperatura ambiente>>. *Vaccimonitor*. Cuba. Vol 12 (3): 5-10

Whitman, W.; A. Parte, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M. Trujillo, W. Ludwig y K.I. Suzuki. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria, Volumen 5, Parts 1-2*. Springer. Pág. 807-811

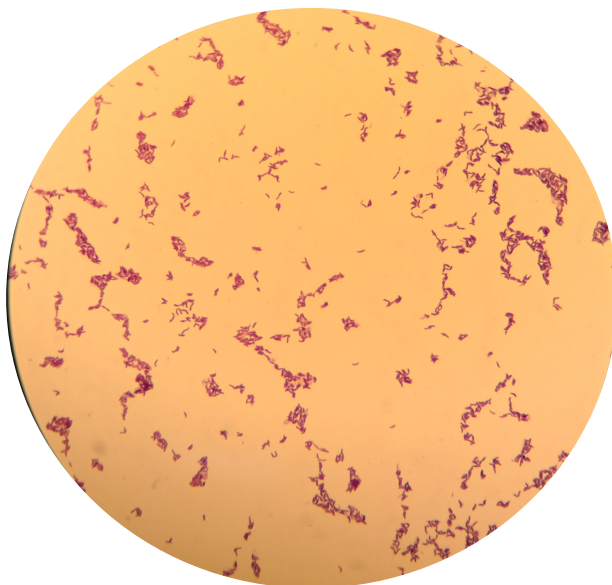
X. Xu *et al.* 2011. Isolation and Identification of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. The Ohio State University. Pág. 1-25

Zang, L.Y.; O. Sommerburg y F. Van Kuijk. 1997. << Absorbance changes of carotenoids in different solvents >>. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol 23(7): 1086-1089

XI. ANEXOS

A. Figuras

Figura 14 tinción Gram para *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* proporcionada por el Laboratorio de Protección Vegetal



Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis presentó una tinción Gram positivo (color morado) con una morfología de bacilo.

Figura 15 curva de calibración de estándares de McFarland y ecuación de la recta

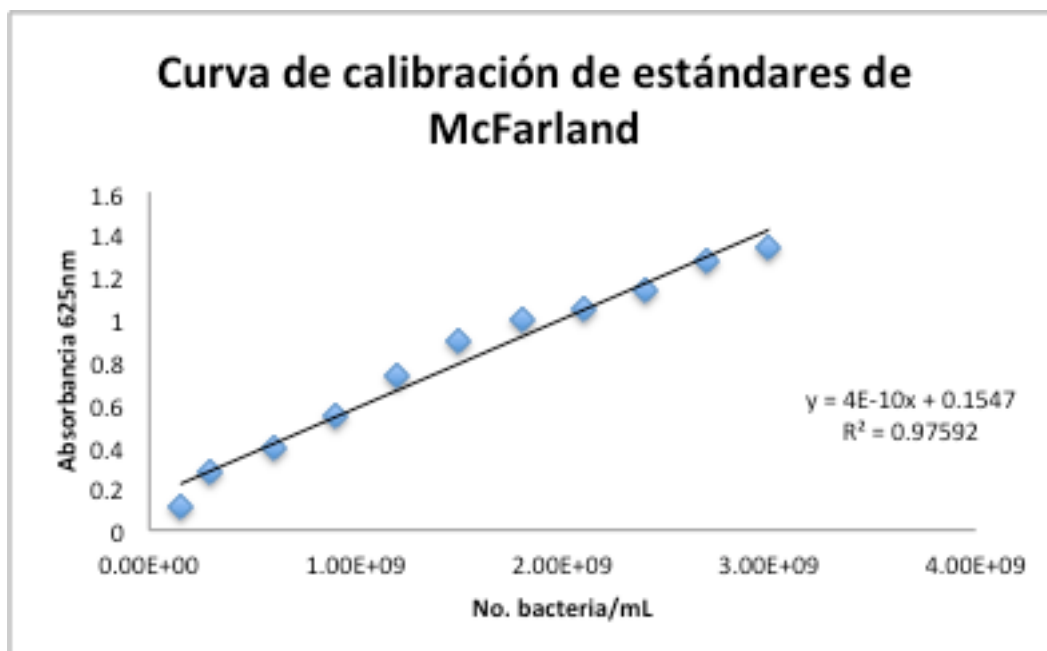
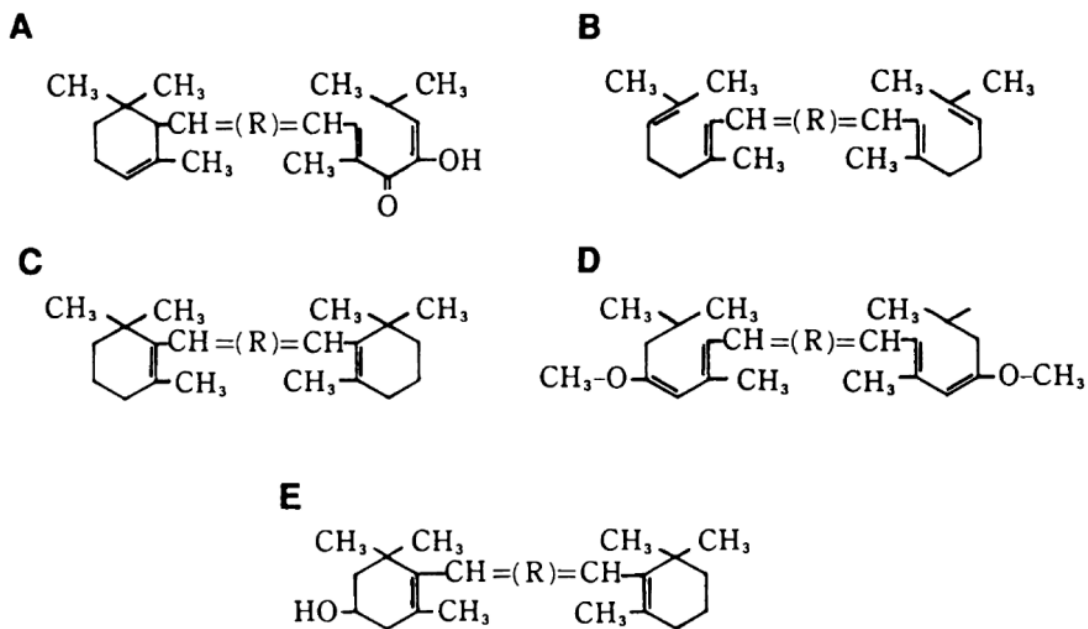


Figura 16 pigmentos carotenoides producidos por *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*



Se presentan las estructuras de los carotenoides producidos por *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*: A) Cantaxantina; B) Licopeno; C) β -caroteno; D) Spiriloxantina; E) Criptoxantina. (Fuente de la imagen: Goto, 1992).

Figura 17 Mezcla de mucílago de tomate junto con agua pura para promover la fermentación y desprendimiento de las semillas



Figura 18 Semillas de tomate en período de incubación para la infestación con las bacterias *Cmm*, *E. carotovora*, *X. campestris* y *P. fluorescens*



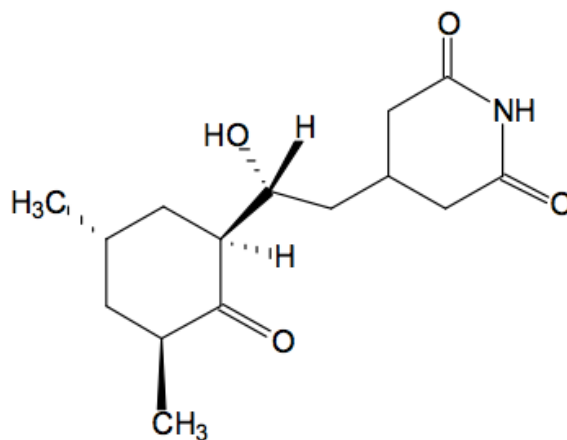
Figura 19 Extracto de semillas infestadas con *Cmm*



Figura 20 Listado de abreviaturas

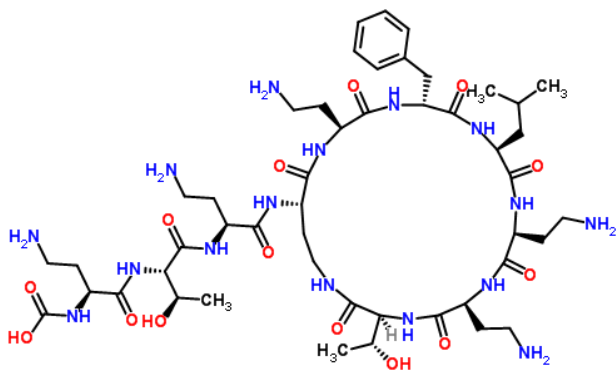
Abreviatura	Significado
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis subsp michiganensis</i>
<i>subsp</i>	subespecie
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
ISTA	International Seed Testing Association
NBY	Nutrient Broth Yeast
mCNS	Modified <i>Corynebacterium nebraskense</i> selective
SCM	Semiselective medium for <i>Clavibacter michiganensis</i>
SCMF	Semiselective medium for <i>Clavibacter michiganensis fast</i>
BCT	Bacterial canker of tomato
D2ANX	Esta abreviatura se encuentra en Chun, W.C.C. Identification and detection of <i>Corynebacterium michiganense</i> in tomato seed using the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. MSc Thesis, University of Hawaii, Honolulu, HI, USA, 1982.

Figura 21 Estructura de Cicloheximida



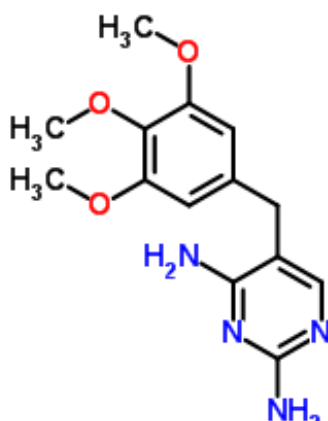
Fuente: Sigma, 2006

Figura 22 Estructura Polimixin B sulfato



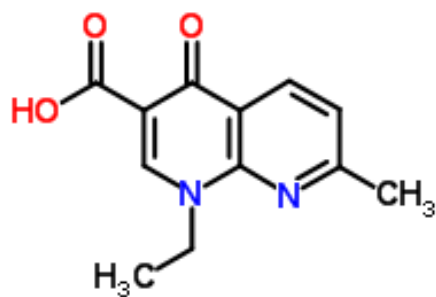
Fuente: ChemSpider, 2013

Figura 23 Estructura Trimethoprim



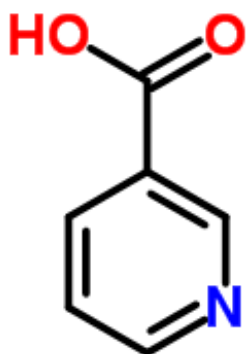
Fuente: ChemSpider, 2013

Figura 24 Estructura ácido nalidixico



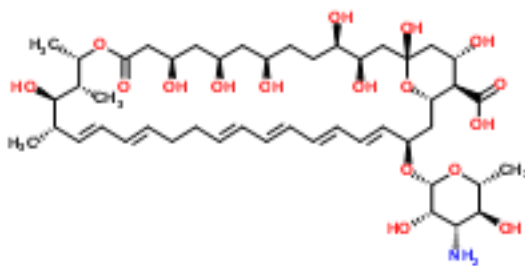
Fuente: ChemSpider, 2013

Figura 25 Estructura ácido nicotínico



Fuente: ChemSpider, 2013

Figura 26 Estructura Nistatina



Fuente: ChemSpider, 2013

B. Cuadros

Cuadro 8 resultados pruebas confirmatorias para *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*

Prueba	Resultado
Presencia de catalasa	Positivo
Presencia de Oxidasa	Negativo
Hidrólisis de almidón de papa	Positivo

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis presentó resultados positivos para catalasa e hidrólisis de almidón de papa y un resultado negativo para oxidasa, lo cual concuerda con la literatura reportada (EPPO, 2005).

Cuadro 9 resultados prueba de crecimiento de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* en tres variantes de los medios semiselectivos

Medio	Cultivo Puro			Dilución		
	Sin Abx	Abx	1/2 Abx	Sin Abx	Abx	1/2 Abx
NBY	+++	-	-	+++	-	-
mCNS	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cmm	+++	+++	+++	+++	+++	+++
D2ANX	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SCM	+++	+++	+++	+++	++	+++
SCMF	+++	+++	+++	+++	++	+++
BCT	+++	+++	+++	+++	++	++
EPPO original	+++	++	+++	++	-	+
EPPO buffer	+++	++	+++	+++	+	+++
EPPO buffer levadura	++++	++	+++	+++	++	+++

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis se sembró entres variantes de los medios semiselectivos: 1) Sin antibiótico (Sin Abx), 2) Antibiótico (Abx) y 3) mitad de concentración de antibiótico (1/2 Abx). *Cmm* creció en diferente patrón en los medios, siendo: (++++) crecimiento muy confluyente, (+++) crecimiento confluyente, (++) aproximadamente 400 UFC, (+) aproximadamente 100 UFC, (-) no presentó crecimiento. En el caso de NBY, solamente se sembró en el medio sin antibiótico ya que este medio es nutritivo.

Cuadro 10 recomendaciones para trabajar en el laboratorio de Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala

Recomendaciones para trabajar en el laboratorio
Almacenar los medios de cultivo con antibiótico por un tiempo máximo de 1 mes
Elaborar soluciones stock de componentes como sales para evitar variación en la concentración
Almacenar medios de cultivo en paquetes de 10 placas Petri
Colocar agua en un recipiente dentro de la incubadora para mantener la humedad
Esterilizar la campana y todos los materiales a utilizar por un lapso de 15-20 minutos
Preparar material estéril como cristalería y puntas de micropipeta antes de trabajar
Secar el material autoclaveado en el horno a 60°C para evitar acumulación de humedad

Se presenta un listado de recomendaciones para trabajar en el laboratorio de Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, las cuales se pueden implementar para favorecer y agilizar el trabajo de laboratorio.