



**DETERMINACION DE LA INTERACCIÓN DE
Janthinobacterium lividum Y EL HONGO
BASIDIOMICETO *Itersonilia* sp.**

MARIANA GONZÁLEZ VARGAS

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
Microbióloga Industrial**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, 2011**



DETERMINACION DE LA INTERACCIÓN DE
***Janthinobacterium lividum* Y EL HONGO**
BASIDIOMICETO *Itersonilia* sp.

MARIANA GONZÁLEZ VARGAS

APROBADO

Ingrid Schuler, Ph. D
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Janeth Arias Palacios, M.Sc-M.Ed
Directora carreras de Microbiología



**DETERMINACION DE LA INTERACCIÓN DE
Janthinobacterium lividum Y EL HONGO
BASIDIOMICETO *Itersonilia* sp.**

MARIANA GONZÁLEZ VARGAS

APROBADO

Marcela Franco Correa, Ph. D
Directora

Melva Linares Linares M.Sc.
Jurado

Luis Daniel Prada cd. M.Sc.
Codirector

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946 “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 <i>Janthinobacterium lividum</i>, bacteria Gram negativa productora de antimicrobianos.....	3
2.1.1 Género <i>Janthinobacterium</i>	3
2.1.2 <i>Janthinobacterium lividum</i>	3
2.1.3 Formación de biopelículas	4
2.2 Violaceína.....	5
2.2.1 Qué es la violaceína?	5
2.2.2 Actividad y aplicaciones de la violaceína.....	5
2.3 El basidiomiceto <i>Itersonilia</i> sp., como causante de enfermedad en crisantemos.....	6
2.3.1 <i>Itersonilia</i> sp.	6
2.3.2 Enfermedad causada por <i>Itersonilia</i> sp. en crisantemo	7
2.3.3 Métodos empleados para controlar la enfermedad.....	7
2.4 Antagonismo microbiano usado como control biológico.....	7
2.4.1 Interacciones microbianas/antagonismo.....	7
2.4.2 Antagonismo <i>in vitro</i>	8
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. OBJETIVOS.....	11
4.1 OBJETIVO GENERAL	11
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
5. METODOLOGÍA.....	12
5.1 Establecimiento de las condiciones nutricionales y de temperatura óptimas de crecimiento de los microorganismos <i>J. lividum</i> e <i>Itersonilia</i> sp.....	12
5.1.1 Evaluación de diferentes condiciones de cultivo.....	12
5.1.2 Banco de cepas	13
5.2 Evaluación de la mejor metodología entre las reportadas en literatura para la extracción preliminar de violaceína de <i>J. lividum</i>.....	13
5.2.1 Extracción preliminar de violaceína de <i>J. lividum</i>	13

5.3	Evaluación del crecimiento de <i>Itersonilia</i> sp. en interacción con <i>J. lividum</i> en cultivo dual y frente a los extractos de violaceína.....	14
5.3.1	Enfrentamiento dual	14
5.3.2	Curva de crecimiento de <i>J. lividum</i>	15
5.3.3	Pruebas de Gauze	16
6.	RESULTADOS	18
6.1	Evaluación de diferentes condiciones de cultivo.....	18
6.2	Banco de cepas	21
6.3	Extracción preliminar de violaceína de <i>J. lividum</i> :	22
6.4	Enfrentamiento dual:.....	22
6.5	Curva de crecimiento de <i>J. lividum</i> :.....	24
6.6	Prueba de Gauze:	25
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
8.	CONCLUSIONES.....	32
9.	RECOMENDACIONES	33
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	34
11.	ANEXOS.....	39
11.1	Tabla de resultados de la evaluación de las diferentes condiciones de cultivo para <i>Itersonilia</i> sp.....	39
11.2	Análisis de varianza ANOVA para la evaluación de las diferentes condiciones de cultivo para <i>Itersonilia</i> sp.	40
11.3	Tablas de resultados de crecimiento de <i>Itersonilia</i> sp. en enfrentamiento dual con <i>J. lividum</i>	41
11.4	Análisis de varianza ANOVA para los PIM en ensayos de enfrentamiento dual.	42
11.5	Tabla de resultados curva de crecimiento <i>J. lividum</i>	43
11.6	Tabla de resultados de pruebas de Gauze	44
11.7	Análisis de varianza ANOVA para pruebas de Gauze.....	45
11.8	Medios de cultivo usados en el trabajo de grado.....	46
11.9	Coloraciones usadas en el trabajo de grado.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Características de las colonias de <i>J. lividum</i> en medio PDA.....	4
Figura 2.2 Balistosporas de <i>Itersonilia</i> sp.	6
Figura 2.3 Lesiones causadas por <i>Itersonilia</i> sp.....	7
Figura 6.1 Crecimiento de <i>Itersonilia</i> sp. en diferentes medios de cultivo y temperaturas.....	20
Figura 6.2.1 Banco de cepas.....	21
Figura 6.2.2 Láminas con azul de lactofenol de <i>Itersonilia</i> sp.....	21
Figura 6.2.3 Lámina coloración de Gram de <i>J. lividum</i>	22
Figura 6.3 Proceso de obtención de extracto preliminar de violaceína	22
Figura 6.4.1 Enfrentamiento dual <i>J. lividum</i> e <i>Itersonilia</i> sp.....	23
Figura 6.4.2 Crecimiento de <i>Itersonilia</i> sp. en enfrentamiento dual con <i>J. lividum</i>	23
Figura 6.4.3 Porcentaje de Inhibición Micelial en los ensayos de Enfrentamiento dual..	24
Figura 6.5 Curva de crecimiento de <i>J. lividum</i>	24
Figura 6.6.1 Prueba de Gauze.	25
Figura 6.6.2 Inhibición en pruebas de Gauze.	26

RESUMEN

El hongo *Itersonilia* sp. es el agente causal de quema de pétalos en crisantemo, una de las principales flores comercializadas por el país a nivel mundial, lo cual genera grandes pérdidas económicas al sector floricultor colombiano. Teniendo en cuenta que se ha reportado la acción antagónica de la bacteria Gram negativa productora de violaceína *Janthinobacterium lividum* frente a diferentes hongos fitopatógenos, la interacción entre la bacteria y el hongo *Itersonilia* sp. fue evaluada. Se realizó la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de los dos microorganismos, seguido por la realización de la extracción preliminar de violaceína, la curva de crecimiento de la *J. lividum* y la evaluación del comportamiento del hongo frente a la misma por enfrentamiento dual y a diferentes horas de crecimiento, al sobrenadante crudo y al extracto preliminar de violaceína mediante prueba de Gauze. Obteniéndose como resultado que el medio PDA a temperatura ambiente es la mejor condición para evaluar interacciones entre los dos microorganismos y que es posible obtener la mayor cantidad de violaceína realizando la extracción de las dos fracciones del cultivo bacteriano, pellets y sobrenadantes. Se observó un efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo frente a la presencia de la bacteria en las pruebas realizadas. La mayor inhibición se presentó en la hora 56 de la curva de crecimiento de *J. lividum*. Pudiendo concluir que se considera antagonista del hongo *Itersonilia* sp. en condiciones óptimas de crecimiento *in vitro* de los dos microorganismos.

ABSTRACT

The fungus called *Itersonilia sp.*, is the causal agent of burning from petals in the chrysanthemum, one of the main flowers marketed by the country throughout the world, which generates large economic losses to the Colombian flower grower sector. Taking into account that it has been reported the antagonist action of the Gram-negative bacterium *Janthinobacterium lividum* which produces violacein in front of various phytopathogenic fungi, the interaction between the bacteria and *Itersonilia sp* fungi was evaluated. The determination of the optimal conditions for growth of the two microorganisms was accomplished, followed by the implementation of preliminary extraction of violacein, the growth curve of the *J. lividum* and assessment of the behaviour of the fungi in front of the same by dual confrontation and at different hours of growth, to the crude supernatant and to the preliminary extract of violacein through the Gauze test. As result was obtained that the PDA medium to room temperature is the best condition to evaluate the interactions between the two microorganisms and that it is possible to obtain the greatest amount of violacein performing the extraction of the two fractions of the bacterial culture, pellets and supernatants. It was observed an inhibitory effect on the growth of the fungi in front of the presence of this bacterium in the tests carried out. The most inhibition was presented at the 56 hour of the growth curve of *J. lividum*, and it may conclude that it is considered an antagonist of the *Itersonilis sp.*, fungi, in optimum conditions of in vitro growth of the two microorganisms.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando se habla de microorganismos necesariamente se habla de ubicuidad ya que se encuentran en todos los ambientes generando beneficios o perjuicios.

Itersonilia sp. es un hongo fitopatógeno encontrado en varios países europeos, como Italia, Alemania, Austria, Suiza y Bulgaria, así como en EE.UU., Asia y Nueva Zelanda (Rodeba *et al.*, 2009). Ha sido aislado de distintos tipos de plantas, algunas de origen oriental difundidas en América del Sur como Malva Real, Arce de Oregón y *Arctium lappa*, además en especies colombianas de girasoles, gérbera, cilantro, perejil, alcachofa y, quizás el más reportado, en crisantemo (Horita y Yasuoka, 2002; Horita *et al.*, 2005; McGovern *et al.*, 2006). En este último, causa manchas foliares en las flores hasta causar su decaimiento total (McGovern *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 1992). La técnica utilizada para controlar esta enfermedad es básicamente evitar condiciones de humedad, y aunque se han utilizado algunos fungicidas como miclobutanil, bicarbonato de potasio y propiconazol, el insuficiente control de este hongo, causa grandes pérdidas económicas a los floricultores en Colombia y a nivel mundial (McGovern *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta que los crisantemos hacen parte del 50% de las principales flores comercializadas por Colombia a nivel mundial, la marchitez del crisantemo es un problema serio para los productores de la nación.

Se ha encontrado a *Janthinobacterium lividum* como una de las bacterias que inhiben el desarrollo *in vitro* de diferentes hongos, dentro de los cuales se encuentran: el patógeno de anfibios *Batrachochytrium dendrobatidis* (Brucker *et al.*, 2008), el hongo micorrízico *Gigaspora margarita*, el patógeno oportunista *Rhizomucor* sp. (Lauer *et al.*, 2008) y los fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*, entre otros (Shirata *et al.*, 2000; Robledo, 2009), a través de la secreción de metabolitos antifúngicos (Brucker *et al.*, 2008).

El propósito de este trabajo es determinar el tipo de interacción entre *Janthinobacterium lividum* y el hongo basidiomiceto *Itersonilia* sp. bajo condiciones *in vitro* con el fin de evaluar si existe un antagonismo y de esta manera empezar a proponer estudios que permitan encontrar estrategias para disminuir la frecuencia de aplicación de productos

químicos y suplementarlos con controladores biológicos, lo cual ayudaría a disminuir notablemente los efectos negativos que trae el uso de químicos en las plantas, dentro de los que se encuentran: alteraciones a nivel ambiental y alto costo económico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Janthinobacterium lividum*, bacteria Gram negativa productora de antimicrobianos.

2.1.1 Género *Janthinobacterium*:

Las bacterias de este género son bacilos Gram negativos de 0,8-1,5 x 1,8-6 µm, algunas veces un poco curvas, y pueden presentarse en parejas o en cadenas cortas, no poseen cápsula, pero se ha observado la formación de limo intracelular, presentan inclusiones de lípidos y no se les conocen estructuras de resistencia. Son estrictamente aerobias, crecen en un amplio rango de temperatura entre 2°C a 33°C, con un óptimo de 25°C. El pH en el cual presentan un óptimo crecimiento está entre 7-8 y no crecen por debajo de pH 5. No presentan crecimiento en medios que contengan 6% o más de NaCl. Son quimiorganótrofas, es decir, que utilizan la energía química extraída directamente de la materia orgánica, y tienen un único mecanismo de respiración donde el oxígeno es el aceptor final de electrones. Presentan movilidad gracias a un único flagelo polar y por lo general de uno hasta cuatro flagelos subpolares o laterales. Acidifican pero no fermentan la glucosa y otros carbohidratos. Son catalasa positiva, indol negativo y Vogues-Proskauer negativo. Reducen nitritos y nitratos con producción de gas y degradan las peptonas generando amonio. Poseen actividad fosfatasa y crecen en medios sencillos con peptona, pueden utilizar el amonio y el citrato como fuente de carbono para crecer y expandirse rápidamente, no requieren factores de crecimiento (Garrity, 2000; Hendricks y Holt, 1994).

El género es caracterizado por la presencia de los siguientes fosfolípidos principales: fosfatidiletinolamina, fosfatidil glicerol y difosfatilglicerol como lípidos polares. Presentan resistencia a diversos antibióticos β-lactámicos por la producción de β-lactamasas (Garrity, 2000).

2.1.2 *Janthinobacterium lividum*:

Antes denominada *Chromobacterium lividum* (De ley *et al.*, 1978), es una de las dos especies del género *Janthinobacterium*, ha sido aislada comúnmente de los suelos, el agua de los ríos, lagos y manantiales y de la piel de anfibios (Brucker *et*

al., 2008; Pantanella *et al.*, 2007). Sin embargo así como ha sido encontrada a temperatura ambiente, también ha sido encontrada en condiciones psicrótrofas, en glaciares (Lu *et al.*, 2009) y en bancos de sangre, pero no crece a más de 33°C (Martínez y Pérez, 2002). En medios de cultivo sólidos presenta colonias convexas, mucoides, redondas, y dependiendo de los componentes del medio, se observan colonias con pigmentación violeta (Figura 2.1), por lo que se diferencia de la otra especie de este género, *Janthinobacterium agaricidamnorum*, que no presenta pigmentación alguna (Garrity, 2000).

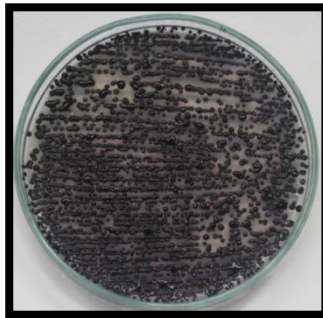


Figura 2.1 Características de las colonias de *J. lividum* en medio PDA.

En *J. lividum* se ha encontrado una importante actividad antimicrobiana que incluye capacidad antibacteriana, antiviral, antiprotozoaria y antifúngica (Pantanella *et al.*, 2007). Esta última se da por la producción de metabolitos como la violaceína y el indol-3-carboxaldehído, que junto a la competencia por nutrientes y espacio, genera una interacción de tipo antagónico, por lo cual puede ser usada como controlador biológico *in-vitro* de los hongos patógenos (Lauer *et al.*, 2008; Brucker *et al.*, 2008; Brenner *et al.*, 2005).

2.1.3 Formación de biopelículas:

Janthinobacterium lividum posee la capacidad de crecer en condiciones sésiles formando biopelículas, lo cual le permite colonizar rápidamente las superficies. El desarrollo de la biopelícula es regulado por sistemas “quórum sensing” (Juhas *et al.*, 2005; Suntharalingam y Cvitkovitch, 2005). Muchas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, de hecho, producen cantidades relevantes de exopolisacáridos (EPS) sólo cuando es estimulado por las moléculas señales de “quorum sensing”, a las que se les denomina auto-inductores (Pantanella *et al.*, 2007).

El “quórum sensing” es una forma de comunicación intercelular y depende del gen de regulación encontrado especialmente en Gram negativos. Estos tipos de células de señalización son mediados por dos familias de reguladores transcripcionales conocidos como LuxI y LuxR. LuxI cataliza la síntesis de los autoinductores que interactúan con los receptores codificados por los LuxR, quienes también regulan la transcripción de genes específicos (Blosser y Gray, 2000).

2.2 Violaceína.

2.2.1 Qué es la violaceína?

Es el metabolito secundario de pigmento púrpura de estructura dimérica compuesta por 5 hidroxindol, Oxindol y 2 – subunidades de pyrrolidona, y que se forma por la condensación de dos moléculas de triptófano modificado (August *et al.*, 2000), es soluble en etanol, pero insoluble en agua o cloroformo. Se sugiere que la biosíntesis se debe a la detección de la molécula señal difusible, denominada N-acil-homoserin-lactona (AHL), bajo el proceso de “quórum sensing” (Shinoda *et al.*, 2007).

La biosíntesis de violaceína está codificada por un operón constituido por los genes *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD* y *vioE* y su expresión está regulada por la fuente de carbono, la presencia de antibióticos y cofactores (Jian *et al.*, 2010; August *et al.*, 2000; Pantanella *et al.*, 2007). La violaceína tiene la fórmula general $C_{20}H_{13}N_3O_3$, y la absorción máxima en una solución de metanol es de 585 nm (Blosser y Gray, 2000). La producción de violaceína se ve favorecida a temperaturas bajas y en medios que contengan triptófano (Lu *et al.*, 2008; Garrity, 2000).

2.2.2 Actividad y aplicaciones de la violaceína:

Se ha demostrado que la violaceína posee actividad antimicrobiana, antitumoral y antioxidante. Es eficaz contra la leucemia, el cáncer de pulmón, el melanoma uveal en humanos, y células de linfoma, donde media la apoptosis (Duran *et al.*, 2007). Además, se ha reportado la actividad genotóxica de este pigmento en cultivos de líneas celulares y se ha utilizado para teñir fibras sintéticas y naturales. Este metabolito tiene características de controlador *in-vitro* frente a varios patógenos

humanos y vegetales, como bacterias, virus, hongos y protozoos (Lauer *et al.*, 2008; Brucker *et al.*, 2008; Brenner *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2010).

2.3 El basidiomiceto *Itersonilia* sp., como causante de enfermedad en crisantemos.

2.3.1 *Itersonilia* sp.:

Es un hongo dimórfico perteneciente al filum basidiomicota y a la familia *Sporobolomycetaceae*. Es un fitopatógeno capaz de producir clamidosporas y balistosporas (Figura 2.2) que se dispersan por el viento, causando enfermedad en crisantemos, eneldo, bardana, girasol y alcachofa (Smith *et al.*, 1992; McGovern *et al.*, 2006; Horita y Yasuoka, 2002; Rodeva *et al.*, 2009).



Figura 2.2 Balistosporas de *Itersonilia* sp. Fuente: McGovern *et al.*, 2006

En medios de cultivo sólidos, en su forma micelial, presenta colonias suaves algodónosas de color blanco a crema con crecimiento de hifas debajo de la superficie del agar, y a nivel microscópico, se observan hifas hialinas, septadas, con conexiones en grapa, ramificadas, de 2-5 micras de ancho que terminan en carpóforos con células esporógenas que generan balistosporas infladas de paredes delgadas, piriformes, de ovoides a subglobosas, de paredes lisas con contenido granular, algunas veces las balistosporas se originan directamente de la hifa sin la presencia de células esporógenas, también se observan apresorios que se generan formando una lámina de superficie dura sobre el medio de cultivo y clamidosporas globosas y subglobosas, solitarias o en cadenas cortas, de pared gruesa, especialmente en las zonas más antiguas del cultivo, por debajo de la superficie del agar; mientras en el estado levaduriforme presenta colonias lisas, sin brillo de color blanco a crema pálido (Horita y Yasuoka, 2002; Rodeva *et al.*, 2009).

Este hongo forma clamidosporas en la superficie foliar de las flores, las cuales germinan produciendo un basidio corto septado, en el que se generan

basidiosporas que se fusionan en parejas sobre el basidio dando lugar a las balistosporas (Smith *et al.*, 1992; Olive, 1952).

2.3.2 Enfermedad causada por *Itersonilia* sp. en crisantemo:

Itersonilia sp. se distribuye como saprófito de la superficie foliar de las plantas, se ha reportado como el agente causal de quema de pétalos de crisantemo, en el que causa marchitez, especialmente en condiciones húmedas, a una humedad relativa >70%, y temperaturas frescas, entre 10 y 23°C, por lo que se ve favorecido por las lluvias. Las lesiones inician como pequeñas manchas pardas, que después se extienden tomando una coloración amarilla de borde oscuro y se cubren de una capa blanca opaca (Figura 2.3), comienza en los pétalos externos y luego se disemina por toda la flor causando su decaimiento total (Smith *et al.*, 1992; McGovern *et al.*, 2006; Horita y Yasuoka, 2002).



Figura 2.3 Lesiones causadas por *Itersonilia* sp. Fuente: McGovern *et al.*, 2006

2.3.3 Métodos empleados para controlar la enfermedad:

La forma de controlar esta enfermedad es evitar condiciones de humedad (Rodeva *et al.*, 2009), realizar cultivos *in-vitro* y la utilización de algunos fungicidas como, miclobutanil, bicarbonato de potasio y propiconazol (McGovern *et al.*, 2006).

2.4 Antagonismo microbiano usado como control biológico.

2.4.1 Interacciones microbianas/antagonismo:

En el suelo, la composición de los ecosistemas microbianos se regula por las interacciones entre sí y con el medio ambiente, con lo cual se mantiene el equilibrio. Estas interacciones pueden ser de tipo benéfico (cuando existe beneficio de una o las dos partes) o **antagónico** (cuando hay perjuicio de alguna de las partes). Los microorganismos que actúan como antagonistas tienen la capacidad potencial de ser usados en el control biológico (Manacorda y Cuadros, 2005).

2.4.2 Antagonismo *in vitro*:

Las pruebas *in vitro* para determinar la capacidad antagónica de un microorganismo con respecto a otro, no representan necesariamente el grado de antagonismo y de control biológico en condiciones naturales, pero reflejan la capacidad y variabilidad genética del antagonista, y la del fitopatógeno para resistir el antagonismo. Dichas pruebas permiten realizar la selección preliminar de aislamientos facilitando el trabajo, ya que no es probable que un antagonista eficiente en el campo no lo sea en el laboratorio (Quiroz *et al.*, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

Colombia se destaca en el mercado internacional entre los principales países exportadores de flor fresca de corte, ocupando el segundo lugar en las exportaciones de flores después de Holanda, seguido por Ecuador e Israel (Castellanos *et al.*, 2009; Orozco y Cruz, 2007). Se ha establecido como el mayor proveedor de flores hacia Estados Unidos. Además, los productores nacionales han incursionado en mercados como Europa, Asia y Japón, en los cuales han comenzado a consolidarse (Tenjo *et al.*, 2005).

La exportación de flores, por Colombia, se estimó en aproximadamente US\$ 1.049,03 millones en el año 2009, donde los principales productos exportados fueron rosa (29%), crisantemo (pompón) (13%), clavel (12%), miniclavel (7%), Alstroemerias (6%) y otros (33%) (Asocolflores, 2010).

El sector floricultor genera un gran efecto social a nivel nacional, ya que genera 94.300 empleos directos (15 personas por hectárea/año), 80.200 indirectos y es un estimulante de la economía, pues requiere materiales, insumos y servicios. En cuanto al medio ambiente, está comprometido con buen uso del suelo, el agua y el aire, buscando preservarlos según las políticas ambientales concertadas con el Estado (Orozco y Cruz, 2007).

Para la consolidación de las exportaciones colombianas y la imagen del país, la Asociación Colombiana de Exportaciones de Flores: Asocolflores, realizó la homologación del sello colombiano Florverde® con la organización internacional GLOBAL G.A.P., con sede en Colonia, Alemania. Florverde® es un sello mediante el cual se certifica que las flores cultivadas en Colombia cumplen con estrictos estándares sociales y ambientales desde el momento de la siembra hasta la post-cosecha. Y dentro de sus estándares dan prioridad al uso de estrategias para el control de enfermedades y plagas diferentes al control químico.

Teniendo en cuenta que de las principales flores comercializadas a nivel mundial, los crisantemos participan en el 50% de las negociaciones en el mercado. Resulta esencial para el sector floricultor colombiano encontrar estrategias y planes de acción mediante los cuales se logre una producción sostenible y competitiva, posicionando sus productos en el

mercado nacional e internacional (Castellanos *et al.*, 2009). En su producción como flor de corte, necesita que le sea proveído material inicial, de excelente calidad fisiológica y sanitaria (Dole y Wilkins 1999, Fernández *et al.*, 2007) y la utilización de plaguicidas y fungicidas aumenta los costos de producción (Olivera *et al.*, 2000). Durante los ciclos de propagación, los patógenos tienen un efecto negativo y desmejoran la calidad sanitaria y salud de las plantas, la calidad y el valor comercial de las flores cosechadas (Enríquez *et al.*, 2005).

Itersonilia sp. se ha reportado como el agente causal de quema de pétalos de crisantemo, en el que causa marchitez, comienza a causar lesiones en los pétalos externos y luego se disemina por toda la flor causando su decaimiento total (Smith *et al.*, 1992; McGovern *et al.*, 2006; Horita y Yasuoka, 2002). El tratamiento tradicional de esta enfermedad es con la aplicación de fungicidas, los cuales generan un alto costo por la frecuencia con que se debe realizar el tratamiento. La obtención de sustancias menos costosas, pero igualmente o más efectivas que las ya existentes, constituiría un gran aporte en este campo.

Los controladores químicos claramente no pueden ser reemplazados en su totalidad; sino que por el contrario su uso menos frecuente y suplementado con controladores biológicos, ayudaría a disminuir notablemente los efectos negativos que trae el uso de químicos en las plantas, dentro de los que se encuentran: alteraciones a nivel ambiental y alto costo económico.

En este estudio, se busca determinar si se presenta una actividad antagónica entre *J. lividum* e *Itersonilia* sp., debido a las ventajas que trae la utilización de un controlador biológico frente a uno químico o físico, por su acción duradera, ya que posee la capacidad de permanecer en el ambiente, teniendo en cuenta la temperatura óptima de crecimiento de 25°C (Rossolini *et al.*, 2001), lo cual representa una ventaja para establecerse y reproducirse sobre los individuos, produciendo más agentes de control, y diseminándose en toda la población; además no representa toxicidad hacia las plantas (Becker *et al.*, 2009). Aprovechando las ventajas biológicas presentadas por este microorganismo en reportes previos frente a hongos patógenos se desea evaluar dicha actividad frente al hongo *Itersonilia* sp. causante de cuantiosas pérdidas en el sector floricultor del país.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la interacción de *Janthinobacterium lividum* y el hongo *Itersonilia* sp.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Establecer las condiciones nutricionales y de temperatura óptimas de crecimiento de los microorganismos *J. lividum* e *Itersonilia* sp.
- 4.2.2 Evaluar la mejor metodología entre las reportadas en la literatura para la extracción preliminar de violaceína de *J. lividum*.
- 4.2.3 Evaluar el crecimiento de *Itersonilia* sp. en interacción con *J. lividum* en cultivo dual y frente a los extractos de violaceína.

5. METODOLOGÍA

5.1 Condiciones nutricionales y de temperatura óptimas para el crecimiento de los microorganismos *J. lividum* e *Itersonilia* sp.

5.1.1 Evaluación de diferentes condiciones de cultivo:

Con el fin de encontrar las condiciones nutricionales y de temperatura en las que los dos microorganismos crecieran de forma óptima y bajo las cuales se pudieran realizar las pruebas antagónicas, se evaluaron diferentes condiciones de cultivo.

Se evaluó una cepa de *J. lividum* donada por el Dr. Vance T. Vredenburg, ecólogo de la Universidad Estatal de San Francisco. Se sembró en los medios de cultivo, Tripticasa de soya y Triptona Gelatina hidrolizada Lactosa (TGhL) en los que se ha reportado su crecimiento (Pantarella *et al.*, 2007), y en Papa Dextrosa Agar (PDA). Se hicieron ensayos con y sin antibióticos, como, sulfato de estreptomycin, penicilina, gentamicina (discos de 10 µg), cloranfenicol (discos de 10 µg) y tetraciclina, debido a que *Itersonilia* sp. es un hongo difícil de cultivar y se ha indicado su utilización para un mejor crecimiento (Comunicación personal con Diana Navarrete). Se incubó por 48 horas a dos temperaturas, 23°C y temperatura ambiente, las cuales han sido reportadas para su crecimiento (Garrity, 2000), al cabo de dicho tiempo se realizó una determinación cualitativa de crecimiento y producción de pigmento en las diferentes condiciones.

Igualmente, a partir de una cepa de *Itersonilia* sp. aislada de crisantemo, donada por Diana Navarrete, Microbióloga de la Sociedad de Comercialización Internacional Jardines De Los Andes S.A., se tomaron discos de agar y se colocaron en el centro de los medios de cultivo, TSA, PDA y TGhL, con y sin antibióticos como, penicilina (basados en los resultados obtenidos con *J. lividum*, ver numeral 6.1) y tetraciclina, ya que este antibiótico influencia el crecimiento del hongo (Comunicación personal con Diana Navarrete). Se incubó a temperatura ambiente, 23°C (temperaturas reportadas para su crecimiento (Horita y Yasuoka, 2002)) y 28°C (temperatura reportada para el crecimiento de la bacteria (Garrity, 2000)). La incubación se llevó a cabo durante 10 días, y se observó su crecimiento cada 24 h en las diferentes condiciones de manera cuantitativa.

Una vez realizados los ensayos, se establecieron las condiciones a utilizar durante los enfrentamientos.

5.1.2 Banco de cepas:

Una vez establecidas las condiciones nutricionales, se realizó un banco de cepas para los dos microorganismos. Se realizó siembra masiva de *J. lividum* en medio PDA, incubándose a temperatura ambiente por 48 h. Posteriormente se realizó coloración de Gram para verificar la pureza del cultivo, se tomaron discos del cultivo y se depositaron en tubos de microcentrífuga con glicerol al 25% como crioprotector y se almacenó en congelación a -4°C (Pantarella *et al.*, 2007).

Y se realizó la siembra de *Itersonilia* sp. en medio PDA depositando un disco invertido en medio PDA, se incubó a temperatura ambiente por 10 días, luego se realizó una lámina con azul de lactofenol y coloración de Gram para verificar morfología y pureza, respectivamente. Se tomaron discos de agar con crecimiento para depositarlos en tubos de microcentrífuga en 1 ml de agua destilada y se almacenaron en congelación a -4°C (Horita *et al.*, 2005).

5.2 Evaluación de la mejor metodología entre las reportadas en la literatura para la extracción preliminar de violaceína de *J. lividum*.

5.2.1 Extracción preliminar de violaceína de *J. lividum*:

Se evaluaron dos protocolos reportados en la literatura para la extracción de violaceína, uno en el que se obtenía violaceína a partir de los pellets resultantes de la centrifugación del cultivo, y otro en el que se obtenía a partir de los sobrenadantes.

Se tomaron asadas de un cultivo puro en medio sólido Triptona 1% de *J. lividum* y se realizó una solución en 100 ml de medio Triptona al 1% en un erlemeyer de 500 ml hasta obtener una densidad óptica de 1 abs a una longitud de onda de 660nm. Se incubó durante 72 horas a temperatura ambiente en agitación constante a 200 rpm, en condiciones de luz. Al cabo de dicho tiempo, se tomaron alícuotas de 10 ml y se depositaron en tubos falcon de 50 ml. Luego, se centrifugó a 3.661 xg

durante 5 min. (Lu *et al.*, 2009; Brucker *et al.*, 2008; Matz *et al.*, 2008). Se separaron los sobrenadantes y los pellets en diferentes tubos. Se separaron dos sets de tubos con sobrenadantes, el primer set se filtró a través de una membrana de 0,22 micras, este resultante se denominó sobrenadante crudo y se refrigeró a 4°C para ser usado posteriormente en la prueba de Gauze.

Para el primer ensayo, los pellets se resuspendieron en 400 µl de medio Triptona al 1%, se agregaron 400µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, se sometieron a agitación y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente (Lu *et al.*, 2009).

Para el segundo ensayo, se tomó el segundo set de los sobrenadantes resultantes de la centrifugación del cultivo (Brucker *et al.*, 2008).

Los pellets y sobrenadantes se depositaron en conos de decantación por separado y manteniendo una relación de 1:1 v/v se agregó acetato de etilo, se esperó a que se separaran las fases (acuosa y orgánica) y se recogió la fase orgánica, realizando tres lavados sucesivos (relación 1:3 v/v). La solución resultante se concentró a una presión reducida (240mbar) utilizando un rotaevaporador a 40°C, hasta obtener 1/3 del volumen inicial, obteniendo como resultado extracto preliminar de violaceína, el cual se refrigeró a 4°C (Lu *et al.*, 2009; Matz *et al.*, 2004; Bruker *et al.*, 2008; Pantanella, 2007).

Posteriormente, se realizó la misma prueba pero utilizando las dos fracciones, sobrenadantes y pellets resultantes de la centrifugación del cultivo de *J. lividum* y mezclando el extracto resultante.

5.3 Evaluación del crecimiento de *Itersonilia* sp. en interacción con *J. lividum* en cultivo dual y frente a los extractos de violaceína.

5.3.1 Enfrentamiento dual:

Para esta prueba se realizaron 3 ensayos utilizando el medio escogido en el numeral 5,1.

En el primer ensayo se realizó una siembra inicial de un disco de medio con el hongo a 3 cm del borde de la caja, se incubó durante 2 días a temperatura ambiente, y al cabo de dicho tiempo, se sembró la bacteria por estría desde la mitad de la caja (4,5cm) hacia el otro extremo. A este ensayo se le denominó E1.

En el segundo ensayo se realizó el mismo procedimiento, pero se sembró inicialmente la bacteria en la mitad de la caja y luego de 2 días de incubación a temperatura ambiente, se sembró el hongo a 3cm del borde de la caja. A este ensayo se le denominó E2.

En el tercero, se realizó la siembra de los dos microorganismos de manera simultánea. A lo que se le denominó E3.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron a temperatura ambiente por 10 días una vez se habían sembrado los dos microorganismos. Adicionalmente se realizó la siembra del hongo y de la bacteria en cajas de petri separadas con el mismo medio de cultivo, como controles para verificar su viabilidad (Ramírez *et al.*, 2006).

Este procedimiento permitió evaluar el momento del crecimiento en el que se generaría la posible inhibición. Se tomaron mediciones del diámetro de las colonias del hongo cada 24h y se determinó la inhibición mediante la fórmula de Porcentaje de Inhibición Micelial:

$$\text{PIM} = \frac{\text{Crecimiento hongo no influenciado} - \text{Crecimiento hongo influenciado}}{\text{Crecimiento hongo no influenciado}} * 100$$

A partir de los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico de donde se obtuvieron medidas de tendencia central y de dispersión, como lo son: una media aritmética, una varianza y una desviación estándar, y se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) para identificar el mejor tratamiento (Sentís *et al.*, 2003).

5.3.2 Curva de crecimiento de *J. lividum*:

A partir de un cultivo puro en medio sólido triptona al 1%, con dos días de crecimiento, se inocularon 3 asadas en 20 mL de caldo triptona al 1%. Se incubó

este pre-inóculo por 48 h a una temperatura de 25°C. Pasadas las 48 horas, se estableció la densidad óptica (D.O) del pre-inóculo basados en esta D.O se ajustó la concentración mediante diluciones en el mismo medio de cultivo a un equivalente de 10^5 (teniendo en cuenta que una D.O de 0.2 equivale a una concentración de 10^8 células/ml). Se tomaron 5 ml del pre-inóculo a una concentración de 10^5 células/ml, y se inoculó en un volumen de 45 mL de caldo triptona 1%, en erlenmeyer de 250 mL (con el fin de obtener una concentración inicial para la curva de 10^4 células/ml). Se incubó en agitación 180 rpm, a temperatura ambiente durante 48 horas. Se realizaron mediciones cada 4 horas durante todo el transcurso del tiempo (52 horas) en condiciones de esterilidad y con un ambiente aséptico, tomando una alícuota de 1500 μ L, empleados de la siguiente manera:

- 800 μ L para medición de D.O. (longitud de onda de 540 nm)
- 100 μ L para la siembra en placa por triplicado.
- 100 μ L para diluciones necesarias para siembras (diluciones 1/10 sucesivas con volumen final de 1000 μ L con caldo Triptona 1% como diluyente).
- 50 μ L para recuentos de cámara de Neubauer.
- 450 μ L de contra-muestra.

Este protocolo se realizó por duplicado.

5.3.3 Pruebas de Gauze:

Se evaluaron 3 tratamientos mediante pruebas de Gauze, utilizando, bacteria, extracto preliminar de violaceína y sobrenadante crudo.

Para la bacteria, se evaluaron 2 concentraciones de un cultivo de *J. lividum* en medio Triptona 1% líquido en 4 puntos de la curva de crecimiento de la bacteria. Para esto se utilizaron cajas de petri con medio PDA, en las que, realizando la forma de un triángulo equilátero (5 cm de cada lado), se depositaron alícuotas de 50 μ L de medio estéril (control) y las diluciones 1/1000000 y 1/10000000 de los diferentes puntos a evaluar (horas 16, 36, 52 y 72 de la curva de crecimiento), en el centro del triángulo se depositó un disco invertido de medio con el hongo *Itersonilia* sp. (Li et al., 2005).


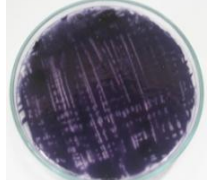



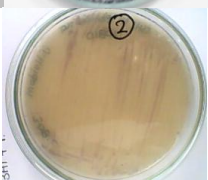
Se llevó a cabo un procedimiento similar para el extracto preliminar de violaceína y el sobrenadante depositando en los pozos alícuotas, así: el primero con medio triptona 1% estéril (control), el segundo con sobrenadante crudo o extracto preliminar, según sea el tratamiento, y el tercero con una dilución 1/10 de la fracción evaluada (extracto o sobrenadante) con medio Triptona 1% como diluyente.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron a temperatura ambiente por 10 días. Se realizó medición del radio de inhibición y a partir de los datos obtenidos se realizó un análisis de varianzas para establecer el tratamiento más efectivo.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación de diferentes condiciones de cultivo:

Los resultados obtenidos en la evaluación de diferentes medios de cultivo y temperaturas para observar el crecimiento de *J. lividum* y la producción de pigmento en las diferentes condiciones, se muestran en la Tabla 6.1 La lectura de los resultados se realizó de manera cualitativa.

Medio de cultivo	Temperatura	Crecimiento	Pigmentación	Imagen del resultado
Tripticasa de soya	23°C	+	+	
Tripticasa de soya + penicilina	23°C	+	+	
Tripticasa de soya + sulfato de estreptomicina	23°C	+	-	
TGhL	23°C	+	+	
TGhL + penicilina	23°C	+	+	
TGhL + sulfato de estreptomicina	23°C	+	-	




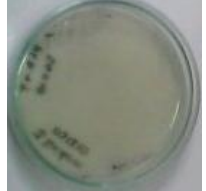
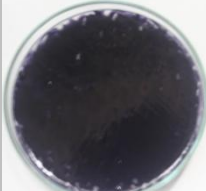

TGhL + discos de gentamicina(*)	23°C	Disminución de la biomasa.	Disminución de la pigmentación.	
TGhL + discos de cloranfenicol (*)	23°C	-	-	
TGhL + glicerol + penicilina	23°C	+	+	
PDA + tetraciclina	23°C	-	-	
PDA	23°C	+	+	
PDA	Ambiente	+	+	

Tabla 6.1 Resultados obtenidos en la evaluación de diferentes condiciones de cultivo para *J. lividum*. (*) Los datos descritos en los medios de cultivo con discos de antibióticos, son los que se generaron alrededor de los discos.

Como se observa, los medios de cultivo en los que se obtuvieron resultados positivos para el crecimiento de la bacteria y producción de pigmento fue en TSA, TSA + penicilina, TGhL, TGhL + penicilina, TGhL + penicilina y glicerol y PDA a las dos temperaturas evaluadas, 23°C y ambiente.

Con el fin de determinar las condiciones nutricionales y de temperatura que favorecen el crecimiento de los dos microorganismos para poder establecer el medio de cultivo y la temperatura de incubación a utilizar en los ensayos de enfrentamiento y de Gauze, se

realizó la respectiva evaluación del crecimiento de la cepa de *Itersonilia* sp., los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.1. La tabla de resultados se muestra en el anexo 11.1.

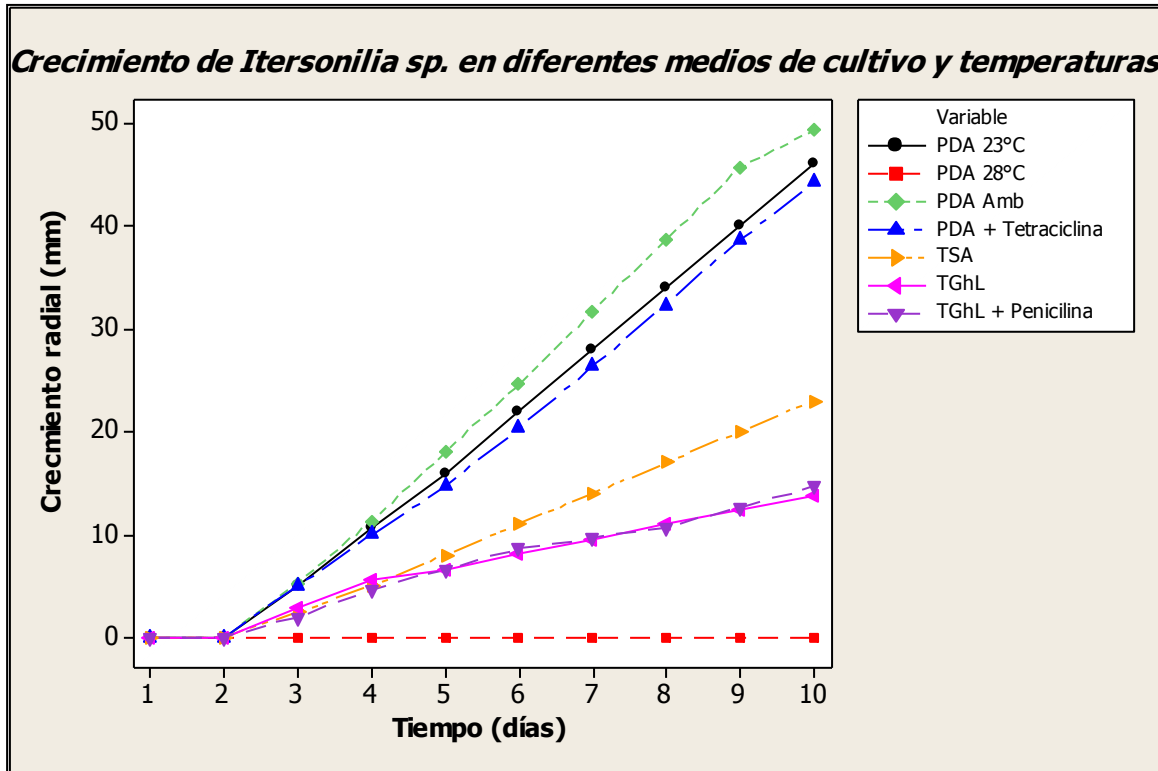


Figura 6.1 Crecimiento de *Itersonilia* sp. en diferentes medios de cultivo y temperaturas. Los datos graficados, corresponden a la media de los resultados arrojados en las réplicas realizadas.

La evaluación de las diferentes condiciones de cultivo para *Itersonilia* sp. se realizó de manera cuantitativa. A partir los datos obtenidos en las tres réplicas de cada condición, se calcularon las medias y se obtuvo la gráfica de crecimiento (Figura 6.1), con el análisis de varianza ANOVA (anexo 11.2) se logró determinar que *Itersonilia* sp. presentó el mayor crecimiento en el medio de cultivo PDA a temperatura ambiente, con un 95% de confiabilidad, siendo los resultados estadísticamente diferentes para esta condición frente a las otras condiciones evaluadas.

Con base en lo anterior y teniendo en cuenta los resultados obtenidos para *J. lividum*, se eligió el medio PDA y la temperatura ambiente para llevar a cabo las pruebas de antagonismo, ya que favorece el crecimiento de los dos microorganismos evaluados.

6.2 Banco de cepas:

Al realizar el banco de las cepas (figura 6.2.1), se verificó morfología y pureza de las cepas. En las figuras 6.2.2 y 6.2.3 se muestran las láminas realizadas.

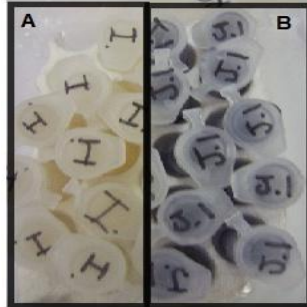


Figura 6.2.1 Banco de *Itersonilia* sp. (A) y *J. lividum* (B).

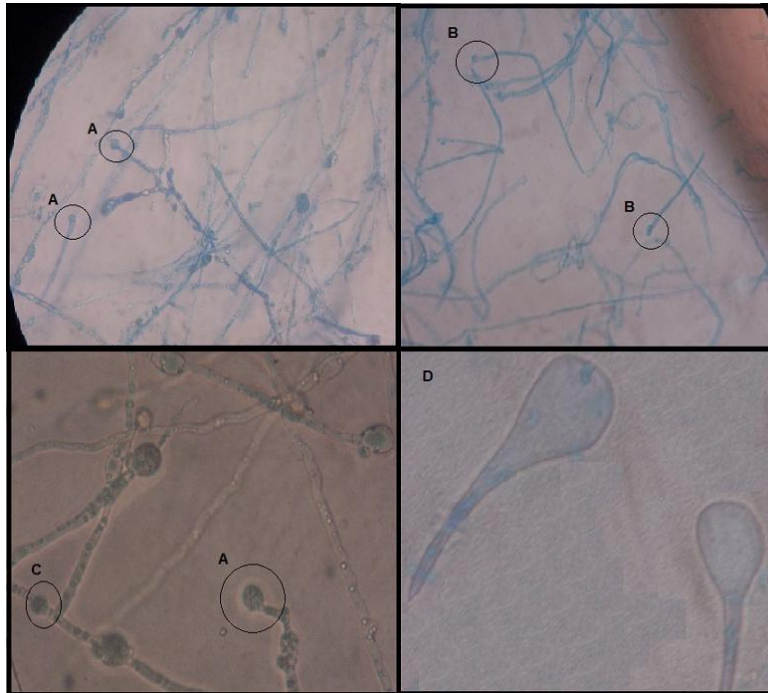


Figura 6.2.2 Láminas con azul de lactofenol de *Itersonilia* sp. (A) Producción de balistosporas, (B) uniones en grapa, (C) clamidiosporas, (D) balistosporas.

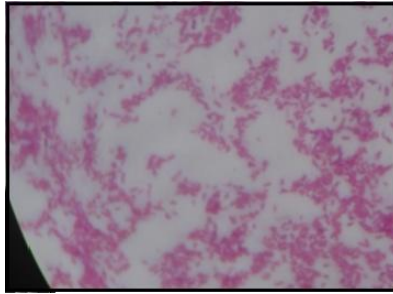


Figura 6.2.3 Lámina coloración de Gram de *J. lividum*.

Se constituyó el banco de cepas de cultivo en PDA, medio de cultivo con las mejores condiciones nutricionales para el desarrollo de los dos microorganismos.

6.3 Extracción preliminar de violaceína de *J. lividum*:

Al realizar las pruebas para la extracción preliminar de violaceína mediante los métodos reportados, se encontró que tanto de los pellets como de los sobrenadantes es posible obtener extracto, por lo cual se realizó la metodología descrita en el numeral 5.3, realizando la extracción a partir de los pellets y sobrenadantes. Sin embargo, es necesario mencionar, que en base en las características físicas de la violaceína, el mayor volumen de extracto se obtuvo a partir de los sobrenadantes del cultivo de *J. lividum*. El proceso de extracción se muestra en la figura 6.3.

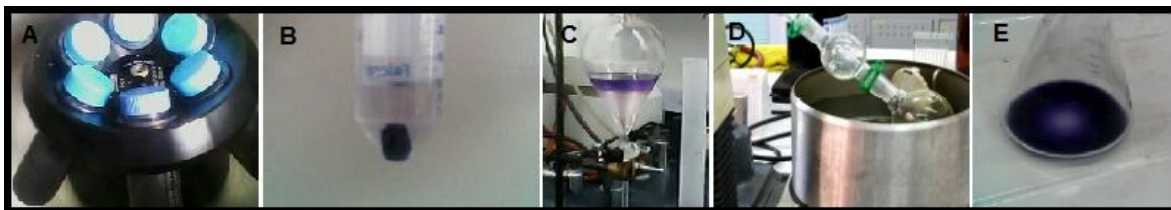


Figura 6.3 Proceso de obtención de extracto preliminar de violaceína. A. Centrifugación. B. Pellet y sobrenadante separados. C. Cono de decantación, fase superior contiene violaceína y acetato de etilo. D. Rotaevaporación. E. Extracto preliminar de violaceína.

6.4 Enfrentamiento dual:

En los ensayos realizados de enfrentamiento dual se encontró que *Itersonilia* sp. disminuye notoriamente el crecimiento micelial al acercarse a la bacteria y detiene su crecimiento al encontrarse con la misma. En la figura 6.4.1 se observa el comportamiento descrito.

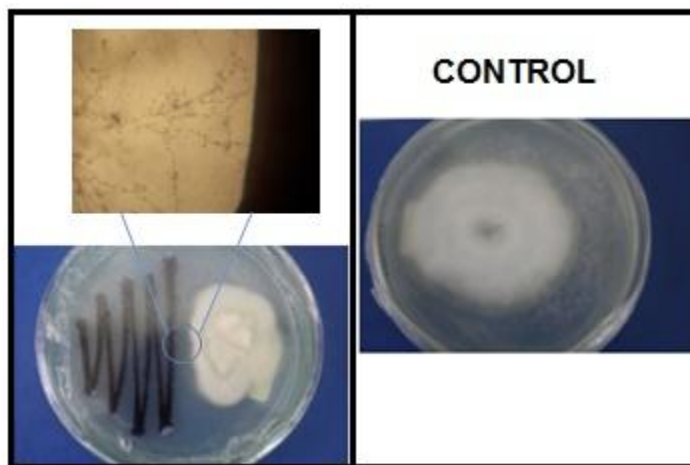


Figura 6.4.1 Enfrentamiento dual *J. lividum* e *Itersonilia* sp.

El crecimiento de *Itersonilia* sp. en los diferentes ensayos de enfrentamiento dual realizados se muestran en la figura 6.4.2. La tabla de resultados se muestra en el anexo 11.3.

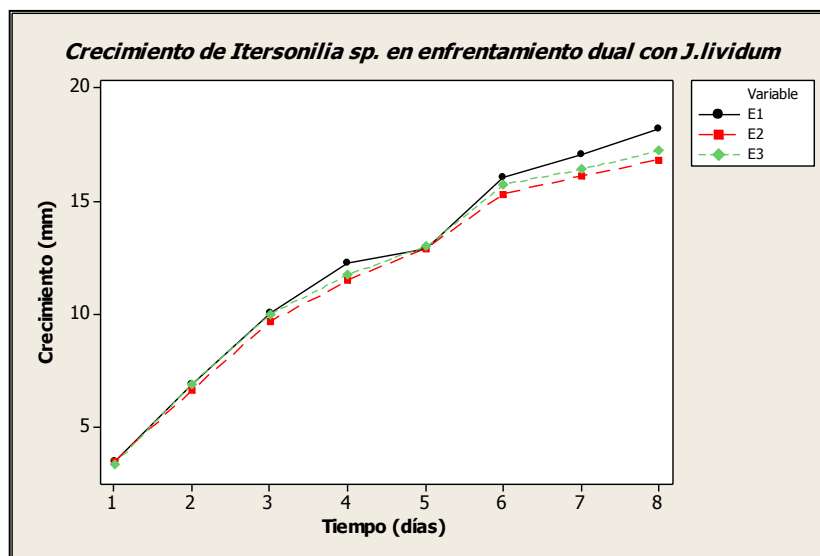


Figura 6.4.2 Crecimiento de *Itersonilia* sp. en enfrentamiento dual con *J. lividum*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el crecimiento del control de *Itersonilia* sp. se obtuvieron los Porcentajes de Inhibición Micelial (PIM) en cada uno de los ensayos. Los resultados se muestran en la figura 6.4.3.

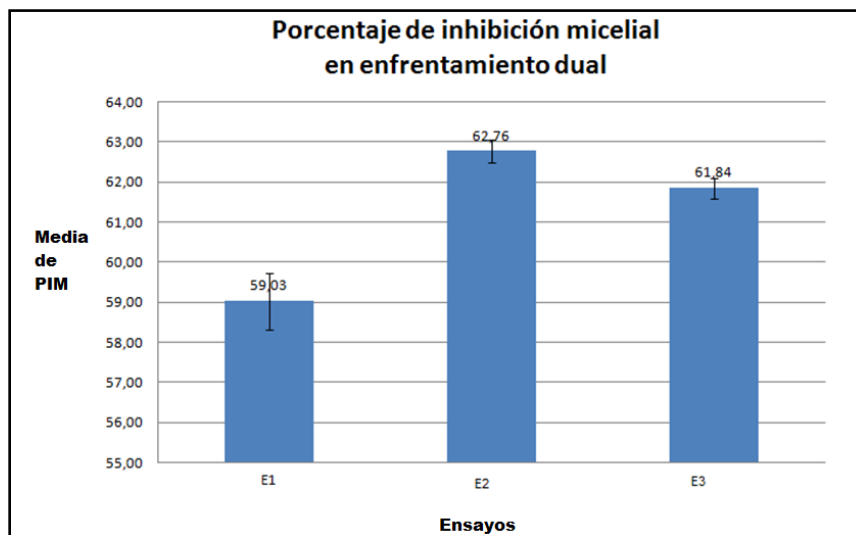


Figura 6.4.3 Porcentaje de Inhibición Micelial en los ensayos de enfrentamiento dual. Los datos graficados son las medias de los resultados de las réplicas realizadas.

Adicionalmente se realizó un análisis de varianza ANOVA (anexo 11.4) y se determinó con un 95% de confiabilidad que aunque el mayor PIM se generó en E2, el resultado de este ensayo no es estadísticamente diferente al resultado obtenido en E3. Pero estos dos si lo son con respecto a E1, el cual es menor.

6.5 Curva de crecimiento de *J. lividum*:

La curva de crecimiento obtenida para *J. lividum* se muestra en la figura 6.5. Los datos completos se muestran en el anexo 11.5.

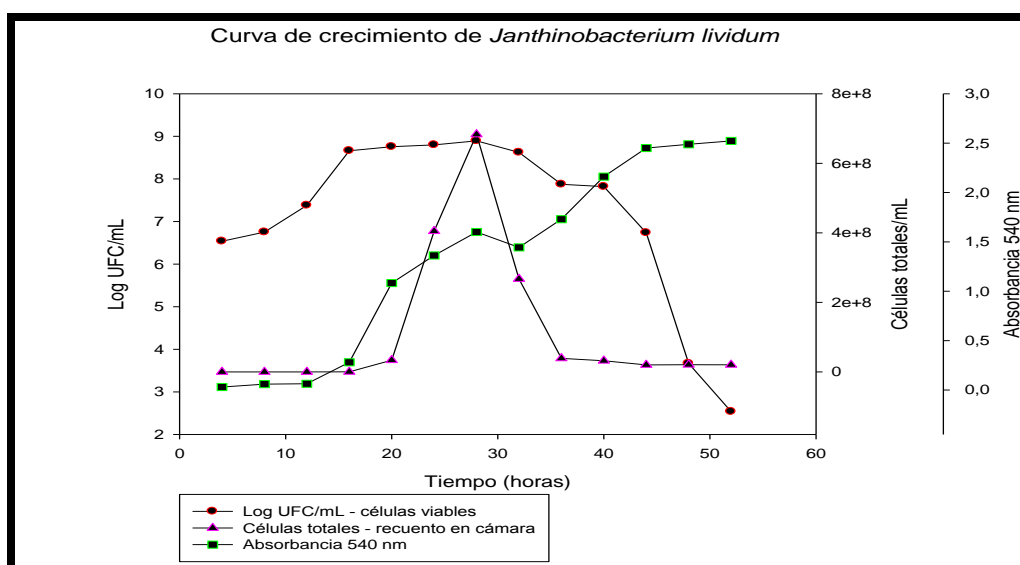


Figura 6.5 Curva de crecimiento de *J. lividum*.

En la gráfica, la curva de células viables muestra que la bacteria presentó una fase exponencial hasta la hora 16, a partir de la cual entró en fase estacionaria, en la hora 32 entra en fase de muerte, donde se observa una disminución drástica de las células totales, pero en la hora 36 hay un aumento en la absorbancia lo cual coincide con una nueva fase estacionaria en las células viables, debido a la producción de violaceína, que junto a la formación de biofilms, que se observa al disminuir el recuento de células totales, se generan a manera de supervivencia posibilitando una recuperación en la viabilidad, estabilidad en las células viables hasta la hora 44, en la que vuelve a entrar en fase de muerte, sin embargo, la absorbancia, continúa aumentando, lo que indica que la producción de violaceína continúa mientras hayan células viables. La absorbancia nunca decrece gracias a la presencia del pigmento.

6.6 Prueba de Gauze:

De los tratamientos evaluados mediante la prueba de Gauze, el sobrenadante crudo y el extracto preliminar de violaceína, no generaron ninguna inhibición al hongo *Itersonilia* sp., el cual creció por encima de los discos impregnados. Sin embargo en presencia de la bacteria, a la hora 16, aunque el hongo creció sobre los discos, en el reverso de la caja se observa una disminución del crecimiento del micelio de sustrato. En el ensayo con la bacteria a la hora 32 se observó una disminución en la esporulación, en la hora 56 se una inhibición total del hongo alrededor de los discos. Mientras que en la hora 72 el hongo creció sin presentar ningún tipo de inhibición. Los resultados se muestran en la figura 6.6.1. y en la figura 6.6.2 Los datos completos se muestran en el anexo 11.6

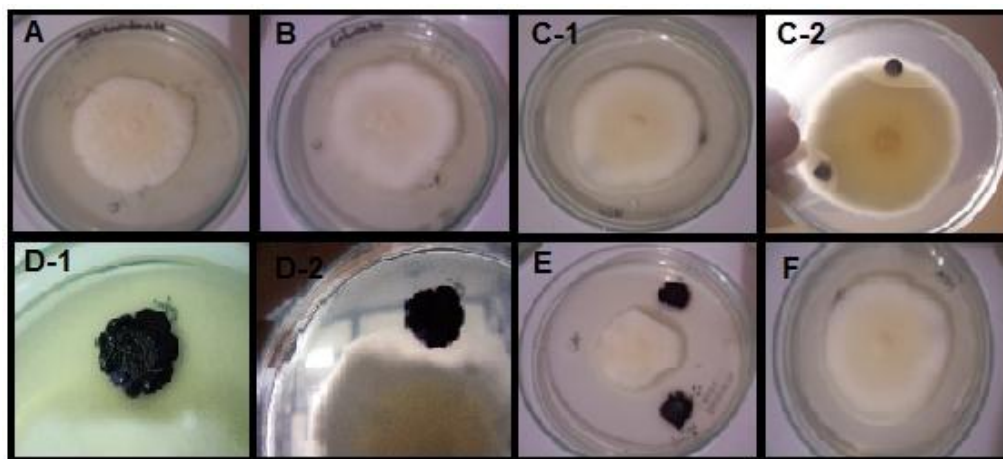


Figura 6.6.1 Prueba de Gauze. A. Con sobrenadante, B. Con extracto preliminar de violaceína, C. Con bacteria en hora 16, D. Con bacteria en hora 32, E. con bacteria en hora 56, F. Con bacteria en hora 72.

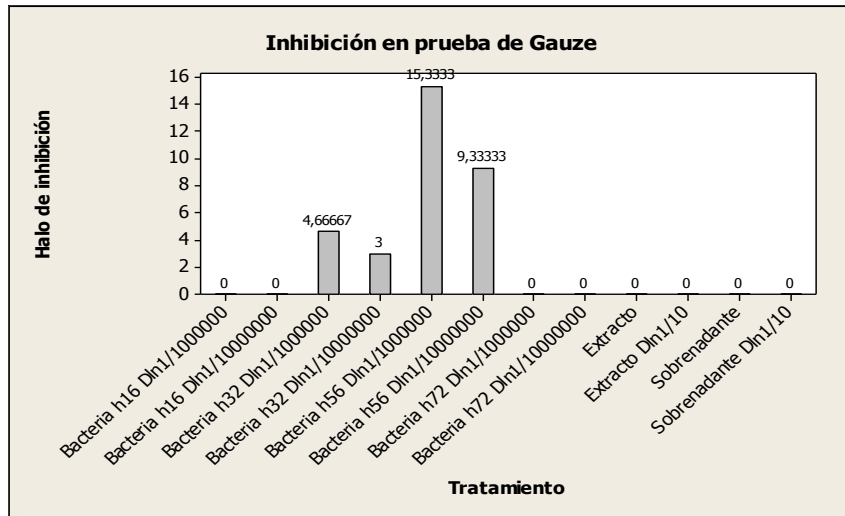


Figura 6.6.2 Inhibición en prueba de Gauze. Los resultados que se muestran son las medias de las 3 réplicas realizadas para cada tratamiento.

Con los datos obtenidos en las mediciones de la inhibición en cada tratamiento, se realizó un análisis de varianza ANOVA (anexo 11.7) y con un 95% de confiabilidad se determinó que la mayor inhibición se generó a la hora 56 del crecimiento de la bacteria en la dilución 1/1000000 siendo estadísticamente diferente al resto de tratamientos.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se realizó una evaluación de diferentes condiciones de cultivo para los dos microorganismos buscando encontrar la temperatura y el medio adecuado para realizar las pruebas de antagonismo, de tal forma que tanto bacteria como hongo presentaran el mejor crecimiento en las condiciones dadas.

En la evaluación de dichas condiciones de cultivo para *J. lividum*, se encontró que se ve inhibida por los antibióticos gentamicina, cloranfenicol y tetraciclina, todos ellos producidos por actinomicetos y cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de síntesis de proteínas, al interactuar con los ribosomas en las etapas de iniciación y elongación de las mismas (Sánchez *et al.*, 2004). Esta sensibilidad del género *Janthinobacterium* sp. frente a los antibióticos producidos por actinomicetos fue descrita por Garrity (2000) y Brenner *et al.* (2005). Se observó, adicionalmente en los medios TGhL y TSA, como lo han reportado Pantanella *et al.* (2007), August *et al.* (2000) y Garrity (2000) que *J. lividum* crece produciendo pigmento en medios sencillos que contengan triptófano, debido a que la violaceína se deriva de este compuesto, y la pigmentación se ve estimulada por la presencia de glicerol, debido a que funciona como un co-sustrato para el crecimiento de la bacteria, mientras ésta puede emplear todo el triptófano para producir violaceína, y por la presencia de penicilina, debido a que la bacteria posee la capacidad de producir β -lactamasas para romper el anillo β -lactámico de la penicilina y todos los demás antibióticos de este grupo.

Mediante la realización de esta prueba se encontró que la bacteria presenta crecimiento y producción de pigmento antifúngico en un medio que aún no había sido reportado para su cultivo, y que es específico para el crecimiento de hongos y levaduras, lo cual permite estudios de interacciones, el medio PDA. Shirata *et al.* (2000) habían reportado el crecimiento y producción de pigmento de la bacteria en medio PSA (papa, sacarosa, agar), Lu *et al.* (2009) en su estudio habían sugerido que al parecer algún componente del extracto de papa promueve la producción de pigmento por parte de la bacteria. Teniendo en cuenta lo reportado, para la producción de pigmento, la bacteria requiere de triptófano, ya que ha sido mencionado como la única molécula precursora en la biosíntesis de violaceína (Lu *et al.*, 2009), y de acuerdo con los estudios de Wissar y Ortiz (1988), donde afirman que la papa contiene una buena cantidad de aminoácidos, siendo relativamente

alta la cantidad de triptófano y lisina, se podría deducir que la bacteria al crecer en PDA, adquiere el triptófano de la papa contenida en el medio y aunque este medio posee un pH de aproximadamente 5,6, el amplio rango de pH en el que crece esta bacteria (Garrity, 2000), le permite no verse inhibida como sucedería con la mayoría de bacterias y al contrario, el bajo pH promueve también la producción del pigmento, como ya había sido sugerido por Lu *et al.* (2009) en su estudio. Sin embargo, contrario a lo reportado por Mendes *et al.* (2001) en un estudio realizado a *Chromobacterium violaceum* (otra bacteria productora del metabolito) indicaron que la glucosa afecta la producción de violaceína, y Pantanella *et al.* (2007) quienes afirmaron que en presencia de glucosa *J. lividum* no produjo pigmentación, en este medio se indujo una buena pigmentación por parte de la bacteria *J. lividum*, con igual intensidad a la presentada en medios de cultivo con adición de glicerol y penicilina.

Por otro lado, *Itersonilia* sp. únicamente presentó el mejor crecimiento en el medio PDA, específico para hongos, y generó un crecimiento muy reducido en los medios TSA y TGhL en los que la bacteria había presentado buen crecimiento. Esto se puede deber principalmente por el pH de estos medios, ya que en ambos es de aproximadamente 7, mientras *Itersonilia* sp. crece a pH de 5,5-6,5, los mismos pH que prefiere el crisantemo (Vences *et al.*, 2009). El medio PDA si presenta el pH adecuado para su crecimiento ya que es de 5,6. La adición de tetraciclina para inhibir flora bacteriana en el medio, no genera ninguna influencia en el crecimiento del hongo, como se había indicado al iniciar el estudio, mientras que como ya se había dicho, si inhibe el crecimiento de *J. lividum*, por lo que el medio escogido para las pruebas de antagonismo fue el PDA sin antibióticos.

En cuanto a las temperaturas evaluadas, el hongo *Itersonilia* sp. en concordancia con lo descrito por Horita y Yasuoka (2002), no presentó crecimiento a una temperatura de 28°C, temperatura a la que ha sido reportado el crecimiento de la bacteria, sin embargo, la temperatura ambiente fue la mejor para el desarrollo del hongo y de la bacteria, gracias a que ambos crecen en la naturaleza en condiciones medioambientales y necesitan adaptarse a los cambios de temperatura que se presentan durante el día y la noche, sin verse afectados por ellos, por lo cual la temperatura escogida fue la temperatura ambiente.

Al realizar el proceso de extracción preliminar de violaceína de *J. lividum* de acuerdo con las metodologías descritas por autores que ya han realizado el procedimiento (Lu *et al.*, 2009; Matz *et al.*, 2004, Brucker *et al.*, 2008) se estableció que se obtiene mayor volumen de violaceína si se utilizan las dos fracciones resultantes de la centrifugación, pellets y sobrenadantes. Muchos autores han optado por utilizar solamente los pellets probablemente porque es donde se observa mayor pigmentación una vez se ha realizado la centrifugación y las fracciones están separadas, según Lu *et al.* (2009) los sobrenadantes se pueden descartar debido a la muy baja concentración de violaceína presente en ellos, sin embargo, en los ensayos realizados, se encontró que aunque los sobrenadantes no parecen contener el pigmento a simple vista, de ellos se extrae el mayor volumen del componente con las características físicas y químicas en el que se encuentra la violaceína. Brucker *et al.* (2008) utilizan los sobrenadantes y descartan los pellets sin especificar la razón de ello. Sin embargo, el estudio realizado por Matz *et al.* (2008) quienes también realizaron la extracción de sedimentos celulares y sobrenadantes de los cultivos de células de bacterias productoras de violaceína, reveló que ésta se almacena intracelularmente acumulándose en el periplasma, además de estar asociada a la membrana externa; por lo cual se puede decir que es posible extraer este metabolito de ambas fracciones, ya que al realizar la centrifugación, el metabolito asociado a membrana se queda en el sobrenadante, y al realizar la ruptura de las células del pellet con el dodecil sulfato de sodio (SDS), se obtiene la porción almacenada en el interior de las células.

De esta manera se realizó el método empleando las dos fracciones, y se utilizó SDS (Matz *et al.*, 2004) ya que este detergente provoca una gran disrupción de membranas con efecto de lisis (Sánchez *et al.*, 2005) para poder obtener la violaceína intracelular y con la ayuda del acetato de etilo, éster miscible en alcohol, se separa la violaceína del agua contenida en el medio (Negrón *et al.*, 1999). La fase superior resultante contiene acetato de etilo y violaceína, además de muchos otros compuestos. El acetato de etilo, se evapora por rotaevaporación a presión reducida (Brucker *et al.*, 2008).

En las pruebas de enfrentamiento dual se encontró una disminución en el crecimiento del hongo al acercarse a la bacteria y una inhibición al encontrarse con ella, sin embargo, al evaluar los tres ensayos con tiempos de siembras diferentes para los dos microorganismos, se encontró que el porcentaje de inhibición micelial del hongo disminuye cuando este es sembrado 2 días antes que la bacteria; esto indica que el

hongo se puede adaptar mejor al nuevo medio antes que la bacteria y sin tener ningún tipo de estrés. Sin embargo, los otros ensayos, en el que se puso a crecer la bacteria 2 días antes y en el que se sembraron los dos microorganismos simultáneamente, no presentaron diferencias estadísticamente significativas, debido a que la bacteria tiene una velocidad de crecimiento mucho mayor que el hongo, y los dos días de ventaja no hacen la diferencia en la inhibición del hongo. Por lo cual, para próximos ensayos se puede optar por realizar el ensayo del tratamiento E3, ya que disminuye tiempo en la investigación.

El mecanismo por el cual *J. lividum* provoca la inhibición de otros microorganismos es gracias a la producción de metabolitos, dentro de los que se encuentra la violaceína, la cual causa apoptosis de manera general por desaminar varios tipos de aminoácidos en las células de bacterias, parásitos, hongos y demás (August *et al.*, 2000). Además, se ha descrito que puede deberse a la combinación de la producción de metabolitos y la competencia (Brucker *et al.*, 2008).

Así mismo, al realizar las pruebas de Gauze se encontró una inhibición de *Itersonilia* sp. en presencia de la bacteria, pero no en presencia del sobrenadante y del extracto, debido posiblemente a que se utilizó un diluyente no adecuado (caldo Triptona 1%), ya que la violaceína es miscible en etanol y no en agua. Sin embargo, Fernández (2001) afirma que la mayoría de microorganismos antagonistas no tienen un único modo de acción frente a los patógenos, lo que haría pensar que el efecto antagónico de *J. lividum* frente a *Itersonilia* sp. no se debe únicamente a la violaceína, sino que en la interacción pueden estar involucrados otros metabolitos, y la presencia misma de la bacteria. Muchos autores han mencionado que la bacteria produce otro metabolito con capacidad antifúngica, el indol-3-carboxaldehído, el cual no fue tenido en cuenta en este estudio y que como es soluble en agua no quedó atrapado en la extracción realizada. Brucker *et al.* (2008) afirman que la producción de violaceína está relacionada con la densidad de biomasa de la bacteria, ya que es un metabolito generado a partir del proceso de *quorum sensing* entre las bacterias de un cultivo, además afirma que el antagonismo de la violaceína está asociado a la presencia de la bacteria.

Esto mismo se ve reflejado al observar los resultados obtenidos frente a la bacteria en diferentes horas de su crecimiento y comparándolos con lo obtenido en la curva de crecimiento. Lu *et al.* (2009) en su investigación encontraron que hay un aumento del

pigmento cuando el crecimiento de las células de la bacteria ha cesado, tal como lo que se generó en este estudio donde la absorbancia continuó aumentando mientras la bacteria estaba en fase estacionaria y a la hora 36 aumentó la absorbancia, cuando la bacteria había entrado en una fase de muerte, esto puede deberse a que la producción de violaceína se da en mayor cantidad en condiciones de estrés, junto a la producción de biopelículas (ambos procesos regulados por *quorum sensing*) como mecanismos de supervivencia de la bacteria (Pantanella *et al.*, 2007).

Todo esto explica que la mayor inhibición se hayan generado en la hora 56 debido a que en ese tiempo se detectó la mayor cantidad de violaceína sintetizada por la bacteria, pero aún habían células viables, mientras que a juzgar por el comportamiento de la curva de crecimiento, en la hora 72, ya la bacteria estaba en fase de muerte, y en esta hora no se generó ningún tipo de inhibición, volviendo a ratificar que la violaceína sola no afecta el crecimiento del hongo, sino que es su acción en asociación con la presencia de la bacteria viable y que existen otros factores que están influyendo en dicha inhibición, lo cual es muy positivo, ya que el tener varios mecanismos de acción en los agentes antagonistas es una característica importante para su selección como agentes de control biológico ya que si éste posee varios modos de acción reduce la posibilidad de que el microorganismo patógeno desarrolle resistencia frente a éste (Fernández *et al.*, 2001).

8. CONCLUSIONES

- El medio PDA y la temperatura ambiente son las mejores condiciones de cultivo para evaluar interacciones entre *J. lividum* e *Itersonilia* sp.
- La mejor metodología de las reportadas en la literatura para la extracción preliminar de violaceína en mayor volumen fue la realizada a partir de las dos fracciones resultantes de la centrifugación del cultivo de *J. lividum*, pellets y sobrenadantes.
- El hongo *Itersonilia* sp. se ve inhibido en presencia de la bacteria, en la hora 56 de crecimiento de la misma.

CONCLUSIÓN GENERAL

La bacteria *Janthinobacterium lividum* se considera antagonista del hongo fitopatógeno *Itersonilia* sp. en condiciones nutricionales y de temperatura adecuadas para el crecimiento de los dos microorganismos.

9. RECOMENDACIONES

Cuando se realizó la extracción preliminar de violaceína no se determinó la presencia de la misma por cromatografía como lo han realizado otros autores, sino que únicamente se utilizaron las características químicas, físicas y la metodología reportada para realizar la extracción. Brucker *et al.* (2004) afirma que una concentración de 1.82uM de violaceína inhibe el crecimiento del hongo *B. dendrobatidis*, sin embargo, en este estudio no se realizó la cuantificación del metabolito. Por lo que se recomienda realizar la verificación de la presencia de violaceína por cromatografía y la cuantificación de su concentración en estudios posteriores, además de llevar a cabo ensayos en medios líquidos que faciliten la difusión del metabolito y la utilización de diluyentes a base de etanol, en el cual es miscible la violaceína.

Adicionalmente, se recomienda hacer estudios para identificar el mecanismo por el cual se genera la inhibición de *Itersonilia* sp. y realizar extracción de otros metabolitos como el indol-3-carboxaldehído para probar su acción frente al hongo estudiado.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Asocolflores. Boletín económico No. 6. [http:// www.asocoflores.org](http://www.asocoflores.org) Consultado el 7 de febrero de 2011
- August P, Grossman T, Minor C, Draper M, McNeil I, Pemberton J, Call K, Holt D, Osborne M. Sequence Analysis and Functional Characterization of the Violacein Biosynthetic Pathway from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2000; **2**(4): 513-519
- Becker M, Brucker R, Schwantes C, Harris R, Minbiole K. The Bacterially Produced Metabolite Violacein Is Associated with Survival of Amphibians Infected with a Lethal Fungus. *Applied and environmental microbiology* 2009; **75** (21): 635–6638
- Blosser R, Gray K. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for *N*-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods* 2000; **40**, 47–55
- Brenner J, Garrity G, Krieg N, Staley J. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volumen 2 parte3. Springer. Estados Unidos. 2005, 636-642p.
- Brucker R, Harris R, Schwantes C, Gallaher T, Flaherty G, Lam B, Minbiole K. Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology* 2008; **34**,1422–1429
- Castellanos O, Fonseca S, Buriticá S. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de flores y follajes con énfasis en clavel.
http://www.minagricultura.gov.co/archivos/agenda_prospectiva_de_investigacion_y_desarrollo_tecnologico_para_la_cadena_productiva_de_flores_y_follajes_con_en_fasis_en_clavel.pdf Consultado el 11 de noviembre de 2010.
- De Ley J, Segers P, Gillis M. Intra- and Intergeneric Similarities of *Chromobacterium* and *Janthinobacterium* Ribosomal Ribonucleic Acid Cistrons. *International journal of systematic bacteriology* 1978; **28** (2): 154-168
- Dole J, Wilkins H. *Floriculture. Principies and species*. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 1999, 613 p.
- Duran N, Justo G, Ferreira C, Melo P, Cordi L, Martins D. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2007; **48**,127–133.

- Enríquez J, Velásquez B, Vallejo A, Velasco V. Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro* durante su aclimatación en invernadero. *Revista de Fitotecnología de México* 2005; **28**(4):337-383.
- Fernández A, Casanova A, Jiménez R, Correa M, Méndez M. Efecto de tipos de bandejas y sustratos en la propagación de esquejes y la floración del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) cultivar "polaris. *Temas de Ciencia y Tecnología* 2007; **11**(33):65-69.
- Fernández O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas* 2001; **62**, 96-100
- Garrity G. *Bergey's manual of Systematic bacteriology*. Segunda Edición. Springer. Estados Unidos. 2000, 636-643p.
- Hendricks D, Holt J. *Bergey's manual of Determinative bacteriology*. Novena Edición. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, Estados Unidos. 1994, 85-86p.
- Horita H, McGovern R, Komatsu T, Yasuoka S. Effects of inoculum density, leaf age, moisture, temperature, and wetness duration on black streak of edible burdock. *Journal of General Plant Pathology* 2005; **71**, 247–252
- Horita H, Yasuoka S. Black Streak of Edible Burdock caused by *Itersonilia perplexans* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 2002; **68**, 277-283
- Jiang P, Wang H, Zhang Ch, Lou K, Xing X. Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella* sp. B2 in different heterologous hosts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; **86**, 1077–1088
- Juhas M, Eberl L, Tumbler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology* 2005; **7**, 459–471.
- Lauer A, Simon M, Banning J, Lam B, Harris R. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *The ISME journal* 2008; **2**, 145-157
- Li L, Qu Q, Tian B, Zhang Q. Induction of Chlamydospores in *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* by Antifungal Compounds Produced by *Bacillus subtilis* C2. *Journal of Phytopathology* 2005; **153**, 686–693
- Lu Y, Wang L, Xue Y, Zhang Ch, Xing X, Lou K, Zhang Z, Li Y, Zhang G, Bi J, Su Z. Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal* 2009; **43**, 135–141

- Manacorda A, Cuadros D. Interacciones microbianas. http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia_ambiental/interacciones_microbianas.pdf Consultado el 20 de diciembre de 2010
- Matz C, Deines P, Boenigk J, Arndt H, Eberl L, Kjelleberg S, Jürgens K. Impact of Violacein-Producing Bacteria on Survival and Feeding of Bacterivorous Nanoflagellates. *Applied and environmental microbiology* 2004; **70** (3): 1593–1599
- Matz C, Webb J, Schupp P, Phang S, Penesyan A, Egan S, Steinberg P, Kjelleberg S. Marine Biofilm Bacteria Evade Eukaryotic Predation by Targeted Chemical Defense. *Plos one* 2008; **3**(7): 1-7
- Martínez A, Perez J. *Acinetobacter* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. http://mvz.unipaz.edu.co/textos/biblioteca/microbiologia/microbiologia_y_parasitologia_medicas_-_tomo_i/microcap30.pdf. Consultado el 28 de agosto de 2010.
- McGovern R, Horita H, Stiles C, Seijo T. Host Range of *Itersonilia perplexans* and Management of *Itersonilia* Petal Blight of China Aster. *Plant Management Network* 2006
- Mendes A, Carvalho J, Duarte M, Durán N, Bruns R. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Biotechnology Letters* 2001; **23**: 1963–1969
- Negrón G, Fuentes A, Romero M, Madrid G, Cruz R. Preparación de N-metil-3-arilpirrolidinas mediante reacciones de cicoadición dipolares. *Journal of the mexican chemical society* 1999; **43** (3,4): 123-126
- Olive L. Studies of the morphology and cytology of *Itersonilia perplexans* derx. *Bulletin of the torrey botanical club* 1952; **79** (2): 126-128
- Olivera V, Gutiérrez M, Gutiérrez J, Andrade M. Cultivo *in vitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro* 2000; **12**(3):75-80.
- Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S. Violacein and biofilm production *Janthinobacterium lividum*. *Journal of applied of microbiology* 2007; **102**, 992-999.
- Quiroz V, Ferrera R, Alarcón A, Lara M. Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo de ajo. *Revista mexicana de micología* 2008; **26**, 27-34

- Ramírez J, Delgado E, Marinella R, Tosi S. Actividad antagonista de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. *Boletín Micológico* 2006; **21**, 49 – 53
- Robledo O. Estudio de las comunidades bacterianas de diversos vermicompost mediante T-RLFP. **Trabajo de grado de maestría**. Facultad de ciencias. Universidad de la república, Montevideo, 2009, 77p.
- Rodeba R, Gabler J, Stoyanova Z. First evidence of *Itersonilia perplexans* on dill (*Anethum graveolens*) in Bulgaria. *Scientific works of the lithuanian institute of horticulture and lithuanian university of agriculture. Sodininkystė ir daržininkystė* 2009; **28**(3).
- Rossolini G, Condemi M, Pantanella F, Docquier J, Amicosante G, Thaller M. Metallo- β -Lactamase Producers in Environmental Microbiota: New Molecular Class B Enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001; **45** (3): 837-844
- Sánchez L, Saenz E. Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología peruana* 2005; **15** (2): 82-103
- Sánchez L, Saenz E, Pancorbo J, Lanchipa P, Zegarra R. Antibióticos sistémicos en dermatología: primera parte: betalactámicos - carbapenems- aminoglucósidos - macrólidos. *Dermatología Peruana* 2004; **14**(1): 7-20.
- Sentís J, Pardell H, Cobo E, Canela J. *Manual de bioestadística*. Tercera Edición. Masson. Barcelona, España. 2003, 33-45.
- Shinoda K, Hasegawa T, Sato H, Shinozaki M, Kuramoto H, Takamiya Y, Sato T, Nikaidou N, Watanabe T, Hoshino T. Biosynthesis of violacein: a genuine intermediate, protoviolaceinic acid, produced by VioABDE, and insight into VioC function. *Chemical Communications (Camb)* 2007; (40): 4140–4142
- Shirata A, Tsukamoto T, Yasui H, Hata T, Hayasaka S, Kojima A, Kato H. Isolation of Bacteria Producing Bluish-Purple Pigment and Use for Dyein. *JARQ* 2000, **34** (2): 131-140
- Smith I, Dunez J, Lelliot R, Phillips D, Archer S. *Manual de enfermedades de las plantas*. Ediciones Mundi-prensa. España. 1992, 523p.
- Suntharalingam P, Cvitkovitch D. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol* 2005; **13**, 3–6.
- Tenjo F, Montes E, Martínez J. Comportamiento reciente (2000-2005) del sector floricultor colombiano.

<http://www.banrep.gov.co/docum/ftp/borra363.pdf> consultado el 11 de noviembre de 2010

- Vences C, Vásquez L, Hernández O. Regeneración *in vitro* de once cultivares de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) a partir de meristemas apicales. *Agronomía mesoamericana* 2009; **20** (2): 409-415
- Wissar R, Ortiz R. Mejoramiento de papa en el CIP por adaptación a climas cálidos tropicales. CIP. Lima, Perú. 1988, 4p.

11. ANEXOS

11.1 Tabla de resultados de la evaluación de las diferentes condiciones de cultivo para *Itersonilia* sp.

Los resultados que se muestran a continuación son las medias de los datos obtenidos a partir de las 3 réplicas de cada medio de cultivo.

Tiempo (días)	Crecimiento <i>Itersonilia</i> (mm)						
	PDA 23°C	PDA 28°C	PDA Amb.	PDA + T	TSA	TGhL	TGhL +P
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	5,0	0,0	5,3	5,0	2,5	2,8	2,0
4	10,6	0,0	11,3	10,0	5,0	5,6	4,7
5	16,0	0,0	18,0	14,7	8,0	6,6	6,7
6	22,0	0,0	24,6	20,3	11,0	8,2	8,7
7	28,0	0,0	31,7	26,3	14,0	9,6	9,7
8	34,0	0,0	38,7	32,3	17,0	11,0	10,7
9	40,0	0,0	45,7	38,7	20,0	12,4	12,7
10	46,0	0,0	49,3	44,3	23,0	13,8	14,7

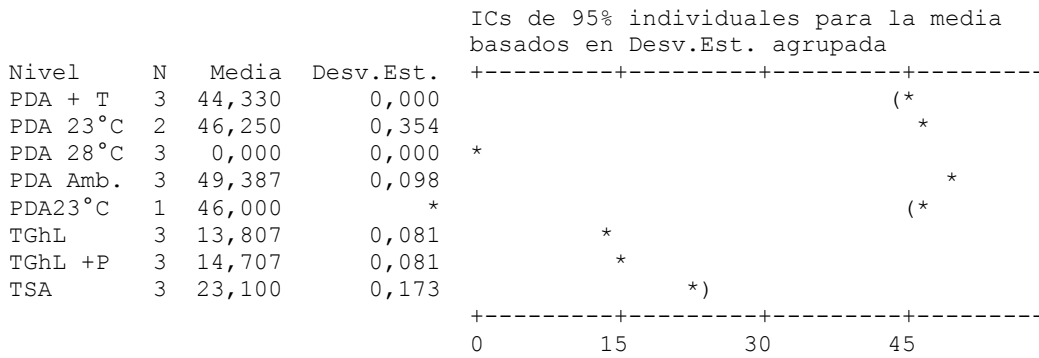
11.2 Análisis de varianza ANOVA para la evaluación de las diferentes condiciones de cultivo para *Itersonilia* sp.

El análisis de varianza se realizó en el software estadístico Minitab 15 en español. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

ANOVA unidireccional: Crecimiento (mm) vs. Medio

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Medio	7	6712,129	958,876	54103,22	0,000
Error	13	0,230	0,018		
Total	20	6712,359			

S = 0,1331 R-cuad. = 100,00% R-cuad.(ajustado) = 99,99%



Desv.Est. agrupada = 0,133

11.3 Tablas de resultados de crecimiento de *Itersonilia* sp. en enfrentamiento dual con *J. lividum*

E1						
Tiempo (días)	Caja 1 (mm)	Caja 2 (mm)	Caja 3 (mm)	Media	Control	PIM
1	3,5	3,4	3,5	3,47	3,6	3,70
2	7	6,5	7,25	6,92	9	23,15
3	10,25	9,7	10,25	10,07	14,6	31,05
4	12,25	12,3	12,2	12,25	21	41,67
5	13	12,8	13	12,93	27,5	52,97
6	16	16	16,25	16,08	33,25	51,63
7	17	17,5	16,8	17,10	39,25	56,43
8	18,3	18,9	17,5	18,23	44,5	59,03
9	18,5	19,4	18,3	18,73	50	62,53
10	18,5	19,5	18,4	18,80	56,1	66,49

E2						
Tiempo (días)	Caja 1 (mm)	Caja 2 (mm)	Caja 3 (mm)	Media	Control	PIM
1	0	0	0	0	0	0,00
2	0	0	0	0	0	0,00
3	3	4	3,5	3,50	3,7	5,41
4	7,1	6,3	6,5	6,63	9,12	27,27
5	10,25	9,3	9,5	9,68	15,4	37,12
6	12	11,5	11	11,50	22,1	47,96
7	13,5	12,8	12,5	12,93	28,5	54,62
8	15	15,5	15,5	15,33	33,8	54,64
9	16,5	15,9	16	16,13	39,6	59,26
10	17	16,5	17	16,83	45,2	62,76

E3						
Tiempo (días)	Caja 1 (mm)	Caja 2 (mm)	Caja 3 (mm)	Media	Control	PIM
1	0	0	0	0	0	0,00
2	0	0	0	0	0	0,00
3	3,5	3,5	3,1	3,37	3,7	9,01
4	7,25	6,5	7	6,92	9,12	24,16
5	10,5	9,5	10	10	15,4	35,06
6	12,25	11	12	11,75	22,1	46,83
7	13	12,5	13,5	13,00	28,5	54,39
8	16,25	15,5	15,5	15,75	33,8	53,40
9	16,75	16	16,5	16,42	39,6	58,54
10	17,25	17	17,5	17,25	45,2	61,84

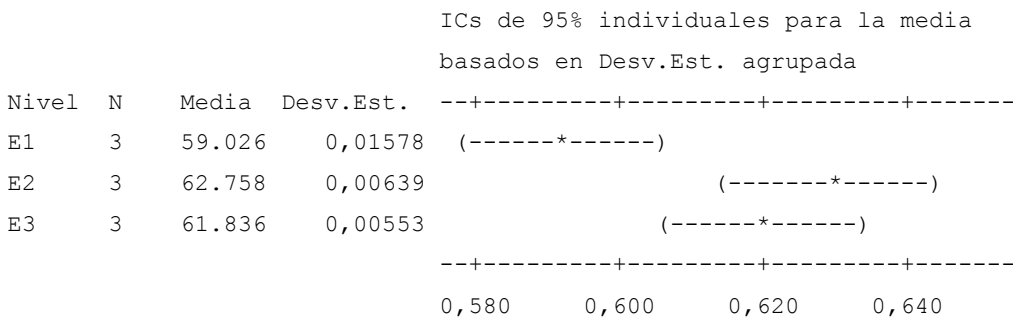
11.4 Análisis de varianza ANOVA para los PIM en ensayos de enfrentamiento dual.

El análisis de varianza se realizó en el software estadístico Minitab 15 en español. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

ANOVA unidireccional: PIM vs. Ensayo

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Ensayo	2	0,002267	0,001134	10,61	0,011
Error	6	0,000641	0,000107		
Total	8	0,002908			

S = 0,01034 R-cuad. = 77,96% R-cuad.(ajustado) = 70,61%



Desv.Est. agrupada = 0,01034

11.5 Tabla de resultados curva de crecimiento *J. lividum*.

Tiempo	Abs A	Abs B	Promedio abs	Cámara A	Cámara B	Promedio Cámara	Recuento A	Recuento B	Promedio Recuento	Log UFC/ml
4	0,03	0,03	0,0305	2,74E+03	2,86E+03	2,80E+03	3,10E+06	3,80E+06	3,45E+06	6,54
8	0,06	0,06	0,06	1,44E+04	1,55E+04	1,49E+04	5,80E+06	5,50E+06	5,65E+06	6,75
12	0,06	0,07	0,064	2,32E+04	2,44E+04	2,38E+04	2,10E+07	2,70E+07	2,40E+07	7,38
16	0,34	0,22	0,2805	2,54E+05	2,65E+05	2,60E+05	4,70E+08	4,50E+08	4,60E+08	8,66
20	1,19	0,98	1,0835	3,60E+07	3,15E+07	3,38E+07	6,10E+08	5,30E+08	5,70E+08	8,76
24	1,52	1,21	1,3628	4,30E+08	3,80E+08	4,05E+08	6,40E+08	6,20E+08	6,30E+08	8,80
28	1,75	1,45	1,600	7,18E+08	6,48E+08	6,83E+08	7,90E+08	7,80E+08	7,85E+08	8,89
32	1,37	1,52	1,444	2,80E+08	2,55E+08	2,68E+08	4,10E+08	4,30E+08	4,20E+08	8,62
36	1,84	1,62	1,7295	4,30E+07	3,50E+07	3,90E+07	7,60E+07	7,40E+07	7,50E+07	7,88
40	2,49	1,83	2,1615	4,60E+07	1,80E+07	3,20E+07	6,90E+07	6,30E+07	6,60E+07	7,82
44	2,65	2,26	2,4505	2,30E+07	1,70E+07	2,00E+07	5,30E+06	5,60E+06	5,45E+06	6,74
48	2,68	2,30	2,4885	2,28E+07	1,87E+07	2,08E+07	4,50E+03	4,80E+03	4,65E+03	3,67
52	2,71	2,33	2,522	2,34E+07	1,76E+07	20500000	3,20E+02	3,70E+02	3,45E+02	2,54

Abs: Absorbancia UFC: unidades formadoras de colonias Recuento: recuento en placa
A y B: Réplicas Cámara: Recuento en cámara

11.6 Tabla de resultados de pruebas de Gauze

Los resultados que se muestran a continuación son las medias de los datos obtenidos a partir de las 3 réplicas de cada tratamiento.

Replicas	Inhibición (mm)											
	Sobrenadante		Extracto		Bacteria hora 16		Bacteria hora 32		Bacteria hora 56		Bacteria hora 72	
	S	Dln 1/10	E	Dln 1/10	Dln 1/10 ⁶	Dln 1/10 ⁷	Dln 1/10 ⁶	Dln 1/10 ⁷	Dln 1/10 ⁶	Dln 1/10 ⁷	Dln 1/10 ⁶	Dln 1/10 ⁷
1	0	0	0	0	0	0	5	3	15	9	0	0
2	0	0	0	0	0	0	4	3	16	10	0	0
3	0	0	0	0	0	0	5	3	15	9	0	0
Media	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,67	3	15,33	9,33	0,00	0,00

11.7 Análisis de varianza ANOVA para pruebas de Gauze.

El análisis de varianza se realizó en el software estadístico Minitab 15 en español. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

ANOVA unidireccional: Inhibición vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	11	797,6389	72,5126	870,15	0,000
Error	24	2,0000	0,0833		
Total	35	799,6389			

S = 0,2887 R-cuad. = 99,75% R-cuad.(ajustado) = 99,64%

Nivel	N	Media	Desv.Est.
Bacteria h16 Dln1/10 ⁶	3	0,000	0,000
Bacteria h16 Dln1/10 ⁷	3	0,000	0,000
Bacteria h32 Dln1/10 ⁶	3	4,667	0,577
Bacteria h32 Dln1/10 ⁷	3	3,000	0,000
Bacteria h56 Dln1/10 ⁶	3	15,333	0,577
Bacteria h56 Dln1/10 ⁷	3	9,333	0,577
Bacteria h72 Dln1/10 ⁶	3	0,000	0,000
Bacteria h72 Dln1/10 ⁷	3	0,000	0,000
Extracto	3	0,000	0,000
Extracto Dln1/10	3	0,000	0,000
Sobrenadante	3	0,000	0,000
Sobrenadante Dln1/10	3	0,000	0,000

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	IC Inferior	IC Superior
Bacteria h16 Dln1/10 ⁶	(*)	
Bacteria h16 Dln1/10 ⁷	(*)	
Bacteria h32 Dln1/10 ⁶		*)
Bacteria h32 Dln1/10 ⁷	(*)	
Bacteria h56 Dln1/10 ⁶		(*
Bacteria h56 Dln1/10 ⁷		(*
Bacteria h72 Dln1/10 ⁶	(*)	
Bacteria h72 Dln1/10 ⁷	(*)	
Extracto	(*)	
Extracto Dln1/10	(*)	
Sobrenadante	(*)	
Sobrenadante Dln1/10	(*)	

0,0 5,0 10,0 15,0

Desv.Est. agrupada = 0,289

11.8 Medios de cultivo usados en el trabajo de grado.

MEDIO PDA	
COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
Infusión de papa	4
Dextrosa	20
Agar	15

INDICACIONES: Disolver los componentes del medio en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C.

MEDIO PDA + tetraciclina	
COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
Infusión de papa	4
Dextrosa	20
Agar	15

INDICACIONES: Disolver los componentes del medio en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C, dejar enfriar un poco y agregar 30mg/L de tetraciclina.

MEDIO TSA	
COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
Tripticasa	15
Peptona de soya	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

INDICACIONES: Disolver los componentes del medio en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C.

MEDIO TSA + penicilina	
COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
Tripticasa	15
Peptona de soya	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

INDICACIONES: Disolver los componentes del medio en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C, dejar enfriar un poco y agregar 200mg/L de penicilina.

MEDIO TSA + sulfato de estreptomycin	
COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
Tripticasa	15
Peptona de soya	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

INDICACIONES: Disolver los componentes del medio en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C, dejar enfriar un poco y agregar 300mg/L de sulfato de estreptomycin.

MEDIO TGhL	
COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
Triptona	16
Gelatina hidrolizada	4
Lactosa	2
Agar	10

INDICACIONES: Disolver los componentes del medio en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C.

MEDIO TGhL + penicilina	
COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
Triptona	16
Gelatina hidrolizada	4
Lactosa	2
Agar	10

INDICACIONES: Disolver los componentes del medio en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C, dejar enfriar un poco y agregar 200mg/L de penicilina.

MEDIO TGhL + sulfato de estreptomycin	
COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
Triptona	16
Gelatina hidrolizada	4
Lactosa	2
Agar	10

INDICACIONES: Disolver los componentes del medio en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C, dejar enfriar un poco y agregar 300mg/L de sulfato de estreptomicina.

MEDIO TGhL + penicilina + glicerol	
COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
Triptona	16
Gelatina hidrolizada	4
Lactosa	2
Agar	10

INDICACIONES: Disolver los componentes del medio en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C, dejar enfriar un poco y agregar 200mg/L de penicilina y 10 g/L de glicerol.

MEDIO Triptona 1%	
COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
Triptona	10
Agar*	15

INDICACIONES: Disolver los componentes del medio en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y autoclavar por 15 minutos a 121°C.
*No agregar en medio líquido.

11.9 Coloraciones usadas en el trabajo de grado.

A. Coloración de Gram:

1. Tomar una asada del cultivo y depositarla en la mitad de una lámina portaobjetos mezclándola con una gota de agua.
2. Con la ayuda de una pinzas, pasar la lámina sobre la llama del mechero para fijar.
3. Una vez seca, colocar una gota de cristal violeta y dejar por 1 min. Luego enjuagar.
4. Colocar una gota de lugol, dejar por 1 min. y enjuagar.
5. Colocar una gota de alcohol acetona, dejar por 30 seg. Y enjuagar.
6. Colocar una gota de fucsina, dejar 1 min. y enjuagar.
7. Secar y observar al microscopio. Para observar a 100 x se debe colocar una gota de aceite de inmersión.

B. Azul de lactofenol:

1. Poner una gota de azul de lactofenol sobre la lámina portaobjetos.
2. Con ayuda de una aguja de disección o una cinta pegante transparente tomar micelio del hongo.
3. Colocar sobre la gota de azul de lactofenol.
4. En el caso de usar aguja, colocar una laminilla sobre la gota de azul de lactofenol.
5. Observar al microscopio con un aumento de 40x.