



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA
EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL MICHOACÁN**

**“ABATIMIENTO DE *Salmonella sp.* EN TEJIDOS
INTERNOS DE PLANTA DE PAPA (*Solanum
tuberosum L.*) MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE
Bacillus sp.”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE**

PRESENTA:

BIOL. ELVIA GUADALUPE LIMAS MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS VICTOR MUÑOZ RUIZ

JIQUILPAN MICHOACAN, DICIEMBRE DEL 2011



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos V. Muñoz Ruiz por permitirme trabajar en este proyecto bajo sus enseñanzas, por brindarme su apoyo y confianza, por haberme proporcionado todo lo necesario para realizar esta investigación. Por compartir sus conocimientos y experiencias.

A mis revisores Dra. M. Valentina Angoa Perez, Dr. Jose Luis Montañez Soto, Dra. Hortencia G. Mena Violante., M en C Rebeca Flores Magallón. Por el tiempo dedicado a revisar este trabajo, así como por las sugerencias y recomendaciones realizadas.

A mi esposo Miguel Angel y mis hijos Miguel, Rodrigo y Oscar que hoy son la fuerza para seguir adelante y la alegría de mi vida.

A mis padres por su gran apoyo, sus enseñanzas, sus consejos por estar pendiente siempre de mí

A ti mami que te quiero y te agradezco todo el respaldo dado, por todo el cariño que me has brindado

A mis hermanos Toño ,Ana, Mary y Liz. siempre presentes con su apoyo en todo momento

A mis tíos Sabina, Trinidad, Rafael, Rosa Elba , Perla Araceli, Miguel Angel, Graciela, Elvira, Silvia por estar conmigo en todas las formas y de los cuales he aprendido tanto.

A mis queridos sobrinos, Isabel, Alberto, Monse e Ivonne.

En especial a mi mamá Trini porque aunque estando lejos siempre estuvo pendiente de mí y ha sido y seguirá siendo un gran pilar al igual que a Papá Sabino que supo inculcarme los valores ellos influyeron sobre mi educación y

formación, les agradezco infinitamente aun que ya no estén aquí, los llevo siempre presentes.

A toda mi familia por escucharme motivarme y darme siempre un buen consejo gracias.

A mis compañeros de generación del CIIDIR-MICH así como a los integrantes del laboratorio por hacer un ambiente agradable de trabajo.

Al Instituto Politécnico Nacional por permitir continuar con mi formación profesional, así como por la beca institucional otorgada a través de la Secretaría de Servicios Educativos por conducto de la Dirección de Servicios Estudiantiles y la beca PIFI otorgada a través de la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas para realizar estudios de maestría así como elaboración del proyecto de tesis.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 11:00 horas del día 03 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Michoacán para examinar la tesis titulada:

"Abatimiento de Salmonella sp. en tejidos internos de planta de papa Solanum tuberosum L, mediante la inoculación de Bacillus sp".

Presentada por el alumno:

LIMAS

Apellido paterno

MARTINEZ

Apellido materno

ELVIA GUADALUPE

Nombre(s)

Con registro:

B	0	6	1	2	0	9
---	---	---	---	---	---	---

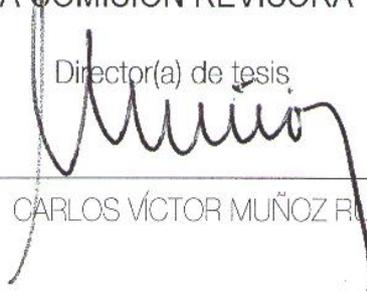
aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

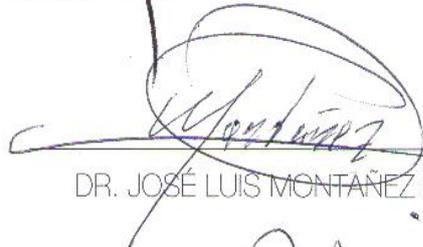
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

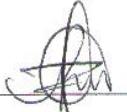
LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis


DR. CARLOS VÍCTOR MUÑOZ RUÍZ


DRA. MARÍA VALENTINA ANGOA
PÉREZ


DR. JOSÉ LUIS MONTAÑEZ SOTO


M.C. REBECA FLORES MAGALLON


DRA. HORTENCIA GABRIELA MENA
VIOLANTE

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. GUILLERMO HERRERA ARREOLA



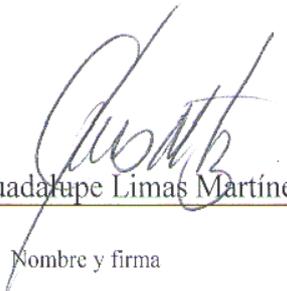


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan Mich. el día 5 del mes Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Elvia Guadalupe Limas Martínez alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B061209, adscrito al Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr Carlos Víctor Muñoz Ruiz y cede los derechos del trabajo intitulado Abatimiento de *Salmonella sp.* en tejidos internos de planta de papa (*Solanum tuberosum L.*) mediante la inoculación de *Bacillus sp.*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección martinezlimas@yahoo.com.mx, cvmunoz@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Elvia Guadalupe Limas Martínez

Nombre y firma

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	1
INDICE DE CUADROS	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1 INTRODUCCIÓN	5
1.1 Vegetales crudos y contaminación con enteropatógenos	5
1.2 El género <i>Salmonella</i>	6
1.3 Microorganismos endófitos	9
1.4 La asociación bacteria-planta	12
1.5 El género <i>Bacillus</i>	14
1.6 La familia Solanaceae	15
1.7 La planta de papa como modelo de investigación	17
2. OBJETIVO	19
Objetivos particulares	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS	20
3.1 Aislamiento de bacterias del género <i>Bacillus</i> sp. antagonistas a <i>Salmonella</i> sp.	20
3.2 Identificación del género <i>Bacillus</i> .	22
3.3 Propagación de papa (Alfa) in vitro	23
3.4 Suspensión bacteriana para inoculación en plantas	25
3.5 Prueba de asociación bacteria-planta.	25
3.6 Tratamientos para la prueba de inhibición de establecimiento de <i>Salmonella</i> sp.	26

3.7 Análisis estadístico	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Aislamiento de bacterias antagonistas a enteropatógenos	29
4.2 Suspensión bacteriana	29
4.3 Prueba de asociación bacteria-planta.	29
4.4 Tratamientos para la prueba de inhibición de establecimiento de <i>Salmonella</i> sp.	30
4.5 Prueba de inhibición de establecimiento de <i>Salmonella</i> sp. mediante maceración de plantas.	30
4.6 Contrastación de medias	32
5. DISCUSION	33
6.-CONCLUSIONES.	37
7. - LITERATURA CITADA	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bacterias endófitas	11
Figura 2. Identificación del género <i>bacillus sp.</i>	23
Figura 3. propagación in vitro de la planta de papa	24
Figura 4. prueba de asociación bacteria-planta	26
Figura 5. trasplante de plántulas de papa	28

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Prueba de establecimiento de inóculos bacterianos en plantas de papa <i>in vitro</i> en diferentes medios y con distintos tratamientos	31
--	----

RESUMEN

Los brotes epidémicos de infección intestinal por *Salmonella* spp, son uno de los problemas de salud más comunes en todo el mundo y con mayor frecuencia en países subdesarrollados, siendo los vegetales que se consumen en crudo vehículos potenciales para que estos microorganismos patógenos se transmitan al hombre. Aunado a lo anterior, los procedimientos de desinfección comúnmente empleados, regularmente son ineficientes para eliminar *Salmonella* spp, tanto en las raíces, como en las hojas o los frutos, lo cual sugiere que estos microorganismos se encuentran localizados en microhabitats protegidos, ya sea en la superficie o en el interior de los tejidos. Además, se ha demostrado que enteropatógenos como *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*, pueden contaminar y sobrevivir en diversos tejidos de la planta. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la introducción de bacterias del género *Bacillus* aisladas del interior de *Lycopersicon esculentum*= *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* “Tinguraque” podía inhibir el establecimiento de *Salmonella* spp. dentro de los tejidos de la papa cultivada *in vitro*. Para ello se emplearon bacterias del género señalado que mostraron antagonismo a enteropatógenos del hombre. Inicialmente se comprobó que tanto las bacterias aisladas del “Tinguraque” como *Salmonella* spp. se asocian a las raíces y tejidos de papa propagada *in vitro*. De igual manera se comprobó que las plantas inoculadas con la especie de *Bacillus* aislada, inhibió de manera altamente significativa ($P < 0.01$), el establecimiento de *Salmonella* spp, en el interior de la papa cuando se inoculó en condiciones asépticas a concentraciones de 1×10^7 UFC/cm³ al agar soporte de la radícula del vegetal.

ABSTRACT

Epidemic outbreaks of intestinal infection caused by *Salmonella* spp, are one of the problems of health more common anywhere in the world and especially in underdeveloped countries. Being the vegetables that are consumed in crude, potential vehicles for these pathogenic microorganisms transmit the man. The procedures of disinfection commonly used, can be inefficient to eliminate *Salmonella* spp, as much in the roots, as in the leaves or the fruits, which suggests these microorganisms are located in protected microhabitats or in the surface or inner weaves. In addition, one has demonstrated that enteropatógenos like enteric *Salmonella* and *Escherichia coli*, can contaminate and survive in diverse weaves of the plant. By previous, the objective of this work it was to evaluate if the introduction of bacteria of the *Bacillus* sort isolated of the interior of *Lycopersicon esculentum*= *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* "Tinguraque" could inhibit the establishment of *Salmonella* spp. within weaves of the worked potato test-tube. For it bacteria of the indicated sort were used that they showed antagonism enteropatógenos of the man. Initially it was verified that as much the isolated bacteria of the "Tinguraque" like *Salmonella* spp. they could be associated to the roots and weaves of propagated potato test-tube, finally, it was verified that in the plants inoculated with the species of isolated *Bacillus*, the establishment of *Salmonella* in internal weaves of the potato when inoculated in aseptic conditions to concentrations of 1×10^7 UFC/cm³ to the agar has supported of root of the vegetable, to the being compared with different treatments stayed out highly significantly ($P < 0.01$).

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Vegetales crudos y contaminación con enteropatógenos

Debido a su apreciable contenido en vitaminas, fibra dietética, antioxidantes y su baja aportación calórica, los vegetales son ampliamente recomendados como parte de la dieta diaria. No obstante, una serie de prácticas en torno a su producción, cosecha y comercialización, hacen que este grupo de alimentos se convierta en vehículo potencial de microorganismos patógenos especialmente cuando se consumen crudos (Zeigler, 1993; Castro *et al.*, 2006).

Las verduras crudas pueden contaminarse por fuentes diversas dentro de las que destacan: el uso de agua de riego contaminada, el suelo de cultivo, los abonos de origen animal, el aire, los instrumentos y equipo para las labores de campo, los recipientes y utensilios, los materiales de transporte o el manejo humano (Whitfield, 1998).

La contaminación microbiológica de estos alimentos, toma mayor importancia cuando se consumen frescos sin cocinar, considerando que el tiempo de sobrevivencia de los microorganismos patógenos puede ser prolongado (semanas o meses) (Feahmen, 1983), particularmente cuando los microorganismos están en las áreas del vegetal más húmedas, protegidas de la desecación y de los rayos directos del sol, como ocurre en la lechuga, repollo, zanahoria y rábano (Shuval *et al.*, 1986).

Diversos estudios de campo y laboratorio, han mostrado que los patógenos inoculados en la tierra de cultivo o en las aguas de irrigación de vegetales pueden sobrevivir hasta por dos meses, período suficiente para que alcancen en forma viable al consumidor (Feahmen, 1983).

Actualmente existe una preocupación a nivel mundial por la eliminación de enfermedades gastrointestinales, que en muchas ocasiones son causadas por consumir alimentos mal desinfectados (Santos y Torres, 2006).

Las epidemias de infección intestinal por *Salmonella* spp son uno de los problemas más comunes en todo el mundo, principalmente en países en desarrollo (Navarrete y Santo, 1998; Temporado *et al.*, 1997), constituyendo un problema de salud pública. Se estima que cada año ocurren en los Estados Unidos de América (EUA) entre 800 000 y 4 millones de infecciones por *Salmonella*, de las cuales alrededor de 500 son fatales (Glynn *et al.*, 1998). El costo total de la salmonelosis humana se calcula en 3 mil millones de dólares anuales en EUA (<http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/>).

En México este tipo de infecciones se han notificado de manera ocasional, aunque se cree que la frecuencia es mayor, debido al escaso control que se tiene en la manufactura y distribución de alimentos (Molina *et al.* 1997). En general se ha estimado que el número de enfermedades de origen microbiano transmitidas por alimentos asciende a 200 millones por año (Fernández, 2000).

Aunque limitados, se tienen algunos reportes de la presencia de *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp. en diferentes verduras que se expenden en mercados públicos de las ciudades de Puebla (Castro *et al.*, 2006), México (Castro *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 1996) y Guadalajara (Torres *et al.*, 1996; 1997). Sin embargo, en atención a la forma como se cultivan, cosechan, transportan y comercializan las verduras, es de esperarse la presencia de microorganismos patógenos en ellas (Castro *et al.*, 2006).

1.2 El género *Salmonella*

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, integrada por bacilos cortos Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos. Poseen,

por lo tanto, las características generales de las enterobacterias, entre otras; fermentadores de glucosa, catalasa positivos, oxidasas negativos y móviles; siendo una excepción *Salmonella gallinarum*, siempre inmóvil (Leminor, 1992; Miller y Pegues, 2000).

Frecuentemente se utiliza la nomenclatura recomendada por el Centro de Referencia e Investigación de *Salmonella* de la Organización Mundial de la Salud en el Instituto Pasteur (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*) que acorde con los hallazgos genéticos describe dos subespecies distintas: *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*. Cada una contiene a su vez varias serovariedades (serotipos) definidas por su expresión antigénica. *Salmonella enteritidis*, *S. typhi* y *S. typhimurium* son en la actualidad serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*. (Leminor, 1992; Brenner *et al.*, 2000; Euzéby, 1999).

El género *Salmonella* causa diversas manifestaciones clínicas en el humano como son fiebres entéricas, gastroenteritis, septicemia, infecciones localizadas, y estado de portador crónico (Acha y Szyfres 2001; Pegues *et al.*, 2002). Para este patógeno se ha determinado que la población mínima de microorganismos capaz de producir enfermedad está entre 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC). El número de gérmenes puede ser menor si hay cierta neutralización o disminución de jugo gástrico como en el caso de comidas, uso de antiácidos, gastritis atrófica o pacientes gastrectomizados (Ossa, 2000).

Los procedimientos de desinfección que eliminan bacterias, pueden ser ineficientes para eliminar *Salmonella* spp en brotes o en hojas, lo que sugiere que estas bacterias se encuentran localizadas en un microhabitat protegido (Cooley *et al.*, 2003).

Se han realizado investigaciones sobre control biológico de *Salmonella* spp., en las cuales se ha publicado que la micro flora nativa establecida en el alimento puede tener características inhibitorias contra la contaminación por patógeno establecidos en los alimentos por competencia o antibiosis, contra el patógeno (Anderson, *et al.*, 2002; Leistner y Gorris, 1995; Schuenzel y Harrison, 2002;

Leverentz *et al.*, 2006). En este sentido, algunas bacterias, tales como las del género *Pseudomonas*, así como levaduras, se han identificado y comercializado para el control de hongos en las frutas postcosecha (Janisiewicz y Korsten, 2002). Las levaduras pueden controlar el decaimiento del producto postcosecha ocasionado por hongos que se internan en el tejido lesionado (Janisiewicz 1987; Wilson y Wisniewski, 1989; Jijakli *et al.*, 1993; Janisiewicz 1998; Droby *et al.*, 1998; Leverentz *et al.*, 2000). Aunque los mecanismos moleculares involucrados en el proceso no están todavía, completamente elucidados, la secreción de enzimas degradadoras de pared celular, la competencia por nutrientes potenciada por la secreción de una matriz extracelular, y las toxinas producidas, constituyen posibles mecanismos de lucha biológica. Con respecto al uso de levaduras, existen escasos informes sobre su aplicación en alimentos, como agentes de control para patógenos humanos bacterianos (Janisiewicz, 1987; Deak y Beuchat, 1996; Liao y Fett, 2001). Algunos señalan inclusive que hay levaduras que exacerban el crecimiento del patógeno en el producto procesado, esto debido al incremento del pH (Wade *et al.*, 2003). Cabe resaltar que seleccionando por su inocuidad algunas levaduras y bacterias con actividad antagonista hacia patógenos, pudieran ser útiles para aplicarse para la seguridad alimentaria (Deak y Beuchat, 1996; Janisiewicz *et al.*, 1999; Leverentz *et al.* 2002; Leverentz *et al.*, 2006). De igual manera los microorganismos señalados, pueden disminuir la capacidad de crecimiento del patógeno en los alimentos, mediante la competencia por ellos (Liao, 1999; Campo *et al.*, 2001).

Otros mecanismos que se han señalado para controlar patógenos en los alimentos incluyen la reducción del pH (Brashears y Durre, 1999), así como en el uso de bacterias que producen como metabolito al ácido láctico o que compiten por sustrato y espacio (Geisen, 1999; Spadaro *et al.*, 2002; Spadaro *et al.*, 2004). Los lactobacilos también producen sustancias inhibitorias de bacterias denominados bacteriocinas (Ganzle *et al.*, 1999; Laukova *et al.*, 2000) los cuales son péptidos o estructuras proteicas y pueden actuar como agentes de biocontrol (Reuter, 2001). De igual forma se ha reportado el uso de bacteriófagos como método de control de patógenos humanos presentes en vegetales frescos (Leverentz *et al.*, 2002; Leverentz *et al.*, 2006). Sin embargo, el efecto inhibitorio de estos microorganismos utilizados como agentes de competencia biológica,

llega a ser evidente a partir de 2 a 5 días de almacenaje y solamente actúan en la superficie de los vegetales, (Leverentz *et al.*, 2006), mientras que los microorganismos patógenos podrían encontrarse residiendo en el interior, protegidos ya por las estructuras vegetales.

1.3 Microorganismos endófitos

Los microorganismos endófitos comprenden a los hongos y bacterias que viven sin causar daño en el interior de células o tejidos de plantas superiores durante una parte de su ciclo de vida (Quispel, 1992; Kado, 1992; Kobayashi y Palumbo 2000).

El primero en observar microorganismos residiendo en el interior de las plantas fue Pasteur en 1870 determinando que cursaban en forma asintomática para su huésped (Hallman *et al.*, 1997). La palabra endófito se deriva del griego *endon*, que significa dentro y *phyte* que significa planta. De Bary fue el primero en utilizar este término, en el año 1866, (Petrini, 1986) al referirse a hongos viviendo dentro de los tejidos de una planta.

En la década de 1940, se obtuvieron numerosos informes del aislamiento de bacterias endófitas de diversos tejidos vegetales, entre los cuales destacan; semillas, óvulos, tubérculos, raíces, tallos, hojas y frutos. Sin embargo en la década de 1950 aún se publicaban trabajos en los que se concluía que su existencia era el resultado de una mala desinfección superficial (Hallman *et al.*, 1997).

A través de los años, se han propuesto diferentes definiciones para las bacterias endófitas, sin embargo se coincide en que aun colonizando tejidos internos de los vegetales les son asintomáticas (Petrini 1991; Hallmann *et al.*, 1997; Schulz y Boyle, 2006), y que además pueden ser aisladas en la superficie de los vegetales desinfectados o de su interior (Hallmann *et al.*, 1997).

Las bacterias endófitas entran en el tejido vegetal sobre todo en la zona de la rizosfera (Agarwal y Shende, 1987; Gagne *et al.*, 1987; Sevilla y Kennedy, 2000); sin embargo, también pueden penetrar (Kobayashi y Palumbo, 2000) por las aperturas naturales aéreas de plantas, tales como flores, tallos, cotiledones, estomas (Roos y Hattingh 1983), o a través de daño foliar (Leben *et al.*, 1968).

Habitualmente, las bacterias entran en tejidos a través de las grietas que se forman en los puntos de emergencia de las raíces laterales, colonizando las radículas, así como las uniones de las raíces principales y secundarias, posteriormente los espacios intercelulares de la raíz, el parénquima y células corticales, algunos penetrando al cambium para alcanzar al tejido vascular incluyendo al de hojas y tallos (James *et al.*, 2002).

Dentro de una planta, las bacterias endófitas se localizan cerca del punto de entrada o dispersas dentro de ella (Hallmann *et al.*, 1997), ya que se han aislado de toda la planta incluyendo las semillas (Posada y Vega, 2005). Las preferencias de ubicación en sitios específicos, parece ser característico de compatibilidad especie-cepa (Hallmann *et al.*, 1997).

Las bacterias endófitas se localizan principalmente en la zona cortical de la raíz de la mayoría de las plantas, ya sea de manera latente o activa; pueden localizarse en los espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular (Fig. 1) (Quispel, 1992; Reinhold y Hurek, 1998; Bacon *et al.*, 2001). La asociación de las bacterias endófitas con su hospedero puede ser mutualista y llegar hasta el umbral de un organismo patógeno en estado de latencia (Strobel y Long, 1998).

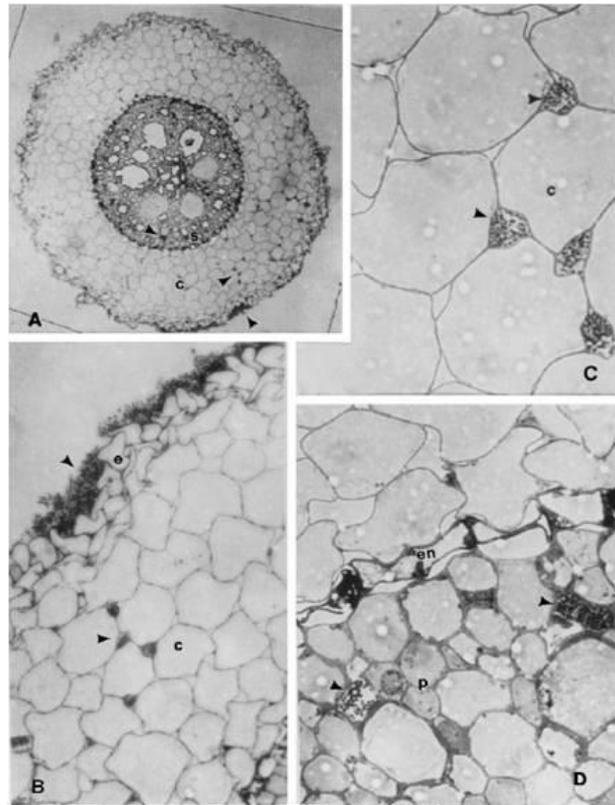


Figura 1. Bacterias endófitas. Micrografía de raíz primaria donde se observan bacterias residiendo en el interior de plantas. A) Demuestra su organización en epidermis moviéndose hacia adentro a la corteza (c) y finalmente en el estele (s). B) Sección de la figura A agrandada para demostrar las bacterias (flecha) situadas sobre la epidermis y bacterias situadas dentro de los espacios intercelulares de la corteza. C) Demuestra la localización intercelular de las células bacterianas, flechas. D) Las células del estele muestran bacterias en la flecha al lado de las células primarias del floema (p) apenas debajo de los endodermis (tomado de Bacon et al., 2001).

Las bacterias endófitas han sido aisladas de una gran diversidad de plantas (Sturz y Matheson., 1996), donde se han encontrado tanto endófitos bacterianos Gram positivos como Gram negativos aislados de diferentes tejidos. Además, diversas especies bacterianas se han aislado de una sola planta (Kobayashi y Palumbo, 2000; Strobel *et al.*, 2004).

1.4 La asociación bacteria-planta

Existen alrededor de 300,000 - 500,000 variedades de plantas superiores, por lo que la cantidad de hongos y bacterias asociadas a ellos debe estimarse en valores superiores, con una extensa diversidad de bacterias endófitas (Strobel y Long, 1998) con posibilidad de ser empleados en agrobiotecnología. Especies de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Erwinia* y *Xanthomonas* han sido aislados frecuentemente de diversos vegetales (Muñoz y Caballero en Martínez y Martínez 2001).

Sobre el empleo de bacterias para controlar patógenos del suelo, se han realizado muchos trabajos y resúmenes (Chang y Kommedahl, 1968; Cooksey y Moore, 1982; Liang *et al.*, 1982; Geels y Schippers, 1983; Weller, 1988; Cook, 1990; Gutterson, 1990; De Freitas y Germida, 1991; De la Cruz *et al.*, 1992; Laville *et al.*, 1992; Lemanceau *et al.*, 1992;). Desde 1965 el interés y la investigación en esta área se ha incrementado (Cook y Baker, 1983; Baker, 1987) como se refleja en el número de libros (Baker y Cook, 1974; Papavizas, 1981; Chet, 1987; Weller, 1988;) y revisiones acerca del tema (Baker, 1968; Brown, 1974; Moore, 1979; Papavizas y Lumsden, 1980; Schroth y Hancock, 1981; Schroth y Hancock, 1982; Suslow, 1982; Burr y Caesar, 1984; Jatala, 1986). Actualmente ha cambiado la opinión sobre el control biológico y su importancia en la agricultura del futuro y esto ha motivado el desarrollo de programas para la búsqueda de microorganismos para ese fin. Este renovado interés en el uso de la lucha biológica para combatir plagas se debe en parte a la preocupación pública sobre los efectos nocivos asociados al uso de plaguicidas químicos.

De entre los microorganismos asociados a los vegetales, los que crecen en la rizosfera son ideales para usarse como agentes controladores, puesto que es en dicha zona donde se ubica la línea frontal de defensa para las raíces, contra la invasión de microorganismos que habitan el suelo además de ser la fuente de origen principal para las bacterias endófitas. En los últimos 20 años, varios ejemplos de bacterias capaces de brindar un control substancial de las enfermedades en campo han sido reportados. Estos recientes éxitos en el control

biológico contrastan con los resultados obtenidos al principio del siglo pasado (Weller, 1988), lo anterior en parte por el mayor conocimiento de la rizosfera y la complejidad de las interacciones que en ella ocurren.

Las bacterias endófitas forman parte de la gran cantidad de bacterias benéficas presentes en la rizosfera, que favorecen el desarrollo de las plantas y las protegen contra organismos del suelo que causan enfermedades (Weller, 1988; Hallmann *et al.*, 1997).

La diversidad y número de bacterias rizoféricas es muy grande, lo cual ocasiona que en este ambiente exista una fuerte competencia por los nutrientes, en donde su disponibilidad es limitada. Sobre esta base se ha considerado que las bacterias endófitas tienen ventajas sobre las bacterias rizoféricas, ya que la disponibilidad de nutrientes es mayor en el interior de las plantas y el número de microorganismos endófitos es menor que el de los rizoféricos (James, 2000). Por otro lado, las bacterias endófitas se encuentran mejor protegidas hacia condiciones adversas en relación a las rizoféricas, ya que aún siendo la rizosfera un biotopo rico en nutrientes en relación al suelo en general, estos son siempre fluctuantes y heterogéneos (Reinhold y Hurek, 1987).

Por otra parte, las bacterias endófitas podrían brindar beneficios más directos a su hospedero al contrastarse con las bacterias rizoféricas. Por ejemplo, podrían excretar fitohormonas en el interior de las plantas y protegerlas contra la acción de los fitopatógenos (Weller, 1988; Hallmann *et al.*, 1997). Se ha demostrado que algunas fitohormonas, como el ácido indol acético, producido por los microorganismos rizoféricos inducen un aumento de la superficie de la raíz, permitiendo a la planta una mayor absorción de nutrientes (Okon y Labandera, 1994).

También puede brindarse protección a través de la producción de sustancias que inhiben el crecimiento de los patógenos (Muthukumarasamy *et al.*, 2000) o bien, por el desencadenamiento de una respuesta de defensa de la planta en contra de patógenos promovida por el endófito, en forma similar a la que se observa con algunas rizobacterias (Pieterse *et al.*, 1999). Al respecto se han

publicado trabajos demostrando que los microorganismos endófitos pueden tener la capacidad de controlar patógenos de las plantas (Sturz y Matheson, 1996; Duijff *et al.*, 1997; Krishnamurthy y Gnanamanickam, 1997), insectos (Azevedo *et al.*, 2000) y nematodos (Hallmann *et al.*, 1997, 1998). Bacterias, que pertenecen mayormente a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, son antagonistas de importantes patógenos de la raíz en muchos cultivos de importancia económica (Schroth y Hancock 1982; Hallmann y Berg 2006).

Varios patógeno bacterianos oportunistas incluyendo *Burkholderia*, *Enterobacteria*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Stphyilococcus* y *Stenotrophomonas* se han identificado como colonizadores de la rizosfera de la planta (Berg *et al.*, 2005). En la diversidad de los suelos se encuentran muchos endófitos facultativos como especies rizosféricas o bacterias adaptadas para vivir *in planta*, que pueden incluir patógenos oportunistas de humanos o animales.

Es importante mencionar que algunos patógenos humanos tales como *Salmonella* spp han sido aislados como endófitos en brotes de alfalfa, desde 1995 en Estados Unidos, Asia y Europa (Ponka *et al.*, 1995). Se ha demostrado que enteropatógenos como *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*, pueden crecer dentro de la planta (Taormina *et al.*, 1999; Charkowski *et al.*, 2002; Cooley *et al.*, 2003). Lo que explicaría en parte el que, tanto los métodos de desinfección superficial como el cloro, el uso de bacterias antagonistas que crecen en la superficie de vegetales (Leistner y Gorris, 1995; Anderson *et al.*, 2002; Schuenzel y Harrison; 2002; Leverentz *et al.*, 2006), así como el uso de bacteriófagos (Leverentz *et al.*, 2002; Leverentz *et al.*, 2006), no sean eficientes para eliminar enteropatógeos presentes en vegetales que se consumen crudos ya que se encontrarían protegidos por las estructuras vegetales.

1.5 El género *Bacillus*

El género *Bacillus* incluye una amplia variedad de especies Gram-positivas, inocuas para el hombre, con propiedades antagónicas hacia otros microorganismos. Son buenas secretoras de proteínas y metabolitos, fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades (Berg y Hallmann, 2006). Los mecanismos de acción de *Bacillus* spp incluyen competencia por espacio y nutrientes (Handelsmann y Stabb, 1996), antibiosis (Loeffler *et al.*, 1986) e inducción de resistencia (Kloepper y Ryu, 2006). Además son promotoras del crecimiento de los vegetales (Kloepper *et al.*, 2004). La capacidad de *Bacillus* spp de formar esporas que sobreviven y permanecen metabólicamente activas bajo condiciones adversas (Rodgers, 1989), las hace apropiadas para la formulación de productos estables a nivel de campo y así emplearlos en el control biológico. *B. subtilis* es uno de los microorganismos más eficientes en este nicho ecológico, el cual exhibe actividad antagónica contra varios hongos y bacterias fitopatógenos. Este antagonismo se ha atribuido a la producción de antibióticos y a la capacidad de colonizar diferentes microhábitats en la planta (Loeffler *et al.*, 1986; McKeen *et al.*, 1986; Bochow y Gantcheva, 1995).

Para considerar un microorganismo endófito como potencial agente para control biológico se requieren ciertas características. En primer lugar, que no sea patógeno para los vegetales, hombre o animales. Debe tener una elevada capacidad de colonización y reproducción en los tejidos internos después de su inoculación en las plantas, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora presente en los cultivos (Schippers *et al.*, 1987; Weller, 1988; Lugtenberg y Dekkers, 1999). También es muy importante que tenga la capacidad de reproducirse abundantemente en condiciones *in vitro* para asegurar su reproducción y conservación (Cook, 1993; Hernández y Escalona, 2003).

1.6 La familia Solanaceae

Las solanáceas (Solanaceae Juss.) conforman a una familia de plantas herbáceas o leñosas con las hojas alternas, simples y sin estípulas pertenecientes al orden Solanales, de las dicotiledóneas (Magnoliopsida). Comprende aproximadamente 98 géneros y unas 2700 especies, con una gran diversidad de hábito, morfología y ecología. La familia es cosmopolita, distribuyéndose por todo el globo con la excepción de la Antártida. La mayor diversidad de especies se halla en América del Sur y América Central (Olmstead *et al.*, 1999; Olmstead y Bohs, 2007).

En esta familia se incluyen especies alimenticias tan importantes como la papa o patata (*Solanum tuberosum*), el jitomate (*Solanum lycopersicum*), la berenjena (*Solanum melongena*) y los ajíes o pimientos (*Capsicum*). Muchas plantas ornamentales muy populares pertenecen a las solanáceas, como *Petunia*, *Schizanthus*, *Salpiglossis* y *Datura*. Las solanáceas incluyen muchos organismos modelo para investigar cuestiones biológicas fundamentales a nivel celular, molecular y genético, tales como el tabaco, la petunia y la papa (Olmstead *et al.*, 1999; Olmstead y Bohs, 2007).

Investigaciones moleculares, han demostrado que el jitomate y la papa están filogenéticamente muy relacionados y apoyan la inclusión del jitomate dentro del género *Solanum*, que anteriormente había sido controvertida, creando una nueva denominación *Solanum* sección *Lycopersicum* (Spooner *et al.*, 1993); en consecuencia, la mayoría de los taxónomos han adoptado a *Solanum* como el nombre genérico del jitomate (Peralta *et al.*, 2005).

La mayoría de las especies de las que fueron seleccionadas las plantas cultivadas continúan sobreviviendo en condiciones silvestres, al igual que otras especies estrechamente relacionadas con ellas. Este complejo silvestre constituye los parientes silvestres de los cultivos, los cuales han evolucionado para sobrevivir a condiciones adversas que comúnmente causan daños de importancia económica a los cultivos afines (Hoyt, 1992; Eigenbrode *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1997).

Entre los parientes silvestres del jitomate en Michoacán se puede encontrar, el tomate silvestre, *Lycopersicon esculentum*= *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* es conocido como “Tinguaraque” el cual se desarrolla bajo

condiciones adversas de humedad, y presumiblemente es tolerante a plagas y enfermedades (Eigenbrode y Trumble, 1993; Pérez et al., 1997; Sánchez-Peña et al., 2006). Por lo que puede constituir una buena fuente de bacterias endófitas que le ayuden a tolerar estas adversidades.

1.7 La planta de papa como modelo de investigación

La papa, al igual que el jitomate, es originaria de América del Sur y es cultivada en todo el mundo por sus tubérculos comestibles. *S. tuberosum* es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia (ya que pierde sus hojas y tallos aéreos en la estación fría), de tallo erecto o semi-decumbente, que puede medir hasta 1 m de altura (Dimitri, 1987).

Las hojas son compuestas, con 7 a 9 folíolos (imparipinnadas), de forma lanceolada y se disponen en forma espiralada en los tallos. Son bifaciales, ambas epidermis están compuestas por células de paredes sinuosas en vista superficial. Presentan pelos o tricomas en su superficie, en grado variable dependiendo del cultivar considerado. Los tricomas pueden ser uniseriados, glandulares y con una cabeza pluricelular más o menos esférica. Presentan tres tipos de tallos, uno aéreo, circular o angular en sección transversal, sobre el cual se disponen las hojas compuestas y dos tipos de tallos subterráneos: los rizomas y los tubérculos.

Después del éxito de Morel, alrededor del año 1965, en la multiplicación de orquídeas *in vitro*, se incrementó el interés por las técnicas de cultivo de tejidos como alternativas para la propagación asexual de plantas de importancia económica. Esta premisa hizo que la papa llegara a establecerse como una de las especies tradicionales de multiplicación por medio de estas técnicas. La obtención de plantas libres de patógenos y con una alta pureza varietal, que asegura a los productores un incremento en el rendimiento y una buena calidad del producto, fueron las razones más importantes para la implementación del cultivo *in vitro* en

esta especie (CIAT, 1991; Flores *et al.*, 2002). Las mismas características hacen que además sea muy utilizada para la investigación.

La papa es una importante planta modelo. A pesar de que otras plantas no cultivadas, tales como *Arabidopsis thaliana*, ofrecen ciertas ventajas para la investigación, tales como presencia de genomas simples, pequeños y ciclo de vida corto, no pueden ofrecer respuestas para las preguntas más pertinentes desde el punto de vista de la agricultura. En este contexto, la papa presenta varios aspectos biológicos que la hacen un modelo muy atractivo para su estudio. Como muchos otros cultivos tales como el maíz, el trigo o la soya, la papa es un poliploide. El efecto de la poliploidía sobre la productividad de los cultivos todavía no ha sido determinado, pero su prevalencia entre las especies cultivadas indica que debe presentar evidentes ventajas. (The NSF potato genome project 2008). Otros aspectos que hacen ideal a la papa como modelo de investigación son: sus requerimientos nutricionales básicos, su rápido crecimiento y la posibilidad de trabajar *in vitro* en condiciones de asepsia.

Por todo lo anterior el objetivo del presente trabajo fue demostrar que la introducción de bacterias aisladas de *Lycopersicon esculentum*= *Solanum lycopersum* var. *Cerasiforme* "Tinguraque" puede impedir el establecimiento de *Salmonella* sp. en Solanáceas utilizando la papa como modelo de investigación.

2. OBJETIVO

Demostrar que la introducción de bacterias del género *Bacillus* sp. puede impedir el establecimiento de *Salmonella* sp. dentro de los tejidos radiculares de solanáceas utilizando la papa cultivada *in vitro* como planta modelo.

Objetivos particulares

Confrontar *in vitro* bacterias del género *Bacillus* sp. aisladas de *Lycopersicon esculentum*= *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* "Tinguaraque", con *Salmonella* sp. para seleccionar a las de mejores características de antagonicidad hacia el patógeno.

Identificar las colonias aisladas.

Realizar pruebas de asociación tanto de *Bacillus* sp. como de la *Salmonella* sp. con las plántulas de papa *in vitro* para demostrar que pueden colonizar la planta.

Determinar si la inoculación de *Bacillus* sp. impide el establecimiento de la población de la enterobacteria seleccionadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepa bacteriana del género *Salmonella* fue proporcionada por el Instituto Nacional de Referencia y Epidemiológicos (INDRE); esta se cultivó en cajas Petri con medio Agar-papa-dextrosa (PDA) (apéndice I) a 36° C durante 24 h y fueron almacenadas en refrigeración a 4°C, para posteriormente realizar las pruebas de confrontación con bacterias endófitas aisladas de las plantas silvestres colectadas.

3.1 Aislamiento de bacterias del género *Bacillus* sp. antagonistas a *Salmonella* sp.

Las bacterias del género *Bacillus* sp. antagonistas fueron aisladas de plantas ubicadas en la región Ciénega de Chapala localizada entre los estados de Michoacán y Jalisco. La cual está integrada por una zona plana, originada en parte por la desecación parcial del lago de Chapala . Su precipitación promedio anual es de 728 mm, iniciándose la época de lluvias en mayo y finalizando en octubre. Su temperatura media es de 14.9°C y actualmente en dicha región se practica la agricultura.

Los especímenes vegetales muestreados conocidos regionalmente como “Tinguarque” se obtuvieron retirando del suelo plantas completas, cuidando de retener el suelo adherido a la raíz, fueron trasladadas al laboratorio en bolsas de plástico para el aislamiento de bacterias, proceso realizado mediante tres diferentes técnicas inmediatamente después del arribo de las muestras al laboratorio.

Primera técnica

La técnica fue realizada en condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar de la siguiente manera: con suelo rizosférico, extendido sobre una hoja de papel limpio se realizó la técnica de la impronta, en la cual se empleó un cilindro de esponja estéril de 2 cm. de diámetro, por 5 de longitud. Se tomó con la esponja a manera de sello, un poco del suelo. Las partículas de suelo colectadas en la esponja se descargaron 4 o 5 veces en cada caja sin encimar sobre medio agar papa-dextrosa (medio PDA). Las cajas se incubaron a 21° C por al menos 4 días, para después aislar las colonias bacterianas que formaron halos de inhibición a su alrededor, sobre los microorganismos que se desarrollaron conjuntamente.

Segunda técnica

En esta técnica se usaron fragmentos de tejido de las plantas colectadas. Para ello, inicialmente se eliminó el exceso de suelo en la planta mediante un lavado con agua jabonosa y posterior enjuague con agua corriente. Posteriormente las plantas se sometieron a un proceso de aseptización dentro de una campana de flujo laminar. Primeramente se obtuvieron cortes de 5 mm a partir de la base del tallo y hacia abajo tomando más de la mitad de esta estructura y se sumergieron en una solución de alcohol al 50% durante un minuto, seguidos de una inmersión en hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) al 50% por 5 minutos, finalmente se enjuagó en cinco ocasiones con agua destilada estéril, por alrededor de un minuto para eliminar el exceso de cloro. Los cortes seleccionados se sembraron de manera aséptica en cajas de Petri con medio PDA, las cuales fueron incubadas a 20° C durante una semana.

Tercera técnica

La tercera técnica consistió en maceración de hojas lavadas y aseptizadas de la manera antes descrita, dentro de un homogenizador en 5 ml de agua peptonada y la siembra directa en la superficie del medio PDA para su incubación bajo las condiciones ya descritas.

3.2 Identificación del género *Bacillus*.

En las placas obtenidas con cualquiera de las técnicas empleadas, siempre se buscó la presencia de colonias con la morfología colonial típica del género *Bacillus*, es decir colonias de color blanquecino, borde lobulado, de superficie rugosa, mate a la luz reflejada y traslucida a la luz transmitida y de consistencia cremosa.

En el diagrama de flujo que se presenta a continuación (Figura 2) se esquematiza el procedimiento aplicado en el laboratorio para la identificación del género *Bacillus* (Schaad 1988).

Las bacterias que presentaron esta morfología, fueron confrontadas con las cepas bacterianas enteropatógenas sembrándolas simultáneamente en cajas de Petri con medio PDA. Se realizaron tres repeticiones por planta con cada género bacteriano.

Las cepas del género *Bacillus* que inhibieron a *Salmonella* sp. fueron aisladas en cajas Petri con medio PDA y almacenadas a 4° C para su uso posterior.

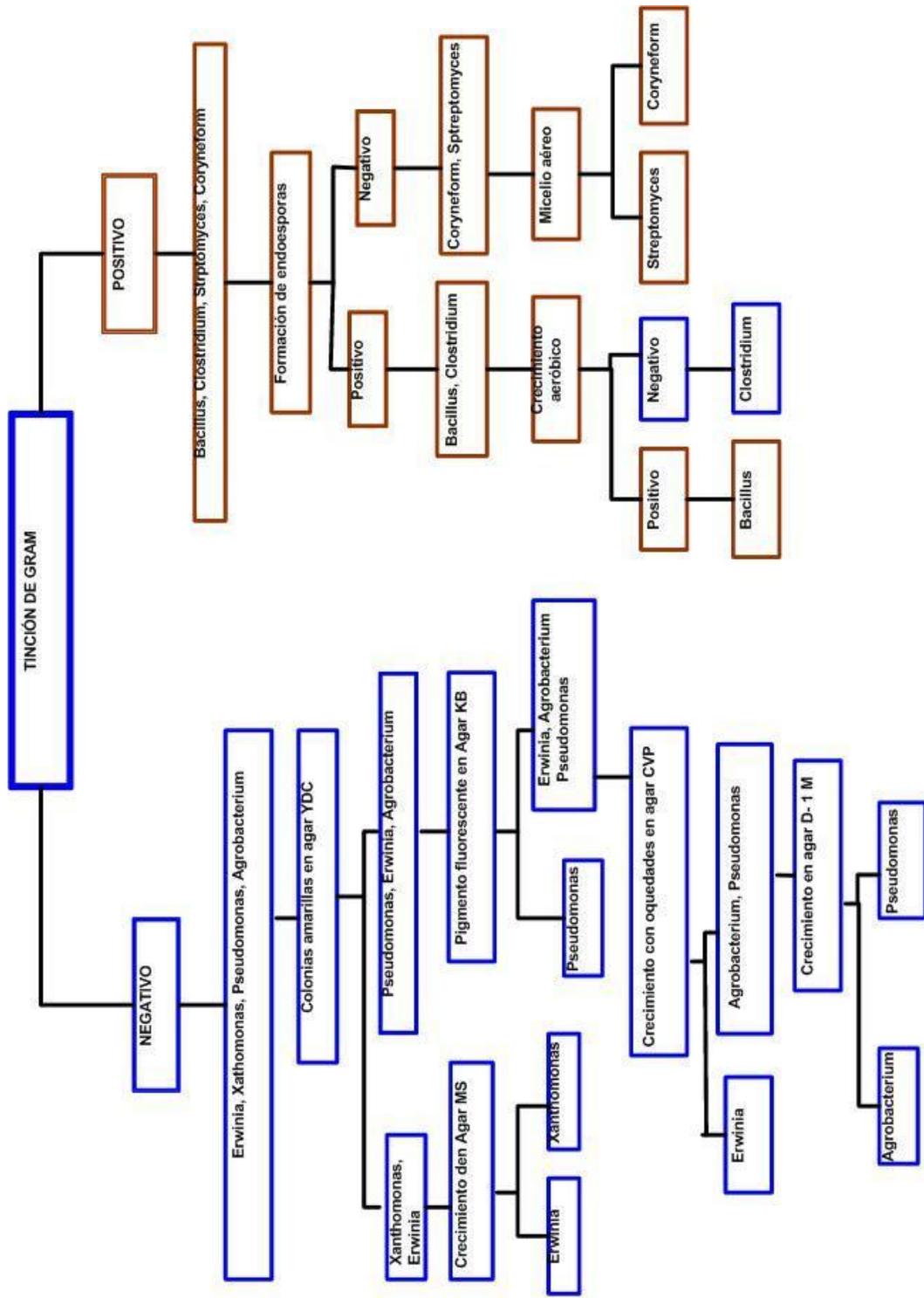


Figura 2. Identificación del género *Bacillus* sp.. Diagrama establecido por la Asociación Americana de Fitopatología Agrícola

3.3 Propagación de papa (Alfa) in vitro

En condiciones de asepsia se propagaron plántulas de papa variedad “Alfa” a partir de una línea establecida en el CIIDIR Michoacán. Para ello se eligieron plantas sanas, se aseptizaron con hipoclorito de sodio comercial al 50%, se enjuagaron en cinco ocasiones con agua destilada estéril por alrededor de un minuto para eliminar el exceso de cloro, se eliminaron las hojas y se realizaron cortes de tallos con dos entrenudos de longitud. Posteriormente se sembraron cinco cortes en frascos para cultivo de tejidos (Figura 3) conteniendo 20 ml de medio Murashige-Skoog (apéndice III) y se incubaron a 21°C manteniendo en fotoperiodo de 18 horas de luz por 6 de oscuridad dejando crecer hasta observar el desarrollo de raíces (14 días) así como el crecimiento de la planta.

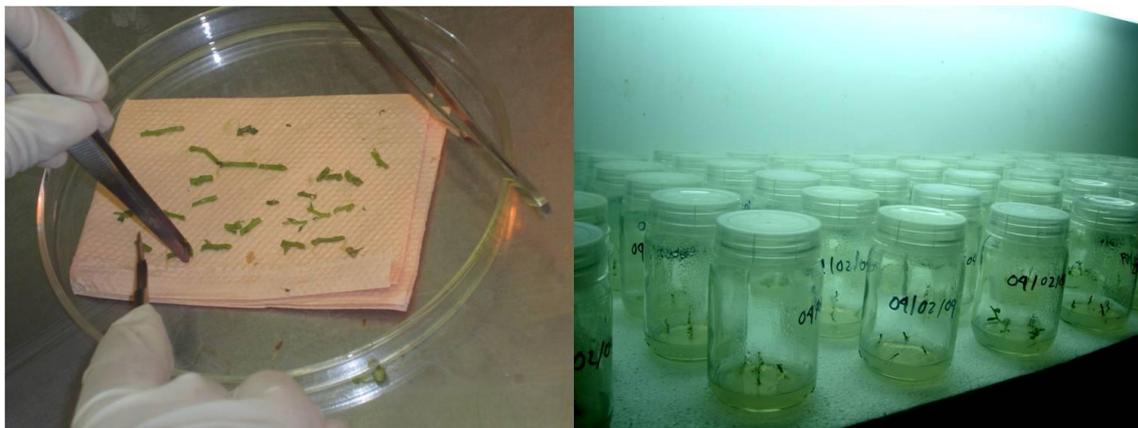


Figura 3 Propagación in vitro de la planta de papa.

3.4 Suspensión bacteriana para inoculación en plantas

Las cepas bacterias (tanto *Bacillus* como *Salmonella*) se hicieron crecer en diferentes matraces con 50 ml de medio Infusión papa dextrosa PDI (apéndice IV); en condiciones asépticas tomando 3 asadas; se colocaron las soluciones en agitación horizontal, a temperatura ambiente, durante 48 horas.

3.5 Prueba de asociación bacteria-planta.

Para conocer la concentración óptima de inóculo tanto de *Bacillus* sp. como de *Salmonella* sp., así como la mejor edad (estado de desarrollo de la planta), para lograr esta asociación, bajo la campana de flujo laminar se inocularon alícuotas de 1, 2, 4, 10 y 20 μL de las suspensiones que estuvieron en agitación durante 48 horas y que alcanzaron concentraciones del orden de 1×10^5 , ufc ml^{-1} , los inóculos se agregaron directamente sobre el medio (Figura 4). Se realizaron 10 repeticiones por concentración, empleando plántulas de papa con raíces de al menos 2 cm de longitud. Dichas plantas se mantuvieron en incubación a 21°C y fotoperiodo 18 horas de luz por 6 de oscuridad, durante 65 días, efectuando revisiones diarias, para observar el desarrollo de la planta y cuantificar la población bacteriana endófito. Esta última se realizó extrayendo la planta del medio de cultivo, posteriormente se lavó con agua corriente y se sumergieron en una solución de alcohol absoluto al 50% durante un minuto, seguidos de una inmersión en hipoclorito de sodio comercial (NaOCI) al 50% por 5 minutos, finalmente se enjuagó en cinco ocasiones con agua destilada estéril, durante un minuto para eliminar el exceso de cloro. Posteriormente, se maceraron en un homogenizador en 5 ml de agua destilada y se sembró todo ese volumen de manera aséptica en cajas de Petri con medio PDA, las cuales fueron incubadas durante 48 horas para su lectura.

La asociación bacteriana también se pudo apreciar ópticamente como una película adherida a las raíces de la planta (plantas bacterizadas). Las pruebas de asociación se realizaron a diferentes tiempos (40, 45, 48, 50 y 55 días) de la propagación *in vitro* para las dos cepas figura 4.

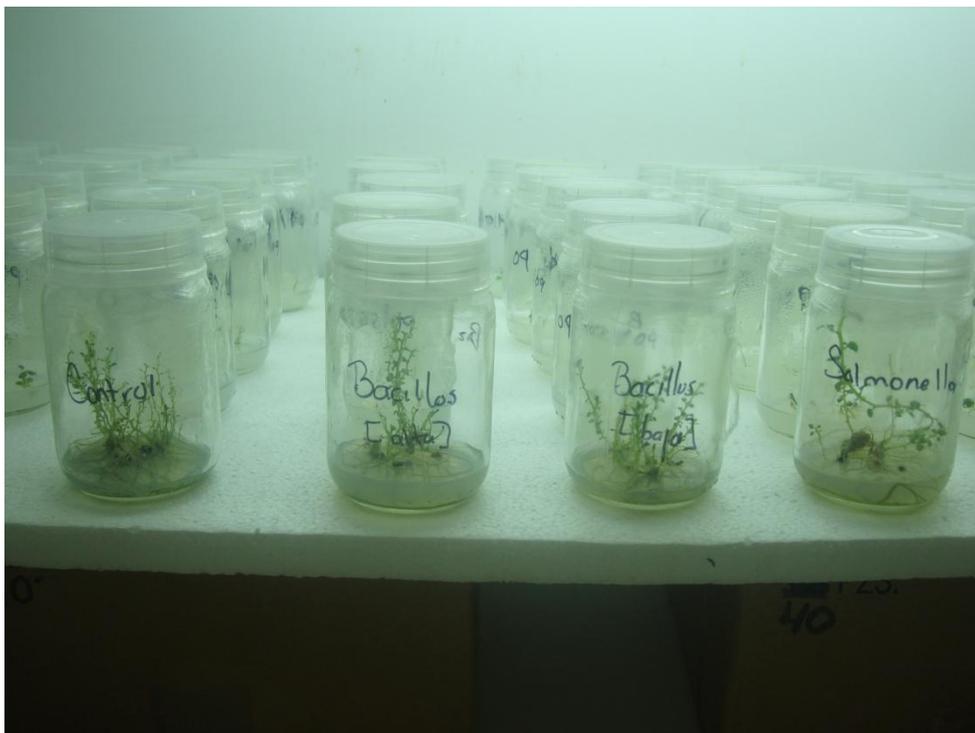


Figura 4 Prueba de asociación bacteria-planta

3.6 Tratamientos para la prueba de inhibición de establecimiento de *Salmonella* sp.

Una vez establecidas las bacterias y para probar que las plantas asociadas con *Bacillus* sp. podían impedir el establecimiento de *Salmonella* sp., en condiciones de asepsia trasplantando plántulas de papa a tubos de ensaye conteniendo 20ml de medio Murashige-Skoog (medio MS) (Murashige y Skoog 1962) (fig. 5) se realizaron los siguientes tratamientos:

T0.-Control Blanco.- 10 Plántulas sin inocular trasplantadas en medio MS. Conteo de UFC en vertida en placa con medio PDA.

T1.- Control positivo para *Bacillus* sp..- 10 Plántulas inoculadas con *Bacillus* sp. trasplantadas en medio MS. Conteo de UFC en vertida en placa con medio PDA.

T2.- Control positivo para *Salmonella* sp.- 10 Plántulas inoculadas con *Salmonella* sp. trasplantadas en medio MS. Conteo de UFC en vertida en placa con medio EMB (Agar Eosina y Azul de Metileno).

T3.- Planta inoculada con *Bacillus* sp vs *Salmonella* sp..-10 Plántulas inoculadas con *Bacillus* sp. trasplantadas en medio MS, el cual, fue inoculado con 5 ml (1×10^3 , ufc ml⁻¹) de *Salmonella* sp. Conteo de UFC en vertida en placa con medio PDA.

T4.- Planta inoculada con *Salmonella* sp. en *Bacillus* sp. vs *Salmonella* sp.10 Plántulas inoculadas con *Bacillus* sp. trasplantadas en medio MS, el cual, fue inoculado con 5 ml (1×10^3 , ufc ml⁻¹) de *Salmonella* sp. Conteo de UFC en vertida en placa con medio EMB.

T5.- Planta inoculada con *Salmonella* sp. vs *Bacillus* sp vs .-10 Plántulas inoculadas con *Salmonella* sp. trasplantadas en medio MS, el cual, fue inoculado con 5 ml (1×10^3 , ufc ml⁻¹) de *Bacillus* sp. Conteo de UFC en vertida en placa con medio PDA.

T6.- Planta inoculada con *Salmonella* sp. vs. *Bacillus* sp.10 Plántulas inoculadas con *Salmonella* sp. trasplantadas en medio MS, el cual, fue inoculado con 5 ml (1×10^3 , ufc ml⁻¹) *Bacillus* sp. Conteo de UFC en vertida en placa con medio EMB.



Fig.5 Trasplante de plántulas de papa en tubos de ensaye conteniendo medio Murashige-Skoog con los diferentes tratamientos inoculados en el medio

Posteriormente se llevaron a fotoperiodo en las mismas condiciones de la primera inoculación observándose a diario para verificar el desarrollo bacteriano.

Las cajas con medio PDA se incubaron a 25°C y las cajas con medio EMB a 37°C. Se observaron para cuantificación a las 24, 48 y 72 hrs.

3.7 Análisis estadístico

Análisis de resultados se realizó mediante la contrastación de medias por la prueba de Tukey

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de bacterias antagonistas a enteropatógenos

De las tres técnicas utilizadas para la obtención de bacterias antagónicas a enteropatógenos (impronta, corte de tallo y maceración de hoja) el aislamiento a partir del corte en tallo permitió obtener la cepa perteneciente al género *Bacillus* sp. que mostraba efecto de inhibición de crecimiento de *Salmonella* sp. en forma de halos de inhibición.

4.2 Suspensión bacteriana

De las concentraciones probadas de las cepas bacterianas de *Salmonella* sp. y *Bacillus* sp., para apreciar ópticamente la asociación bacteria-planta, la concentración óptima se obtuvo a las 48 hrs de incubación bajo las condiciones señaladas, en la que se alcanzó una concentración del orden de 1×10^5 ufc ml⁻¹. Siendo el inóculo mínimo, para lograr la infección bacteriana de las plántulas de papa por esta técnica el de 2 µL para ambas bacterias, detectándose la presencia del género *Bacillus* sp. en el interior de las plántulas después de 3 días de inoculación y para *Salmonella* sp. con esta concentración después de 7 días en la prueba por vertida en placa en el medio PDA.

4.3 Prueba de asociación bacteria-planta.

Las cepas de *Salmonella* sp. y *Bacillus* sp. inoculadas *in vitro* se asociaron a la raíz de la plántula de papa, observándose el desarrollo en la periferia de la raíz. *Salmonella* sp. al igual *Bacillus* sp que no tuvo ninguna complicación para

asociarse, la edad de la planta óptima para apreciar los mejores resultados fue la de las plántulas cultivadas *in vitro* de 48 días de edad.

4.4 Tratamientos para la prueba de inhibición de establecimiento de *Salmonella* sp.

En todos los tratamientos se observó desarrollo de colonias bacterianas en el medio aproximadamente a los 18 días del trasplante excepto para el control.

4.5 Prueba de inhibición de establecimiento de *Salmonella* sp. mediante maceración de plantas.

Los resultados de la prueba de inhibición de establecimiento de *Salmonella* sp. se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 1 Prueba de establecimiento de inóculos bacterianos en plantas de papa *in vitro* en diferentes medios y con distintos tratamientos.

T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SD	4.33X10 ⁵	7.65X10 ³	2.23X10 ³	53X10 ¹	1.08X10 ⁴	2.49X10 ²
SD	3.74X10 ⁴	3.97X10 ³	1.73X10 ⁴	SD	2.20X10 ⁴	6.67X10 ²
SD	7.73X10 ⁵	2.53X10 ³	3.37X10 ³	SD	3.14X10 ³	1.55X10 ²
SD	3.92X10 ⁴	6.24X10 ³	3.62X10 ³	SD	2.23X10 ³	7.25x10 ³
SD	5.64X10 ⁵	3.88X10 ⁴	1.54X10 ³	8X10 ¹	4.27X10 ⁴	2.44X10 ²
SD	6.54X10 ⁴	2.93X10 ³	2.34X10 ⁴	SD	1.28X10 ³	1.43X10 ²
SD	3.87X10 ⁵	1.83X10 ³	1.86X10 ³	SD	1.14X10 ⁴	3.52X10 ²
SD	6.89X10 ⁵	6.62X10 ⁴	1.27X10 ³	41X10 ¹	3.60X10 ⁴	1.61X10 ²
SD	5.46X10 ⁵	2.87X10 ³	3.82X10 ³	SD	3.23X10 ³	1.64X10 ³
SD	3.27X10 ⁵	7.86X10 ³	1.93X10 ⁴	SD	3.32X10 ⁴	3.25X10 ²
Media						
SD	3.86X10 ⁵	1.40X10 ⁴	7.77X10 ³	1 X10 ¹	1.65X10 ⁴	1.11X10 ³

Como se puede ver en el Cuadro 1 las plantas control (T0) no presentaron crecimiento bacteriano, lo que confirma las condiciones asépticas en las que se desarrolló el trabajo.

En el tratamiento T1 (Planta inoculada con *Bacillus* sp. vertida en medio PDA) se aprecia una buena asociación con la planta modelo con promedio del orden de 1x10⁵ UFC, lo cual puede reflejar el establecimiento favorable de la simbiosis entre ambos organismos.

El tratamiento T2 (Planta inoculada con *Salmonella* sp. vertida en medio EMB) por su parte, mostró una menor capacidad para establecer la simbiosis con la planta 1x10³.

En el tratamiento T3 se observan los conteos de las UFC, de ambas colonias compitiendo por un biotopo (el interior de una plántula de papa) con un promedio de UFC próximo a 1×10^3 .

El Tratamiento T4, Planta inoculada con *Bacillus* sp., trasplantada en medio inoculado con *Salmonella* sp., aseptizada y macerada la planta y después vertida en medio EMB, muestra la acción inhibitoria de *Bacillus* sp ya establecido endofíticamente sobre la cepa de *Salmonella* sp. que estaba desarrollándose en el medio, con una diferencia altamente significativa entre las medias poblacionales, ($P < 0.01$).

Los tratamientos T5 y T6, indican que cuando *Salmonella* sp. penetra antes que el *Bacillus*, este, aunque logra establecerse ya no logra eliminar la implantación de *Salmonella* sp. aunque el crecimiento de *Salmonella* sp. es perceptiblemente menor que el control (T2), tratamiento control de *Salmonella* sp., corroborándose el efecto antagónico de *Bacillus* sp. Sobre el enteropatógeno.

4.6 Contratación de medias

De los tratamientos anteriores contrastamos los valores obtenidos para las cuentas de UFC en el interior de las plántulas de papa, en los tratamientos T2 contra T4 es decir las poblaciones endófitas de *Salmonella* sp, presentes cuando se les inocula y se les deja penetrar libremente y por otro lado cuando se les inocula después de que *Bacillus* sp. ha infectado e invadido el interior de las plántulas de papa. Los resultados analizados mediante la prueba de Tukey, indican que existe un valor altamente significativo entre estas medias poblacionales, ($P < 0.01$).

5. DISCUSION

La contaminación de las hortalizas generada durante o después de la cosecha, es un hecho bien documentado, en especial con las bacterias *S. enterica* y *E. coli* O157 H7 las cuales tienen la capacidad de sobrevivir y crecer en los vegetales durante su vida de anaquel (Brandl *et al.*, 2002; Carmichael *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2002; Wachtel *et al.*, 2002). Es importante señalar que la presencia de estas enterobacterias en alimentos, no siempre puede asociarse al surgimiento de la enfermedad. Se considera que para que de inicio un brote epidémico, la carga bacteriana ingerida por el humano debe exceder el umbral de 1×10^7 UFC/ g de peso fresco del alimento analizado (Charkowski *et al.*, 2002; Taormina *et al.*, 1999).

El cloro por décadas ha sido el desinfectante empleado para desinfectar alimentos que se consumen en crudo, sin embargo, Bartz (1988), publicó que la incidencia de patógenos asociada al cultivo del jitomate regado con agua contaminada, puede ser reducida pero no eliminada agregando 50 a 100 ppm de cloro al agua, evidenciando que el tratamiento con cloro no es totalmente eficaz, para eliminar a la amplia gama de microorganismos que pueden estar presentes en los cultivos tanto en el campo, como al momento de empacar los frutos. Zhuang, (1995) reporta que la inmersión de tomates en una solución que contenga 60 o 110 ppm de cloro durante 2 minutos, reduce significativamente la población de *Salmonella* sin embargo, el tratamiento en una solución que contiene 320 ppm de cloro no dio lugar a la inactivación completa, también señala que la población bacteriana se mantiene sin cambios al almacenarse a temperatura de 5 ° C durante 216 h (9 días), pero aumentó significativamente después de un almacenamiento de 22 o 96 horas a 30 o 20° C respectivamente.

Así mismo, se ha probado que al desinfectar la superficie de las plantas con diversos agentes aun teniendo resultados heterogéneos (Taormina *et al.*, 1999),

siempre se ha corroborado que cuando las bacterias se encuentran dentro del tejido vegetal, la desinfección externa no es eficaz (Itoh *et al.*, 1998; Solomon *et al.*, 2002; Takeuchi y Frank 2000; Wachtel *et al.*, 2002).

Muthukumarasamy *et al.*, (2000), reportan que es posible obtener bacterias endófitas inocuas para el hombre y estas pueden poseer propiedades antagónicas a fitopatógenos; algo similar a lo reportado por Sturz y Matheson (1996), Duijff *et al.*, (1997), Krishnamurthy y Gnanamanickam (1997); Azevedo *et al.*, (2000) quienes reportan que este tipo de bacterias pueden tener un efecto antagónico a insectos y Hallmann *et al.*, (1997, 1998) quienes lograron antagonismo a nemátodos.

Al demostrarse en este trabajo que podemos introducir bacterias del género *Salmonella* a plántulas de papa; resultado que, ligado a los obtenidos por Charkowski *et al.*, (2002), Taormina *et al.*, (1999), Cooley *et al.*, (2003), en los que demuestran que *Salmonella* puede crecer dentro de la planta; se remarca la relevancia de emplear un método que antagonice con este patógeno en el interior de los tejidos vegetales.

Otros ensayos donde se ha usado agentes biológicos para abatir bacterias, siempre se ha conseguido una desinfección superficial, ejemplos los tenemos con el uso de bacterias antagonistas que se establecen en la superficie de los vegetales, (Anderson *et al.*, 2002; Leistner y Gorris, 1995; Schuenzel y Harrison, 2002; Leverentz *et al.*, 2006), así como el uso de bacteriófagos (Leverentz *et al.*, 2001; Leverentz *et al.*, 2003) los que por no penetrar a los tejidos no pueden ser suficientes para eliminar a estas bacterias.

En este trabajo se aisló una cepa bacteriana perteneciente al género *Bacillus* sp. de una planta silvestre comestible *Lycopersicon esculentum*= *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* conocida como "Tinguraque", esto para asegurar la inocuidad hacia el humano. Dicha bacteria presentó la propiedad biológica de inhibir al género *Salmonella* sp., al confrontarlas *in vitro* así como impedir el establecimiento en el interior de la plántula de papa. Lo anterior se comprobó al introducir a este *Bacillus* sp. a través de la radícula y posteriormente confrontarla

con poblaciones de *Salmonella* sp. del orden de 1×10^7 UFC/ml en el medio de cultivo las cuales no pudieron penetrar o establecerse en el interior de los tejidos del vegetal. En cuanto al empleo a la técnica de la impronta para el aislamiento de rizobacterias, es decir bacterias que viven en la periferia de la raíz y no en su interior, esto se hizo por que regularmente las bacterias que se aíslan de esa zona, se pueden introducir a huéspedes que se cultivan *in vitro*. Además de que la técnica de la impronta es la que más rápido señala en donde existe un microorganismo antagónico a la biota que le rodea, aunque en este caso no se identificó ningún *Bacillus* antagónico a *Salmonella* sp.

Sin embargo mediante la técnica aséptica de los cortes transversales de los tallos de “Tinguarque”, para aislar a las bacterias que residen en su interior si se realizó el hallazgo de bacterias del género *Bacillus* que tuvieron antagonicidad hacia *Salmonella* sp. y limitó su establecimiento en las plántulas de papa, esto cuando se aplicó previamente a la inoculación de la enterobacteria al sustrato que soportaba a la planta y no mostró efecto inhibitor al ser introducido cuando la bacteria *Salmonella* sp. se estableció previamente, lo cual indica que para una posible aplicación en campo, este método debería ser preventivo.

Es importante señalar que en este trabajo, se empleó una técnica para demostrar que las bacterias endófitas, pueden inhibir el establecimiento de bacterias enteropatógenas del género *Salmonella* sp. dentro de los tejidos vegetales fisiológicamente activos, no obstante lo anterior, hay que mencionar que la metodología aquí empleada, no es la única útil para inocular bacterias a los cultivos (se han aplicado a través de semillas, asperjadas al follaje, inoculadas al sustrato) y esto puede permitir imaginar muchas más posibilidades para el uso de estos microorganismos benéficos y aplicación dentro del proceso productivo agrícola sustentable.

Con referencia al inóculo mínimo, que se requirió para infectar a las plántulas de papa nuestro dato de $2 \mu\text{L}$, de la suspensión bacteriana tanto para *Bacillus* sp. como para *Salmonella* sp. el dato difiere del aportado por Dong *et al* en el año 2003 para *Klebsiella pneumoniae* 342 especie bacteriana perteneciente también a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual inoculó a diversas plantas tanto

dicotiledóneas como monocotiledóneas y en todas encontró que con inóculos tan pequeños como 1 UFC mL^{-1} , se podía establecer la infección interna de los vegetales cultivados *in vitro*. Esta diferencia pudiera deberse a características de las especies para establecer la relación huésped parásito o a las diferentes metodologías empleadas, ya que los autores citados, marcaron a las bacterias con proteínas fluorescentes y para localizarlas emplearon microscopía confocal de barrido.

Y al contrastar estadísticamente el efecto de la inoculación de *Bacillus* sp., sobre el establecimiento del género *Salmonella* sp. se demuestra estadísticamente que el abatimiento de estos patógenos es altamente significativo a un nivel de significancia de ($P < 0.01$).

6.-CONCLUSIONES.

En este trabajo se describe una metodología para impedir el establecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella* sp. dentro de los tejidos de la plántula de papa, mediante el uso de bacterias endofíticas.

Se rescatan bacterias del género *Bacillus* sp. a partir de la rizosfera de *Lycopersicon esculentum*= *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* "Tinguraque", jitomate silvestre que se consideran relictos de la agricultura mesoamericana y estos microorganismos benéficos se pueden introducir a la producción agrícola actual.

Se demuestra que el "Tinguraque" es fuente de bacterias rizosféricas y endofíticas, con características biológicas dominantes, las que incluso pueden inhibir el desarrollo de bacterias patógenas del hombre, en este caso el género *Salmonella*.

Se señala la existencia de asociación e introducción a la papa de las bacterias del género *Bacillus* sp. aisladas de solanáceas, así como también de las enterobacterias del género *Salmonella*.

7. - LITERATURA CITADA

Poner las iniciales del nombre de segundo autor o antes o después del apellido, tratar de homogenizar esto

Acha, P. y B. Szyfres, 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. I *Bacteriosis y micosis*. Publicación Científica N° 580. 3a ed. Washington: OPS; p. 240-253.

Agarwal, S., y S. T. Shende. 1987. Tetrazolium reducing microorganisms inside the root of *Brassica* species. *Curr. Sci.* 56:187–188.

Aderson, S. M., L. Verchick, R. Sowadsky, R. Civen, J. C. Mohle-Boetani, S. B. Werner, M. Starr, S. Abbott, M. Gutierrez, M. Palumbo, J. Farrar, P. Shillam, E. Umland, M. Tanuz, M. Sewell, J. Cato, W. Keene, M. Goldoft, J. Hofmann, J. Kobayashi, P. Waller, C. Braden, G. Djomand, M. Reller, y W. Chege. 2002. Multistate outbreaks of *Salmonella* serotype Poona infections associated with eating cantaloupe from Mexico-United States and Canada, 2000-2002 (Reprinted from *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51:1044-1047, 2002). *JAMA* 288: 2967.-2969.

Azevedo, J.L., J. Jr. Maccheroni, O. Pereira y W.L. Ara. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electr. J. Biotech.* 3: 40–65.

Baker, K.F., 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:67-85.

Baker, R., 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 6:263-94.

Baker, K. y R. Cook. *Biological control of plant pathogens*. W.H. Freeman Company, San Francisco, USA, 1974. 433 p.

- Bartz, J. A., 1988. Potential for postharvest disease in tomato fruit infiltrated with chlorinated water. *Plant Dis.* 72:9–13.
- Berg, G., J. Hallmann. 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacteria endophytes. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. *Microbial root endophytes.* (Soil Biology Vol. 9). Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 53-69.
- Berg, G., L. Eberl y A. Hartmann. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* 7: 1673–1685.
- Bochow, H., K. Gantcheva. 1995. Soil introductions of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent and its population and activity dynamic. *Acta Horticulturae* 382:164-172.
- Brandl, M. T., y R. E. Mandrell. 2002. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3614-3621.
- Brashears, M. M., y W. A. Durre. 1999. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157: H7 during growth and refrigerated storage. *J. Food Prot.* 62:1336-1340.
- Brenner, F.W., R.G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, B. Swaminathan. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2465-2467.
- Brown, M. E. 1974. Seed and root bacterization. *Annee. Rev. Phytopathol.* 12:181-97.
- Burr, T. J., y A. Caesar. 1984. Beneficial plant bacteria. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 2:1-20.
- Campo, J. D., F. Carlin, y C. Nguyen-the. 2001. Effects of epiphytic *Enterobacteriaceae* and Pseudomonads on the growth of *Listeria monocytogenes* in model media. *J. Food Prot.* 64:721-724.

Carmichael, I., I. Harper, M. Coventry, P. Taylor, J. Wan, y M. Hickey. 1999. Bacterial colonization and biofilm development on minimally processed vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 85:45S-51S

Castro-Rosas J. A., M. Rojas-Olvera, Y. Noguera-Ugalde, E. M. Santos-López, A. Zúñiga-Estrada y C. A. Gómez-Aldapa. 2006. Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo. Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Alfa Editores Técnicos. *Industria Alimentaria* Julio / Agosto: 9-21.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 1991. Roca, W; y Mroginski, L. (editores). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones.* Cali, CO. 970 p.

Chang, I. y T. Kommedahl. 1968. Biological control of seeding blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopatology* 58:1395-1401.

Charkowski, A. O., J. D. Barak, C. Z. Sarreal, y R. E. Mandrell. 2002. Differences in growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3114-3120.

Chet, I. 1987. *Innovative Approaches to Plant Disease Control.* New York: Wiley. 372 pp.

Cook, R. J. y K. F. Baker. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.* St. Paul: Am. Phytopathol. Soc. 539 pp.

Cook, R. J. 1990. Twenty-five years of progress towards biological control, p.1-14. In D. Hornby (ed.), *biological control of soil-borne plant pathogens.* C.A.B. International, Wallingford, United Kingdom.

Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31: 53-80.

Cooksey, D. A. y L. W. Moore. 1982. Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter*. *Phytopathology* 72: 919-921.

Cooley, M. B., W. G. Miller, y R. E. Mandrell. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4915-4926.

Deak, T., y L. Beuchat. 1996. Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, New York, NY.

De Freitas, J. R. y J. J. Germida, 1991. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* 37: 780-784.

De la Cruz, A. R., A. R. Poplawsky, y M. V. Wiese. 1992. Biological suppression of potato ring rot by fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1985-1991.

Dimitri, M. 1987. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I. Descripción de plantas cultivadas. ACME S.A.C.I, Buenos Aires.

Dong Y., A.L.Iniguez y E.W.Triplett. 2003. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant y Soil.* 257:49-59.

Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzur, M., Shachnai, A., 1998. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control* 12, 97–101.

Duijff, B.J., V. Gianinazzi-Pearsonand, y P. Lemanceau. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytol* 135: 325–334.

Euzeby J. P. 1999. Request for an opinion. Revised Salmonella nomenclature. Int J Syst Bacteriol; 49: 927-930.

Eigenbrode, S.D. y J.T. Trumble. 1993. Antibiosis to beet armyworm (*Spodoptera exigua*) in *Lycopersicon* accessions. Hortscience 28: 932-934.

Eigenbrode, S.D., J.T. Trumble y R.A. Jones, 1993. "Resistance to beet army worm (*Spodoptera exigua* [Hubner]), hemipterans, and *Liriomyza* spp. in *Lycopersicon*". *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 118: 525–530.

Feahmen R., D. Bradley, H. Garelick y D. Mara. 1983. Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. J. Wiley, Nueva York. 501 p.

Fernández, E. E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México.pp

Flores, M., Abdelnour, A. y S. Alvarenga. 2002. Cultivo de tejidos II: Manual de laboratorio. Escuela de biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 52 p.

Gagne, S., C. Richard, H. Rousseau, y H. Antoun. 1987. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. Can. J. Microbiol. 33:996–1000.

Ganzle, M. G., S. Weber, y W. P. Hammes. 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. Int. J. Food Microbiol. 46:207-217.

Geels, F. P. y B. Schippers. 1983. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathol. Z.108:207-214.

Geisen, R. 1999. Inhibition of food-related pathogenic bacteria by *god*-transformed *Penicillium nalgiovense* strains. J. Food Prot. 62:940-943.

Gutterson, N. 1990. Microbial fungicides: recent approaches to elucidating mechanisms. Crit. Rev. Biotechnol. 10:69-91.

Glynn M. K., C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, M. Mokhtar y F. J. Angulo. 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 infections in the United States. N. Engl. J. Med. 338:1333-1338.

Guo, X. A., M. W. van Iersel, J. R. Chen, R. E. Brackett, y L. R. Beuchat. 2002. Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. Appl. Environ. Microbiol. 68:3639-3643.

Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, y J. W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43:895-914.

Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, R. Rodríguez-K´abana y J. W. Kloepper 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. Soil. Biol. Biochem. 30: 925–937.

Hallmann, J., Berg, G. 2006. Spectrum y population dynamics of bacterial root endophytes. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. Soil Biology Vol. 9. p. 15-32.

Handelsmann, J; Stabb, EV. 1996. Biocontrol of soilborne pathogens. Plant Cell 8:1855-1869.

Hernández, L.G., M. A. Escalona. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR (en línea). La ciencia y el hombre. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana 16(1).

Hoyt, E., 1992. *Conservando los parientes silvestres de las plantas cultivadas*. Addison–Wesley Iberoamericana. Delaware, Estados Unidos de America. Traducción: Enrique Forero. 52 pp.

Itoh, Y., Y. Sugita-Konishi, F. Kasuga, M. Iwaki, Y. Hara-Kudo, N. Saito, Y. Noguchi, H. Konuma, y S. Kumagai. 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1532-1535.

James, E. K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65:197-209.

Janisiewicz, W. J. 1987. Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology* 77:481-485.

Janisiewicz, W.J., 1998. Biological control of postharvest diseases of temperate fruits: challenges and opportunities. In: Boand, G.J., Kuykendall, L.D. (Eds.), *Plant–Microbe Interaction and Biological Control*. Marcel Dekker Inc., NewYork, pp. 171–198.

Janisiewicz, W. J., y L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:411-414.

Janisiewicz, W. J., W. S. Conway, y B. Leverentz. 1999. Biological control of postharvest decays of apple can prevent growth of *Escherichia coli* O157:H7 in apple wounds. *J. Food Prot.* 62:1372-1375.

Jatala, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:453-89.

Jijakli M.H., Lepoivre P., Tossut P., Thonard P., 1993. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp. on postharvest apples by two antagonistic yeasts. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* 58 (3b): 1349-1358.

Kado, C. I. 1992. Plant pathogenic bacteria, p. 659–674. *In* A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. I. Springer-Verlag, New York, N.Y.

Kobayashi, D. Y., y J. D. Palumbo. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture, p. 199–233. *In* C. W. Bacon and J. F. White (ed.), *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

Kloepper, J. W., Ryu, y C. M., Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.

Kloepper, J. W., Ryu, C. M. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. *In* Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. *Microbial root endophytes*. Berlin- Heidelberg, DE, Springer-Verlag. *Soil Biology* Vol. 9. p. 33-52.

Krishnamurthy K. y S. S. Gnanamanickam. 1997. Biological control of sheath blight of rice: induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp. *Curr. Sci.* 72: 331–334.

Laville, J., Voisard C., Keel C., Maurhofer M., Defago G. y D. Hass 1992. Global control en *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1562-1566.

Laukova, A., P. Juris, Z. Vasilkova, y I. Papajova. 2000. Treatment of sanitary-important bacteria by bacteriocin substance V24 in cattle dung water. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:402-405.

Leben, C., G. C. Daft, y A. F. Schmitthenner. 1968. Bacterial blight of soybeans: population levels of *Pseudomonas glycinea* in relation to symptom development. *Phytopathology* 58:1143–1146.

Leistner, L. y G. Gorris. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 6:41-46

Lemanceau, P., Bakker, W. J. de Kogel, C. Alabouvette, B. Schippers. 1992. Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WC358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2978-2982.

Leminor L. The genus *Salmonella*. In: Balows, A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer. 1992. *The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag. p. 2760-2774.

Leverentz, B., W. S. Conway, W. Janisiewicz, M. Abadias, C. P. Kurtzman, y M. J. Camp. 2006. Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1135-1140.

Leverentz, B., W. J. Janisiewicz, y W. S. Conway. 2002. Biological control of minimally processed fruits and vegetables, p. 319-332. In J. S. Novak, G. M. Sapers, and V. K. Juneja (ed.), *Microbial safety of minimally processed foods*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Leverentz, B., W. J. Janisiewicz, W. S. Conway, R. A. Saftner, Y. Fuchs, C. E. Sams, y M. Camp. 2000. Combining yeasts or a bacterial biocontrol agent and heat treatment to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. *Postharvest Biol. Technol.* 21:87-94.

Leverentz, B., W.S. Conway, Z. Alavidze, W.J. Janisiewicz, Y. Fuchs, M. J. Camp, Chighladze, y A. Sulakvelidze 2001. Examination of bacteriophages as a biocontrol method for salmonella on fresh cut fruit: A model study. *J. Food Prot.*, 64: 1116-1121.

Leverentz, B., W.S. Conway, M.J. Camp, W.J. Janisiewicz, T. Abuladze, M. Yang, R. Saftner and A. Sulakvelidze, 2003. *Food Microbiology-Biocontrol of*

Listeria monocytogenes on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacterosin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4519-26.

Liang, I. N., J. L. Sinclair, L. M. Mallory, y M. Alexander.1982. Fate in model ecosystems of microbial species of potencial use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 708-714.

Liao, C. H. 1999. Influence of soft rot bacteria on growth of *Listeria monocytogenes* on potato tuber slices. *J. Food Prot.* 62:343-348.

Liao, C. S., y W. F. Fett. 2001. Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *J. Food Prot.* 64:1110-1115.

Loeffler, W., S. M. Tschen, N. Vamittanakoon, M. Kugler, E. Knorpp, T. F. Hsieh, T. G. Wu. 1986. Antifungal effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *Journal of Phytopathology* 115:204-213.

Lugtenberg, B. J. y L. C. Dekkers 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* 1(1):9-13.

McKeen, C. D., C. C. Reilly, P. L. Pusey. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 76:136-139.

Miller, S. I., y D. A. Pegues. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds.) *Mandell, Douglas, Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 2344-2363.

Molina-Gamboa J. D., Ponce-de-León-Rosales S., Guerrero-Almeida M. L., Carvalho A. C., Romero-Oliveros C., Báez-Martínez R., Huertas-Jiménez M., Osornio-Silva G., Ortiz R., Domínguez-Sosa F., Quiñones-Falconi F., Ruiz-

Palacios G. *Salmonella* gastroenteritis outbreak among workers from a tertiary care hospital in Mexico City. Rev. Invest. Clin. 1997;49:349-353.

Moore, L. W. 1979. Practical use and succes of *Agrobacterium radiobacter* strain 84 fur crown gall control. See Ref. 36. pp. 553-68

Muñoz Rojas, J. y Caballero Mellado, J., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito, en Martínez Romero, E. y Martínez Romero, J. (editores), Microbios en línea <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>, UNAM, México, 2001, pp. 157-176.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.* 15: 473-497.

Muthukumarasamy, R., G. Rebathi, y M. Vadivelu. 2000. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal of red-rot of sugarcane. *Curr. Sci.* 78:1063-1065.

Navarrete, S., J. I. Santos. Gastroenteritis. En: Navarrete S, Muñoz y O, Santos Preciado JI, eds. Infecciones intrahospitalarias en pediatría. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana, 1998; 137-142.

Okon, Y., y C. A. Labandera-González. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil. Biol. Biochem.* 26:1591-1601.

Olmstead, R. G., Sweere, J. A., Spangler, R. E., Bohs, L., and J. D. Palmer. 1999. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. Pp. 111-137. En: Solanaceae IV: advances in biology and utilization, M. Nee, D. E. Symon, R. N. Lester, and J. P. Jessop (eds.). The Royal Botanic Gardens, Kew .

Olmstead, R.G. and Bohs, L. 2007. A Summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982-2006. *Acta Hort.* (ISHS) 745:255-268.

Ossa G. Diarrea infecciosa (infecciones entéricas). Bol. Hosp. S. J. de Dios 2000; 47: 205-17.

Papavizas, G. C. y R. D. Lumsden. 1980. Biological control of soilborne fungal propagules. Annu. Rev. Phytopathol. 18:389-413.

Papavizas, G. C. 1981. Biological control in crop production. Beltsville Symposia in Agricultural Research. Allanheld, Osmun Pub. London. 461 p.

Peralta, I., S. Knapp, and D.M. Spooner. 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru. Syst. Bot. 30:424-434.

Pérez, G. M., F. S. Márquez y A. L. Peña, 1997. *Mejoramiento genético de hortalizas*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 149–181.

Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues. In Fokkema, NJ; van den Heuvel, J. eds. Microbiology of the phyllosp.. Cambridge, UK, Cambridge University. p. 175-187.

Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In Andrews, J; Hirano, S. eds. Microbial ecology of leaves. Berlin Heidelberg, New York, Springer. p. 179-197.

Pegues, D.A., M. E. Ohl, y S. I. Miller. *Salmonella*, including *Salmonella typhi*. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerran RL (eds.). Infections of the gastrointestinal tract. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 669-697.

Pieterse, C. M. J., y L. C. van Loon. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends Plant Sci. 4:52-58.

Ponka, A., Y. Andersson, A. Siitonen, B. de Jong, M. Jahkola, O. Haikala, A. Kuhmonen y P. Pakkala. 1995. Salmonella in alfalfa sprouts. *Lancet* 345: 462–463.

Posada, F., Vega, F.E., 2005. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia* 97, 1195–1200.

Quispel, A. 1992. A search for signals in endophytic microorganisms, p. 471-491. In Verma, D. P. S. (ed.), *Molecular signals in plant-microbe communications*, CRC press. Boca Raton.

Reinhold-Hurek, B. y T. Hurek. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6:139-144.

Rodgers, PB. 1989. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. *Pesticide Science* 27:155-164.

Reuter, G. 2001. Probiotics—possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for man and animals. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 114:410-419.

Roos, I. M. M., y M. J. Hattingh. 1983. Scanning electron microscopy of *Pseudomonas syringae* pv. morsprunorum on sweet cherry leaves. *Phytopathol. Z.* 108:18–25.

Santos, G. E. y F. A. Torres. 2006. Evaluación de los métodos de desinfección aplicados a vegetales de hojas que se consumen crudos. Tesis. Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Negocios y Economía Departamento de Turismo

Sánchez-Peña, P., K. Oyama, J. Núñez-Farfan, J. Fornoni, S. Hernández-Verdugo, J. Márquez-Guzmán y J.A. Garzón-Tiznado. 2006. Sources of resistance to whitefly (*Bemisia* spp.) in wild populations of *Solanum lycopersicum*

var. *Cerasiforme* (Dunal) Spooner G.J. Anderson et R. K. Jansen, in *Northwestern México. Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 711-719.

Schaad, N. 1988. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Minnesota, American Phytopathological Society. (ed.). 164 p.

Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A. H. M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology* 25:339-358.

Schroth, M. N., J. G. Hancock. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216:1376-1381.

Schroth, M. N. J. G. Hancock. 1981. Selected topics in biological control. *Annu. Rev. Microbiol.* 35:453-76.

Schuenzel, M. K., y A. M. Harrison. 2002. Microbial antagonists of foodborne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. *J. Food Prot.* 65:1909-1915.

Schulz, B., C. Boyle. 2006. What are endophytes? In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. *Microbial root endophytes*. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. *Soil. Biology*. Vol. 9. p. 1-13.

Shuval H., A. Adien, B. Fattal, E. Rawitz y P. Yekutiail. 1986. *Wastewater irrigation in devoloping countries*. World bank Technical Paper Number 51, Washington, D.C. 322 p.

Sevilla, M., Kennedy, C., 2000. Colonization of rice and other cereals by *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. In: Laddha, J.K., Reddy, P.M. (Eds.), *The quest for nitrogen fixation in rice*. Proceedings of the Third Working Group Meeting on Assessing Opportunities for Nitrogen Fixation in Rice, 9–12 Aug. 1999, Los Baños, Laguna, Philippines. International Rice Research Institute, Makati City (Philippines), pp. 151–165.

Solomon, E. B., S. Yaron, y K. R. Matthews. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:397-400.

Spadaro, D., A. Garibaldi, y M. L. Gullino. 2004. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biol. Technol.* 33:141-151.

Spadaro, D., R. Vola, S. Piano, y M. L. Gullino. 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol. Technol.* 24:123-134.

Spooner, D.M., G.J. Anderson & R.K. Jansen. 1993. Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes and pepinos (Solanaceae). *American Journal of Botany* 80: 676-688.

Strobel, G. A., y D. M. Long. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *ASM News* 64:263-268.

Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo, y J. Harper. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67: 257–268.

Sturz, A. V. y B. G. Matheson. 1996. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant Soil* 184: 265–271.

Suslow, T. V. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. In *Phytopathogenic Prokaryotes*, ed. M. S. Mount, G. H. Lacy, 1:187-223. London: Academic.

Takeuchi, K., y J. F. Frank. 2000. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. *J. Food. Prot.* 63:434-440

Taormina, P. J., L. R. Beuchat, y L. Slutsker. 1999. Infections associated with eating seeds sprouts: an international concern. *Emerg. Infect. Dis.* 5:626-634.

Temporado, S., J. M. Hughes, y W. R. Jarvis. 1997. Nosocomial gastrointestinal infections. En: Wenzel RP, ed. *Prevention and control of nosocomial infections.* Maryland: Williams & Wilkins. 925-975.

Torres, V. M. R., H. V. Navarro, y F. O. T. Urakami. 1996. *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* en lechuga fresca que se expende en mercados de la ciudad de Guadalajara. XIII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jal, México.

Torres, V. M. R., H. V. Navarro, y F. O. T. Urakami. 1997. *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* en cilantro fresco que se expende en mercados de la ciudad de Guadalajara. XIV Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jal, México.

Vázquez, S. C., R. E. Quiñones, y F. G. Lugo. 1996. Investigación de *Vibrio cholerae* en hortalizas que se consumen crudas en la ciudad de México. XIII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jalisco, México.

Wachtel, M. R., L. C. Whitehand, y R. E. Mandrell. 2002. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J. Food. Prot.* 65:18-25.

Wade, W. N., R. Vasdinnyi, T. Deak, y L. R. Beuchat. 2003. Proteolytic yeasts isolated from raw, ripe tomatoes and metabiotic association of *Geotrichum candidum* with *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 86:101-111.

Weller, DM. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26:379-407.

Whitfield, F. 1998. Microbiology of food taints. *Int. J. Food Sci. and Techn.*, 3: 31-51.

Wilson, C. L., y M. E. Wisniewski. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:425-441.

Zeigler, R. G. 1993. Vegetables, fruits and carotenoides and the risk of cancer. *Am. J. Clin. Nut.* 53: 251-259.

Zhuang R. Y., L. R. Beuchat, y F. J. Angulo. Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:2127–2131.

The NSF potato genome project 2008. «Potato as a plant model». www.potatogenome.org/nsf5

Apendice I

PDA Agar papa dextrosa

Medio rico en nutrientes útil para crecer cualquier microorganismo

Materiales y método

Balanza granataria matraz Erlenmeyer 1 l

Mechero Fisher

Rayador

Embudo

gasa

Horno de microondas

Probeta de 1l

autoclave

agua destilada

200g de papa

15g de agar bacteriológico

20g de dextrosa

En el matraz se colocan 200gr de papa rayada inmersos en 500ml de agua destilada se llevan a ebullición a la llama del mechero durante 15 min. La infusión es filtrada hacia otro matraz a través de la gasa, se le añaden 200 ml de agua destilada, 15 g de agar bacteriológico y 20 gr de dextrosa, se agita se deja disolver y se deja reposar por 10 min para la hidratación del agar. Se clarifica en el horno de microondas, se deja que baje su temperatura para aforar a 1L, se esteriliza a 121°C en la autoclave por 15 minutos.

Apéndice II

PDI Infusión papa dextrosa

Medio líquido utilizado para el crecimiento de microorganismos como bacterias y algunos hongos

Materiales y método

Balanza granataria

Matraz Erlenmeyer 1L

Mechero Fisher

Rayador

Embudo

Gasa

Horno de microondas

Probeta de 1L

Autoclave

Agua destilada

200gr de papa

20gr de dextrosa

En el matraz se colocan 200grs de papa rayada inmersos en 500ml de agua destilada se llevan a ebullición a la llama del mechero durante 15 min la infusión es filtrada hacia otro matraz a través de la gasa se le añaden 200 ml de agua destilada y 20 gr de dextrosa, se agita se afora a 1L se esteriliza a 121°C en el autoclave por 15 minutos.

Al enfriarse los matraces son inoculados con la sepa de bacillo y de salmonella bajo condiciones de asepsia utilizando para esto la campana de flujo laminar posteriormente se incuban en agitación a temperatura entre 28- 30°C.

Apéndice III

Medio EMB Agar Eosina y Azul de Metileno

El Agar Eosina y Azul de Metileno es un medio utilizado para el aislamiento y diferenciación de bacilos entéricos Gram negativos. Este medio también es conocido como Agar EMB por sus siglas en inglés.

Materiales y método:

Digerido Pancreático de Gelatina 10.0 Lactosa 5.0

Sacarosa 5.0 Fosfato Dipotásico 2.0

EosinaY 0.4 Azul de Metileno 0.065

Agar Bacteriológico 15.0

pH 7.2± 0.2

Suspender 36 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.