

**Evaluación *in vitro* de actividad antimicrobial
de 23 cepas bacteriales no identificadas en
contra de *Burkholderia glumae***

María Alejandra Caldera Domínguez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2011

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación *in vitro* de actividad antimicrobial
de 23 cepas bacteriales no identificadas en
contra de *Burkholderia glumae***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

María Alejandra Caldera Domínguez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2011

Evaluación *in vitro* de actividad antimicrobial de 23 cepas bacteriales no identificadas en contra de *Burkholderia glumae*

Presentado por:

María Alejandra Caldera Domínguez

Aprobado:

Jeffery Pack, D.P.M.
Asesor principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Carrera de Ingeniería Agronómica

Singh Raghuwinder, D.P.M.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

RESUMEN

Caldera Domínguez, M.A 2011. Evaluación *in vitro* de actividad antimicrobial de 23 cepas bacteriales no identificadas en contra de *Burkholderia glumae*. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 24 p.

El añublo bacterial de la panícula del arroz causada por *Burkholderia glumae* se ha incrementado en los últimos años, convirtiéndose en una gran amenaza para la producción de arroz en América Central, el Caribe, Asia, Colombia y estados productores de arroz en Estados Unidos. El incremento se debe a las altas temperaturas, humedad relativa favorable para el desarrollo de este patógeno y al alto porcentaje de semillas infectadas plantadas por los agricultores de arroz. El objetivo de este ensayo fue evaluar la actividad antimicrobial *in vitro* de 23 cepas bacteriales aisladas de diferentes variedades de arroz, en contra de *Burkholderia glumae* (336 gr-1) y que previamente habían mostrado actividad antimicrobial contra *Rhizoctonia solani*. La evaluación se llevó a cabo en incubadoras a 30°C, 37°C y a temperatura ambiente. Se usaron dos testigos, platos Petri con *Burkholderia glumae* y con *Escherichia coli*. Dos experimentos preliminares fueron analizados mediante estadística descriptiva y luego se utilizó un diseño completamente al azar en el cual las medias fueron separadas mediante la prueba de Duncan. En el laboratorio se evaluaron las 23 cepas de las cuales se seleccionaron 7 que mostraron mayor inhibición en 30°C, 37°C y temperatura ambiente (22°C) en LB agar. La cepa número 8 fue la que presentó mayor inhibición (0.5 cm) en temperatura ambiente mientras que las cepas 2, 4 y 9 tuvieron mayor actividad en temperaturas de 30 °C y 37 °C.

Palabras clave: Añublo, *Pseudomonas glumae*, pudrición de arroz.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MATERIALES Y MÉTODO	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4. CONCLUSIONES	19
5. RECOMENDACIONES	20
6. LITERATURA CITADA.....	21

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Interacción de cepas de bacterias en tres diferentes temperaturas.....	18
Figuras	Página
1. Plaqueado de cepas de bacterias no identificada	4
2. Plaqueado de cepas de bacterias no identificada	4
3. Línea en el centro de <i>B. glumae</i> , acompañada	5
4. Cuatro diferentes tipos de cepas de bacterias.	5
5. (A)Control negativo utilizando <i>Burkholderia glumae</i> (336gr-1)	6
6. Control negativo con <i>Burkholderia glumae</i> (336gr-1).....	6
7. Cepa número 13 después de 2 semanas.....	10
8. Cepa número 16 después de 2 semanas.....	10
9. La cepa número 23 después de 2 semanas	10
10. Interior del plato Petri con solución de <i>B. glumae</i> y las cepas 2, 3,4 y 5 y reverso del plato mostrando crecimiento y halo de inhibición marcado en las cepas 2 y 4....	11
11. Cepas número 6, 8, 10 y 11 en 30 °C.	11
12. Cepas 8, 9,10 y 11 en temperatura	12
13. Cepas número 14, 15 y 16 en	12
14. Cepas número 14,15 y 16 en 30 °C.	12
15. Cepas número 17,19,20 y 22 en temperatura ambiente (22 °C).....	13
16. Cepas número 1,13, 20 y 23 en 30 °C.	13
17. Cepa número 2 en 37°C, 30°C y temperatura ambiente.....	14
18. Cepa número 4 en 37°C, 30°C y temperatura ambiente.....	14
19. Cepa número 8 en 37°C, 30°C y temperatura ambiente.....	14
20. Cepa número 9 en 37 °C, 30 °C y temperatura ambiente.....	15
21. Cepa número 9 en 30 °C mostrando un halo de color amarillo fuerte.	15
22. Cepa número 10 en 37 °C, 30 °C y temperatura ambiente.....	15
23. Cepa número 16 en 37 °C, 30 °C y temperatura ambiente.....	15
24. Cepa número 23 en 37 °C, 30 °C y temperatura ambiente.....	16
25. Evaluación de efecto antimicrobial de siete cepas de bacterias en 30 °C. Datos en la gráfica de barra con diferentes letras difieren significativamente entre sí ($P \leq 0.05$)	16

26. Evaluación de efecto antimicrobial de siete cepas de bacterias no identificadas en 37° C. Datos en la gráfica de barra con diferentes letras difieren significativamente entre sí ($P \leq 0.05$). 17
27. Evaluación de efecto antimicrobial de siete cepas de bacterias no identificadas en Temperatura ambiente (22 °C). Datos en la grafica de barra con diferentes letras difieren significativamente entre sí ($P \leq 0.05$). 17

1. INTRODUCCIÓN

El arroz es un cereal de gran importancia en la población asiática, así como en Latinoamérica, el Caribe y África. Ocupa el segundo lugar después del maíz en mayor producción a nivel mundial y se estima que siga creciendo en producción en los años siguientes debido a que se ha expandido en 1.8 % por año, arriba del rango de crecimiento poblacional (Calpe, 2002). Sin embargo, este incremento puede ser reducido en un futuro por enfermedades que se han venido desarrollando en los últimos años y que se han considerado como los mayores patógenos del futuro. Entre ellos está *Burkholderia glumae* o comúnmente conocida como añublo bacterial de la panícula.

En los Estados Unidos, el arroz es sembrado en aproximadamente 1 millón de hectáreas y en dos distintas regiones, California y muchos estados del sur: Arkansas, Louisiana, Mississippi, Missouri y Texas. Este cereal ha sido cultivado en Louisiana por más de 300 años y hoy en día representa uno de los cultivos más importantes.

El arroz producido en el sur de los Estados Unidos ha tenido un gran historial de pérdidas por pudrición bacterial de la panícula, pero su etiología era desconocida. Los síntomas de pudrición ocurrieron durante 1995 y 1998 donde se registraron elevadas temperaturas, con pérdidas de rendimientos en algunos campos de hasta el 40%. Pérdidas considerables también fueron experimentadas en Louisiana durante 2000 y 2010.

La enfermedad también fue reportada en Panamá en el 2002 y 2005. Más tarde los mismos síntomas fueron observados en países de Asia y Latinoamérica y a partir del año 2003 síntomas de vaneamiento en arroz fueron observados en zonas arroceras del pacífico de Nicaragua causando pérdidas del 70-90% en campo.

La pudrición bacterial de la panícula ha sido atribuida a diferentes factores abióticos incluyendo altas temperaturas, estrés hídrico y fitotoxicidad cerca de la zona radicular. Sin embargo, durante 1996 y 1997 el agente causal fue identificado como *Burkholderia glumae* en el sur de los Estados Unidos. Los síntomas del añublo bacterial de la panícula fueron reportados por primera vez en Hungría (Klement, 1955) y el agente causal fue descrita como *Pseudomonas oryzae*, más tarde demostrado por Visnyovszky (1971) a ser un sinónimo de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Ou, 1985) y fue descrita por segunda vez en Japón en 1956 como causante de la pudrición del grano y plántula de arroz. La Pudrición del grano de arroz se informó que es causada por varias bacterias, incluyendo *Pseudomonas glumae* (*Burkholderia glumae*) de acuerdo con Hashioka (1969), la temperatura óptima para el crecimiento de *Burkholderia glumae* está en un rango de 30-35 °C y un punto de muerte térmica de 70 °C (Kurita *et al.*, 1964).

Debido a que el arroz es uno de los cultivos más importantes, está claro que una distribución amplia del añublo bacterial de la panícula se convertiría en una gran desventaja para la economía mundial. Las consecuencias directas a nivel agronómico serían pérdidas en rendimiento y estabilidad en producción, ya que este patógeno tiene el potencial de reducir el rendimiento hasta en un 75% en regiones severamente afectadas debido al peso del grano, esterilidad de los floretes e inhibición de la germinación de la semilla.

Características de *Burkholderia* spp. *Burkholderia* es considerada el mayor agente bacterial causante de la pudrición del grano de arroz en Japón. *B. glumae* es una bacteria no fluorescente que produce un pigmento amarillo-verde en algunos medios. Este microorganismo tiene forma de barra y posee de 1-3 flagelos polares. La colonia es grisácea blanca o amarilla debido al pigmento.

Virulencia. En 1989, se aislaron dos sustancias bioactivas de un filtrado proveniente de un cultivo de *B. glumae*, identificadas como toxoflavin y fervenulin. Se indicó que estas fitotoxinas pueden inducir manchas cloróticas en hojas de arroz. Toxoflavin es un sólido amarillo cristalino que fue aislado por primera vez en 1933 de *B. cocovenenans* (Buckle *et al.*, 1990), lo que reduce el alargamiento de los brotes y las raíces de las plántulas de arroz (Suzuki *et al.*, 1998; Yoneyama *et al.* 1998). Las fitotoxinas también fueron detectadas en *Burkholderia glumae* y en algunas cepas de *B. gladioli* (Suzuki *et al.* 1998), y no solo de filtrado de cultivo sino también de plántulas infectadas de arroz.

Síntomas y epidemiología. El estado crítico de infección se presenta en la emergencia de la panícula y en floración causando esterilidad en los floretes, aborto y decoloración de granos en desarrollo, pardeamiento de la hoja bandera y decoloración de la espiguilla a un color grisáceo con la mitad del florete oscuro (Shahjahan, 2000b).

Síntomas. La enfermedad bacteriana de rayado en la hoja de arroz, con decoloración de grano se reportó que fue causado por *Pseudomonas avenae* (Kadota y Ohuchi, 1983). La pudrición de la vaina y la decoloración del grano en Latinoamérica se creyeron que fueron causadas por *Pseudomonas glumae* (Zeigler y Alvarez, 1987). Sin embargo, los diferentes patógenos comparten síntomas similares entre ellos. Por ejemplo, *P. syringae*, *P. fluorescens* y *B. glumae* causaron similares síntomas (Goto *et al.*, 1987). Zeigler reportó los síntomas producidos por *Pseudomonas fuscovaginae* como partes remojadas (watersoaking), necrosis con márgenes mal formados y glumas decoloradas antes de que la panícula emergiera de los botones. Granos infectados variaron de completamente decolorados y estériles a casi asintomáticos con pequeños puntos café (Zeigler y Álvarez, 1987; Zeigler *et al.*, 1987; Zeigler y Álvarez, 1989a; Zeigler y Álvarez, 1989c). Síntomas típicamente causados por *B. glumae* en Louisiana fueron pudrición de la panícula con decoloración del florete (de grisáceo a un color pajizo), usualmente en la parte baja de la mitad del grano en desarrollo, con un claro borde café seguido de esterilidad o llenado parcial de los floretes causando que las panículas se queden erectas (Shahjahan *et al.*, 1998; Shahjahan *et al.*, 2000b).

Epidemiología. Las bacterias de las plantas existen en muchas partes del ecosistema y son encontradas usualmente en el aire, suelo y agua. La distribución en el suelo de estos

patógenos es afectada por el tipo de PH, plantas cultivadas y condiciones de clima. Se ha establecido que esta bacteria patogénica se encuentra en los filoplanos de las plantas de arroz durante la etapa de crecimiento (Matsuda y Sato, 1987; Hikichi, 1993a; Hikichi, 1993b; Hikichi *et al.*, 1993; Otofujii *et al.*, 1988; Tsushima *et al.*, 1996), o en semillas de arroz guardadas a temperatura ambiente en invierno (Tsushima *et al.*, 1987; Tsushimi *et al.*, 1989) en malezas en el campo y en tejidos de arroz de cosechas pasadas que se quedaron en el suelo (Sogou y Tsuzaki, 1983). La enfermedad se puede desarrollar de un inóculo de semillas infectadas de años previos en el suelo y en malezas en el campo. En el proceso de infección, la susceptibilidad del hospedero, la densidad del inóculo y los factores climáticos juegan el principal rol (Tsushima *et al.*, 1985; Tsushima *et al.*, 1987; Tsushima y Naito, 1991; Tsushima *et al.*, 1995a; Tsushima *et al.*, 1996; Tsushima, 1996).

Esta enfermedad tiende a presentarse en condiciones inusuales con altas temperaturas, especialmente en la noche y en tiempos de frecuentes lluvias (Tsushima *et al.*, 1985; Mew, 1992; Zeigler y Álvarez, 1990).

Las células del patógeno presente en las vainas foliares juegan un rol fundamental ya que proveen la fuente principal de inóculo para la panícula emergente (Tsushima *et al.*, 1991 and Tsushima *et al.*, 1996). El primer lugar de infección de *B. glumae* es aparentemente a través de las plúmulas (Hikichi, 1993a; Hikichi, 1995b). La bacteria entra a la lema y a la palea a través de los estomas, se multiplica en las células del parénquima (Tabei *et al.*, 1989) y se mueve hacia los tejidos y células sanas. La bacteria fue detectada en la epidermis, parénquima y esclerénquima de las glumas de semillas de arroz naturalmente infectadas usando un antisuero (Hikichi, 1993b). El movimiento de larga distancia de la bacteria fue realizado vía sistemas vasculares y fue observada por X. Yuan, saliendo de los sistemas vasculares de arroz severamente infectado por técnicas de seccionado.

Detección y métodos de identificación. Es difícil diferenciar patógenos que son muy parecidos en fisiología y taxonomía por los síntomas que producen y por los medios selectivos donde crecen. Tsushima en 1986 desarrolló un medio semi selectivo para *B. glumae*, sin embargo, otras especies de *Burkholderia* pueden crecer en este medio (SP-G medium). La mejor diferenciación se ha dado por el programa Biolog TM (Cottyn *et al.*, 1996b). Aunque los métodos inmunológicos poseen alta resolución, anticuerpos específicos para algunos antígenos no se obtienen fácilmente y esto representa una gran limitante en la aplicación de estos métodos. Recientemente PCR y otras técnicas moleculares se han hecho más populares debido a su fácil operación, buena precisión y rapidez.

Clasificación y nomenclatura. Por mucho tiempo se ha sabido que algunas especies de *Pseudomonas* son patógenas en plantas. Algunas bacterias como *Pseudomonas gladioli* fueron identificadas como agente causal de la pudrición floral de *gladiolus*. Burkholder describió al causante de la pudrición de la cebolla como *Pseudomonas cepaci* y hasta 1960 las *Pseudomonas* también fueron reconocidas como posibles patógenos en humanos. Se ha confirmado que *Burkholderia gladioli* y *Burkholderia cepacia* pueden producir fibrosis quística y enfermedades pulmonares (Baxter *et al.*, 1997; Parke y Gurian-Sherman, 1998; Vandamme, 1996, Vandamme *et al.*, 1997, y Vandamme *et al.*, 2000).

El género *Burkholderia* fue establecido hasta 1922 cuando Yabuuchi propuso transferir siete especies previamente en el grupo *Pseudomonas* al nuevo género *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992) *Pseudomona plantari* y *Pseudomona glumae* fueron transferidos en 1994. Hasta el 2002 se encuentran 28 especies en el género *Burkholderia*. Muchas de estas especies son consideradas patógenas de plantas como arroz, tabaco, maíz entre otros cultivos. Los patógenos establecidos para arroz incluyen *P. avenae* (Goto y Ohata, 1956), *P. fuscovaginae* (Zeigler, 1987,1989, 1990; Rott, 1989 y 1991; Cottyn, 1996 y 2001), *P. syringae*, *Burkholderia glumae* (Goto y Ohata, 1956; Goto,1965 y Goto y Ohata,1987; Hikichi *et al.*, 1993d, Hikichi *et al.*,1994, y Hikichi *et al.*,1995a; Tsushima *et al.*, 1985, Tsushima *et al.*,1986, y Tsushima, 1991; Cottyn *et al.*, 1996a, 1996b y 2001), *B. plantarii* (Azegami *et al.* 1985, Azegami *et al.*,1987 y Azegami *et al.*1988), *B. gladioli* (Cheng *et al.*, 2001), y *B. vietnamiensis* (Trung *et al.*, 1993).

Control químico. Existen bactericidas disponibles en el mercado que ayudan a controlar el efecto de *B.glumae* incluyendo antibióticos, cobre y cobre conteniendo compuestos (Yuan, 2004). El ácido oxolínico es un derivado del quinolone con actividad antibacterial en contra de bacterias gram negativas incluyendo *B. glumae*. Cuando las semillas y las plantas con panículas de arroz son tratadas con el ácido oxolínico, el crecimiento de *B. glumae* se ve inhibido en las plúmulas y en las espiguillas, resultando en un eficaz control. Sin embargo, en los experimentos realizados por Hikichi (2001) demuestran que hay ciertas cepas de *B. glumae* que están demostrando resistencia hacia este ácido. Incluso un grupo de cepas presentaron resistencia en dosis de 1000 µg/ml. Otra de las limitantes es que su uso no es designado para arroz en los Estados Unidos.

El calentamiento global ha generado el incremento en temperaturas y como consecuencia se han desarrollado nuevos patógenos. *Burkholderia glumae* se está esparciendo por todo el mundo y hasta ahora solo se conocen pocas variedades resistentes a ellas y mínimas medidas de control. Es por eso que el uso de microorganismos con actividad antagonista en contra de este patógeno sería una buena solución, si se pudiera utilizar en campo como un pesticida natural que no daña al ambiente y puede funcionar en diferentes temperaturas.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobial *in vitro* de 23 cepas de bacterias no identificadas en contra de *Burkholderia glumae* a temperatura ambiente (22°C), 30 y 37°C.

2. MATERIALES Y MÉTODO

El estudio fue realizado en el laboratorio del centro de diagnóstico de plantas de la universidad estatal de Louisiana (LSU).

Diseño experimental y análisis de datos. Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para analizar las 23 cepas en tres temperaturas (22°, 30° y 37°C) con tres repeticiones en tiempo y una separación de medias Duncan. Se utilizó un modelo lineal general (GLM) del programa estadístico SAS[®] (Statistical Analysis System) versión 9.1, con un nivel de significancia de $P < 0.05$. La variable estudiada fue el halo de inhibición en el plato Petri. Los primeros experimentos realizados fueron analizados mediante estadística descriptiva y las cepas que no presentaban halo o inhibición eran descartadas para el último experimento.

Preparación de medio de cultivo. Se utilizó un protocolo estándar para la producción de medio Kings B agar y LB, cuidando de no contaminar los medios.

Producción de inoculante de *Burkholderia glumae* (336 gr-1). Se esterilizó la superficie de semillas contaminadas con cloro al 10% o etanol al 70% y se lavó con agua destilada. Después se mantuvo por unos 2 minutos en agua doble destilada (dd H₂O) y se movió vigorosamente. El agua de la mezcla se utilizó para hacer un plaqueado en KB agar y se incubó a 37 °C por 24 horas. Cuando se identifica que tipo de cepa es, se rotula y es mantenida a 37 °C hasta su uso. Normalmente se hacía producción de inóculo nuevo, agarrando una colonia aislada y haciendo una placa en un medio de crecimiento nuevo.

Almacenamiento de inoculante de cepas de bacterias no identificadas. Las 23 cepas de bacterias fueron recolectadas de variedades de arroz (CL131, Catahoula, Cheniere, Neptune, Cocodrie, Cl261, Cl151, M201, Cl111) y fueron conservadas en glicerol al 30% en tubos individuales a - 4°C.

Plaqueado de cepas de bacterias no identificadas. Cuando se utilizaron las cepas de bacterias guardadas en glicerol, se evitó un choque térmico mediante la introducción de los tubos en hielo. El plaqueado (Figura 1.) se realizó en una cámara de flujo laminar y se utilizaron platos estériles de plástico tamaño estándar con Kings B agar como medio de cultivo. Se flameó la lupa en el mechero y se realizó un plaqueado por cada cepa de bacteria. Los platos Petri fueron sellados con parafilm y luego se incubaron a 30°C por 24 horas.



Figura 1. Plaqueado de cepas de bacterias no identificada en medio KB.

A las 24 horas los platos fueron extraídos de la incubadora, se flameó la lupa en el mechero y se tomó una colonia aislada para realizar un rayado en todo el plato Petri (Figura 2). Luego fueron incubadas a 30°C. Las incubadoras usadas fueron Heratherm Microbiological Incubators y provienen de la empresa Thermoscientific.

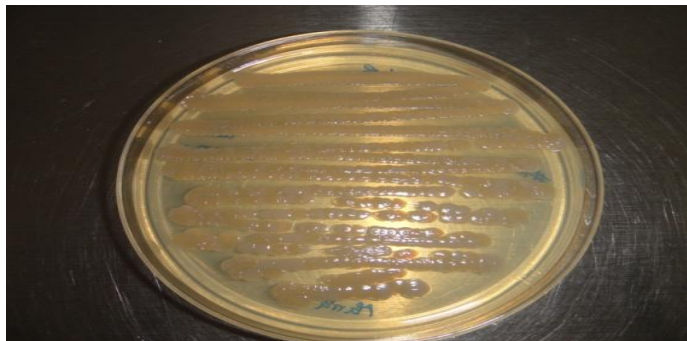


Figura 2. Plaqueado de cepas de bacterias no identificada en medio KB.

Veinte y cuatro horas después se extrajeron los platos y con la lupa se realizó una línea en el centro del plato Petri con *Burkholderia glumae* (336 gr-1) y una línea abajo y arriba con la cepa de la bacteria que se quería evaluar (Figura 3). Por cada bacteria se realizaron tres platos uno por cada temperatura correspondiente (temperatura ambiente, 30°C, 37°C) y por cada temperatura se realizó un control con una línea en el centro, uno abajo y arriba de *Burkholderia glumae* (336 gr-1)

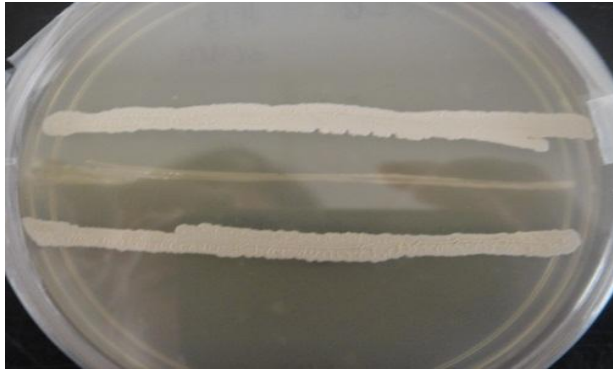


Figura 3. Línea en el centro de *B. glumae*, acompañada de una línea abajo y arriba de la cepa de bacteria a evaluar.

Producción de solución de *Burkholderia glumae* (336 gr-1). Para realizar una dilución de 100x se escogió un cultivo fresco y puro de *Burkholderia glumae* (336gr-1) y con la lupa flameada se agarró un poco del patógeno y se mezcló vigorosamente con 100 micro litros de agua destilada en un tubo de plástico. Después se chequeó en el espectrofotómetro si la concentración de células era de 10^7 células/ml.

Una vez cuantificado el número de células (10^7 células/ml), se tomaron 100 micro litros con una pipeta y se esparció en los platos Petri con el medio de LB agar. Luego se ubicaron cuatro cepas desconocidas por cada plato (Figura 4.) y se realizó una repetición por temperatura correspondiente (temperatura ambiente, 30°C, 37°C) de 24-48 horas. Durante este experimento se hicieron dos controles negativos por cada temperatura, utilizando el mismo proceso pero con *Escherichia coli* y *Burkholderia glumae* (Figura 5.), ya que se ha confirmado que *Escherichia coli* no tiene actividad antimicrobial con *Burkholderia glumae* y *B. glumae* no tiene actividad antagonista contra ella misma.



Figura 4. Cuatro diferentes tipos de cepas de bacterias.

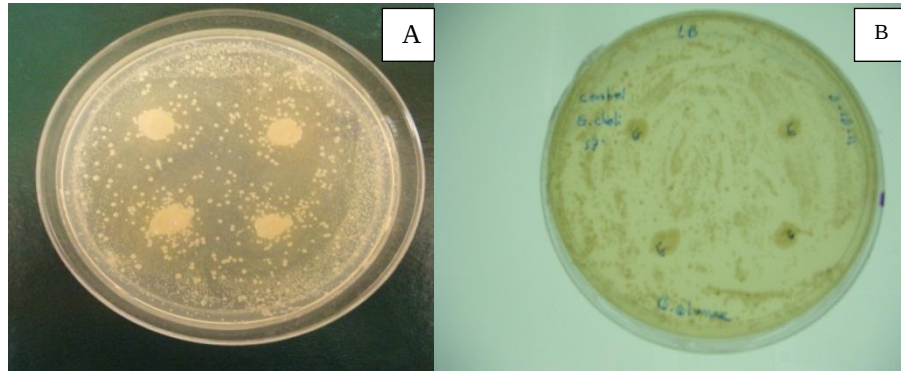


Figura 5. (A) Control negativo utilizando *Burkholderia glumae* (336gr-1), (B) control negativo utilizando *Escherichia coli*.

Para las cepas que presentaron actividad antimicrobial se realizó el mismo proceso, pero sin dilución y solo ubicando una bacteria en el centro con una repetición y un control con *Burkholderia glumae* (Figura 6.) por temperatura (30 °C, 37 °C y temperatura ambiente). Se realizó un último experimento que consistía en el mismo proceso, pero con tres repeticiones por cepa y por temperatura

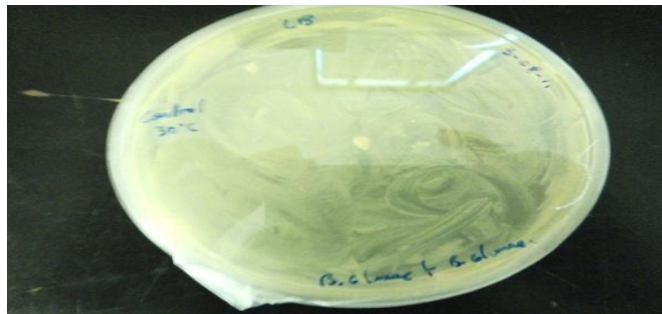


Figura 6. Control negativo con *Burkholderia glumae* (336gr-1) en 30 °C.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de líneas. En el primer ensayo de tres líneas se observó que el halo que producía *B. glumae* no pasaba la barrera de algunas cepas no identificadas y que los primeros indicios de actividad antimicrobial se presentaron hasta las 43 horas en 37°C y 30°C y hasta los 5 días se presentó crecimiento de *B. glumae* y actividad antimicrobial con algunas cepas en temperatura ambiente.

La mayoría de cepas mostraron actividad antimicrobial en este experimento, exceptuando las cepas número 1, 7, 18, 21, y 22. Estas fueron descartadas por no presentar el halo de inhibición o por recubrir el plato.

La cepa número 13 (Figura 7) no mantuvo la actividad después de las 48 horas en 30, 37°C y temperatura ambiente (22°C).

Con la cepa número 16 (Figura 8) la línea de *Burkholderia glumae* no creció adecuadamente, sin embargo, se observó un halo alrededor que no pasó las barreras de la cepa número 16 después de dos semanas.

La cepa número 23 (Figura 9) después de 2 semanas todavía mostraba actividad antimicrobial ya que el halo no pasó las barreras y la coloración del halo alrededor de la línea de *B. glumae* era más fuerte.

Resultados después de 2 semanas

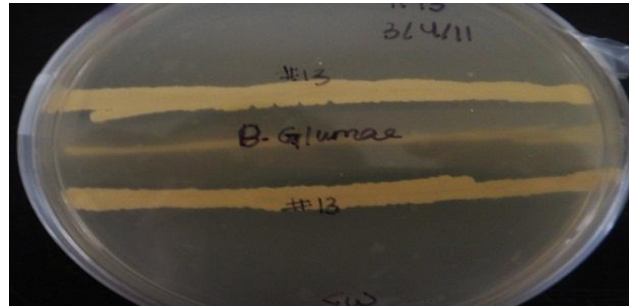


Figura 7. Cepa número 13 después de 2 semanas

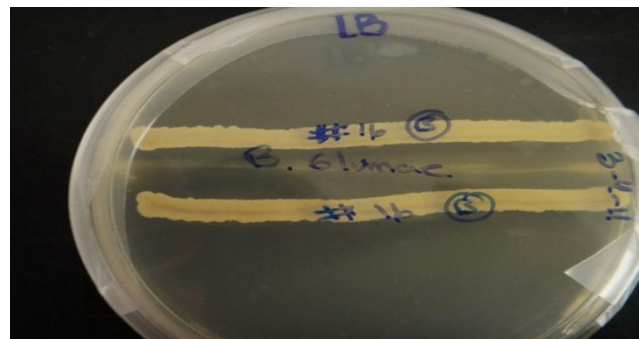


Figura 8. Cepa número 16 después de 2 semanas.

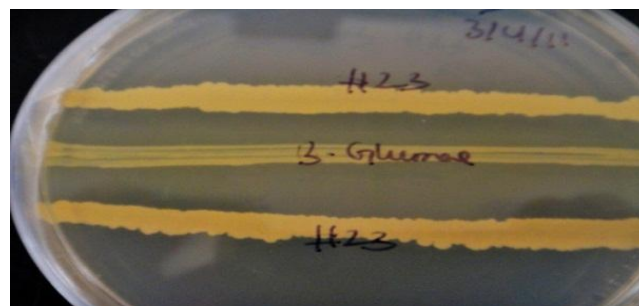


Figura 9. La cepa número 23 después de 2 semanas.

Ensayo de cuatro cepas diferentes con *Burkholderia glumae* en dilución. Las cepas número 3 y 5 (Figura 10) no mostraron actividad antimicrobial en comparación con la cepa número 2 y 4 en 30°C que mostraron un fuerte halo de inhibición. Las cepas número 6, 8, 10 y 11 (Figura 11) mostraron actividad antimicrobial en 30 ° C. Las cepas número 8,10 y 11 (Figura 12) también mostraron actividad antimicrobial en temperatura ambiente (22° C) e incluso cuando se ubicaron en conjunto con la cepa número 9 mostraron mayor inhibición al punto que *Burkholderia glumae* solo creció en pocas partes del plato Petri. Las cepas número 14, 15 y 16 en 37°C (Figura 13) presentaron actividad antimicrobial. Durante este experimento se utilizó *Escherichia coli* como control negativo ya que según la literatura esta bacteria no tiene actividad antimicrobial en contra de *Burkholderia glumae*. En el experimento en 30°C (Figura 14) y sin *Escherichia coli* el halo de inhibición fue mayor que en 37°C. También se mostró un mayor crecimiento de las cepas en 30 °C. Las cepas número 19 y 20 (Figura 15) mostraron actividad antimicrobial en temperatura ambiente (22°C). La cepa número 19 creció menos que la 20, sin embargo, fue la que presentó la mayor inhibición. Las cepas número 13 y 23 (Figura 16) también mostraron actividad antimicrobial en 30 ° C.

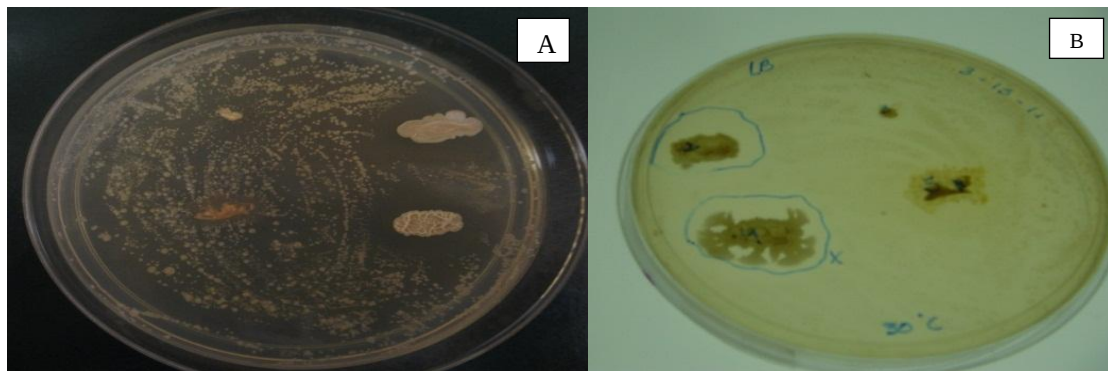


Figura 10. (A) Interior del plato Petri con solución de *B. glumae* y las cepas 2, 3, 4 y 5 (B) reverso del plato mostrando crecimiento y halo de inhibición marcado en las cepas 2 y 4.

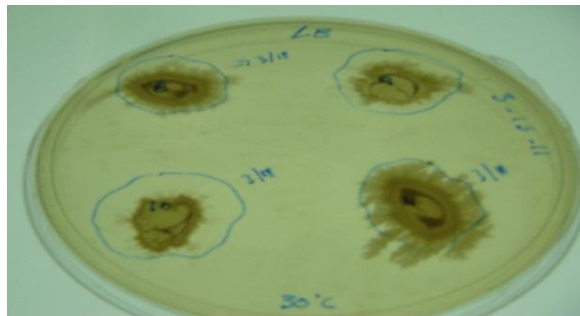


Figura 11. Cepas número 6, 8, 10 y 11 en 30°C.

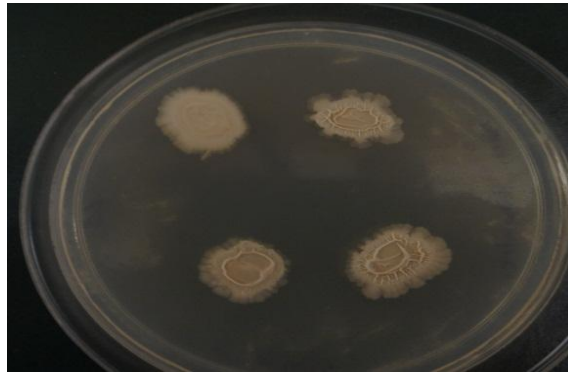


Figura 12. Cepas 8, 9, 10 y 11 en temperatura ambiente (22°C).

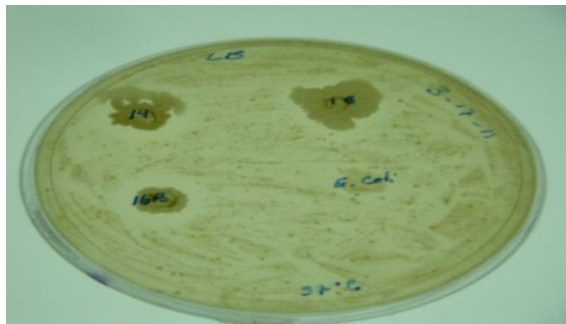


Figura 13. Cepas número 14, 15 y 16 en 37°C con *Escherichia coli*.



Figura 14. Cepas número 14,15 y 16 en 30° C.

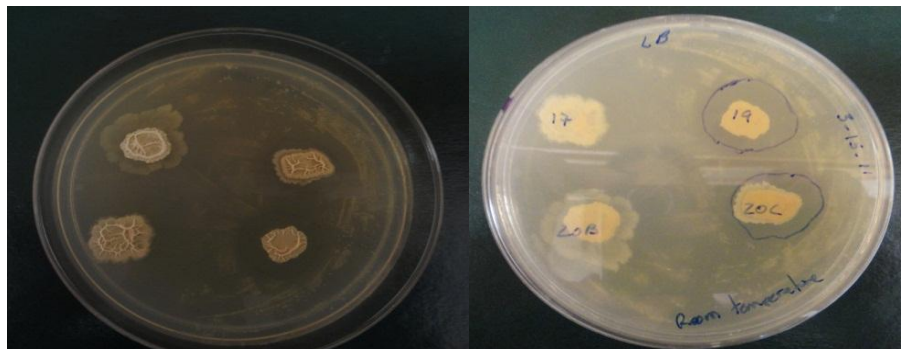


Figura 15. Cepas número 17, 19, 20 y 22 en temperatura ambiente (22°C).

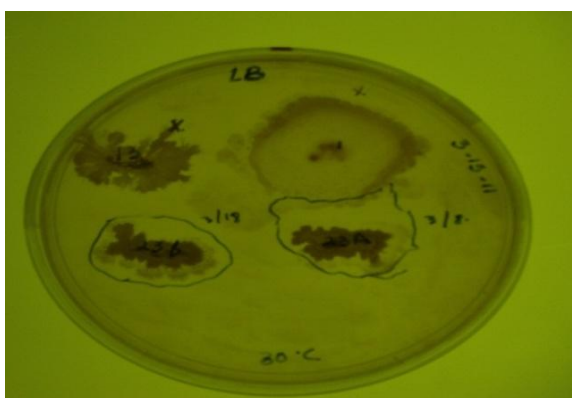


Figura 16. Cepas número 1, 13, 20 y 23 en 30 ° C.

Ensayo de cepas individuales con *B. glumae* sin dilución. Cuando las cepas fueron ubicadas individualmente en LB agar con la solución de *B. glumae* (336gr-1) sin dilución, el halo de inhibición fue menor en comparación al ensayo con dilución de 100x. La cepa número 2 (Figura 17) obtuvo un halo de inhibición de 0.33 cm a 30°C, 0.27 cm a 37 °C y 0.30 cm a temperatura ambiente. La cepa número 4 tuvo 0.33 cm de inhibición en 30°C, 0.33cm en 37°C y 0.37 cm en temperatura ambiente. La cepa número 8 se comportó igual en 30°C y 37°C (0.20 cm), pero en temperatura ambiente obtuvo 0.5 cm de inhibición. La cepa número 9 obtuvo 0.30 cm en 30°C, 0.40 cm en 37 °C y 0.37 cm de inhibición en temperatura ambiente que puede estar relacionado con la fitotoxina toxoflavin que es producida por *B. glumae*. La cepa número 10 obtuvo 0.13 cm en 30 °C, 0.23 cm en 37°C y 0.30 cm en temperatura ambiente. La cepa número 16 obtuvo 0.20 cm en 30°C, 0.33 cm en 37°C y 0.37 cm en temperatura ambiente. La cepa número 23 obtuvo 0.33 cm en 30 °C, 0.1 cm en 37 °C y 0.30 cm en temperatura ambiente.



Figura 17. Ceba número 2 en 37°C, 30°C y temperatura ambiente (22°C).

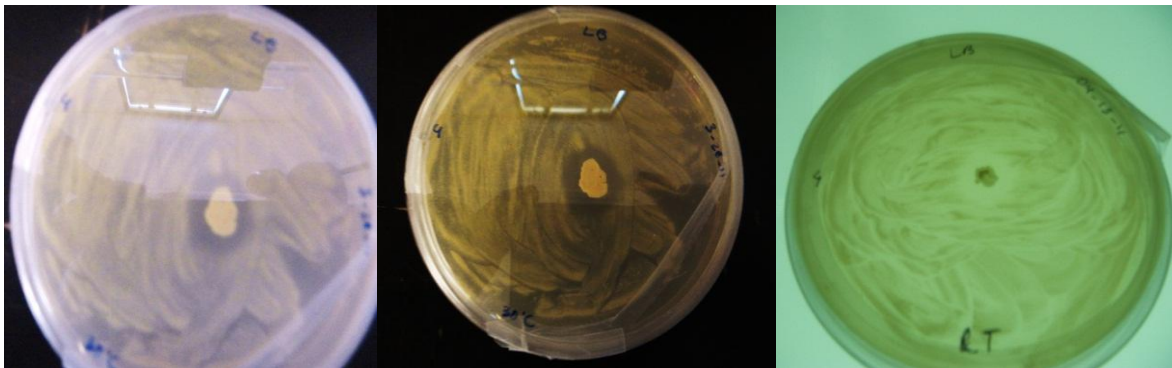


Figura 18. Ceba número 4 en 37°C, 30°C y temperatura ambiente (22°C).

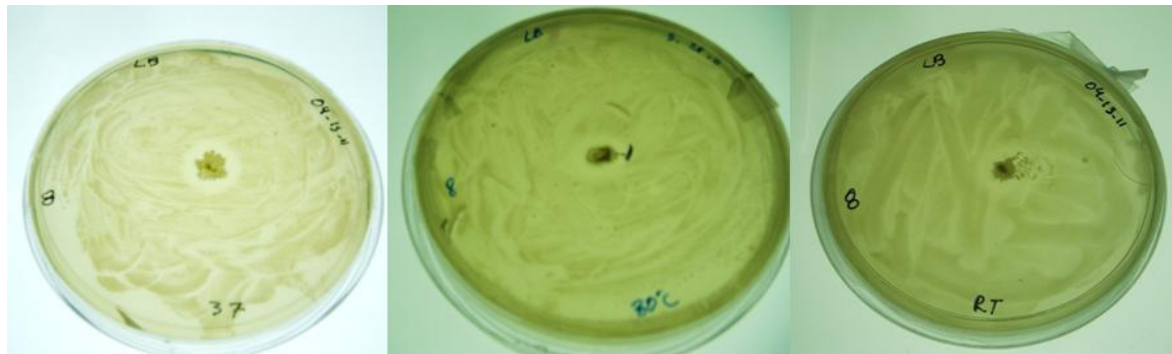


Figura 19. Ceba número 8 en 37°C, 30°C y temperatura ambiente (22°C).

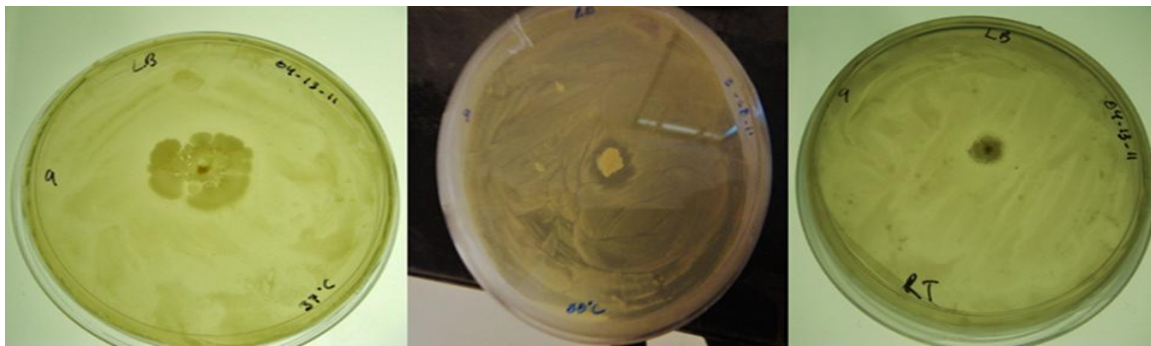


Figura 20. Ceba número 9 en 37°C, 30°C y temperatura ambiente (22°C).

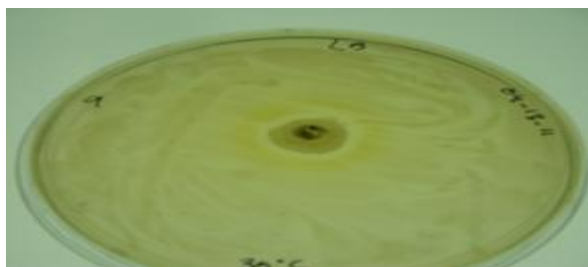


Figura 21. Ceba número 9 en 30 °C mostrando un halo de color amarillo fuerte.



Figura 22. Ceba número 10 en 37°C, 30°C y temperatura ambiente (22°C).



Figura 23. Ceba número 16 en 37°C, 30°C y temperatura ambiente (22°C)

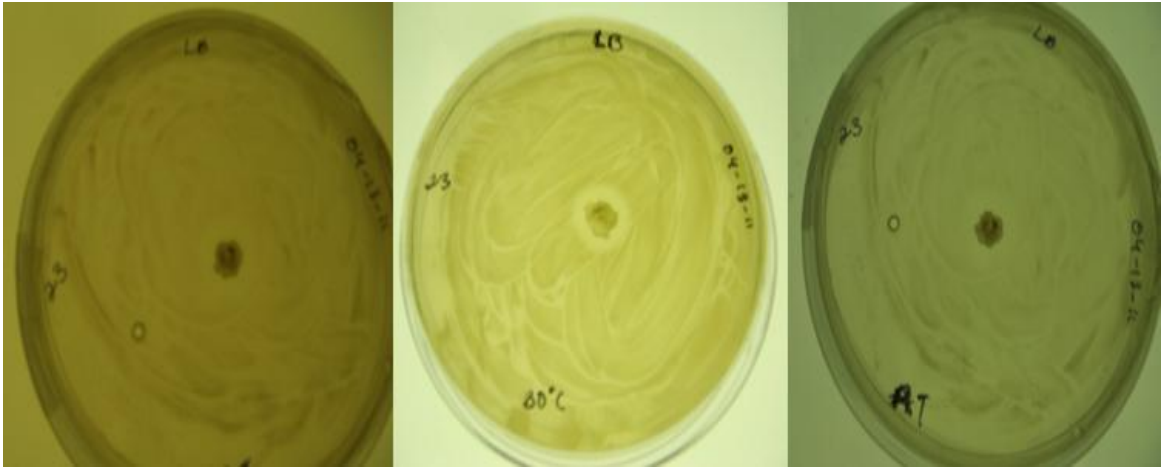


Figura 24. Cepa número 23 en 37°C, 30°C y temperatura ambiente (22°C).

Comportamiento de actividad antimicrobial por temperatura de cepas de bacterias no identificadas. Las cepas que presentaron más inhibición en 30 ° C fueron las cepas número 2, 4,9 y 23; las cuales no presentaron diferencia significativa entre si. En esta temperatura, el halo de inhibición de las cepas 8, 10 y 16 fue menor que las mencionadas anteriormente y no presentaron diferencia significativa entre si.

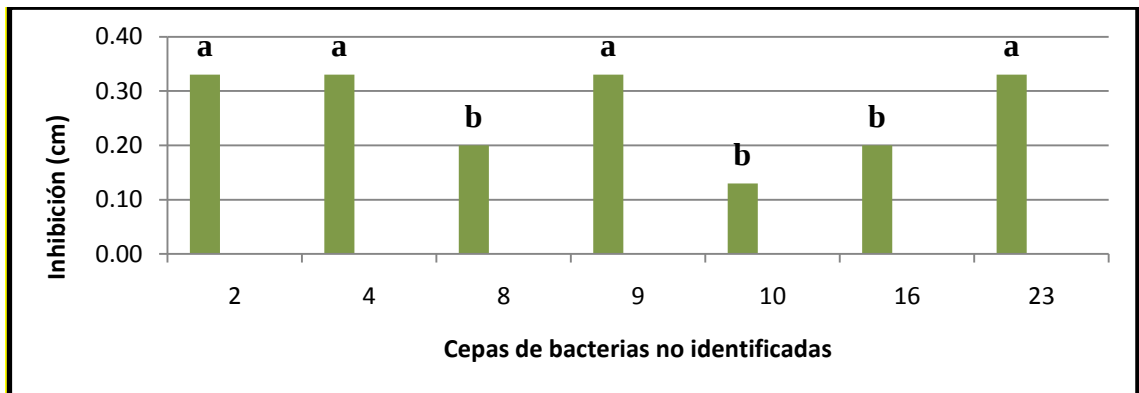


Figura 25. Evaluación del efecto antimicrobial de siete cepas de bacterias en 30° C. Barra con diferentes letras difieren significativamente entre sí ($P \leq 0.05$)

En 37° C la actividad antimicrobial fue mayor que a 30° C obteniendo hasta 0.40 cm de halo de inhibición. Las cepas que mejor se comportaron en esta temperatura fueron las cepas número 4, 9 y 16 y la cepa con menor inhibición fue la número 23 con 0.10 cm de halo de inhibición.

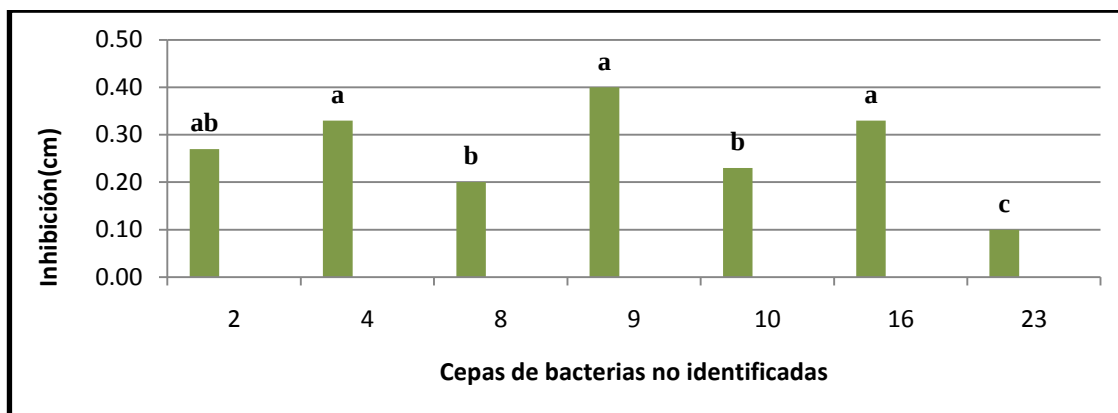


Figura 26. Evaluación de efecto antimicrobial de siete cepas de bacterias no identificadas en 37° C. Barra con diferentes letras difieren significativamente entre sí ($P \leq 0.05$).

En temperatura ambiente (22° C) se presentó mayor inhibición que a 30 y 37 ° C. Siendo la cepa de mejor comportamiento la cepa número 8 con 0.50 cm., la cepa que peor se comportó a esta temperatura fue la cepa número 9 que en 30° C había presentado un buen comportamiento de inhibición.

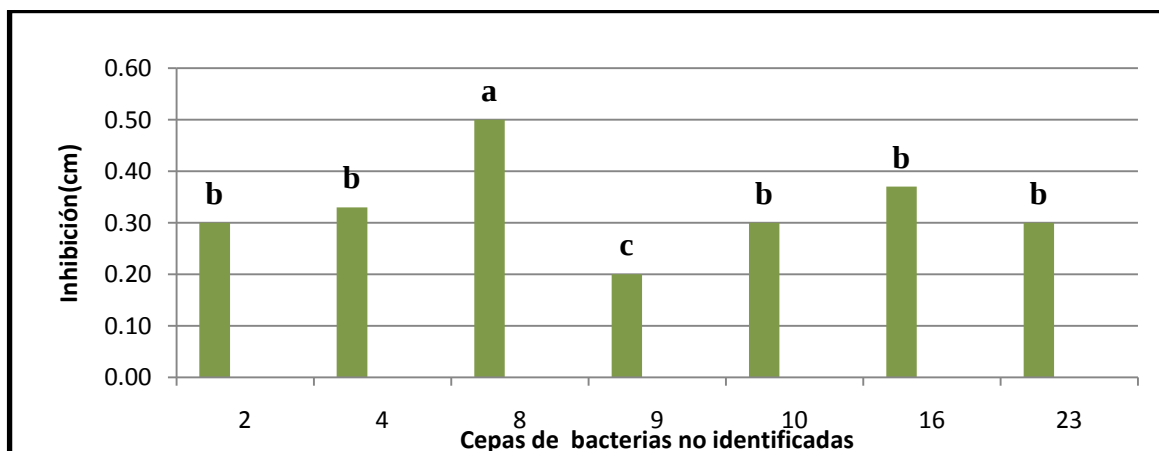


Figura 27. Evaluación de efecto antimicrobial de siete cepas de bacterias no identificadas en Temperatura ambiente (22°C). Datos en la gráfica de barra con diferentes letras difieren significativamente entre sí ($P \leq 0.05$).

Cuadro 1. Interacción de cepas de bacterias en tres diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Número de cepa	Halo de inhibición (cm)
22°C	2	0.30 cde
22°C	4	0.36 bc
22°C	8	0.50 a
22°C	9	0.20 fg
22°C	10	0.30 cde
22°C	16	0.36 bc
22°C	23	0.30 cde
30°C	2	0.33 bcd
30°C	4	0.33 bcd
30°C	8	0.20 fg
30°C	9	0.33 bcd
30°C	10	0.13 gh
30°C	16	0.20 fg
30°C	23	0.33 bcd
37°C	2	0.26 def
37°C	4	0.33 bcd
37°C	8	0.20 fg
37°C	9	0.40 b
37°C	10	0.23 ef
37°C	16	0.33 bcd
37°C	23	0.10 h

Haciendo una interacción entre cepa y temperatura (Cuadro 1), la mejor inhibición se presentó en la cepa número 8 a temperatura ambiente (22°C), sin embargo, a 30°C y 37°C esta presentó inhibición menor. La cepa número 16 y 9 no difieren entre si y tampoco difieren entre si las cepas número 2, 10 y 23 en temperatura ambiente. La cepa número 10 en 30°C y la 23 en 37°C son las que presentaron la menor inhibición siendo la 23 diferente a todas las demás.

4. CONCLUSIONES

- Las cepas de bacterias no identificadas que presentaron actividad antimicrobial en las tres temperaturas fueron: 2, 4, 8, 9, 10, 16 y 23.
- La cepa con mayor actividad antimicrobial es la cepa número 8 a temperatura ambiente y la que presentó menos inhibición fue la 23 a 37°C.
- Después de las 48 horas el halo de inhibición no continúa creciendo.
- La cepa número 8 no tiene buena actividad antimicrobial en 30°C ni en 37°C.
- El efecto de estas cepas de bacterias es preventivo y no curativo ya que el halo de inhibición a las 2 semanas no eliminó la presencia de *Burkholderia glumae*.
- Se presentó mayor actividad antimicrobial en los ensayos realizados con dilución (100x) de *B. glumae*

5. RECOMENDACIONES

- Continuar estudiando el comportamiento de estas cepas con las temperaturas más comunes de los lugares de incidencia.
- Evaluar estas cepas en campo para ver si produce alguna fitotoxicidad en diferentes variedades de arroz.
- Utilizar estas cepas en material infectado para medir el grado de inhibición.
- Estudiar la aplicación de esta bacteria durante la etapa de floración y la fase vegetativa.

6. LITERATURA CITADA

- Azegami, K., K. Nishiyama, Y. Watanabe, T. Suzuki, M. Yoshida, K. Nose and S. Toda. 1985. Tropolone as a root growth-inhibitor produced by a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. Causing seedling blight of rice. Ann. Phyto. Soc. Japan. 51: 315-317.
- Azegami, K., K. Nishiyama, Y. Watanabe, I. Kadota, A. Ohuchi, and C. Fukazame. 1987. *Pseudomonas plantarii* sp. Nov., the causal agent of rice seedling blight. Int. J. Syst. Bacteriol. 17: 144-152.
- Azegami, K., K. Nishiyama, and H. Tabei. 1988a. Infection courts of rice seedlings with *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae*. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 54 (3): 337-341
- Baxter, I. A., P. I. Lamber and I. N. Simpson. 1997. Isolation from clinical sources of *Burkholderia cepacia* possessing characteristics of *Burkholderia gladioli*. Journ. of Antimicrobial Chemotherapy. 39: 169-175
- Buckle, K. A. and E. Kartadarma. 1990. Inhibition of bongkreik acid and toxoflavin production in tempe bongkreik containing *Pseudomonas cocovenenans*. Journal of Applied Bacteriology 68: 571-576.
- Calpe,C .2002. Rice in world trade. Status of the world rice market in 2002. 35-40.
- Cheng, G., A. K. M. Shahjahan, X. L. Yuan, and M. C. Rush. 2001. Distinguishing among isolates of *Burkholderia glumae*, *B. gladioli*, *B. plantarii*, and *B. cepacia* from Rice. Proc. 29th RTWG. 29: 94.
- Cottyn, B., M. T. Cerez, M. F. Van Outryve, J. Barroga, J. Swings, and T. W. Mew. 1996a. Bacterial diseases of rice. I. Pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. Plant Dis. 80 (4): 429-437
- Cottyn, B., M. F. van. Outryve, M. T. Cerez, M. de. Cleene, J. Swings, and T. W. Mew. 1996b. Bacterial disease of rice. II. Characterization of pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. Plant Dis. 80 (4): 438-445.

- Cottyn, B., E. Regalado, B. Lanoot, M. de. Cleene, T. W. Mew, and J. Swings. 2001. Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology* 91 (3): 282-292.
- Goto, K., and K. Ohata. 1956. New bacterial disease of rice (brown stripe and grain rot). *Ann. Phyto. Soc. Jap.* 21: 46-47
- Goto, T., K. Nishiyama and K-I. Ohata. 1987. Bacteria causing grain rot of rice. *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 53: 141-149.
- Hikichi, Y. 1993a. Mode of action of oxolinic acid against bacterial seedling rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. I. Relationship between population dynamics of *P. glumae* on seedling of rice and disease severity of bacterial seedling rots of rice. *Ann. Phyto. Soc. Jap.* 59: 441-446.
- Hikichi, Y. 1993b. Relationship between population dynamics of *Pseudomonas glumae* on rice plants and disease severity of bacterial grain rot of rice. *J. Pesticide Sci.* 18: 319-324.
- Hikichi, Y., T. Okuno, and I. Furusawa. 1994. Susceptibility of rice spikelets to infection with *pseudomonas-glumae* and its population-dynamics. *J. of Pest. Sci.* 19 (1): 11-17
- Hikichi, Y. 1995a. Mode-of-action of oxolinic acid against bacterial seedling rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. II. Efficacy of oxolinic acid against secondary infection. *Annals of the Phytopath. Soc. of Jap.* 59 (4): 447-451
- Hikichi, Y. 1995b. The spread of bacterial grainrot of rice and its control in the paddy fields. *J. Pest. Sci.* 20: 329-331
- Kadota, I. And A. Ohuchi. 1983. Symptoms of bacterial brown stripe of rice seedlings in nursery boxes. *Ann. Phyto. Soc. Jap.* 49: 561-564.
- Matsuda, I. And Z. Sato. 1987. Ecology of *P. glumae*, cause bacterial grain rot of rice, from planting to the mature stage. *Ann. Phyto. Soc. Jap.* 53:122.
- Mew, T. W. 1992. Grain Rot. p.9. In: *Compendium of Rice Diseases*. (Ed.) Webster, R.K. and P.S. Gunnell. APS Press, St. Paul, MN. 62p.
- Otofuji, M., K. Kadoshige and K. Yoshida. 1988. Persistent part of *Pseudomonas glumae* Jurita et Tabei in rice plant. *Proc. Assoc. Plant Prot. Kyushu.* 34: 1-4.
- Parke, J. L. and D. Gurian-Sherman. 1998. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 225-258.

- Pérez, C. 2010. Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el Caribe colombiano. Disponible en: <http://www.slideshare.net/xescobar/004-avances-en-el-manejo-integrado-de-la-bacteria-burkholderia-glumae-en-el-caribe-colombiano-cristo-perez>
- Shahjahan, A. K. M., M. C. Rush, C. E. Clark, and D. E. Groth. 1998. Bacterial sheath rot and panicle blight of rice in Louisiana. Proc. 27th RTWG. 27: 31-32.
- Shahjahan, A. K., M. C. Rush, D. Groth, and C. Clark. 2000b. Panicle Blight. Rice Journ. 15: 26-29
- Suzuki, F., Y. F. Zhu, H. Sawada, and I. Matsuda. 1998. Identification of proteins involved in toxin production by *Pseudomonas glumae*. Annals of the Phytopath. Soc. of Jap. 64 (2): 75-79
- Tabei, H., K. Azegami, T. Fukuda, and T. Goto. 1989. Stomatal infection of rice grain with *Pseudomonas glumae*, the causal agent of the bacterial grain rot of rice. Ann. Phyto. Soc. Jap. 55 (2): 224-228
- Trung, H. M., N. V. Van, N. V. Vien, D. T. Lam, and M. Lien. 1993. Occurrence of rice grain rot disease in Vietnam. Int. Rice Res. Notes 18 (3): 30
- Tsushima, S., S. Mogi and H. Saito. 1985. Effects of inoculum density, incubation temperature and incubation period on the development of rice bacterial grain rot. Proc. Assoc. Plant Prot. Kyushu. 31: 11-12.
- Tsushima, S., S. Wakimoto and S. Mogi. 1986. Selective medium for detecting *Pseudomonas glumae* Jurita et Tabei, the causal bacterium of grain rot of rice. Ann. Phytopath. Soc. Japn. 52: 253-259.
- Tsushima, S., K. Tsuno, S. Mogi, S. Wakimoto and H. Saito. 1987. The multiplication of *Pseudomonas glumae* on rice grains. Ann. Phyto. Soc. Japan. 53: 663-667.
- Tsushima, S., S. Mogi, and H. Naito, and H. Saito. 1989. Existence of *Pseudomonas glumae* on the rice seeds and development of the simple method for detecting *P. glumae* from the rice seeds. Bull. of the Kyushu Nat. Agric. Expt. Sta. 25 (3): 261-270.
- Tsushima, S. and H. Naito. 1991. Spatial distribution and dissemination of bacterial grain rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. Ann. Phyto. Soc. Jap. 57 (2): 180-187.
- Tsushima, S., H. Naito, and M. Koitabashi. 1995a. Change in panicle susceptibility associated with flowering rate of spikelets in bacterial grain rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. Annals of the Phytopath. Soc. of Jap. 61 (2): 109-113.
- Tsushima, S. 1996. Epidemiology of bacterial grain rots of rice caused by *Pseudomonas glumae*. JARQ 30 (2): 85-89.

- Vandamme, P. A. R. 1996. Polyphasic taxonomy in practice: the *Burkholderia cepacia* challenge. Available: online: <http://www.wfcc.info/NEWSLETTER/>.
- Vandamme, P., B. Holmes, M. Vancanneyt, T. Coenye, B. Hoste, R. Coopman, H. Revets, S. Lauwers, M. Gillis, K. Kersters, and J. R. W. Govan. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 1188-1200.
- Vandamme, P., E. Mahenthiralingam, B. Holmes, T. Coenye, B. Hoste, P. D. Vos, D. Henry, and D. P. Speert. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). Journ. of Clinical Microbiol. 38 (3): 1042-1047
- Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. Nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. Microbial. Immun. 36:1251-1275.
- Yoneyama, K., Y. Kono, I. Yamaguchi, M. Horikoshi, and T. Hirooka. 1998. Toxoflavin is an essential factor for virulence of *Burkholderia glumae* causing rice seedling rot disease. Annals of the Phytopath. Soc. of Jap. 64 (2): 91-96.
- Zeigler, R. S., and E. Alvarez. 1987. Bacterial sheath brown rot of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in Latin America. Plant Dis. 71: 592-597.
- Zeigler, R. S., G. Aricapa, and E. Hoyos. 1987. Distribution of fluorescent *Pseudomonas* spp. causing grain and sheath discoloration of rice in Latin American. Plant Dis. 71: 896-900.
- Zeigler, R. S. and E. Alvarez. 1989a. Differential culture medium for *Pseudomonas* species causing sheath rot (ShR) and grain discoloration (GID) of rice. Int. Rice Res. Inst. Newsl. 14: 27-28.
- Zeigler, R. S. and E. Alvarez. 1989b. Grain discoloration of rice caused by *Pseudomonas glumae* in Latin America. Plant Dis. 73 (4): 368.
- Zeigler, R. S. and E. Alvarez. 1989c. *Pseudomonas* species causing rice sheath rot (ShR) and grain discoloration (GID). Int. Rice Res. Newsletter 14 (1): 26.
- Ziegler, R. S. 1990. Nonfluorescent *Pseudomonas* strains causing rice sterility and grain discoloration in Colombia. Int. Rice Res. Newsletter 15 (3): 28-29.
- Zeigler, G. S. and E. Alvarez. 1990. Characteristics of *Pseudomonas* spp. causing grain discoloration and sheath rot of rice, and associated *Pseudomonas* epiphytes. Plant Dis. 74 (11): 917-922.

