

Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad

AISLAMIENTO

Es la obtención de un cultivo bacteriano puro, extraído de un ambiente a otro mediante técnicas de laboratorio, con la finalidad de inducir su crecimiento en medios de cultivo artificiales, con el objetivo de realizar su identificación.

El método de aislamiento y los medios de cultivo para el desarrollo de una bacteria, se seleccionan de acuerdo al patógeno del que se sospecha, la enfermedad, la sintomatología y el hospedante. Los aspectos importantes a considerar, son el tipo de síntoma, órgano afectado, grado de avance de la enfermedad, así como del material y equipo disponible (Rodríguez, 2006). El aislamiento puede realizarse directamente de tejido vegetal con síntomas iniciales (**Cuadro 1**) o a partir de material propagativo para confirmar la presencia o ausencia de patógenos; este incluye semillas, tubérculos, bulbos o plántulas en las que se sospeche la presencia de infecciones latentes.

Cuadro 1. Técnicas de aislamiento a partir de los diferentes síntomas ocasionados por bacterias fitopatógenas

Síntoma	Inmersión del tejido en agua destilada estéril	Maceración del tejido	Punción directa	Siembra directa del tejido enfermo
Manchas	X	X		X
Tizones	X	X		
Sobrecrecimientos	X	X		X
Roñas	X	X		
Cancros	X	X		
Pudriciones	X		X	
Marchitez	X		X	

Fuente: Rodríguez (2006)

La **Inmersión del tejido en agua destilada estéril** es la técnica de aislamiento más utilizada y consta de los siguientes pasos:

- 1) Seleccionar el tejido vegetal infectado que presente signos o síntomas (**Figura 1**).
- 2) Realizar cortes finos en la zona de avance de las lesiones (tejido sano y enfermo) con un bisturí, previamente desinfectado con etanol al 70 %. Colocar el tejido en un vaso de precipitado o caja Petri estéril.
- 3) En condiciones asépticas, desinfectar el tejido con hipoclorito de sodio al 1 % durante 90 s.



Figura 1. Selección de tejido infectado

- 4) Enjuagar y decantar tres veces con agua destilada estéril, seccionar nuevamente el tejido en fragmentos más pequeños y transferirlos a un tubo de ensaye con agua destilada estéril o solución salina estéril al 0.85 % .
- 5) Mantener el tubo en agitación o en reposo de 10 a 15 min a temperatura ambiente, para facilitar la salida de las bacterias del tejido hacia el agua o solución salina para obtener la suspensión bacteriana.

SIEMBRA

Para obtener un cultivo bacteriano, se debe sembrar por estría cruzada en medio de cultivo de aislamiento (Agar nutritivo) el inóculo (suspensión bacteriana), o colocar porciones de la muestra (tejido o material propagativo) sobre el medio de cultivo, para propiciar el desarrollo y multiplicación de las bacterias.

Siembra con inóculo. Para llevar a cabo esta técnica utilizar la suspensión que se mantuvo en incubación o agitación.

- 1) En una cámara de transferencia, tomar la caja Petri en la palma de la mano ligeramente inclinada, con la mano contraria manipular el asa y flamearla directamente a la llama de un mechero, enfriarla en un lado del agar (**Figura 2**).
- 2) Introducir el asa a la suspensión bacteriana, tomar un poco del inóculo y llevarlo al medio de cultivo, realizar una línea arrastrando los microorganismos presentes en la suspensión hacia el extremo contrario del agar, repetir formando una estría.
- 3) Girar 90 °C la caja Petri, flamear el asa, enfriar y tomar inóculo del extremo de la última estría, repetir el mismo paso como se muestra en la **Figura 3**. Esta técnica tiene como objetivo reducir la carga microbiana arrastrada por el asa (Rojas, 2011) para obtener colonias aisladas (**Figura 4**).



Figura 2. Siembra en medio de cultivo

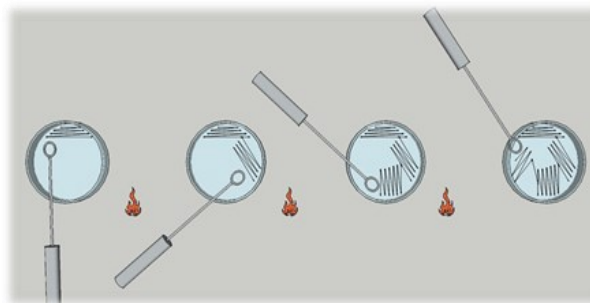


Figura 3. Técnica de siembra por estría cruzada (Meneses, 2020)

Dirección General de Sanidad Vegetal

Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Subdirección de Diagnóstico Fitosanitario

Departamento de Fitopatología

Laboratorio de Bacteriología

4) Sellar las cajas con cinta parafilm o similar, e incubar a temperatura constante de 28 °C durante 24 - 48 horas .

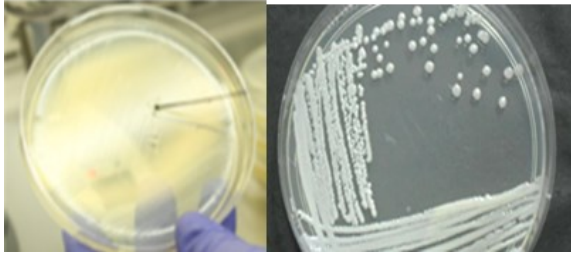


Figura 4. Crecimiento bacteriano por estría cruzada

Siembra directa

Una vez desinfectados los tejidos seleccionados realizar lo siguiente:

- 1) En una cámara de transferencia, cortar finamente el tejido vegetal.
- 2) Con unas pinzas, previamente esterilizadas, tomar una porción de tejido y colocarlo directamente en la caja Petri con el medio de cultivo seleccionado (Figura 5).
- 3) Sellar las cajas e incubar a 28 °C durante 48 h (Schaad et al. 2001).



Figura 5. Siembra del tejido directo

Nota: transcurrido el tiempo de incubación de cualquier tipo de siembra realizada, revisar el crecimiento, identificar la morfología colonial tipo de la(s) bacteria(s) del género buscado y continuar con su purificación.

PURIFICACIÓN

Se le denomina cultivo puro al que contiene un solo tipo de microorganismo. Éstos se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos cuenten con la misma composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de las bacterias y para poder ser identificadas con seguridad.

Procedimiento:

- 1) Seleccionar las colonias tipo individualmente bajo microscopio estereoscópico.
- 2) En una cámara de transferencia, realizar la resiembra de la colonia seleccionada por estría simple en medio semi selectivo o selectivo (consultar bibliografía especializada), incubar por 48 h a 28 °C.
- 3) Realizar las resiembras necesarias hasta obtener la cepa pura (Figura 6).

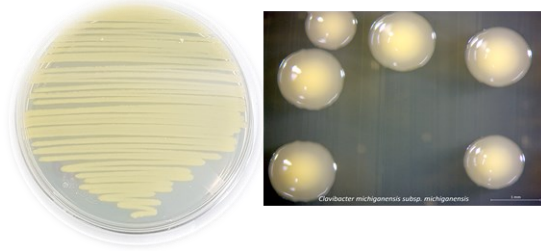


Figura 6. Cepas puras

Aislamiento a partir de semilla

En relación a la semilla y la cantidad que se tenga para analizar, pesar la cantidad correspondiente para realizar la prueba de aislamiento. Si se cuenta con suficientes semillas es recomendable inducir su germinación (Figura 7), ya que de esta forma es posible aislar la bacteria y comprobar su viabilidad.

- 1) Lavar las semillas con agua destilada estéril para eliminar los agroquímicos con los que vienen tratadas. Eliminar el excedente de agua sobre papel secante.
- 2) En una cámara de transferencia, desinfectar las semillas con hipoclorito de sodio al 1 % durante 90 s.
- 3) Enjuagar y decantar tres veces con agua destilada estéril.

Las semillas también se pueden procesar preparando una suspensión con solución amortiguadora y/o sembrarlas directamente sobre el medio de cultivo (Figura 8).

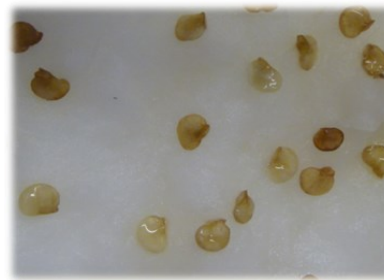


Figura 7. Germinación de las semillas

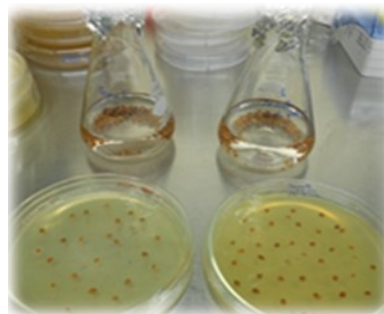


Figura 8. Semillas en solución amortiguadora y siembra directa en medio de cultivo

Siembra de inóculo-suspensión a partir de semillas:

- 1) En una cámara de transferencia, colocar las semillas en un matraz con 100 mL de *buffer* de fosfatos (0.05 M, pH 7.5, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, 0.02 % Tween), previamente esterilizado, e incubarlas por tres horas a 4 °C o bien, durante toda la noche.
- 2) Transcurrido el tiempo de incubación, colocar nuevamente el matraz en agitación durante una hora a temperatura ambiente (**Figura 9a**).
- 3) En una caja Petri con medio de cultivo colocar 100 µL del *buffer* y con un triángulo de vidrio o metal, dispersar la solución en todo el medio de cultivo (**Figura 9b**), para este caso se puede utilizar medio de aislamiento (Agar Nutritivo) o medios semi selectivos (B de King, YDC-levadura-carbonato de calcio dextrosa, CPG-glucosa, peptona y casaminoácidos). Se recomienda consultar bibliografía especializada.
- 4) Las cajas Petri con la bacteria sembrada se dejan incubar de 24 a 48 h a 28 °C. Una vez transcurrido el tiempo, seleccionar las colonias con morfología tipo a las bacterias del género buscado y continuar con su purificación.

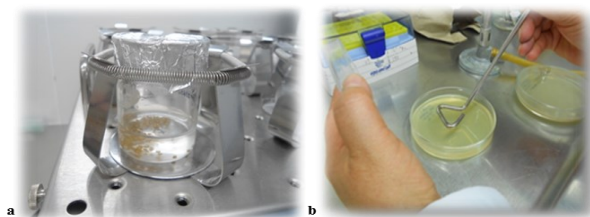


Figura 9 Aislamiento a partir de semillas. a) Suspensión de semillas en *buffer* de fosfatos. b) Siembra de la suspensión bacteriana

Pruebas de patogenicidad

La mayoría de los fitopatógenos secretan enzimas al estar en contacto con algún sustrato; por ejemplo, enzimas celulolíticas que provocan el ablandamiento y la desintegración de las sustancias de la pared celular y, además, permiten que el patógeno al penetrar y propagarse en los tejidos, ocasione el colapso y la desintegración de su estructura celular.

Para realizar las pruebas de patogenicidad, es necesario seleccionar un método de inoculación adecuado, el hospedante y la vía de entrada del patógeno, de este modo se verificará la patogenicidad de la bacteria.

Pudrición de tubérculo de papa

Esta prueba se emplea para determinar la presencia de enzimas pectolíticas, para ello se debe realizar lo siguiente:

- 1) Con el fin de evitar la contaminación por organismos saprófitos durante la prueba, es necesario desinfectar el tubérculo. Sumergir una papa en un vaso de precipitado que contenga etanol al 70 % e hipoclorito de sodio al 1 % V/V durante 15 min.
- 2) Dejar escurrir y secar la papa, bajo condiciones asépticas desinfectar superficialmente el tubérculo con etanol al 70

%. Posteriormente flamear.

- 3) Cortar dos rodajas de papa de aproximadamente 4 mm de grosor y colocarlas en una caja Petri de vidrio con una base de papel filtro, ambos previamente esterilizados.
- 4) Con un bisturí o cuchillo desinfectado o flameado, realizar una incisión en el centro de cada una de las rodajas de papa.
- 5) Tomar con el asa bacteriológica, previamente flameada, un poco de la cepa bacteriana pura e inocular en el centro de una rodaja. La rodaja sobrante se emplea como control testigo por lo que no debe contener a la bacteria.
- 6) Adicionar de 3 a 5 mL de agua destilada estéril para humedecer el papel filtro y crear un ambiente húmedo dentro de la caja.
- 7) Incubar a 28 °C de 24 a 72 h, esto es variable dependiendo el tipo de cultivo bacteriano. Una vez transcurrido el tiempo, revisar si se observa pudrición blanda en la rodaja inoculada (**Figura 10**).



Figura 10. Pudrición blanda. Reacción ocasionada por bacterias fitopatógenas pectolíticas (izquierda) testigo, (derecha) inoculada

Hipersensibilidad en tabaco

Las bacterias fitopatógenas ocasionan necrosis del tejido vegetal en plantas susceptibles e inducen una clara reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) después de 24 h de la inoculación (Rodríguez, 2006).

Para comprobar que la cepa bacteriana es fitopatógena, se recomienda realizar lo siguiente:

- 1) Bajo condiciones asépticas, preparar una suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^{-8} UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias) e inocular en el envés de una hoja de tabaco con ayuda de una jeringa (**Figura 11**).



Figura 11. Infiltración de la cepa bacteriana

- 2) Mantener la planta a temperatura ambiente durante 24 o 48 h. Transcurrido el tiempo, observar si se presenta necrosis del tejido en la hoja inoculada (**Figura 12 b**) .

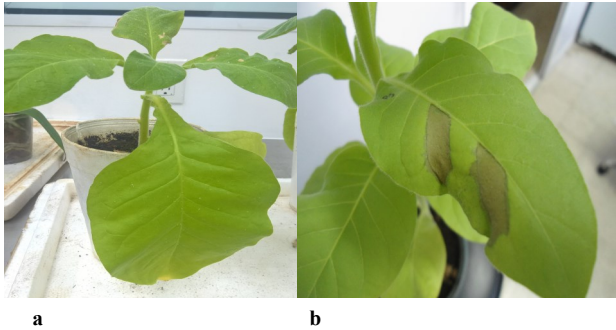


Figura 12. Hipersensibilidad en hojas de tabaco a) Hoja sana b) Hoja inoculada, necrosis del tejido, reacción positiva

REFERENCIAS

- Arauz, C. L. F. (1998). *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. Universidad de Costa Rica.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. y Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (3a ed.). APS PRESS, St. Paul Minnesota.
- Rodríguez, M. M. L. (2006). *Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas*. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
- Rojas, T. A. (2011). *Manual de Microbiología Conceptos y Práctica de Microbiología General*. Universidad Nacional de Colombia.
- Meneses, H. A. G. (2020). Dibujo técnica siembra por estría cruzada.

Forma recomendada de citar

Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Ficha Técnica: Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad [Versión 1.0]. Autor.

Contacto

Correo: lab.bacteriologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 55 5905 1000 Ext. 51314 y 51333