



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA  
MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL



**IDENTIFICACIÓN DE CONTAMINANTES BACTERIANOS EN EL CULTIVO *in vitro* DE *Prosthechea* aff. *citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins  
(Orchidaceae)**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**



**PRESENTA:**

**TOMASITA SANTIAGO JERÓNIMO**

DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
DIRECCIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES

**Bajo la supervisión de: DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA**

Chapingo, Estado de México, noviembre de 2016

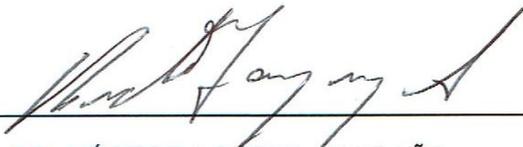


IDENTIFICACIÓN DE CONTAMINANTES BACTERIANOS EN EL CULTIVO *in vitro* DE *Prosthechea aff. citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins (Orchidaceae)

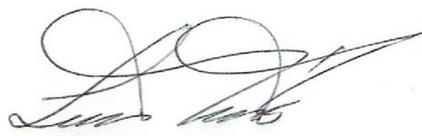
Tesis realizada por **TOMASITA SANTIAGO JERÓNIMO** bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

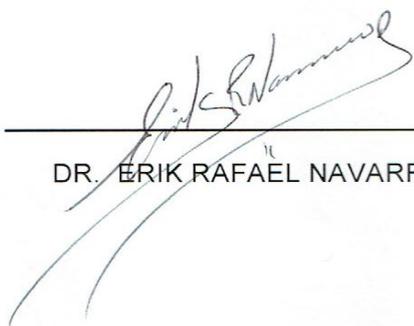
DIRECTOR: \_\_\_\_\_

  
DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESORA: \_\_\_\_\_

  
M. C. MARÍA DE LOURDES RODRÍGUEZ MEJÍA

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
DR. ERIK RAFAEL NAVARRO LÓPEZ

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por financiar mis estudios.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por permitirme hacer uso de sus instalaciones durante mi formación y formar parte de esta distinguida institución.

Dr. Héctor Lozoya Saldaña por todo el apoyo brindado para la realización de la investigación y por ser un ejemplo a seguir.

A la M. C. María Lourdes Rodríguez Mejía por todos los conocimientos y aportaciones realizadas a la presente.

Al Dr. Erik Rafael Navarro López por las contribuciones realizadas.

Al Dr. Mateo Vargas por su valiosa ayuda en los análisis estadísticos.

A mi familia que siempre estuvo apoyándome.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

Tomasita Santiago Jerónimo nació en Santiago Teotlasco Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

Inició sus estudios de Licenciatura la Universidad de la Sierra Juárez (UNSIJ) en el municipio de Ixtlán en el año 2008, obteniendo el título de Licenciada en Biología en el 2013.

Realizó un curso de inglés en el “Language Studies International” en Vancouver.

En agosto de 2016 inició sus estudios de posgrado en la Maestría en Protección Vegetal, en la Universidad Autónoma Chapingo.

## ÍNDICE GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.2 OBJETIVOS .....	3
1.2.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
1.3 HIPÓTESIS.....	3
CAPÍTULO 2 .....	4
2.1 REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1.1 Biodiversidad de México .....	4
2.1.2 <i>Prosthechea citrina</i> (La Llave & Lex.) W. E. Higgins (Orchidaceae).....	4
2.1.3 El cultivo de tejidos vegetales .....	6
2.1.4 Bacterias asociadas a las plantas .....	7
2.1.5 Contaminación bacteriana .....	7
2.1.6 Antibiogramas .....	7
2.1.7 Identificación molecular de los contaminantes bacterianos .....	8
CAPÍTULO 2.2.....	9
LITERATURA CITADA.....	9
CAPÍTULO 3 .....	12
3.1 INTRODUCCIÓN.....	13
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.2.1 Material biológico .....	14
3.2.2 Aislamiento y purificación de los contaminantes bacterianos .....	15
3.2.3 Caracterización bioquímica de los contaminantes bacterianos .....	16
3.2.4 Identificación molecular de los contaminantes bacterianos. ....	17
3.2.6 Antibiogramas .....	18
3.2.7 Análisis de datos .....	19
3.3 RESULTADOS.....	19
3.3.1 Aislamiento y purificación de los contaminantes bacterianos .....	19

3.3.2 Caracterización bioquímica de los contaminantes bacterianos .....	20
3.3.3 Identificación molecular de los contaminantes bacterianos. ....	22
3.3.4 Antibiogramas .....	23
3.3 DISCUSIÓN.....	26
3.4 CONCLUSIONES.....	28
3.5 LITERATURA CITADA .....	29
ANEXO .....	32
APÉNDICE .....	33

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.-</b> Bacterias aisladas de las distintas partes de <i>Prosthechea aff. citrina</i> (La Llave & Lex.) W. E. Higgins (Orchidaceae), de acuerdo a los dos sitios de colecta en Ixtlán de Juárez Oaxaca. ....	20
<b>Cuadro 2.-</b> Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los nueve aislamientos .....	22
<b>Cuadro 3.-</b> Resultados de las secuencias consultadas en la base de datos del GenBank.....	22
<b>Cuadro 4.-</b> Comparación de medias de los diámetros de inhibición (mm) del crecimiento de las bacterias respecto a diferentes antibióticos y tiempos de exposición .....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Ubicación de la sierra norte, lugar de colecta. ....	14
<b>Figura 2.-</b> Partes de la planta utilizadas como explantes. ....	15
<b>Figura 3.-</b> Morfología de las colonias bacterianas aisladas de los tejidos de la orquídea. ....	20
<b>Figura 4.-</b> Morfología celular de los aislamientos. ....	21
<b>Figura 5.-</b> Determinación del metabolismo de los aislamientos. ....	21
<b>Figura 6.-</b> <i>A. hydrophila</i> frente a distintos antibióticos; <b>6a</b> : oxitetraciclina, <b>6b</b> : tetraciclina, <b>6c</b> : rifampicina y <b>6d</b> : ampicilina. ....	23
<b>Figura 7.-</b> Cepa B frente a distintos antibióticos; <b>7a</b> : ampicilina, <b>7b</b> : tetraciclina, <b>7c</b> : oxitetraciclina y <b>7d</b> : rifampicina. ....	24
<b>Figura 8.-</b> Cepa G frente a diferentes antibióticos; <b>8a</b> : ampicilina, <b>8b</b> : tetraciclina, <b>8c</b> : oxitetraciclina y <b>8d</b> : rifampicina. ....	24
<b>Figura 9.-</b> <i>Enterobacter</i> frente a diferentes antibióticos; <b>9a</b> : ampicilina, <b>9b</b> : tetraciclina, <b>9c</b> : oxitetraciclina y <b>9d</b> : rifampicina. ....	25

## LISTA DE APÉNDICES

<b>Apéndice 1.-</b> Análisis de varianza de la bacteria A= <i>Aeromonas hydrophila</i> . ..	33
<b>Apéndice 2.-</b> Análisis de varianza de la bacteria B. ....	34
<b>Apéndice 3.-</b> Análisis de varianza de la bacteria C= <i>Aeromonas hydrophila</i> . ..	35
<b>Apéndice 4.-</b> Análisis de varianza de la bacteria D= <i>Aeromonas hydrophila</i> ...	36
<b>Apéndice 5.-</b> Análisis de varianza de la bacteria E= <i>Aeromonas hydrophila</i> . ..	37
<b>Apéndice 6.-</b> Análisis de varianza de la bacteria F= <i>Aeromonas hydrophila</i> . ..	38
<b>Apéndice 7.-</b> Análisis de varianza de la bacteria G.....	39
<b>Apéndice 8.-</b> Análisis de varianza de la bacteria H= <i>Enterobacter</i> sp.....	40
<b>Apéndice 9.-</b> Análisis de varianza de la bacteria H= <i>Enterobacter</i> sp.....	41
<b>Apéndice 10.-</b> Alineamiento de la cepa A con <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	42
<b>Apéndice 11.-</b> Alineamiento de la cepa C con <i>Aeromonas hydrophila</i> , las marcas en amarillo indican en que pares de bases difieren las secuencias. ....	44
<b>Apéndice 12.-</b> Alineamiento de la cepa D con <i>Aeromonas hydrophila</i> . ....	47
<b>Apéndice 13.-</b> Alineamiento de la cepa E con <i>Aeromonas hydrophila</i> , las marcas en amarillo indican en que pares de bases difieren las secuencias. ....	49
<b>Apéndice 14.-</b> Alineamiento de la cepa F con <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	52

# CAPÍTULO 1

## 1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos de plantas más diversos, sobresaliendo su uso ornamental, aromatizante, medicinal, artesanal y comestible, lo que le da importancia cultural y económica (Solano-Gómez *et al.*, 2007).

Lamentablemente en nuestro país, la riqueza de orquídeas está en peligro permanente a consecuencia de la destrucción y transformación de sus hábitats, el tráfico ilegal de las especies y el crecimiento urbano (Ávila & Salgado, 2006). De acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, 187 especies de orquídeas se encuentran catalogadas dentro de algún status de conservación, de las cuales 15 están en peligro de extinción, 62 amenazadas, 109 sujetas a protección especial y una especie se encuentra extinta en la naturaleza (*Laelia gouldiana*) (SEMARNAT, 2010). Así mismo, toda la familia Orchidaceae ha sido incluida en los apéndices I y II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2016).

Al igual que otras plantas las orquídeas establecen una relación simbiótica con muchos microorganismos, dentro de los cuales se encuentran las bacterias, bacterias endófitas que ejercen varios efectos benéficos sobre las plantas hospedantes, tal como la estimulación del crecimiento, fijación del nitrógeno e inducción de resistencia contra fitopatógenos (Sturz *et al.*, 1997; Kirchhorf *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1995).

Las rizobacterias son las mejor conocidas por su importancia en la fijación de nitrógeno, tal como ocurre en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. Sin embargo, las bacterias endófitas han sido aisladas de las leguminosas como la alfalfa trébol (Sturz *et al.*, 1997) y chícharo (Recuenco & Van-Vuurde, 2000). Varias bacterias han sido aisladas de los tejidos de las leguminosas, incluyendo *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Chryseomonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* (Gagne *et al.*, 1987, citado por Quang & Annapurna, 2004).

De los géneros bacterianos aislados de las orquídeas, se ha demostrado que *Azotobacter* y *Bacillus radicolica* promueven la germinación de semillas de orquídeas por la producción de la fitohormona auxina (IAA). Los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Xanthomonas*, *Sphingomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Rhodococcus* sp., *Cellulomonas* sp., *Pseudomonas* sp., y *Micrococcus luteus* también tienen la capacidad de producir esta hormona (Knudson, 1922; Wilkinson *et al.*, 1989 y 1994; Tsavkelova *et al.*, 2004a, 2004 b). Ramos *et al.* (2007) realizaron un estudio de bacterias asociadas a *Laelia furfuracea* y *Oncidium sphacelatum*, encontrando a los géneros *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* y *Herbaspirillum* como habitantes de la rizósfera, rizoplano y endófito de la planta.

Una de las formas de propagación más demandada de las orquídeas, es por medio del cultivo de tejidos *in vitro*, en este proceso se hace uso de distintos antibióticos, con la finalidad de controlar o eliminar a los microorganismos contaminantes que se presentan en los medios de cultivo utilizados para tal fin. Dentro de los más usados se encuentran la rifampicina, es un antibiótico bactericida de amplio espectro, pertenece al grupo de las rifamicinas, con un mecanismo de acción que inhibe la síntesis del ARN al unirse a la subunidad beta de la ARN polimerasa dependiente del ADN, evitando la unión de la enzima al ADN y bloqueando así la iniciación de la transcripción del ARN (Lizárraga *et al.*, 1991). Las tetraciclinas también tienen un espectro antimicrobiano muy amplio, que incluye gran parte de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Son antibióticos de acción bacteriostática, esta acción se halla asociada a una inhibición de la síntesis proteica bacteriana en el proceso de reproducción y crecimiento celular, al ligarse al ribosoma bacteriano 30S (Connamacher & Mandel, 1965) y evitar la llegada del complejo aminoacil RNAt al sitio aceptor (A) en el complejo RNAm-ribosoma. Esta unión irreversible impide de forma eficaz la incorporación de los aminoácidos que constituyen la cadena peptídica, inhibiendo de esta forma la síntesis de proteínas. La tetraciclina y oxitetraciclina de acuerdo a su liposolubilidad pertenecen al grupo de las hidrosolubles (Schnappinger &

Hillen, 1996). Los beta-lactámicos como la ampicilina son antibióticos penicilínicos semisintéticos de amplio espectro y de efecto bactericida. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBPs (Penicillin-Binding Proteins) localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la ampicilina ocasiona, en último término, la lisis de la bacteria y su muerte (Mérida, 2013).

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar las bacterias contaminantes desarrolladas durante el cultivo *in vitro* de *Prosthechea aff. citrina* para evitar su desarrollo en futuros estudios

### **1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar a los microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro* de *Prosthechea aff. citrina*
- Identificar molecularmente los aislamientos bacterianos.
- Evaluar diferentes antibióticos para el control y/o erradicación de los contaminantes en el cultivo *in vitro*.

## **1.3 HIPÓTESIS**

Ho: No se encontrará ninguna bacteria contaminando al cultivo *in vitro* de *P. aff. citrina*.

Ha: Se encontrará por lo menos una especie de bacteria contaminando al cultivo *in vitro* de *P. aff. citrina*.

Ho: Todos los antibióticos tendrán el mismo efecto sobre el crecimiento de las bacterias.

Ha: Al menos un antibiótico tendrá un efecto diferente sobre el crecimiento de las bacterias.

## CAPÍTULO 2

### 2.1 REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1.1 Biodiversidad de México

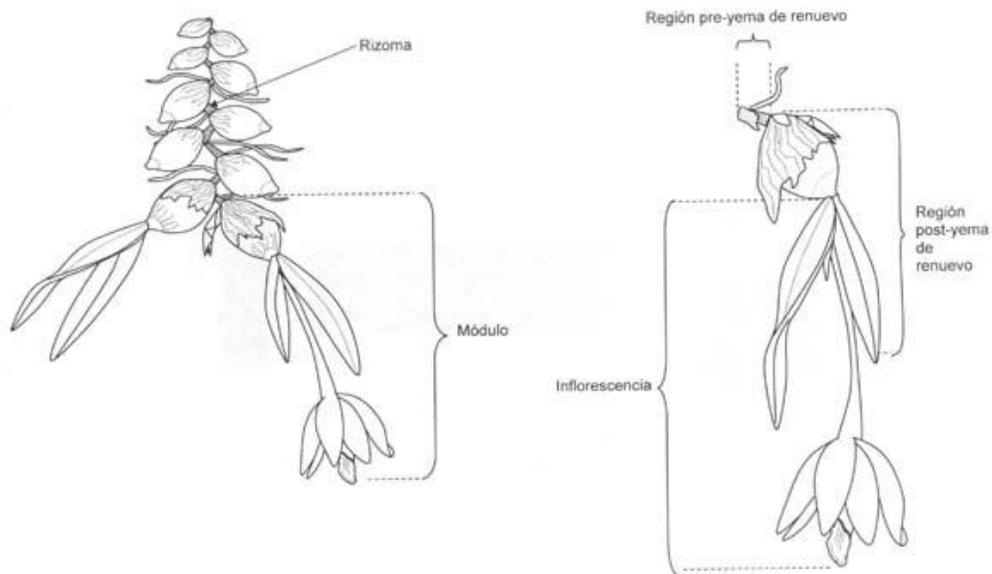
México es reconocido como un país de alta diversidad biológica, se ha calculado que nuestro país posee el 10 % de la flora del mundo equivalente a 22 411 especies sin incluir a las especies introducidas, estas cifras ubican a México en el tercer lugar a nivel mundial. Su gran diversidad biológica se atribuye a la combinación de diversos factores, entre ellos, su posición geográfica, variabilidad geológica, diversidad de altitudes, climas y su orografía (Magaña & Villaseñor, 2002; Salazar, 2010). México es un país notable no sólo por su riqueza en especies, sino también por su gran número de endemismos. Más del 50 % de las especies de plantas endémicas reportadas para México, están representadas en sólo cinco familias: Cactaceae, Asteraceae, Poaceae, Fabaceae y Orchidaceae (Salazar, 2010).

Las orquídeas presentan una distribución amplia, pero son más abundantes y diversas en los bosques húmedos que se concentran en la parte sur del país. El número aproximado de especies reconocidas para México es de 1,300 y la proporción de especies endémicas de la orquideoflora se ha estimado en 40 % (Soto-Arenas & Salazar, 2004; Solano-Gómez *et al.*, 2007).

#### 2.1.2 *Prosthechea citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins (Orchidaceae)

Es una orquídea endémica de México y se conoce en Nayarit, Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Morelos, Oaxaca, Puebla y Veracruz, donde su hábitat preferido son los bosques de encino y pino-encino. Las plantas florecen de marzo a mayo, sus flores son muy vistosas y producen una fragancia muy agradable lo cual la ha convertido en una de las plantas mexicanas más apreciada en cultivo (Salazar, 2006). También ha sido una de las orquídeas con más usos en México desde tiempos prehispánicos como fuente de un adhesivo natural el cual se empleó en el arte de la plumaría, como fijador de pinturas, aglutinante de papel amate, para cementar una harina de caña de maíz con la que se hacían esculturas religiosas y en la elaboración de dulces como las calaveritas. No

obstante, el uso más relevante de *P. citrina* es el ornamental al grado que es una de las orquídeas mexicanas más apreciadas en cultivo en el país y el extranjero (Salazar, 2009). En el pasado sus flores, sumamente vistosas y con una fragancia muy agradable, se utilizan para elaborar coronas, guirnaldas y ramilletes, al igual que para adornar imágenes religiosas. Es también una de las orquídeas mexicanas más extraídas de su hábitat para ser vendida como adorno efímero en calles y mercados de las ciudades de México, Morelia y Oaxaca. Esta situación y la pérdida y transformación de algunos de sus hábitats son causa de que esta especie esté incluida dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie sujeta a protección especial (Soto-Arenas & Solano-Gómez, 2007). El modelo arquitectónico de *P. citrina* corresponde a un crecimiento simpodial, rizomatoso y plagiotrópico (crecimiento colgante), donde los módulos se producen anualmente, constituyendo una cadena que generalmente se ramifica (Figura A y B) (Solano-Gómez, 2009).



**Figura A.-** Dibujo esquemático que muestra el modelo de crecimiento simpodial de *Prosthechea citrina*. (Solano-Gómez, 2009)



**Figura B.-** Detalle de la flor de *Prosthechea* aff. *citrina*.

### **2.1.3 El cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales ha tenido un gran impacto tanto en la industria como en la agricultura, proveyendo las plantas necesarias que el mundo demanda, ha hecho grandes contribuciones en el avance de la ciencia agronómica y actualmente constituye una herramienta muy indispensable en la agricultura moderna, el cual permite la producción de especies libres de agentes patógenos (Arditti & Yam, 2009). También brinda la alternativa de producir ejemplares de plantas que no producen semillas fértiles, porque han sido obtenidas de cruces inter-genéricos. Así como hacer posible el mejoramiento de variedades de cultivos con alto potencial de resistencia a los plaguicidas (Hussain *et al.*, 2012).

En lo que respecta a la familia Orchidaceae los estudios realizados han sido muchos y muy variados, a fin de lograr establecer las condiciones ideales de propagación *in vitro*. La primera propagación exitosa de orquídeas en condiciones *in vitro* a partir de la germinación de semillas fue lograda por Knudson (1922) con especies de *Cattleya* (Arditti & Yam, 2009). A partir de esa fecha se han aplicado las técnicas de cultivo de tejidos vegetales a distintas especies de plantas.

#### **2.1.4 Bacterias asociadas a las plantas**

Las plantas están constantemente envueltas en interacciones con un amplio rango de bacterias. Estas bacterias asociadas a las plantas colonizan la rizosfera (rizobacterias), la filosfera (epifitas) y dentro del tejido de las plantas (endófitas). Las bacterias endófitas están protegidas del estrés ambiental y competencia microbiana por la planta y ellas parecen ser alojadas en todo el tejido de la planta, han sido aisladas de las flores, frutas, hojas, ramas, raíces y semillas de varias especies de plantas. Las asociaciones que han establecido las orquídeas con bacterias, estas se han encontrado dentro del sustrato donde se desarrollan y en las raíces de orquídeas tanto epifitas como terrestres (Kobayashi & Palumbo, 2000).

#### **2.1.5 Contaminación bacteriana**

La contaminación por bacterias es un problema importante en el cultivo de tejidos vegetales puede no ser eliminado con ninguna técnica de desinfección, por lo tanto requiere de antibióticos. Los antibióticos ideales deben ser solubles, estables, que carezca de efectos secundarios, amplio efecto bactericida, que no induzca resistencia y no tóxico para la salud humana (Red & Tanprasert, 1995).

El continuo uso de antibióticos en el medio o repetir tratamientos con un solo antibiótico se podría generar resistencia por parte de las bacterias. Los antibióticos son agrupados por su mecanismo de acción; inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos. El uso de antibióticos de diferente modo de acción puede ser favorable, pero algunos son incompatibles y pueden anular los efectos positivos de los fármacos individuales (Red & Tanprasert, 1995).

#### **2.1.6 Antibiogramas**

El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana (Ferraro, 2001). El método de disco-placa se basa en el trabajo de Bauer *et al.* (1966), es un método que se recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El

antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. (Cavaliere *et al.*, 2005).

### **2.1.7 Identificación molecular de los contaminantes bacterianos**

El desarrollo de herramientas de biología molecular ha jugado un papel fundamental en la taxonomía moderna de las bacterias, también ha mejorado el nivel de conocimiento sobre la biología de los microorganismos y sus relaciones filogenéticas con otros organismos (Clarridge, 2004).

En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador está presente en todas las bacterias. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución. Además, tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis. El ARNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas. Así pues, la identificación mediante el ARNr 16S se fundamenta en su secuencia (Fenollar *et al.*, 2006; Gürtler & Stanisich, 1996). La secuencia del gen ARNr 16S presenta de forma aproximada 1.500 pb, y se compone de nueve zonas variables V1-V9 y zonas conservadas. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo inter-específico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas. Los cebadores universales elegidos son complementarios a las zonas conservadas del inicio del gen, en la zona de 540 pb, y al final del gen. Las zonas variables, comprendidas entre estas zonas conservadas son las regiones utilizadas para realizar una taxonomía comparativa (Rodicio & Mendoza, 2004).

## CAPÍTULO 2.2

### LITERATURA CITADA

- Arditti J. & Yam W, T. (2009). History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnol Rep.* 3:1–56.
- Ávila I, D. & Salgado R, G. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas para colaborar en su conservación. *Ciencias Biológico-Agropecuarias.* 8:138-149.
- Cavaliere J, S., Ranking D, I., Harbeck J, R., Sautter L, R., McCarter S, Y., Sharp E, S., Ortez H, J. & Spiegel A, Carol. (2005). Manual of antimicrobial susceptibility testing. American Society for Microbiology. Washington, USA. pp: 39-52.
- Chen C, Bauske E, M., Mussan G., Rodriguez-Kabana R. & Kloepper J, W. (1995). Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol. Control* 5:83-91.
- Clarridge III J, E (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol* 17: 840-862.
- Connamacher R, H. & Mandel H, G. (1965). Binding of tetracycline to the 30S ribosomes and to polyuridylic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20: 98-103.
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, (2016). Disponible en: <https://cites.org/sites/default/files/eng/app/2016/S-Appendices-2016-03-10.pdf>
- Fenollar F., Roux V., Stein A., Drancourt M. & Raoult D. (2006) Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J. Clin Microbiol.* 44:1018-1028.
- Ferraro M, J. (2001). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; *Eleventh Informational Supplement.* 21: 132-1143.
- Gürtler V. & Stanisich V, A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol* 142:3-16.
- Hussain A., Qarchi A., Nazir H. and Ullah I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Plant Tissue Culture* 1-28.
- Kirchhorf G., Reis V, M., Baldani J, I., Eckert B., Döbereiner J. & Hartmann A. (1997). Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant Soil* 194:45-55.

- Knudson L, (1922). Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds, *Bot. Gaz.* 73(1): 1–25.
- Kobayashi D, Y. & Palumbo J, D. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon C, W. & White J, F. (Eds.) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, Inc., N.Y., New York, pp: 199-233.
- Lizárraga, R., Panta, A., Jayasinghe, U. & Dodds, J. (1991). Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos. Guía de investigación CIP 3. Centro Internacional de la papa, Lima, Perú. 21 p.
- Magaña P, R. & Villaseñor J. L. (2002). La flora de México, *Ciencias* 66: 24-26.
- Mérida F, C. (2013). Reacciones adversas a antibióticos betalactámicos en el Área Este de Murcia. Departamento de Ciencias Sociosanitarias, Universidad de Murcia España. 198 p.
- Quang H, P. & Annapurna K. (2004). Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine sp.*) *Omonrice* 12: 92-101.
- Ramos Z, E., Salgado T, J. & Hernández A, T. (2007). Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (orchidaceae). *Lankesteriana* 7(1-2): 322-325.
- Recuenco M, E. & Van Vuurde J, L. (2000). Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can. J. Microbiol.* 46:1036-1041.
- Red M, & Tanprasert P, (1995). Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1(3):137-142.
- Rodicio M, & Mendoza M, C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22: 238-245.
- Salazar A, G. (2006). Orquídeas y otras plantas nativas de la cañada Cuicatlán. Instituto de Biología-UNAM. México. 175 p.
- Salazar A, G. (2009). Orquídeas. En Lot A. & Cano S, Z. (Eds.), *Biodiversidad del Ecosistema de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel*, Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp: 153-169.
- Salazar A, G. (2010). Orquídeas. *Diversidad biológica e inventarios*. Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp: 153-169.
- Schnappinger D. & Hillen W. (1996). Tetracycline: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* 165 (6): 359-369.

- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial (30 de diciembre 2010). México, D.F.
- Solano-Gómez, A. R. (2009). Crecimiento, patrones de distribución y estructura de edades de *Prosthechea karwinskii* (ORCHIDACEAE) en San Vicente Lachixío, Oaxaca, México (pp. 2-11). Informe técnico final proyecto de investigación (sip 20070515).
- Solano-Gómez, A. R., Bello L, R. & Vásquez M, A. (2007). Listado de las orquídeas de la región de Juquila, Oaxaca, México. *Naturaleza y Desarrollo* 5(2): 5-14.
- Soto-Arenas, M. A. & Salazar G, A. (2004). Orquídeas. En: García-Mendoza A. J., M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas (eds.), Biodiversidad de Oaxaca, Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la conservación de la Naturaleza-World wildlife Fund, México. Pp: 271-295.
- Soto-Arenas, M. A. y Solano-Gómez, A. R. (2007). Ficha técnica de *Euchile citrina*. En: Soto-Arenas, M. A. (Comp.). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM- 059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario De la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D. F.
- Sturz A, V., Christie B, R., Matheson B, G. & Nowak J. (1997). Biodiversity of endophytic bacteria, which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soils* 25:13–19.
- Tsavkelova A, E., Cherdyntseva T, A. & Netrusov I, A. (2004a). Bacteria associated with roots of epiphytic orchids. *Microbiology* 73(6): 825–831.
- Tsavkelova A, E., Cherdyntseva T, A. & Netrusov I, A. (2004b). Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology* 74(1): 46–53.
- Wilkinson K, H., Dixon K, W. & Sivasithamparam, K. (1989). Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. *New Phytol.* 112: 429-435.
- Wilkinson K, H., Dixon K, W., Sivasithamparam K. & Ghisalberti E, L. (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant Soil* 159: 291–295.

### CAPÍTULO 3

IDENTIFICACIÓN DE CONTAMINANTES BACTERIANOS EN EL CULTIVO *in vitro* DE *Prosthechea* aff. *citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins (Orchidaceae)

IDENTIFICATION OF CONTAMINAT BACTERIA ON THE *in vitro* CULTURE OF *Prosthechea* aff. *citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins (Orchidaceae)

<sup>1</sup>Tomasita Santiago Jerónimo y <sup>2</sup>Héctor Lozoya Saldaña.

#### RESUMEN

Durante el proceso de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se presentan hongos y bacterias contaminantes, que ocasionan pérdidas del material vegetal. La presente investigación tuvo como objetivo la identificación de bacterias contaminantes en el cultivo *in vitro* de la orquídea *Prosthechea* aff. *citrina*. Mediante pruebas bioquímicas y moleculares (secuenciación del ARN ribosomal 16S), se identificó a *Aeromonas hydrophila* y *Enterobacter* sp. Se evaluaron cuatro antibióticos para su control, rifampicina (20 µg/ml), oxitetraciclina (10 µg/ml), ampicilina (100 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml), con acción altamente específica, pues la mayor inhibición se obtuvo con la oxitetraciclina para *A. hydrophila*; ampicilina para *Enterobacter* sp.

Palabras clave: contaminación, bacterias, antibióticos, *in vitro*.

#### ABSTRACT

During the *in vitro* plant tissue culture process contaminant fungi and bacteria are present, inducing loss of plant material. The objective of this research was the identification of contaminat bacteria on the *in vitro* culture of the orquid *Prosthechea* aff. *citrine*. By biochemical and molecular tests (sequencing the 16S ribosomal RNA), *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacter* sp. were identified. Four antibiotics, rifampicin (20 µg/ml), oxytetracycline (10 µg/ml), ampicillin (100 µg/ml) and tetracycline (10 µg/ml) were evaluated to control them. Their action was highly specific, since the best inhibition was obtained with oxytetracycline for *A. hydrophila* and ampicilin for *Enterobacter* sp.

Keywords: contamination, bacteria, antibiotics, *in vitro*.

<sup>1</sup>Tesista. <sup>2</sup>Director de tesis.

### 3.1 INTRODUCCIÓN

EL cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser una opción de micropropagación y de conservación *in vitro* de germoplasma vegetal, pues, específicamente en el caso de las orquídeas, se reportan especies con las que se ha utilizado este sistema con éxito (Ávila & Salgado, 2006). No obstante, durante el proceso se presentan microorganismos contaminantes. La mayoría de ellos son hongos y bacterias. Estos están comúnmente en las plantas *in vivo* pero pueden provocar efectos devastadores en las plantas *in vitro*. La búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y/o erradicación de los contaminantes resulta una labor relevante, para contribuir a la conservación de las especies mexicanas (Cruz *et al.*, 2006; Santiago, 2013).

Los explantes pueden llevar contaminantes en su superficie y/o en su interior. Aquellos que los llevan sobre su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección superficial, pero los que se encuentran dentro del tejido son difíciles de eliminar, lo que impide cumplir con uno de los requisitos básicos para el éxito de la técnica de cultivo *in vitro* de cualquier especie, el cual es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminantes (Ramírez *et al.*, 2000).

La presencia de microorganismos contaminantes en la fase de establecimiento *in vitro* ocurre sobre todo cuando la planta donante crece directamente en el campo y está expuesta a plagas, enfermedades, polvo y otros agentes, sin ningún control ambiental (Ramírez-Villalobos & Salazar, 1997). También este fenómeno se favorece por las características anatómicas propias de las especies, como la pilosidad foliar, tricomas, etc., que impiden la penetración de los desinfectantes, lo cual dificulta la eliminación de los microorganismos o puede deberse a técnicas inadecuadas de trabajo en el laboratorio (Alvarado, 1998).

La contaminación por bacterias es a menudo difícil de detectar porque ellas permanecen mayormente dentro del tejido de las plantas. Los tejidos contaminados pueden ser asintomáticos, tener tasas de multiplicación y enraizamiento reducidas, pudiendo morir. La introducción de microorganismos se debe también a la deficiente desinfección o esterilización pero esto puede ser

corregido con mejoras en la manipulación de los equipos (Red & Tanprasert, 1995). Con base en lo anterior la presente investigación tuvo como objetivo identificar y reducir la presencia de las bacterias contaminantes en el cultivo *in vitro* de *Prosthechea aff. citrina*.

### 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.1 Material biológico

El material biológico utilizado fueron plantas jóvenes de *Prosthechea aff. citrina*, que se obtuvieron de las siguientes coordenadas geográficas 17°20'012" N, 96°30'654" O y 17°19'890" N, 96°30'774" O a 2104 y 2106 msnm respectivamente, dentro de un bosque de encino-pino ubicado en la comunidad de Ixtlán de Juárez, sierra norte de Oaxaca (Fig. 1). La colecta se llevó a cabo en el mes de enero de 2016.



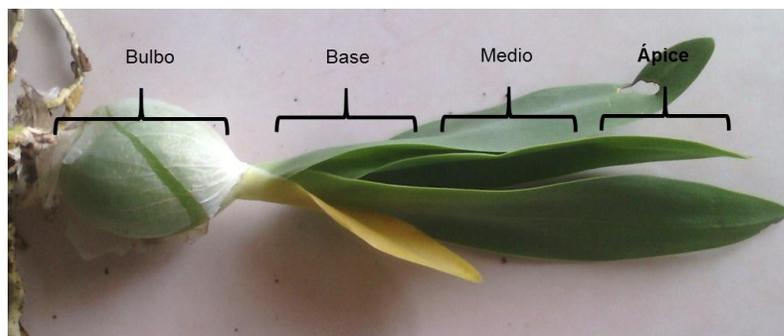
**Figura 1.-** Ubicación de la sierra norte, lugar de colecta.

Las plantas fueron sometidas a un proceso de desinfección que consistió en un enjuague con agua destilada para eliminar la materia orgánica superficial, a los bulbos se les retiraron todas las brácteas membranosas, enseguida bajo condiciones asépticas se realizó un enjuague con alcohol al 70 % durante un minuto, y tres enjuagues con agua destilada estéril, y finalmente se sumergieron

en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 30 minutos, al terminó se volvió a enjuagar tres veces con agua destilada estéril.

### 3.2.2 Aislamiento y purificación de los contaminantes bacterianos

Una vez desinfectadas las plantas, a los bulbos se les retiró la epidermis. Siguiendo la metodología de Ramos *et al.* (2007), cada planta fue dividida en cuatro secciones para la siembra; los bulbos, la base, parte media y el ápice de la hoja (Fig. 2). Después se les realizaron disecciones en partes de 12 milímetros aproximadamente y se procedió a la siembra, procurando poner siempre en contacto el tejido disectado con el medio de cultivo, preparado a partir de las sales básicas de Murashige & Skoog (1962), suplementado con inositol, glicina y sacarosa. Todas la unidades experimentales se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas oscuridad en un cuarto de incubación (Moreno & Menchaca, 2007).



**Figura 2.-** Partes de la planta utilizadas como explantes.

De 10-15 días de haber establecido el experimento se empezó a observar contaminación por bacterias y hongos, a partir de éstas se aislaron únicamente a las bacterias con la ayuda de una asa de siembra esterilizada.

Para el aislamiento se frotó una asa bacteriológica sobre el tejido vegetal que presentaba la presencia de bacterias y éstas se sembraron por estría cruzada, en cajas de Petri con medio LB (Luria Bertani: peptona de caseína 10g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l y agar bacteriológico 15 g/l) y se incubaron a 37 °C durante 48 horas, después de la incubación se realizó la purificación de las colonias bacterianas.

### **3.2.3 Caracterización bioquímica de los contaminantes bacterianos**

De acuerdo a la metodología de identificación bioquímica descrita por Rodríguez (2001) y Bergey (1994), se realizaron las siguientes pruebas.

#### **3.2.3.1 Prueba de Gram**

La primera fue la determinación del Gram, con la finalidad de separar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas, para ello se realizó la prueba Ryu. En un portaobjetos se colocó una gota de hidróxido de potasio al 3 % y se mezcló con una colonia bacteriana, si la mezcla formaba hilo correspondían a bacterias Gram negativas, y si la mezcla no formaba hilo eran Gram positivas.

#### **3.2.3.2 Morfología celular**

La prueba se llevó a cabo colocando en un portaobjetos una gota de agua destilada estéril y se mezcló con una pequeña cantidad de bacterias, se fijó la bacteria flameando el portaobjetos y una vez evaporada el agua se le añadió una gota de cristal violeta al 0.1N, se observó al microscopio óptico a 5X, 10X, 400x y 100X.

#### **3.2.3.3 Prueba de movilidad**

De la misma manera que para la morfología celular, después de mezclar en una gota de agua con la bacteria, se le añadió cuidadosamente el cubreobjetos, para ser observados al microscopio óptico.

#### **3.2.3.4 Producción de endosporas**

En un tubo de ensayo con agua destilada estéril se suspendió una colonia bacteriana, éste se puso en baño maría durante 30 minutos. Posteriormente, se tomó una alícuota de la suspensión y fue sembrada en una caja de Petri con medio de cultivo, con la finalidad de detectar si la bacteria en cuestión formaba endosporas.

#### **3.2.3.5 Determinación del metabolismo**

Para determinar si las bacterias tenían un metabolismo aeróbico estricto o aeróbico facultativo se utilizó el medio de Hugh and Leifson. La bacteria se inoculó por picadura con un asa de siembra, y se incubo en condiciones de

aerobiosis (sin aceite mineral estéril) y de anaerobiosis (con aceite mineral estéril).

### **3.2.4 Identificación molecular de los contaminantes bacterianos.**

#### **3.2.4.1 Extracción de DNA genómico de bacterias**

La extracción del DNA bacteriano se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del kit de extracción (mini DNA easy plants de Qiagen), que consistió en:

Triturar las muestras ( $\leq 100$  mg de peso húmedo o  $\leq 20$  mg de tejido liofilizado) usando el TissueRuptor, el TissueLyser II, o un mortero y pistilo. Añadir 400  $\mu$ l de amortiguador AP1 y 4  $\mu$ l de RNasa A agitar e incubar por 10 minutos a 65 °C. Invertir el tubo 2-3 veces durante la incubación. Añadir 130  $\mu$ l de amortiguador P3. Mezclar e incubar durante 5 minutos en hielo. Recomendación: centrifugar el lisado durante 5 minutos a 20 000 xg (14 000 rpm). Pipetear el lisado en un tubo de columna giratoria QIAshredder en tubos eppendorf de 2 ml. Centrifugar durante 2 minutos a 20 000 xg (14 000 rpm). Transferir el sobrenadante en un nuevo tubo sin el precipitado si está presente. Añadir 1.5 volúmenes de amortiguador AW1 y mezclar por pipeteo. Transferir 650  $\mu$ l de la mezcla a un tubo de columna giratoria DNeasy de centrifugación de 2 ml. Centrifugar por 1 minuto a  $\geq 6$  000 xg ( $\geq 8$  000 rpm). Descartar el sobrenadante. Repetir éste paso con el resto de la muestra. Colocar la columna de centrifugación a un nuevo tubo de 2 ml. Añadir 500  $\mu$ l de amortiguador AW2 y centrifugar por 1 minuto a  $\geq 6$  000 xg ( $\geq 8$  000 rpm). Descartar el sobrenadante. Añadir otros 500  $\mu$ l de amortiguador AW2. Centrifugar por 2 minutos a 20 000 xg (14 000 rpm). Nota: Remover la columna de centrifugación del tubo de recolección cuidadosamente, que la columna no toque el sobrenadante. Transferir la columna de centrifugación a un nuevo tubo de microcentrifuga de 1.5 ml o 2 ml. Añadir 100  $\mu$ l de amortiguador AE para la elución. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C). Centrifugar por 1 minuto a  $\geq 6$  000 xg (8 000 rpm). Repetir el último paso.

La cuantificación del DNA se realizó partiendo del supuesto que una unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 50 ng/ $\mu$ l de DNA de doble cadena (Rickwood &

Hames, 1990). La calidad del DNA fue inferida mediante el cálculo de la relación A260/A280. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro.

#### **3.2.4.2 Amplificación, PCR, secuenciación y alineamiento del ADN ribosomal 16S**

El ADN fue enviado al laboratorio Macrogen en Korea, ubicado en 10F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-gu, Seoul 08511, Rep. of Korea, para la secuenciación de la región 16S del ARN ribosomal, ya que se trata de una molécula muy antigua, que está presente en todas las bacterias, constituyendo una diana universal para su identificación, además de que su estructura y función han permanecido constantes por mucho tiempo, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios (Rodicio & Mendoza, 2004).

Después de 15 días las secuencias fueron recibidas, a las cuales se les realizó la limpieza de las secuencias en ambos sentidos del ARNr 16S, enseguida se volteó la secuencia “R” y se obtuvo la complementaria, estos procedimientos se llevaron a cabo con el programa CHROMAS. Posteriormente con el programa DNASTAR se obtuvo la secuencia consenso o “contig” y finalmente las secuencias fueron corridas en el algoritmo BLASTN del NCBI, para determinar el grado de homología que guardan con respecto a las secuencias depositadas en la base de datos pública GenBank.

#### **3.2.6 Antibiogramas**

Como se explicó en la revisión de literatura, los antibiogramas proporcionan información útil respecto a la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana.

Se prepararon 100 ml de medio de cultivo LB (Luria Bertani) para cada tipo de bacteria, después de la esterilización del medio, cuando la temperatura descendió a unos 40-50 °C se le adicionó la suspensión bacteriana a una turbidez de  $1 \times 10^7$ , el medio fue vaciado en cajas de Petri.

Se evaluaron un total de cuatro antibióticos 1. Rifampicina (20 µg/ml), 2. Oxitetraciclina (10 µg/ml), 3. Ampicilina (100 µg/ml) y 4. Tetraciclina (10 µg/ml). Para estudiar la efectividad de los antibióticos contra los microorganismos contaminantes se empleó el método de disco-placa. Se utilizaron discos de papel filtro Whatman No. 1 de 6.93 mm de diámetro, los cuales fueron sumergidos en 1 ml de solución en cada antibiótico en la dosis arriba mencionadas. Por cada caja de Petri fueron colocados cuatro discos impregnados con antibióticos y uno con agua destilada esterilizada como control, con un total de 12 discos por cada tipo de bacteria.

Con la ayuda de un vernier digital se realizaron dos mediciones a los halos de inhibición, la primera a las 24 horas y la segunda a las 48 horas. Después de las mediciones, a las 72 horas se realizó un frotis sobre el halo de inhibición y se sembró en medio de cultivo sin antibiótico, para analizar si el efecto del antibiótico fue bactericida o bacteriostático.

### **3.2.7 Análisis de datos**

A los datos de los diámetros obtenidos del halo de inhibición se les restó el diámetro del disco (6.93 mm) y se les realizó un análisis de varianza usando un modelo como diseño completamente al azar (DCA), se incluyeron las comparación de medias por el método de Fisher (LSD), mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analyses Systems, version 8).

## **3.3 RESULTADOS**

### **3.3.1 Aislamiento y purificación de los contaminantes bacterianos**

Una vez aisladas y purificadas las bacterias, de los diferentes tejidos de las plantas de la orquídea, se clasificaron de acuerdo a las características de la morfología colonial y para diferenciarlas fueron nombradas con las letras A, B, C, D, E, F, G, H e I (Cuadro 1).

Como se observa en dicho cuadro, la cepa “B” solo se presentó en la parte media de la hoja de una planta, para la cepa “F” no se presentó en los explantes del bulbo, la cepa “D” tampoco estuvo presente en la parte media de las hojas. La

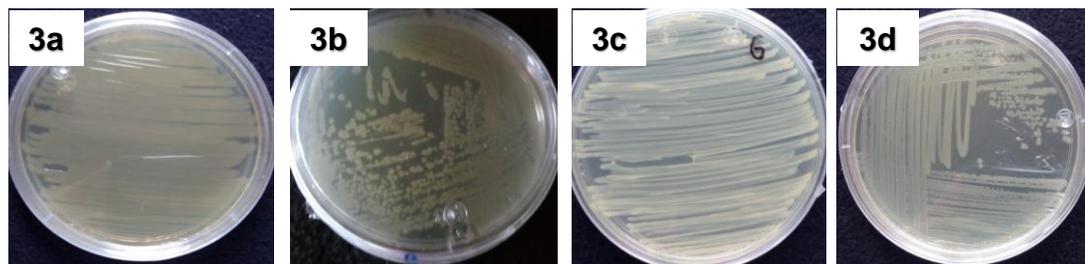
cepa “H”, se encontró en el bulbo de tres de las cuatro plantas y en la base de las hojas de dos plantas, así mismo la cepa “I” se encontró en el bulbo de las cuatro plantas y en tres en la base de las hojas, pero ninguna de estas dos se encontró en las hojas.

**Cuadro 1.-** Bacterias aisladas de las distintas partes de *Prosthechea* aff. *citrina* (La Llave & Lex.) W. E. Higgins (Orchidaceae), de acuerdo a los dos sitios de colecta en Ixtlán de Juárez Oaxaca, enero de 2016.

	Sitio 1		Sitio 2	
	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4
Bulbo	A, C, D, H, I	C, E, H, I	A, D, E, I	C, D, H, I
Base de la hoja	D, E, H, I	A, C, I	A, D, F, I	A, E, H, F
Parte media de la hoja	C, F,	A, F,	A, B, C	A, G,
Ápice de la hoja	A, F, G	D, E	C, D, E	A, F

### 3.3.2 Caracterización bioquímica de los contaminantes bacterianos

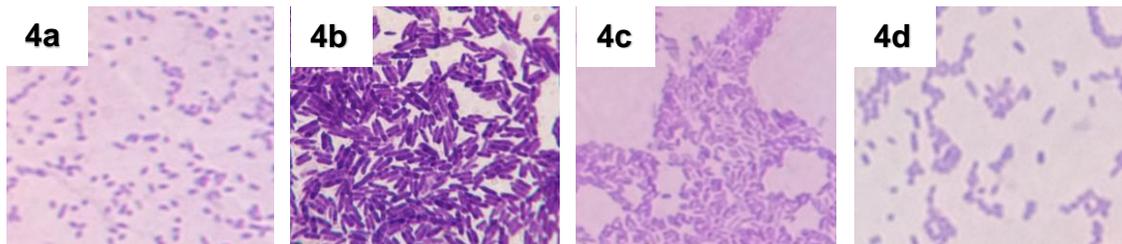
Los aislamientos A, C, D, E y F presentaron, colonias convexas, brillantes y superficie lisa, la coloración fue variando ligeramente entre ellas de café amarillento a un café oscuro (Fig. 3a). La bacteria B, presentó una coloración café, borde ondulado, superficie lisa y opaca (Fig. 3b). La bacteria G, presentó una coloración blanca cremosa, convexa, superficie rugosa, borde ondulado (Fig. 3c). Las colonias del aislamiento H e I mostraron una coloración beige, opaca, convexa y borde ondulado (Fig. 3d).



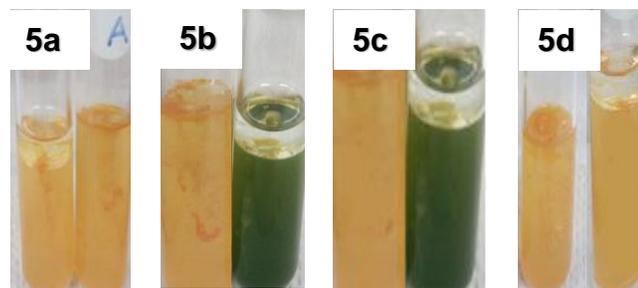
**Figura 3.-** Morfología de las colonias bacterianas aisladas de los tejidos de la orquídea.

Las bacterias A, C, D, E y F resultaron ser Gram negativas y al ser observadas al microscopio mostraron una morfología celular bacilar y con movilidad (Fig. 4a), después de haber sido sometidas a temperaturas de ebullición en baño maría,

se comprobó que no formaron esporas. Así mismo para la determinación del metabolismo aeróbico o anaeróbico, las bacterias A, C, D, E y F, arrojaron resultados positivos para la ambas (Fig. 5a). La bacteria B fue Gram positiva, morfología bacilar con agrupación de empalizada (Fig. 4b), sin movilidad, no forman esporas y tienen un metabolismo aeróbico (Fig. 5b). La bacteria G fue Gram positiva, se le observó una morfología bacilar con agrupación en empalizada (Fig. 4c), no presentan movilidad y no forman esporas, su metabolismo es aeróbico (Fig. 5c). Finalmente las bacterias H e I, resultaron Gram negativas, tenían morfología bacilar con agrupamiento en empalizada (Fig. 4d), con movilidad, sin formación de esporas y resultaron positivas para el metabolismo aeróbico y anaeróbico (Fig. 5d).



**Figura 4.-** Morfología celular de los aislamientos



**Figura 5.-** Determinación del metabolismo de los aislamientos

Mediante las pruebas bioquímicas realizadas no fue posible la identificación a nivel de especie, solo se llegó a posibles géneros como se observa en el cuadro 2. Por lo tanto se continuó con la identificación molecular.

**Cuadro 2.-** Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los nueve aislamientos

Bacterias	Prueba de ryu	Morfología celular	Movilidad	Formación de esporas	Fermentación	Oxidación	Catalasa	Citratasa	Posibles géneros
A	Gram -	bacilos	✓	x	✓	✓	✓	✓	
C	Gram -	bacilos	✓	x	✓	✓	✓	✓	
D	Gram -	bacilos	✓	x	✓	✓	✓	✓	
E	Gram -	bacilos	✓	x	✓	✓	✓	✓	<i>Vibrio</i> spp.
F	Gram -	bacilos	✓	x	✓	✓	✓	✓	<i>Aeromonas</i> spp.
H	Gram -	bacilos	✓	x	✓	✓	✓	✓	
I	Gram -	bacilos	✓	x	✓	✓	✓	✓	
G	Gram +	bacilos	x	x	x	✓	✓	x	<i>Corynebacterium</i> spp.
B	Gram +	bacilos	x	x	x	✓	✓	x	<i>Mycobacterium</i> spp.

\*=Pruebas no realizada, ✓ =Prueba positiva, x=Prueba negativa

### 3.3.3 Identificación molecular de los contaminantes bacterianos.

Las cepas “A”, “C”, “D”, “E” y “F” correspondieron a *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (Cuadro 3), las cepas “A”, “D”, “F” presentaron un 100 % de identidad, la cepa “C” un 99 %, al variar en el nucleótido posicionado en la base 452 y la cepa “E” con 99 % de identidad al diferir en dos nucleótidos posicionados en las bases 1485 y 1487. Las cepas “H” e “I” fueron identificadas como *Enterobacter* sp.

En el caso de los aislamientos “B” y “G” no fue posible la amplificación con los primers universales, por lo tanto carece de identificación molecular.

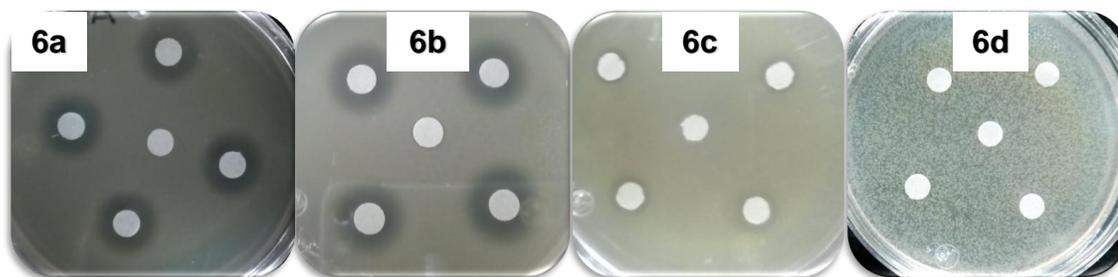
**Cuadro 3.-** Resultados de las secuencias consultadas en la base de datos del GenBank

Aislamiento	Identidad en Gen Bank	Numero de acceso	Tamaño del fragmento pb (%)	% de identidad	de e valor
A	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	NR_074841.1	99	100	0,0
C	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	NR_074841.1	99	99	0,0
D	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	NR_074841.1	99	100	0,0

E	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	NR_074841.1	99	99	0,0
F	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	NR_074841.1	99	100	0,0
H	<i>Enterobacter</i> sp. B15	KF010362.1	100	99	0,0
I	<i>Enterobacter</i> sp. B15	KF010362.1	100	99	0,0

### 3.3.4 Antibiogramas

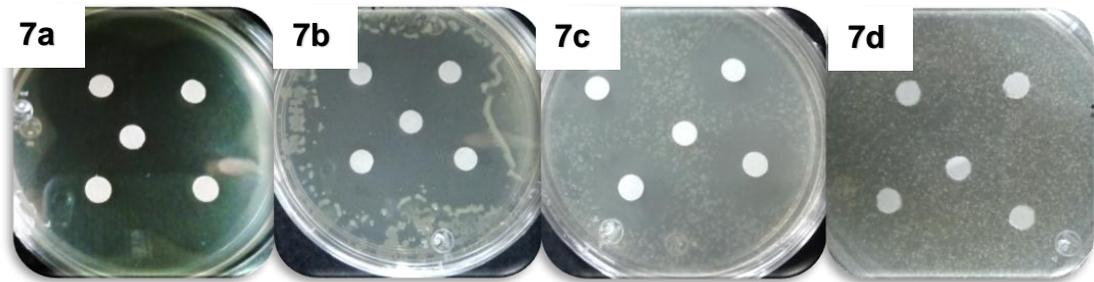
De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de varianza y comparación de medias se puede observar que para *Aeromonas hydrophila*, el antibiótico que mostró la media más alta fue la oxitetraciclina al ser estadísticamente diferente a los demás tratamientos, seguido del antibiótico tetraciclina, estos dos antibióticos revelaron los mismos comportamientos a las 24 y 48 horas. En tercera posición se encontró el antibiótico rifampicina y el último fue la ampicilina dentro de las 24 horas (Fig. 6), sin embargo el orden se invirtió a las 48 horas, lo que sugiere que la rifampicina tiene un efecto residual menor que la ampicilina (Cuadro 4). De manera general para los cuatro antibióticos se observó que los halos de inhibición redujeron ligeramente de las 24 a las 48 horas.



**Figura 6.-** *A. hydrophila* frente a distintos antibióticos; **6a**: oxitetraciclina, **6b**: tetraciclina, **6c**: rifampicina y **6d**: ampicilina.

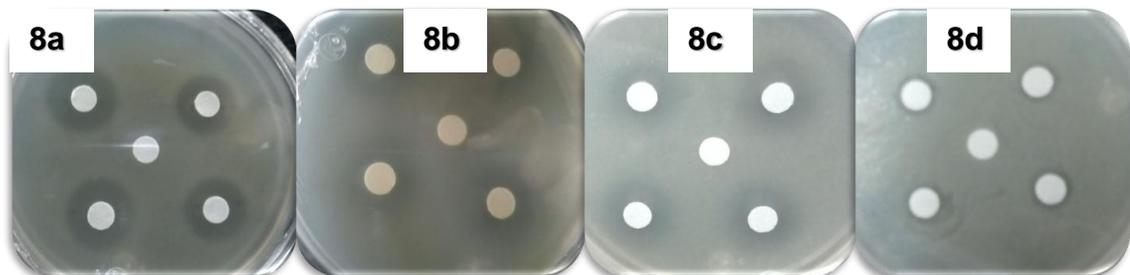
Para la bacteria B, la ampicilina arrojó la media más alta y fue significativamente diferente a los demás tratamientos, seguido de la tetraciclina, oxitetraciclina y finalmente la rifampicina, para esta bacteria el comportamiento fue idéntico a las

24 y 48 horas (Fig. 7) (Cuadro 4). Los halos de inhibición se redujeron levemente entre las dos mediciones realizadas a las 24 y 48 horas.



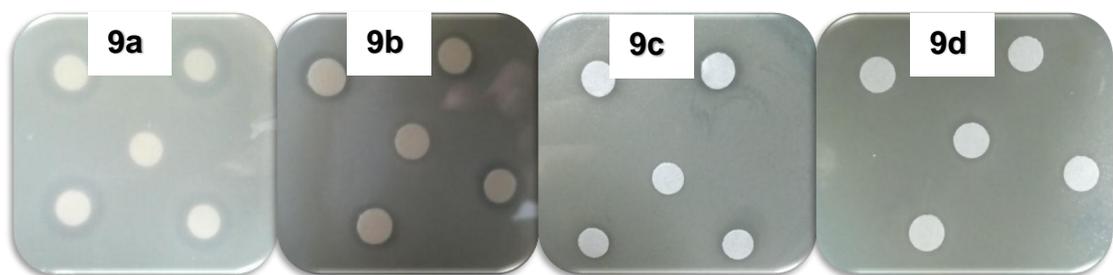
**Figura 7.-** Ceba B frente a distintos antibióticos; **7a:** ampicilina, **7b:** tetraciclina, **7c:** oxitetraciclina y **7d:** rifampicina.

El antibiótico ampicilina fue el óptimo para la bacteria G, en los dos intervalos de mediciones, al ser significativamente diferente a los demás, seguido de la tetraciclina y oxitetraciclina pero sin diferencias significativas entre estos dos antibióticos, en este caso el orden se cambió a las 48 horas, y la rifampicina fue la que menor halo de inhibición presentó (Fig. 8) (Cuadro 4).



**Figura 8.-** Ceba G frente a diferentes antibióticos; **8a:** ampicilina, **8b:** tetraciclina, **8c:** oxitetraciclina y **8d:** rifampicina.

Para *Enterobacter* sp., las medias más altas se obtuvieron con la ampicilina al ser significativamente diferente a los demás, seguido de la tetraciclina, oxitetraciclina y en último lugar a la rifampicina (Fig. 9) (Cuadro 4). Así mismo los halos de inhibición redujeron de diámetro de las 24 a las 48 horas.



**Figura 9.-** *Enterobacter* frente a diferentes antibióticos; **9a:** ampicilina, **9b:** tetraciclina, **9c:** oxitetraciclina y **9d:** rifampicina.

**Cuadro 4.-** Comparación de medias de los diámetros de inhibición (mm) del crecimiento de las bacterias respecto a diferentes antibióticos y tiempos de exposición

Bacterias	Antibiótico	24 horas		48 horas	
		Media	*Grupos	Media	*Grupos
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Rifampicina	3.9908	b	0.7958	c
	Oxitetraciclina	8.1958	a	3.6175	a
	Ampicilina	2.0967	c	0.9092	c
	Tetraciclina	4.0633	b	2.9058	b
<i>Enterobacter</i> sp.	Rifampicina	0.0	d	0.0	c
	Oxitetraciclina	1.2842	c	0.8600	cb
	Ampicilina	4.4633	a	3.0142	a
	Tetraciclina	3.2558	b	1.2725	b
Aislamiento B	Rifampicina	0.0	d	0.0	d
	Oxitetraciclina	13.5558	c	11.4442	c
	Ampicilina	28.6867	a	27.3958	a
	Tetraciclina	15.4608	b	15.2517	b
Aislamiento G	Rifampicina	0.0	c	0.0	c
	Oxitetraciclina	5.6067	b	3.3842	b
	Ampicilina	8.8392	a	6.1117	a
	Tetraciclina	6.1192	b	3.2817	b

\*Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Fisher 0.05)

Finalmente el frotis que se realizó sobre el área del halo de inhibición discernió que los antibióticos empleados tenían un efecto bacteriostático, al crecer todas las bacterias en un medio sin antibiótico.

### 3.3 DISCUSIÓN

Como se pudo ver en los resultados, la bacteria más común en todas las partes de las cuatro plantas de orquídeas fue *A. hydrophila* sin aparentemente influir la zona de colección ni el tipo de tejido, en cambio *Enterobacter* sp. la cual solo se encontró en el bulbo y la base de la hoja, esta diferencia se pudo deber a varios factores como la edad de la planta ya que entre más adulta es la planta mayor concentración y diversidad de microorganismos presenta (Posada *et al.*, 2004), en la cual pueden influir la composición química de los constituyentes de los tejidos, ya que la densidad poblacional de bacterias endófitas es altamente variable, y entre otros factores depende de las especie de bacteria y el genotipo de la planta hospedera, además del estado de desarrollo de la planta y las condiciones ambientales (Pillaw y Norwark, 1997); así mismo, en estudios moleculares recientes sobre diversidad de bacterias endófitas han revelado una alta riqueza filotipos; y que no solo promueven el crecimiento de las plantas, sino que también suprimen fitopatógenos, ayudan a remover contaminantes, solubilizan fosfato y contribuyen a la asimilación biológica de nitrógeno (Rosenblueth y Martinez-Romero, 2006); sin embargo en nuestro caso esto no sucedió ya que solo encontramos dos tipos de bacterias.

Varía según el estado de desarrollo de la planta y además difiere en los distintos órganos, ya sean raíces, tallos, flores e incluso frutas y semilla, lo que indica diversas capacidades de colonización (Berg *et al.*, 2005).

El mayor número de bacterias que se presentaron en los bulbos posiblemente es debido a la diferencia de tamaños de los bulbos respecto a las hojas, ya que entre más grande es el órgano o explante mayor será la concentración de bacterias, por la dificultad de desinfección del tejido (Surga & Guevara, 1994), estos resultados son similares a los reportados por Ramos *et al.* (2007) quienes encontraron mayor número de bacterias en el bulbo de la orquídea *Laelia furfuracea*, hallando a *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* y *Herbaspirillum*.

En lo que respecta a la identificación de los contaminantes de la presente investigación, *A. Hydrophila* es una bacteria ubicada en ambientes naturales como suelos, ríos, lagos y mares; se ha documentado su presencia en agua potables, aguas residuales y en una variedad de alimentos frescos incluyendo vegetales (alfalfa, brócoli, coliflor, lechuga, cilantro, perejil, espinacas), carne (de res, cerdo, pollo y ovejo), productos marinos y lácteos, entre otros y se ha reportado como patógena de humanos; son pocas las investigaciones donde han reportado a *A. hydrophila* asociada a las plantas, se ha aislado de la lechuga (*Lactuca sativa*), cilantro (*Corinadrum sativum*) y perejil (*Petroselinum sativum*) (Ginestrea *et al.*, 2005), en cambio, no existen investigaciones enfocadas a las orquídeas. Sin embargo, el género se ha presentado en el pasto colosana (*Bothriochloa pertusa*), lo que afirma y respalda que *Aeromonas* es capaz de colonizar de manera endófito a las plantas (Pérez-Cordero *et al.*, 2014).

En condiciones *in vitro* la presencia de *A. hydrophila* implica grandes pérdidas del material vegetal ya que estos microorganismos compiten por los nutrientes del medio de cultivo (Hernández & González, 2010). No obstante, en condiciones *in vivo*, *Aeromonas* podría tener una función muy importante y brindarle ciertos beneficios a *P. aff. citrina*, para su sobrevivencia, como es la capacidad que tiene ésta bacteria de solubilizar fosfatos, transformándolo en un compuesto accesible para la planta, de igual manera fija el nitrógeno (Pérez-Cordero *et al.*, 2014; Muleta *et al.*, 2013). Por lo tanto, la relación que mantienen es indispensable para el buen funcionamiento de la planta.

Por otra parte, se ha comprobado su capacidad de producir la enzima quitinasa, esta característica le brinda a la orquídea protección contra ciertos hongos fitopatógenos, que interactúan en condiciones *in vivo* (Gohel *et al.*, 2006).

Caso contrario ocurre con *Enterobacter* ya que es ampliamente conocida por estar relacionada con las plantas incluyendo a las orquídeas. Al igual que la presente, se ha reportado como bacteria endófito del bulbo de *Laelia furfuracea*, orquídea que crece en un bosque de pino-encino, con las condiciones similares de donde se desarrolla *P. aff. citrina* (Ramos *et al.*, 2007).

La relación existente entre *Enterobacter* y *P. aff. citrina* en condiciones *in vivo* resulta favorable, ya que se ha evidenciado la producción de hormonas (auxina) promotoras del crecimiento en las plantas (Fernández *et al.*, 2007).

Sin embargo, como ya se había mencionado la presencia de estas bacterias en el cultivo *in vitro* no resulta favorable, por tal motivo se deben implementar medidas para controlar y/o erradicarlos. El uso de antibióticos constituye una alternativa para su control. Para el caso específico del cultivo *in vitro* de *P. aff. citrina*, con base a los resultados se recomienda hacer uso de la oxitetraciclina alternando con la ampicilina y tetraciclina, o bien una mezcla de la ampicilina con una tetraciclina, por ser de diferente modo de acción, con lo cual se estaría previniendo la resistencia de las bacterias antes estos antibióticos. Al emplear estos antibióticos se estaría controlando a todas las bacterias que se presentaron en la presente, y estos fueron los de mejores resultados. De igual manera, la oxitetraciclina tiene un mayor efecto residual. No se recomienda el uso de la rifampicina ya que no presentó ningún efecto controlador sobre el crecimiento de las bacterias, lo que coincide con Belém & Possebon (2006).

El uso de los antibióticos es de suma importancia en la propagación de tejidos vegetales, ya que sin ellos existe una gran pérdida del material vegetal, sobre todo en situaciones donde se cuenta con pocas muestras.

De acuerdo a las deducciones de esta investigación se rechaza la hipótesis nula, al encontrarse a microorganismos contaminantes en el cultivo *in vitro* de *Prosthechea aff. citrina*, así como los antibióticos presentaron respuestas diferentes ante la inhibición del crecimiento de las bacterias. De igual manera se cumplieron con los objetivos planteados con anterioridad.

### **3.4 CONCLUSIONES**

Se presentó contaminación en el cultivo *in vitro* de *Prosthechea aff. citrina*, las cuales fueron; *Aeromonas hydrophila* y *Enterobacter sp.*

Hubo especificidad en la inhibición del crecimiento de las bacterias, para *A. hydrophila* se obtuvo de la oxitetraciclina y para *Enterobacter* sp. la ampicilina.

Los antibióticos empleados arrojaron efectos bacteriostáticos y no bactericidas.

### 3.5 LITERATURA CITADA

- Alvarado Y, 1998. Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas. En: Pérez Ponce, J.N. (Ed), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, Instituto de Biotecnología de las Plantas. pp: 81-104
- Ávila I, D. & Salgado R, G. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas para colaborar en su conservación. *Ciencias Biológico-Agropecuarias*. 8:138-149.
- Bauer A, W., Kirby W, M., Sherris J, C. & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
- Belém C, A. & Possebon C, J. E. (2006). Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), *Sci. agric.* 63(3): 281-284.
- Berg, G., Krechel A., Ditz M., Sikora R., Ulrich A., Hallmann J. 2005. Endophytic and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 215-229.
- Bergey H, D. & Holt G, J. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9 ed. Baltimore, USA. 787 pp.
- Bertani, G. 1951 Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62: 293-300.
- Centrón D. (2012). Mecanismos de resistencia a los antibióticos B-lactámicos y glicopéptidos, UBA CONICET, Disponible en: <http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/teo213.pdf>. Fecha de consulta; 14/09/16.
- Cruz M., Acosta M., Leiva M., Alvarado Y. & Lezcano M. (2006). Evaluación del efecto carbendazin- $\beta$ -ciclodextrina para el control de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. *Biotecnología vegetal* 2(2): 73-76.
- Falkinham J, O. 3rd, (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol* 9: 177-215.
- Fernández G, R., Pedrinho E, N., Castellane T, L. & Lemos E, M. (2007). Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an

- endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. *R. Bras. Ci. Solo* 35:729-737.
- Ginestrea, M., Rincón, G., Romero, S., Harris, B., Castellano, M. & Colina, G. (2005). Especies de *Aeromonas* en vegetales frescos que se expenden en un Mercado popular de Maracaibo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 25: 96-99.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, D., Chhatpar H, S. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganism. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 54-72.
- Hernández Y. & González M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perenes. *Cultivos tropicales* 31(4): 1-19.
- Koneman W, E. & S. Allen (2008). Diagnostico microbiológico, 6ª ed, Médica Panamericana, Argentina. 1691p.
- Lampe F, M., Minshew H, B. & Sherris C, J. (1979), *in vitro* response of *Enterobacter* to ampicillin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 16(4): 458-462.
- Moreno M, D & Menchaca G, R. 2007. Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta veracruzana*. 9: 27-32.
- Muleta, D., Aseffa, F., Borjesson, E. & Granhall U. (2013). Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forest of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 12: 73-84.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Negrete R, P., Janero J, R. & Figueroa J, L. A. (2004). Antibiotic resistance and presence of plasmids in *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* isolated from *Carassius auratus auratus*. *Vet. Mex.* 35 (1): 21-30.
- Pérez-Cordero A., Tuberquia-Sierra & Amell-Jímenez D. (2014). Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos, *Agron. Mesoam.* 25 (2): 213-223.
- Pírez, M., & Mota, M. (2008). Morfología y estructura bacteriana. Temas de bacteriología y virología médica. Pp: 23-42. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf> Fecha de consulta: 21/06/16.
- Pillay, V. K. & Norwark J. (1997). Inoculum, density, temperature, and genotype effect on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic

colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), seeding inoculated with a Pseudomonas bacterium. *Can J Microbiol.* 43:354-361.

- Posada L., Gómez R., Gallardo J., Reyes M., Herrera I. (2004) Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99. *Biotecnología Vegetal* 4(3): 153-158.
- Ramírez V., Santos A. & Isea R. (2000). Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava*. *Rev. Fac. Agron.* 17:217-225.
- Ramírez-Villalobos M. y Salazar E. (1997). Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) *Rev. Fac. Agron.* 14:497-506.
- Ramos Z, E., Salgado T, J. & Hernández A, T. (2007). Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (orchidaceae). *Lankesteriana* 7(1-2): 322-325.
- Red M, & Tanprasert P, (1995). Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1(3):137-142.
- Rickwood, D. & B. D. Hames (1990). Gel electrophoresis of nucleic acids: A practical approach. Oxford University Press, New York U.S.A. 65-66 p.
- Rodicio M. R. & Mendoza M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 22 (4): 238-245.
- Rodríguez M, Ma. De L. (2001). Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas, 2 ed., Departamento de parasitología agrícola, Chapingo México 119 p.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E. (2006). Bacterial endophytes and their interaction with host. *MPMI.* 19(8):827-837.
- Seija, V, R. (2012). "Principales grupos de antibióticos". Disponible en línea: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>, consultado el 14/09/16.
- Surga J, G. & Guevara Y. (1994). Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de ápices caulinares de banana (*Musa AAA*). *Fitopatología Venez.* 7(1): 14-17.
- Trigiano R., M. Windham & A. Windham (2008). Plant pathology, concepts and laboratory exercises, 2nd. ed., RC Press Florida 558 p.

## ANEXO

## Anexo 1.-Sales básicas de Murashige &amp; Skoog (1962).

N°	COMPONENTES	g/l	g/10 l
<b>1</b>	<b>MACRONUTRIENTES</b>		
	(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	1.65	16.5
	KNO <sub>3</sub>	1.9	19
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.37	3.7
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17	1.7
<b>2</b>	<b>CALCIO</b>		
	CaCl <sub>2</sub>	0.44	4.4
<b>3</b>	<b>MICRONUTRIENTES</b>		
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.01689	0.1689
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.0086	0.086
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0062	0.062
	KI	0.00083	0.0083
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.00025	0.0025
	CuSO <sub>4</sub> .5HO	0.000025	0.00025
	CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.000025	0.00025
<b>4</b>	<b>FIERRO</b>		
	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.0278	0.278
	Na <sub>2</sub> EDTA	0.0373	0.373
<b>5</b>	<b>VITAMINAS</b>		
	Tiamina HCl	0.0001	0.001
	Acido Nicotínico	0.0005	0.005
	Piridoxina HCl	0.0005	0.005
<b>6</b>	<b>INOSITOL</b>	0.10	1.0
<b>7</b>	<b>GLICINA</b>	0.002	0.02
<b>8</b>	<b>CARBOHIDRATOS</b>		
	Sacarosa	30.0	

## APÉNDICE

### Apéndice 1.- Análisis de varianza de la bacteria A= *Aeromonas hydrophila*.

Variable dependiente: 24 horas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	238.2609500	79.4203167	100.28	<.0001
Error	44	34.8469167	0.7919754		
Corrected Total	47	273.1078667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D24sd Mean
0.872406	19.40254	0.889930	4.586667

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiótico	3	238.2609500	79.4203167	100.28	<.0001

Variable dependiente: 48 horas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	72.76489167	24.25496389	48.98	<.0001
Error	44	21.78830000	0.49518864		
Corrected Total	47	94.55319167			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D48sd Mean
0.769566	34.20845	0.703696	2.057083

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	72.76489167	24.25496389	48.98	<.0001

**Apéndice 2.-** Análisis de varianza de la bacteria B.

Variable dependiente: 24 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	4959.649917	1653.216639	1595.33	<.0001
Error	44	45.596450	1.036283		
Corrected Total	47	5005.246367			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D24sd Mean
0.990890	7.056645	1.017980	14.42583

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	4959.649917	1653.216639	1595.33	<.0001

Variable dependiente: 48 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	4591.642442	1530.547481	1438.76	<.0001
Error	44	46.807150	1.063799		
Corrected Total	47	4638.449592			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D48sd Mean
0.989909	7.627099	1.031406	13.52292

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	4591.642442	1530.547481	1438.76	<.0001

**Apéndice 3.-** Análisis de varianza de la bacteria C= *Aeromonas hydrophila*.

Variable dependiente: 24 horas.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	152.4689063	50.8229688	31.14	<.0001
Error	44	71.8230417	1.6323419		
Corrected Total	47	224.2919479			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D24sd Mean
0.679779	27.19932	1.277631	4.697292

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	152.4689063	50.8229688	31.14	<.0001

Variable dependiente: 48 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	98.3615750	32.7871917	27.58	<.0001
Error	44	52.3109500	1.1888852		
Corrected Total	47	150.6725250			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D48sd Mean
0.652817	34.08707	1.090360	3.198750

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	98.36157500	32.78719167	27.58	<.0001

**Apéndice 4.-** Análisis de varianza de la bacteria D= *Aeromonas hydrophila*

Variable dependiente: 24 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	282.6156917	94.2052306	165.24	<.0001
Error	44	25.0851000	0.5701159		
Corrected Total	47	307.7007917			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D24sd Mean
0.918476	18.78454	0.755060	4.019583

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	282.6156917	94.2052306	165.24	<.0001

Variable dependiente: 48 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	179.5313396	59.8437799	59.55	<.0001
Error	44	44.2142083	1.0048684		
Corrected Total	47	223.7455479			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D48sd Mean
0.802391	40.37652	1.002431	2.482708

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	179.5313396	59.8437799	59.55	<.0001

**Apéndice 5.-** Análisis de varianza de la bacteria E= *Aeromonas hydrophila*.

Variable dependiente: 24 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	194.4016417	64.8005472	100.53	<.0001
Error	44	28.3614833	0.6445792		
Corrected Total	47	222.7631250			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D24sd Mean
0.872683	17.45815	0.802857	4.598750

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	194.4016417	64.8005472	100.53	<.0001

Variable dependiente: 48 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	265.7629750	88.5876583	231.01	<.0001
Error	44	16.8732167	0.3834822		
Corrected Total	47	282.6361917			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D48sd Mean
0.940301	19.16964	0.619259	3.230417

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	265.7629750	88.5876583	231.01	<.0001

**Apéndice 6.-** Análisis de varianza de la bacteria F= *Aeromonas hydrophila*.

Variable dependiente: 24 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	223.2309896	74.4103299	106.98	<.0001
Error	44	30.6050083	0.6955684		
Corrected Total	47	253.8359979			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D24sd Mean
0.879430	21.91992	0.834007	3.804792

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	223.2309896	74.4103299	106.98	<.0001

Variable dependiente: 48 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	238.1498396	79.3832799	163.72	<.0001
Error	44	21.3340417	0.4848646		
Corrected Total	47	259.4838813			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D48sd Mean
0.917783	26.67262	0.696322	2.610625

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	238.1498396	79.3832799	163.72	<.0001

**Apéndice 7.-** Análisis de varianza de la bacteria G.

Variable dependiente: 24 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	495.3596750	165.1198917	321.33	<.0001
Error	44	22.6098500	0.5138602		
Corrected Total	47	517.9695250			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D24sd Mean
0.956349	13.94292	0.716840	5.141250

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	495.3596750	165.1198917	321.33	<.0001

Variable dependiente: 48 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	225.0991563	75.0330521	111.71	<.0001
Error	44	29.5526250	0.6716506		
Corrected Total	47	254.6517812			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D48sd Mean
0.883949	25.65581	0.819543	3.194375

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	225.0991563	75.0330521	111.71	<.0001

**Apéndice 8.-** Análisis de varianza de la bacteria H= *Enterobacter sp.*

Variable dependiente: 24 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	130.6344917	43.5448306	49.65	<.0001
Error	44	38.5891000	0.8770250		
Corrected Total	47	169.2235917			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D24sd Mean
0.771964	43.39816	0.936496	2.157917

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	130.6344917	43.5448306	49.65	<.0001

Variable dependiente: 48 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	406.171300	135.390433	1.48	0.2334
Error	44	4028.318667	91.552697		
Corrected Total	47	4434.489967			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D48sd Mean
0.091594	334.4591	9.568317	2.860833

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	406.1713000	135.3904333	1.48	0.2334

**Apéndice 9.-** Análisis de varianza de la bacteria H= *Enterobacter sp.*

Variable dependiente: 24 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	142.8705167	47.6235056	53.62	<.0001
Error	44	39.0774500	0.8881239		
Corrected Total	47	181.9479667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D24sd Mean
0.785227	41.86908	0.942403	2.250833

Source	DF	Type III S	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	142.8705167	47.6235056	53.62	<.0001

Variable dependiente: 48 horas.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	57.8641500	19.2880500	9.15	<.0001
Error	44	92.7337167	2.1075845		
Corrected Total	47	150.5978667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	D48sd Mean
0.384230	112.8305	1.451752	1.286667

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Antibiotico	3	57.86415000	19.28805000	9.15	<.0001

**Apéndice 10.- Alineamiento de la cepa A con *Aeromonas hydrophila*.**

```

Query 3      GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGT 62
            |
            |
            |
Sbjct 15      GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGT 74

Query 63     AGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAG 122
            |
            |
            |
Sbjct 75     AGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAG 134

Query 123    TCGAGGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGAAAGC 182
            |
            |
            |
Sbjct 135    TCGAGGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGAAAGC 194

Query 183    AGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG 242
            |
            |
            |
Sbjct 195    AGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG 254

Query 243    GTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG 302
            |
            |
            |
Sbjct 255    GTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG 314

Query 303    AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG 362
            |
            |
            |
Sbjct 315    AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG 374

Query 363    GAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTT 422
            |
            |
            |
Sbjct 375    GAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTT 434

Query 423    CAGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACTGTGACGTTACTCGAGAAGAA 482
            |
            |
            |
Sbjct 435    CAGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACTGTGACGTTACTCGAGAAGAA 494

Query 483    GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA 542
            |
            |
            |
Sbjct 495    GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA 554

Query 543    ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGCT 602
            |
            |
            |

```

Sbjct 555 ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCT 614  
  
 Query 603 CAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTC 662  
 |||  
 Sbjct 615 CAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTC 674  
  
 Query 663 CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC 722  
 |||  
 Sbjct 675 CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC 734  
  
 Query 723 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG 782  
 |||  
 Sbjct 735 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG 794  
  
 Query 783 GTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGG 842  
 |||  
 Sbjct 795 GTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGG 854  
  
 Query 843 AGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAA 902  
 |||  
 Sbjct 855 AGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAA 914  
  
 Query 903 TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAC 962  
 |||  
 Sbjct 915 TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAC 974  
  
 Query 963 CTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCA 1022  
 |||  
 Sbjct 975 CTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCA 1034  
  
 Query 1023 GAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG 1082  
 |||  
 Sbjct 1035 GAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG 1094  
  
 Query 1083 CAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCAAGGGAGAC 1142  
 |||  
 Sbjct 1095 CAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCAAGGGAGAC 1154  
  
 Query 1143 TGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCC 1202  
 |||

Sbjct 1155 TGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCC 1214

Query 1203 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCG 1262  
 |||

Sbjct 1215 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCG 1274

Query 1263 AATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGG 1322  
 |||

Sbjct 1275 AATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGG 1334

Query 1323 AATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA 1382  
 |||

Sbjct 1335 AATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA 1394

Query 1383 CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGG 1442  
 |||

Sbjct 1395 CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGG 1454

Query 1443 GCGTTTACCACGGTGTGATTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA 1486  
 |||

Sbjct 1455 GCGTTTACCACGGTGTGATTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA 1498

**Apéndice 11.- Alineamiento de la cepa C con *Aeromonas hydrophila*, las marcas en amarillo indican en que pares de bases difieren las secuencias.**

Query 1 GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGT 60  
 |||

Sbjct 15 GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGT 74

Query 61 AGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAG 120  
 |||

Sbjct 75 AGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAG 134

Query 121 TCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGAAAGC 180  
 |||

Sbjct 135 TCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGAAAGC 194

Query 181 AGGGGACCTTCGGGCCTTGC GCGATTGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG 240  
 |||

Sbjct 195 AGGGGACCTTCGGGCCTTGC GCGATTGGATATGCC CAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG 254

Query 241 GTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG 300  
 |||

Sbjct 255 GTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG 314

Query 301 AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG 360  
 |||

Sbjct 315 AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG 374

Query 361 GAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTT 420  
 |||

Sbjct 375 GAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTT 434

Query 421 CAGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACG **G**ATCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAA 480  
 |||

Sbjct 435 CAGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACG **T**ATCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAA 494

Query 481 GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA 540  
 |||

Sbjct 495 GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA 554

Query 541 ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCT 600  
 |||

Sbjct 555 ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCT 614

Query 601 CAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTC 660  
 |||

Sbjct 615 CAACCTGGGAATTGCATTTAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTC 674

Query 661 CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCCCC 720  
 |||

Sbjct 675 CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCCCC 734

Query 721 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG 780  
 |||

Sbjct 735 TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG 794

Query 781 GTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGG 840  
 |||

Sbjct 795 GTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGG 854  
  
 Query 841 AGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAA 900  
 |||  
 Sbjct 855 AGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAA 914  
  
 Query 901 TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC 960  
 |||  
 Sbjct 915 TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC 974  
  
 Query 961 CTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCA 1020  
 |||  
 Sbjct 975 CTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCA 1034  
  
 Query 1021 GAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG 1080  
 |||  
 Sbjct 1035 GAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG 1094  
  
 Query 1081 CAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAAC TCAAGGGAGAC 1140  
 |||  
 Sbjct 1095 CAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAAC TCAAGGGAGAC 1154  
  
 Query 1141 TGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCC 1200  
 |||  
 Sbjct 1155 TGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCC 1214  
  
 Query 1201 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCG 1260  
 |||  
 Sbjct 1215 AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCG 1274  
  
 Query 1261 AATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGG 1320  
 |||  
 Sbjct 1275 AATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGG 1334  
  
 Query 1321 AATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA 1380  
 |||  
 Sbjct 1335 AATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA 1394  
  
 Query 1381 CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGG 1440  
 |||

Sbjct 1395 CCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGG 1454

Query 1441 GCGTTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA 1481  
 |||

Sbjct 1455 GCGTTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA 1495

**Apéndice 12.- Alineamiento de la cepa D con *Aeromonas hydrophila*.**

Query 1 GGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGAAAG 60  
 |||

Sbjct 14 GGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGAAAG 73

Query 61 TAGCTTGCTACTTTTGCCGGCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCA 120  
 |||

Sbjct 74 TAGCTTGCTACTTTTGCCGGCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCA 133

Query 121 GTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGAAAG 180  
 |||

Sbjct 134 GTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGAAAG 193

Query 181 CAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATATGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGA 240  
 |||

Sbjct 194 CAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATATGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGA 253

Query 241 GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG 300  
 |||

Sbjct 254 GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG 313

Query 301 GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG 360  
 |||

Sbjct 314 GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG 373

Query 361 GGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTT 420  
 |||

Sbjct 374 GGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTT 433

Query 421 TCAGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGA 480  
 |||

Sbjct 434 TCAGCGAGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGA 493



```

Query 1081 GCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCAAGGGAGA 1140
          |||
Sbjct 1094 GCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCAAGGGAGA 1153

Query 1141 CTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC 1200
          |||
Sbjct 1154 CTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC 1213

Query 1201 CAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGC 1260
          |||
Sbjct 1214 CAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGC 1273

Query 1261 GAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCG 1320
          |||
Sbjct 1274 GAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCG 1333

Query 1321 GAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC 1380
          |||
Sbjct 1334 GAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC 1393

Query 1381 ACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAG 1440
          |||
Sbjct 1394 ACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAG 1453

Query 1441 GGCGTTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA 1485
          |||
Sbjct 1454 GGCGTTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA 1498

```

**Apéndice 13.-** Alineamiento de la cepa E con *Aeromonas hydrophila*, las marcas en amarillo indican en que pares de bases difieren las secuencias.

```

Query 1 GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGT 60
          |||
Sbjct 15 GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGT 74

Query 61 AGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAG 120
          |||
Sbjct 75 AGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAG 134

```





```

Query 1321 AATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA 1380
          |||
Sbjct 1335 AATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA 1394

Query 1381 CCGCCCCTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGG 1440
          |||
Sbjct 1395 CCGCCCCTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGG 1454

Query 1441 GCGTTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCC 1493
          |||
Sbjct 1455 GCGTTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCC 1507

```

**Apéndice 14.- Alineamiento de la cepa F con *Aeromonas hydrophila*.**

```

Query 3 GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGT 62
       |||
Sbjct 15 GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGT 74

Query 63 AGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAG 122
       |||
Sbjct 75 AGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCAG 134

Query 123 TCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATAACCGCATAACGCCCTACGGGGAAAGC 182
       |||
Sbjct 135 TCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATAACCGCATAACGCCCTACGGGGAAAGC 194

Query 183 AGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG 242
       |||
Sbjct 195 AGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG 254

Query 243 GTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG 302
       |||
Sbjct 255 GTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG 314

Query 303 AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG 362
       |||
Sbjct 315 AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG 374

```



