



“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Janthinobacterium lividum* Y LAS FRACCIONES DE VIOLACEÍNA FRENTE A *Fusarium oxysporum*”

Mayra Alexandra Cardoso Cardoso

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar por el título de:

MICROBIÓLOGA AGRÍCOLA Y VETERINARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

BOGOTÁ D.C.

2011



“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Janthinobacterium lividum* Y LAS FRACCIONES DE VIOLACEÍNA FRENTE A *Fusarium oxysporum*”

Mayra Alexandra Cardoso Cardoso

APROBADO

Ingrid Schuler G. Ph.D.

Decana académica

Janeth Arias P. M.Sc, M.Ed.

Directora de carrera



**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Janthinobacterium*
Lividum Y LAS FRACCIONES DE VIOLACEÍNA FRENTE A *Fusarium*
Oxysporum”**

Mayra Alexandra Cardoso Cardoso

APROBADO

Marcela Franco Correa. Ph.D
Director

Luis Daniel Prada S. cd. M.Sc.
Codirector

Luis David Gómez M.Sc.

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946.

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

AGRADECIMIENTOS

A Marcela, por ser el motor de este proyecto ya que sin ella esto no hubiera sido posible, por tanta paciencia, por ser impulsora de mi formación integral, por su amistad, por sus sabios consejos en los momentos que más los necesite.

A Daniel Prada, por su orientación y colaboración.

A María Ximena por haberme brindado su asesoría y consejos en la realización de este trabajo.

A Adriana Cabra, Alexandra e Iván por su amistad, colaboración y orientación en cada cosa que necesite.

A mis amigos y compañeros unidianos, porque compartí mi rutina de trabajo con ellos, porque sentí la voz de aliento en los días arduos, y por brindarme su amistad.

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de este trabajo, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

Y por último, sin ser lo menos importante, a mi mamá, porque siempre me ha apoyado en lo que he querido hacer en la vida.

A todos los que hicieron parte de esto y de mí muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	10
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
3. MARCO TEÓRICO	14
3.1 <i>Janthinobacterium lividum</i> y producción de violaceína	14
3.2. El género <i>Fusarium</i> como fitopatógeno, causante del marchitamiento vascular del clavel	15
3.2.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	15
3.2.2. Características macroscópicas	15
3.2.3. Características microscópicas	16
3.2.4. Signos y síntomas de la enfermedad en clavel	16
3.2.5. Control biológico	16
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo general	17
4.2. Objetivos específicos	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1. Evaluación de diferentes condiciones de cultivo para <i>Janthinobacterium lividum</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	18
5.1.1. <i>Janthinobacterium lividum</i>	18
5.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	18
5.2. Banco de cepas	18
5.2.1. <i>J. lividum</i>	18
5.2.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	19
5.3. Enfrentamiento de los microorganismos en cultivo dual	19
5.4. Extracción de la violaceína	19
5.5. Curva de crecimiento de la bacteria <i>J. lividum</i>	20
5.6. Pruebas de Gauze	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22

6.1. Condiciones nutricionales y temperaturas óptimas de crecimiento para <i>Janthinobacterium lividum</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	22
6.2. Elección del mejor método de extracción para obtención de violaceína.....	24
6.3. Evaluación del comportamiento de crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> en presencia de la bacteria y las fracciones extracto y sobrenadante crudo.....	25
6.3.1. Curva de crecimiento <i>J. lividum</i>	25
6.3.2. Antagonismo por enfrentamiento en cultivo dual de <i>Janthinobacterium lividum</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i>	26
6.3.3. Antagonismo por amensalismo usando la técnica de Gauze.....	28
7. CONCLUSIONES	31
8. RECOMENDACIONES	32
9. BIBLIOGRAFÍA	33

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Características macroscópicas de *Janthinobacterium lividum* en agar PDA y Observación microscópica en 100x .

Figura 2 Crecimiento de *F. oxysporum* en medio Czapeck

Figura 3 Características macroscópicas de *Fusarium oxysporum* en agar PDA y Observación microscópica en 40x.

Figura 4 Curva de crecimiento *Janthinobacterium lividum*.

Figura 5 Enfrentamiento dual entre *J.lividum* y *Fusarium oxysporum* en agar PDA

Figura 6 Resultados Enfrentamiento dual.

Figura 7 Antagonismo por técnica de Gauze

Figura 8 Resultados antagonismo usando la técnica de Gauze

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Características macroscópicas de *Janthinobacterium lividum* en los diferentes medios de cultivo.

ANEXO 2: Medios de cultivo.

ANEXO 3: Análisis de Varianza (Enfrentamiento dual).

ANEXO 4: Análisis de Varianza (Antagonismo por técnica de Gauze).

RESUMEN

La floricultura es un sector de gran importancia en la economía colombiana, el cual se ha venido destacando como un actor elemental y activo en el desarrollo del país. Sin embargo, los ingresos que llegan al país y la garantía de la calidad del producto, como la enfermedad de marchitamiento vascular causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f sp. *dianthi*. La bacteria *Janthinobacterium lividum* se ha reportado que tiene la capacidad de controlar el desarrollo de *Fusarium oxysporum* in vitro mediante la secreción de metabolitos antifúngicos como la violaceína. Este trabajo tiene como objetivo determinar un efecto antagónico generado por *Janthinobacterium lividum* contra un aislamiento de *Fusarium oxysporum*. Se inició el estudio evaluando las diferentes condiciones de cultivo para *Janthinobacterium lividum* y *Fusarium oxysporum*, se procedió con un enfrentamiento de los microorganismos en cultivo dual en medio PDA y Czapeck. Luego se inocularon colonias de *J. lividum* en 100 ml de medio líquido de triptona al 1% hasta obtener una densidad óptica (DO) de 1 a 660nm; ya establecida la densidad óptica anterior se agregó el inóculo en 100 ml de triptona al 1%, y se incubó por 72 horas a 23°C a 200 rpm, en condiciones de luz. Pasado este tiempo, se tomaron alícuotas de 10 ml, y fueron colocadas en tubos falcon de 50 ml, se centrifugaron a 3.661 x g durante 5 minutos y se separaron los sobrenadantes de los *pellet*. Los *pellet* se resuspendieron en 400 µl de triptona al 1% y 400 µl de SDS al 10% (v/v); se agitó durante 5 minutos a 23°C, y los sobrenadantes obtenidos con antelación fueron pasados por un filtro de 0.22 µ. A los pellets resuspendidos y a los sobrenadantes crudos se les agregó acetato de etilo (EtOAc) en relación 1:3 (v/v) en un embudo de decantación. Al haber realizado la anterior mezcla, se observó una diferenciación de fases líquidas. La fase superior fue recolectada y llevada a un balón aforado, el cual se colocó en un rotaevaporador a 32°C, de esta forma se recuperó el extracto crudo. Se procedió a realizar la curva de crecimiento de *J. lividum* en medio sólido triptona al 1% con un preinóculo de 48 horas de crecimiento, la cual se llevó a cabo durante 52 horas, tomando muestras de 1500 µL cada 4 horas. Se finalizó la curva de crecimiento y se hicieron pruebas de Gauze con dos concentraciones de bacteria en las horas que se presentó el pico de crecimiento más alto, y con el sobrenadante y extracto crudo recuperados de la centrifugación y extracción

respectivamente, para finalmente evaluarlos frente a *Fusarium oxysporum*. Los resultados obtenidos en este ensayo fueron: *J. lividum* presentó crecimiento y producción de pigmento en medios de cultivos mínimos y de crecimiento específico para hongos (PDA), también se logró extraer la violaceína de las fracciones evaluadas, en el enfrentamiento dual y pruebas de Gauze se determinó que *J. lividum* y la violaceína no poseen un efecto antagónico frente a *F. oxysporum*, con lo que se concluyó que *J. lividum* no posee actividad antagónica frente a este fitopatógeno.

Palabras claves: *Janthinobacterium lividum*, *Fusarium oxysporum*, actividad antagónica, violaceína

ABSTRACT

The floriculture is an important sector in the Colombian economy, which has been highlighted as an actor elemental and active in the development of the country. However, the revenue coming into the country and ensuring product quality, such as vascular wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f sp. dianthi. The bacterium *Janthinobacterium lividum* been reported to have the ability to control the growth of *Fusarium oxysporum* in vitro by secreting such as violacein antifungal metabolites. This work aims to determine an antagonistic effect generated *Janthinobacterium lividum* insulation against *Fusarium oxysporum*. Began a study evaluating different culture conditions for *Janthinobacterium lividum* and *Fusarium oxysporum*, we proceeded with a clash of microorganisms in dual culture on PDA medium and Czapeck. Colonies were then inoculated *J. lividum* in 100 ml of liquid medium 1% tryptone until obtaining an optical density (OD) from 1 to 660nm, and provided the optical density before the inoculum was added to 100 ml of tryptone 1%, and incubated for 72 hours at 23 ° C at 200 rpm in light conditions. After this time, aliquots of 10 ml, and were placed in 50 ml Falcon tubes, centrifuged at 3,661 xg for 5 minutes and the supernatants were separated from the pellet. The pellet was resuspended in 400 µl of 1% tryptone and 400 µl of 10% SDS (v / v) was stirred for 5 minutes at 23 ° C, and the supernatants obtained in advance were passed through a filter of 0.22 µ. To the resuspended pellet and the crude supernatants were added ethyl acetate (EtOAc) in relation 1:3 (v / v) in a separatory funnel. Having performed the above mixture, there was a differentiation liquid phases. The upper phase was collected and taken to a graduated balloon, which is placed in a rotary evaporator at 32 ° C, thereby recovered crude extract. They proceeded to the growth curve of *J. lividum* in solid medium 1% tryptone preinoculum with 48 hours of growth, which is carried out for 52 hours, 1500 µL samples taken every 4 hours. It ended the growth curve and Gauze tested with two concentrations of bacteria in the hours of the submission of the highest growth spurt, and the crude extract supernatant recovered by centrifugation and extraction respectively, to finally evaluate them against *Fusarium oxysporum*. The results obtained in this trial were: *J. lividum* presented growth and pigment production in minimal culture media and fungal specific growth (PDA), are also able to extract the fractions violacein evaluated in the dual confrontation and Gauze

tests determined that *J. lividum* and violacein not have an antagonistic effect against *F. oxysporum*, which concluded that *J. lividum* not possess antagonistic activity against this plant pathogen.

Key words: *Janthinobacterium lividum*, *Fusarium oxysporum*, antagonistic activity, violacein.

1. INTRODUCCIÓN

La floricultura es un sector de gran importancia en la economía colombiana. De la producción total de flores, se exporta un 98% a países como Estados Unidos, Rusia, Reino Unido, Canadá, y España, entre otros, hecho que convierte al país en el segundo exportador mundial de flores y el primero en la exportación del clavel, (Asocolflores, 2007). Por otro lado, se caracteriza por ser la actividad agropecuaria con mayor mano de obra por hectárea generando un gran número de personas de diversas disciplinas trabajando en esta área. En Colombia, el sector floricultor se ha venido destacando como un actor elemental y activo en el desarrollo del país (Asocolflores, 2009).

Sin embargo, los ingresos que llegan al país y la garantía de la calidad del producto, se ven afectados por diversas enfermedades, una de las más importantes es el marchitamiento vascular, causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f sp. *dianthi*. Esta patología, es la más limitante e importante en el cultivo del clavel en Colombia, debido a que genera retraso en el desarrollo de la planta, ocasionando marchitamiento y amarillamiento de las hojas, y en algunas ocasiones puede causarle la muerte (Garcés *et al.*, 2001).

La importancia de este patógeno radica en la fácil propagación a través de esquejes infectados, la tolerancia que presenta a tratamientos químicos, el aumento en el número de hospederos y el alto costo y relativa baja eficiencia de las medidas de control utilizadas como cultivo en contenedores o bolsas. La búsqueda de tolerancia natural de las plantas y el uso de químicos comerciales como Oxicarboxin® (Asocolflores, 2002), generan impactos negativos sobre el medio ambiente; pero la finalidad con los controladores biológicos es disminuir dicho impacto porque estos bioproductos no dejan compuestos residuales tóxicos. Se espera un mayor avance en el estudio de los biocontroladores, debido a la preocupación existente entre los productores y consumidores de insumos agrícolas por los efectos reales y potenciales que generan los agroquímicos (Dubey *et al.*, 2007).

Janthinobacterium lividum es una bacteria Gram negativa que tiene la capacidad de controlar el desarrollo *in vitro*, mediante la secreción de metabolitos antifúngicos. Los hongos fitopatógenos que controla son: *Rhizoctonia solani*, *Phyitium*, *Rosellinia necatrix* y *Fusarium oxysporum* (Brucker *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2008), fitopatógenos de gran

importancia a escala mundial y de especial relevancia en zonas tropicales, en comparación a otros países. Desde la perspectiva de una agricultura sostenible y amigable con el medio ambiente, una de las medidas de control aplicables es el uso de antagonistas microbianos como agentes de control biológico.

El objetivo de este trabajo es determinar si el efecto causado por *Janthinobacterium lividum* presenta antagonismo contra un aislamiento de *Fusarium oxysporum* perteneciente al grupo de investigación UNIDIA (Unidad de Investigaciones Agropecuarias).

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, en Colombia, hay 7.300 hectáreas destinadas para el cultivo de flores concentrándose en 272 empresas ubicadas en la Sabana de Bogotá, en la zona de Rionegro (Antioquia), el Eje Cafetero y algunos municipios del Valle del Cauca. En estas áreas cultivadas el 29,69% de las flores exportadas por los productores colombianos corresponde a rosas, un 12,74% a claveles, el 6,72% a mini claveles, el 7,53% a crisantemos, el 32,48% a bouquets y el 10,83% a flores tropicales (Asocolflores, 2009; Castellanos et al., 2009); entre éstos los claveles (*Dianthus caryophyllus*) han ocupado una alta proporción en el mercado de flores de corte por décadas. Los cultivos de flores han enfrentado diversos problemas que influyen en la calidad y presentación final del producto, problemas como la presencia de plagas y enfermedades que generan pérdidas en la industria florícola colombiana, las principales enfermedades en cultivos de clavel son producidas por hongos entre los que se encuentran: *Uromyces dianthi*, *Alternaria dianthi*, *Botrytis cinerea*, y *Fusarium oxysporum*, entre otros (Latorre, 1992).

Una de las enfermedades más relevantes y de difícil control es el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* en condiciones climáticas favorables para el desarrollo y proceso de infección de este microorganismo. La única alternativa eficaz es la desinfección de los suelos con bromuro de metilo, siendo un producto de gran incidencia en el medio ambiente debido a que su composición química conlleva a la destrucción de la capa de ozono y afecta la salud humana, prohibiéndose su uso desde 31 de diciembre de 2005, fecha que entra en vigencia el Tratado de Montreal en los países de la Unión Europea.

Resulta fundamental para el sector floricultor en Colombia, generar estrategias mediante las cuales se logre una producción sostenible y competitiva, para consolidar sus productos en el mercado nacional e internacional (Castellanos et al., 2009). Por lo que cualquier investigación dirigida a obtener sustancias que tengan la capacidad de ejercer un efectivo control sobre los hongos patógenos sin causar inestabilidad en el suelo y medio ambiente, constituiría un aporte importante en este campo.

En este estudio, se busca establecer la actividad antifúngica de *Janthinobacterium lividum* frente a *Fusarium oxysporum* debido a las ventajas que trae la utilización de un controlador biológico frente a uno químico, ya que posee una acción duradera y con

capacidad de permanecer en el ambiente, teniendo en cuenta la temperatura óptima de crecimiento de 25°C (Gillis *et al.*, 2006), constituyendo una ventaja para *J. lividum* establecerse y reproducirse sobre los organismos, diseminándose fácilmente en la población; así mismo, se ha encontrado que no presenta toxicidad hacia las plantas (Becker *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta las ventajas biológicas demostradas por *Janthinobacterium lividum* frente a hongos patógenos, se desea evaluar la posible actividad biocontroladora de esta bacteria frente a *Fusarium oxysporum* causante del marchitamiento vascular en clavel, uno de los problemas patológicos más limitantes del cultivo de clavel en el país.

3. MARCO TEÓRICO Y REFERENTES CONCEPTUALES

3.1 *Janthinobacterium lividum* y producción de violaceína

El género *Janthinobacterium*, consiste en bacilos Gram negativos de 0,8-1,5 x 1,8-6 µm, algunas veces curvos, pudiéndose presentar en cadenas cortas o parejas, son quimiorganótrofos, no poseen cápsula, son móviles con presencia de un flagelo polar, presentan inclusiones de lípidos y no poseen estructuras de resistencia (Garrity, 2000). Esta bacteria es aislada comúnmente de suelo y agua de los ríos, lagos y manantiales; crece bajo un amplio rango de temperatura que oscila entre 4 a 30°C, con una temperatura óptima de 25°C, y un pH óptimo entre 7 y 8. Posee la capacidad de crecer en condiciones sésiles formando biopelículas, permitiéndole colonizar rápidamente las superficies, en medios de cultivo sólidos, presenta colonias convexas, mucoides y redondas, produce metalo-β-lactamasas que le confieren resistencia a varios antibióticos β-lactámicos, es oxidasa y catalasa positivas (Lauer *et al.*, 2008; Brucker *et al.*, 2008; Brenner *et al.*, 2005).

La actividad antimicrobiana generada por *J. lividum* incluye capacidad antibacteriana, antiviral, antiprotozoaria y antifúngica (Pantanella *et al.*, 2007). Esta última se da por la producción de metabolitos como la violaceína y el indol-3-carboxaldehído, por otro lado se ha demostrado su actividad como antagonista en la competencia por nutrientes y espacio frente a varios fitopatógenos tales como: *Rosellinia necatrix*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*; por lo cual puede ser usada como controlador in-vitro de hongos patógenos (Lauer *et al.*, 2008; Brucker *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2008; Duran *et al.*, 2007).

J. lividum tienen la capacidad de producir un pigmento púrpura denominado violaceína, el cual posee una estructura dimérica compuesta por 5 hidroxindol, Oxindol y 2 subunidades de pirrolidona, y que se forma por la condensación de dos moléculas de triptófano modificado (August *et al.*, 2000), este pigmento es insoluble en agua y soluble en alcoholes como metanol, etanol y acetona (Shirata *et al.*, 2000). Recientemente se ha demostrado que la producción de violaceína está implicada en la regulación de la producción de triptófano, que en altas concentraciones es tóxico para las bacterias (Pantanella *et al.*, 2007).

La biosíntesis de violaceína está codificada por un operón constituido por los genes *vioD*, *vioC*, *vioB*, y *vioA*, su expresión es regulada por la fuente de carbono utilizada y la presencia de antibióticos (Pantanella *et al.*, 2007). Se sugiere que la biosíntesis se debe a la detección de la molécula señal difusible, denominada N-acil-homoserin-lactona (AHL), bajo el proceso de “*quorum sensing*” (Shinoda *et al.*, 2007). El *quorum sensing* es una forma de comunicación intercelular, depende del gen de regulación encontrado principalmente en bacterias Gram negativas (Blosser y Gray, 2000). Los sistemas de regulación que funcionan como mecanismo de comunicación intercelular dependiente de *quorum sensing* se han identificado en diversos microorganismos. En todos los casos controlan funciones de comportamiento o fisiológicas, entre ellas, formación de biopelículas, y motilidad; para el caso de *J. lividum* se encuentra mediado por dos reguladores transcripcionales: LuxI, cataliza la síntesis de la señal autoinductora que interactúan con los receptores codificados por LuxR, quienes a su vez activan o reprimen la transcripción de genes específicos dando lugar a la producción de biopelículas (Pantanella *et al.*, 2007).

Por otro lado se ha encontrado que la violaceína posee aplicaciones médicas, debido a que se ha demostrado que este pigmento tiene propiedades con actividad antimicrobiana, antiLeishmania, antiviral y antitumoral (Pantanella *et al.*, 2007). Además de su aplicación en la industria textil para teñir fibras (Lu *et al.*, 2009).

3.2 El género *Fusarium* como fitopatógeno, causante del marchitamiento vascular del clavel

El clavel es atacado por gran variedad de enfermedades causadas por bacterias, hongos, nematodos y virus. Las enfermedades más comunes que se presentan en claveles son producidas por hongos que generan grandes pérdidas, debido a su persistencia en el suelo, la facilidad de propagación y a los altos costos en las medidas necesarias para su control, este es el caso de *Fusarium oxysporum* f sp. *dianthi* representando las mayores pérdidas para los cultivadores de esta planta y en un factor limitante para el cultivo en suelo (Asocolflores, 2010; Alfonso *et al.*, 2008).

3.2.1 *Fusarium oxysporum*: Es un hongo imperfecto perteneciente a los ascomicetos, se aísla como saprófito del suelo y de numerosas plantas (cereales, soja, algodón, flores, plátanos, cebolla, patatas, manzanas, entre otras). Como fitopatógeno causa grandes pérdidas económicas (Agrios, 2002).

3.2.2 Características macroscópicas: Presenta rápido crecimiento en agar papa dextrosa (PDA) a 25°C de 4-7 días. Al iniciar su crecimiento genera colonias lisas y algodonosas, con el tiempo toma un aspecto como de fieltro, de color blanco o salmón pálido, tiñéndose de púrpura en su zona central. El reverso es púrpura o azul oscuro (Leslie y Summerell, 2006).

3.2.3 Características microscópicas: Microscópicamente *F. oxysporum* presenta formación de hifas septadas, conidióforos cortos no bifurcados o ramificados; las macroconidias son propágulos típicos de este género, están constituidos por 3 ó 5 células lo que define los septos transversales. Las macroconidias se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos, esta morfología es común encontrarla sobre la superficie de las plantas afectadas por el patógeno. Estas estructuras presentan paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias tienen un tamaño de 27 a 46 µm de largo por 3,0 a 4,5 µm de ancho. En la mayoría de los cultivos las clamidosporas son abundantes, grandes, hialinas, de pared lisa o rugosa y pueden observarse aisladas o en parejas, intercalares o terminales (Leslie y Summerell, 2006).

3.2.4 Signos y síntomas de la enfermedad en clavel: Apariencia unilateral de los síntomas, amarillamiento asimétrico, marchitez ascendente, retraso en el desarrollo de la planta, doblamiento de brotes y flores y haces vasculares afectados (Soto *et al.*, 2009).

3.2.5 Control biológico: El control biológico ha sido definido por varios investigadores como la reducción de la densidad poblacional del patógeno en estado activo o en dormancia por uno o más organismos, puede ocurrir de forma natural o a través del manejo del medio ambiente, del hospedante o del antagonista (Duarte *et al.*, 1996).

El control biológico de fitopatógenos, mediante la adición de microorganismos antagonistas al suelo, presenta una alternativa para el control de enfermedades vegetales. Sin embargo, para que el control sea efectivo, se requiere de cantidades significativas de inóculo, además de factores tales como: temperatura, pH, condiciones fisicoquímicas del suelo y el tipo de inóculo usado (bacterias: esporas o células vegetativas y en hongos: micelio, conidios, clamidosporas), tiempo de entrada del antagonista en el suelo, entre otras (Hutson y Junshi ,1998).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si se presenta actividad antifúngica de *Janthinobacterium lividum* frente a una cepa de *Fusarium oxysporum* perteneciente a la colección de hongos de UNIDIA.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar las condiciones nutricionales y de temperatura óptimas para el crecimiento de los microorganismos *Janthinobacterium lividum* y *Fusarium oxysporum*.
- Elegir el mejor método de extracción para obtención de fracciones no purificadas de violaceína.
- Evaluar el comportamiento del crecimiento de *Fusarium oxysporum* en presencia de la bacteria y las fracciones sobrenadante crudo y extracto crudo.

5. METODOLOGÍA

5.1 Evaluación de diferentes condiciones de cultivo para *Janthinobacterium lividum* y *Fusarium oxysporum*

5.1.1 *Janthinobacterium lividum*: A partir de una cepa donada por el Dr. Vance Vredenburg, Ecólogo del Departamento de Biología de la Universidad Estatal de San Francisco, se realizaron siembras de *Janthinobacterium lividum* en cajas de Petri con diferentes medios de cultivo para evaluar su crecimiento; los medios empleados en este ensayo fueron: PDA, Medio mínimo de sales, Nutritivo y LB, los dos últimos medios de cultivo fueron evaluados con las principales fuentes de carbono: Glucosa, Sacarosa, Celulosa y Glicerol; las condiciones manejadas fueron las mismas para cada uno de los ensayos (Pantaella *et al.*, 2007). Se incubaron a 23°C por 48 horas, posteriormente se evaluaron las características macroscópicas, y la pureza del cultivo realizando una coloración de Gram.

5.1.2 *Fusarium oxysporum*: Para este ensayo se utilizó *Fusarium oxysporum* cepa 310, perteneciente a la Colección de Microorganismos de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. La cepa escogida fue aislada de clavel (*Dianthus caryophyllus*) identificada morfológica y molecularmente con un porcentaje de identidad del 99.8% (Linares, 2010). Se realizaron siembras del hongo en distintos medios de cultivo para evaluar su crecimiento y esporulación, los medios evaluados fueron: PDA, Extracto de Malta, Czapeck y Avena. Se incubaron a 25°C por 7 días, evaluando diariamente su crecimiento en cada medio usado (Linares, 2010).

5.2 Banco de cepas

5.2.1 *J. lividum*: Se realizó la siembra masiva de la bacteria en medio nutritivo suplementado con glicerol, debido a que esta fuente de carbono posee la capacidad de inducir la producción de la violaceína, compuesto reportado como antifúngico (Lu *et al.*, 2009; Pantanella *et al.*, 2007). Se incubaron a 23°C por 48 horas. Posteriormente se realizó una coloración de Gram para verificar la pureza del cultivo, luego de esto se tomaron aproximadamente 3 asadas del cultivo que fueron depositadas en cada uno de los tubos de microcentrífuga con glicerol el cual fue utilizado como crioprotector, finalmente se almacenaron en nevera a 4°C (García y Urburu, 1991).

5.2.2 *Fusarium oxysporum*: Se realizó la siembra en medio PDA depositando un disco invertido del hongo crecido en medio PDA, se incubó a 28°C por 7 días, luego se realizó una lámina con azul de lactofenol para verificar morfología y pureza. Posteriormente se tomaron discos de agar con crecimiento para depositarlos en tubos de microcentrífuga en 1 ml de agua destilada y se almacenaron en congelación a -4°C (García y Urburu, 1991).

5.3 Enfrentamiento de los microorganismos en cultivo dual: Se realizaron cultivos duales en PDA y Czapeck, para la evaluación de este ensayo se usaron dos tiempos diferentes para la siembra del hongo, en el primer ensayo se realizó primero la siembra de la bacteria por estría en la mitad de la caja, después de 7 días se realizó la siembra del hongo por discos de agar a 3 cms del borde de la caja; en paralelo, siguiendo el mismo procedimiento, se sembraron simultáneamente ambos microorganismos. Se realizaron siembras de cada microorganismo individualmente como control, para verificar su viabilidad (Reyes *et al.*, 2007). Todos los ensayos se realizaron por triplicado, se incubaron a 28°C; y a diario se realizó un seguimiento para observar la inhibición entre los microorganismos evaluados, calculando el porcentaje de inhibición micelial:

$$\text{PIM} = \frac{\text{Crecimiento hongo en el control} - \text{Crecimiento hongo en interacción}}{\text{Crecimiento hongo en el control}} * 100$$

5.4 Extracción de la violaceína: Se inocularon colonias de *J. lividum* en 100 ml de medio líquido de triptona al 1% hasta obtener una densidad óptica (DO) de 1 a una longitud de onda de 660nm, que corresponde a una concentración de aproximadamente de 3×10^8 células/ml. Establecida la concentración anterior de *J. lividum*, se agregó en 100 ml de triptona al 1% en un erlenmeyer de 500 ml, y se incubó durante un periodo de 72 horas a 23°C (temperatura ambiente) en agitación a 200 rpm, en condiciones de luz. Cumplido el tiempo de incubación de la mezcla, se tomaron alícuotas de 10 ml, y consecutivamente fueron colocadas en tubos falcon de 50 ml, se centrifugaron a $3.661 \times g$ durante 5 minutos y finalmente se separaron los sobrenadantes de los *pellet*.

Los *pellet* obtenidos se resuspendieron en 400 µl de triptona al 1% y 400 µl de doecil sulfato de sodio al 10% (v/v); se agitó durante 5 minutos a 23°C (temperatura ambiente). Paralelamente los sobrenadantes obtenidos con antelación fueron pasados por un filtro de 0.22 µ, llamando a este filtrado sobrenadante crudo, el cual se refrigeró a 4°C para su posterior uso.

A los *pellets* resuspendidos y a los sobrenadantes crudos paralelamente se agregó acetato de etilo (EtOAc) en relación 1:1 (v/v) en un embudo de decantación. Al haber realizado la anterior mezcla se observó una diferenciación de fases líquidas, las cuales se sometieron a lavados por triplicado hasta obtener una relación 1:3 (v/v). Luego de la separación de estas fases, la fase superior fue recolectada y llevada a un balón aforado, el cual se colocó en un rotaevaporador a 32°C, hasta que el acetato de etilo se evaporó al vacío, a medida que la presión aumentó; de esta forma se recuperó el extracto crudo para almacenarlo a 4°C (Brucker *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009; Pantanella *et al.*, 2007).

5.5 Curva de crecimiento de la bacteria *J. lividum*: A partir de un cultivo puro en medio sólido triptona al 1% con 48 horas de crecimiento, se llevó a cabo la inoculación de 3 asadas de colonias en 20 ml de caldo triptona al 1%, este pre-inóculo fue incubado a 23°C por 48 horas. Pasado este tiempo, se llevó a establecer la densidad óptica (D.O) del pre-inóculo por espectrofotometría, y con ésta se ajustó la concentración mediante diluciones en el mismo medio de cultivo, a un equivalente de 1×10^5 células/ml (teniendo en cuenta que una D.O de 0.2 equivale a una concentración de 1×10^8 células/ml). A partir de esta concentración se tomaron 5 ml y se inocularon en 45 ml de caldo triptona al 1%.

En un erlenmeyer de 250 ml, con el fin de obtener una concentración inicial de 1×10^4 células/ml, se adicionaron 50 ml de inóculo con caldo triptona y se llevó a incubación durante 48 horas a 23°C a 180 rpm, realizando mediciones cada cuatro horas durante el transcurso del tiempo, tomando una alícuota de 1500 µL aprovechados de la siguiente manera:

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

5.6 Pruebas de Gauze: Se realizaron pruebas de gauze con las fracciones bacteria, sobrenadante y extracto crudo con *Fusarium oxysporum* (Li *et al.*, 2005).

Con bacteria: Se evaluaron 2 concentraciones diferentes de un cultivo de *J. lividum* en medio líquido triptona al 1% (v/v), concentraciones que se escogieron teniendo en cuenta la hora a la que se presentó el pico más alto de crecimiento de la bacteria en la curva de crecimiento. Se plantearon dos estrategias para evaluar las interacciones, y fue la primera manera de evaluación usando cajas de petri con medio de cultivo papa dextrosa (PDA), se trazó un triángulo equilátero (5 cm) en el centro de la caja, y en los vértices se ubicaron tres discos de papel filtro impregnados de la siguiente manera: 1) Medio triptona al 1% estéril (testigo), 2) Dilución 10^6 de las muestras tomadas durante el transcurso de la curva de crecimiento; 3) Dilución 10^7 de las muestras analizadas. En el centro del triángulo se depositó un disco con *F. oxysporum*. La segunda estrategia fue sembrar con antelación de dos días la siembra del hongo en una caja de Petri con medio PDA, y al cumplir este tiempo se procedió a ejecutar el protocolo de la primera estrategia. Se sembró en medio de cultivo PDA a *F. oxysporum* usado como control. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado (Li *et al.*, 2005).

Con extracto crudo y sobrenadante crudo: En este ensayo fue usado el mismo procedimiento con discos de papel filtro impregnados de la siguiente manera: el primero con medio triptona al 1% (v/v) estéril (testigo), el segundo con sobrenadante crudo o extracto crudo, según sea el ensayo, y el tercero con una dilución 1/10 de la fracción evaluada (sobrenadante o extracto). Adicionalmente se llevaron a cabo los ensayos con sobrenadante y extracto crudo siguiendo el mismo procedimiento usado con la bacteria.

A partir de los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de un factor, analizando la distribución de los datos para establecer el tratamiento más efectivo de biocontrol frente a *Fusarium oxysporum* con *Janthinobacterium lividum*.

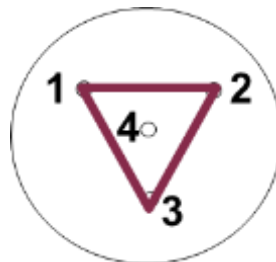


Fig 1. Montaje técnica de Gauze

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Condiciones nutricionales y temperaturas óptimas de crecimiento para *Janthinobacterium lividum* y *Fusarium oxysporum*.

Se desarrolló una evaluación de diferentes condiciones de cultivo para los dos microorganismos buscando encontrar el medio de cultivo y la temperatura apropiada para llevar a cabo las pruebas de antagonismo, de tal manera que bacteria como hongo mostraran un crecimiento óptimo en las condiciones establecidas (Anexo 1).

En la evaluación de dichas condiciones de cultivo para *J.lividum* se encontró inhibición del crecimiento en el medio mínimo de sales, ya que no presentó crecimiento. Esta inhibición del crecimiento en el medio se explica porque la bacteria no soporta condiciones de salinidad según lo encontrado por Chernin *et al.* (1998) y a la ausencia de una fuente de carbono que estimulen la producción del pigmento, debido a que la bacteria es heterótrofa (Pantanella *et al.*,2007)

En los medios Luria Bertani (LB) y medio Nutritivo, se observó que *J. lividum* crece produciendo el pigmento púrpura confirmando los reportes de Pantanella *et al.* (2007) y Lu *et al.* (2009), quienes afirman que la violaceína se induce en medios de cultivos sencillos que contengan triptófano, aminoácido que regula la producción de violaceína; y la pigmentación se ve estimulada por la presencia de fuentes de carbono como glicerol y glucosa. Para el caso de este trabajo se observó que el glicerol indujo una mayor producción de violaceína en medio Nutritivo al observarse una mayor producción del pigmento en este medio; y en menor producción del pigmento en el medio LB. Sin embargo, Pantanella *et al.* (2007) afirmaron que, en presencia de glucosa, *J. lividum* no produjo pigmentación, caso contrario a lo sucedido en este ensayo donde se obtuvo muy buena pigmentación por parte de *J. lividum* en este medio (Nutritivo), como en la presentada en medios de cultivo con adición de glicerol.

Mediante la realización de esta prueba, se encontró que la bacteria presentó crecimiento y producción de pigmento en medio PDA, como se puede observar en la figura 1(A) A pesar de que el crecimiento en este medio no ha sido reportado porque se sabe que el medio PDA es específico para el crecimiento de hongos, este no influye en el crecimiento y

morfología de la bacteria ya que como se puede evidenciar en la figura 1(B), se observan bacilos Gram negativos grandes con forma ovoidal característicos de *J. lividum*.

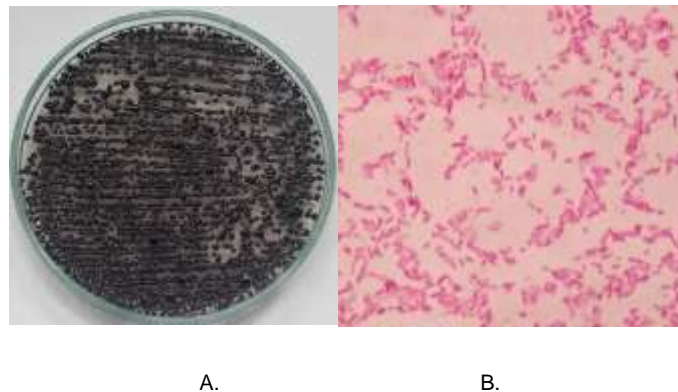


Fig. 2. **A)** Características macroscópicas de *Janthinobacterium lividum* en agar PDA y **B)** Observación microscópica 100x. Coloración de Gram

Se sabe que el triptófano es el precursor de la producción del pigmento, por lo cual se hace necesario diseñar un medio de cultivo con las cantidades necesarias de triptófano para profundizar en la fisiología y la bioquímica de la bacteria. Al sugerir un diseño de medio de cultivo, por costo:beneficio, se buscarán sustratos de bajo costo para lograr el diseño esperado; es el caso de los extractos de la papa analizados por Lu *et al.* (2009) en donde encontraron producción de pigmento y los resultados sugirieron que algún componente del tubérculo estimuló la producción de pigmento.

Por otra parte, *Fusarium oxysporum* presentó buen crecimiento en los medios: PDA, Extracto de Malta, y Avena, y difundió un crecimiento con esporulación lenta y ausencia de pigmentación en Czapeck como se observa en la figura 2. Según lo reportado por Linares (2010), entre los medios de cultivo más usados para evaluar las características morfológicas que permitan identificar las especies de *Fusarium* se encuentran: el agar papa dextrosa (PDA), el cual es útil para evaluar aspectos morfológicos, su alto contenido en carbohidratos permite que las colonias se desarrollen rápidamente, como se observa en la figura 3 (A), por otro lado en este medio de cultivo se pueden observar características principales para el reconocimiento de *Fusarium*, como lo son la producción de macroconidias, y son observados al microscopio en forma curvada, como se puede ver en la figura 3 (B). Por último el agar Extracto de Malta, permite evaluar características macroscópicas, microscópicas y producción de conidios.



A.

Fig. 3 A. Crecimiento de *F. oxysporum* en medio Czapeck



A.

B.

Fig.4 A. Características macroscópicas de *Fusarium oxysporum* en agar PDA y B. Observación microscópica 40x.

6.2 Elección del mejor método de extracción para obtención de violaceína

Al realizar la extracción del metabolito secundario (violaceína) de *J. lividum*, teniendo en cuenta las metodologías descritas por Lu *et al.* (2009), Matz *et al.* (2004) y Brucker *et al.* (2008), se estableció que se obtiene mayor cantidad de violaceína si se utilizan las dos fracciones provenientes de la centrifugación, *pellets* y sobrenadantes. Autores como Brucker *et al.* (2008) utilizan los sobrenadantes para realizar la extracción, descartando los *pellets*, por lo tanto Lu *et al.* (2009) aseguran en sus ensayos que los sobrenadantes se pueden descartar debido a que existe baja concentración de violaceína presente en los mismos, tal vez porque el metabolito no es observado fácilmente a simple vista. No obstante, en los ensayos realizados en el laboratorio, se tuvieron en cuenta ambas metodologías planteadas, y se encontró que aunque los sobrenadantes no parecen tener pigmento, de ellos se extrae la mayor cantidad de violaceína.

En el estudio realizado por Matz *et al.* (2008) quienes realizaron la extracción de sobrenadantes y *pellets* de los cultivos de células bacterianas que producen violaceína,

manifestaron que ésta sustancia se almacena intracelularmente acumulándose en el periplasma. Teniendo en cuenta dichos ensayos, se puede decir que es posible extraer la violaceína de ambas fracciones, ya que al hacer la centrifugación, el metabolito asociado a la membrana, se queda en el sobrenadante, y al realizar la ruptura de las células del pellet con el dodecil sulfato de sodio (SDS), se obtiene la porción recopilada en el interior de las células.

6.3 Evaluación del comportamiento de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en presencia de la bacteria y las fracciones de extracto y sobrenadante crudo.

6.3.1 Curva de crecimiento *J. lividum*

La violaceína es producido por un número limitado de especies de bacterias Gram-negativas, incluyendo *Chromobacterium violaceum* y *Janthinobacterium lividum*, quienes comparten un hábitat común en el medio ambiente (Pantanella *et al.*, 2007). Con el fin de comprender las condiciones que inducen la producción de violaceína en *J. lividum*, se llevó a cabo una curva de crecimiento evaluándola en caldo triptona ya que según Pantanella *et al.* (2007) se ha sugerido que la producción de violaceína está implicado en la regulación de la producción de triptófano, por lo cual fue necesario determinar si la producción de violaceína se determinó en relación a la fuente de carbono y fase crecimiento, para esto, se realizaron muestreos cada 4 horas durante las 52 horas de muestreo evaluadas, donde se determinó UFC/ml células viables, determinación cuantitativa espectrofotométrica, y recuento de células totales.

Curva de crecimiento de *Janthinobacterium lividum*

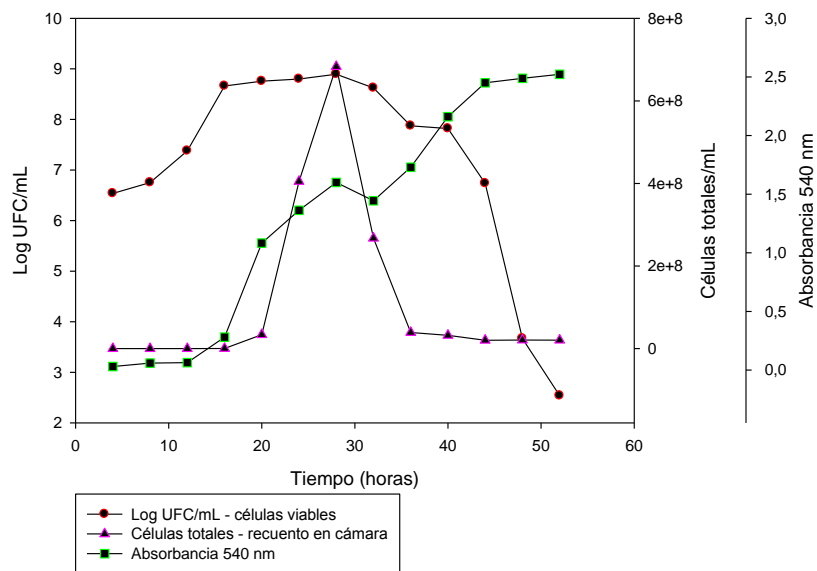


Fig 5. Curva de crecimiento *Janthinobacterium lividum*, creciendo en caldo tripton a 1% a temperatura ambiente.

En la figura 4 se observa que el recuento de células totales y células viables tuvo su pico máximo en la hora 28, y en la hora 36 aproximadamente. En la curva de crecimiento Lu *et al.* (2009) en su trabajo encontraron que hay un aumento del pigmento cuando el crecimiento de las células bacterianas ha disminuido, tal como lo que se generó en este ensayo, donde la absorbancia permaneció aumentando mientras la bacteria estaba en fase estacionaria, alrededor de la hora 36 y 40 aumentó la absorbancia, debido a la producción de violaceína, esto puede corresponder a que la producción del metabolito se da en mayor cantidad en condiciones de estrés como mecanismo de supervivencia de la bacteria (Pantarella *et al.*,2007). Lo anterior indica que a medida que fue aumentando la absorbancia por producción del metabolito, la bacteria se acercaba a su fase de muerte.

Finalmente, se observa que a partir de la hora 40 disminuye la viabilidad de las células y la absorbancia empieza a aumentar, esto indica que las células disminuyen su viabilidad al momento que se inicia la producción del metabolito, lo cual afirma que es un metabolito secundario ya que no tiene un rol directo con el crecimiento del microorganismo, ya que si bien es cierto cuando el crecimiento declina o cesa totalmente, empieza la fase de latencia que se caracteriza por un ligero incremento de la biomasa y por la producción de metabolitos secundarios, lo cual se ve representado en la muerte celular y aumento de absorbancia respectivamente.

6.3.2 Antagonismo por enfrentamiento en cultivo dual de *Janthinobacterium lividum* frente a *Fusarium oxysporum*

En las pruebas de enfrentamiento dual se encontró que no hubo inhibición micelial en el crecimiento del hongo al acercarse a la bacteria como se observa en la figura 5, por el contrario al entrar en contacto con la bacteria, *Fusarium oxysporum* crece sobre ella, de esto se deduce que el metabolito en conjunto con la bacteria no produce ningún efecto nocivo frente al hongo.

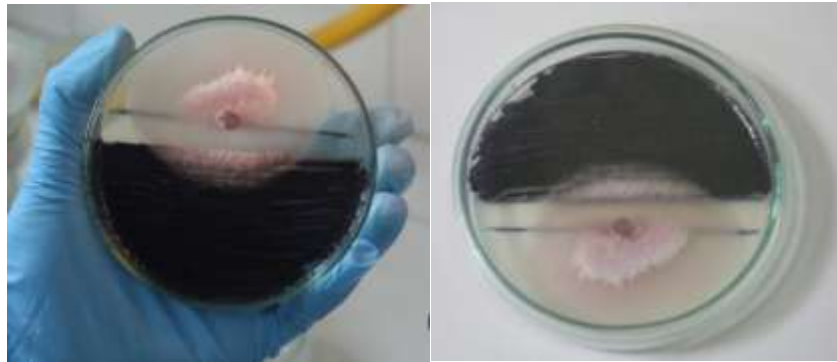


Fig. 6 Enfrentamiento dual entre *J.lividum* y *Fusarium oxysporum* en agar PDA

Se realizó un análisis de varianza (Anexo 2) con los resultados obtenidos del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* como se observa en la figura 6 para los dos tratamientos evaluados, buscando diferencias significativas entre ellos con un nivel de confianza del 95%, al obtener dicho análisis este indicó que no existen diferencias entre los tratamientos.

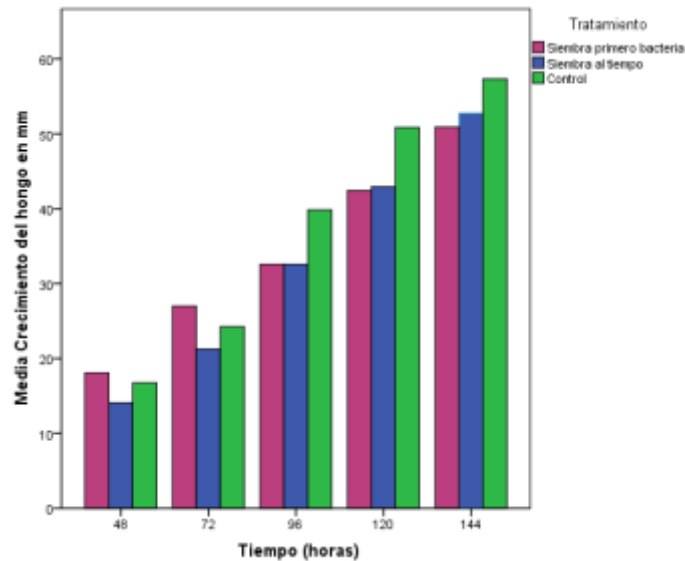


Fig 7. Enfrentamiento dual al tiempo y después comparado con el control

De acuerdo a los resultados reportados por Cruz *et al.* (2008), en este trabajo se esperaba un antagonismo por parte de *J. lividum* frente a *Fusarium*, debido a que *J. lividum* en el trabajo anteriormente reportado, fue evaluada su capacidad antagonista frente a patógenos como *Fusarium oxysporum* ejerciendo control en el crecimiento del patógeno. Una posible explicación a lo anterior podría ser que la bacteria tiene la capacidad para suprimir el crecimiento de patógenos de acuerdo al medio en el cual se encuentre; o debido a que este género se puede encontrar en el suelo y agua, presenta un alto grado de variación genética, por lo tanto, la cepa que fue aislada a partir de esporas de HMA puede presentar diversidad genética que las cepas aisladas de ambientes acuáticos o suelos (McArthur *et al.*, 1988). Cabe aclarar, que en este ensayo los dos microorganismos provenían de ambientes diferentes y los factores medioambientales de cada microorganismo pudieron haber afectado el estudio *in situ* de los microorganismos.

6.3.3 Antagonismo por amensalismo usando la técnica de Gauze

Así mismo, al realizar las pruebas de Gauze se encontró que no hubo inhibición en ninguno de los tratamientos, lo que confirma los resultados obtenidos en enfrentamiento dual, posiblemente este resultado es debido a la complejidad de la pared del hongo con respecto a la pared de las bacterias y a la resistencia frente al metabolito producido por *J. lividum*, esto lleva a pensar que en la interacción antagónica pueden estar involucrados otros metabolitos, Brucker *et al.* (2008) mencionaron que la bacteria produce otro

metabolito con capacidad antifúngica, el indol-3-carboxaldehído, el cual no fue tenido en cuenta en este estudio, ya que como es soluble en agua no pudo ser recuperado en la extracción; además afirman que el antagonismo del metabolito está asociado a la presencia de la bacteria, confirmándose una vez más que realmente no existe actividad antagonica de *J. lividum* frente a *F. oxysporum*. Para confirmar los resultados de las pruebas de gauze se llevó a cabo un análisis de varianza (Anexo 4) para los dos montajes evaluados en los diferentes tratamientos, dicho análisis indico que no existen diferencias significativas manejando un nivel de confianza del 95% , esto se puede ver evidenciado en la figura 7; por otro lado este análisis nos permite concluir que no hubo diferencia alguna en el montaje que se puso a crecer el hongo 2 días antes y en el que se sembraron las fracciones sobrenadante, extracto , bacteria y hongo al tiempo, ya que los resultados arrojados fueron similares, lo cual se observa en la figura 8 donde todos los tratamientos tienen uniformidad en el crecimiento evidenciándose pigmentación en las colonias.

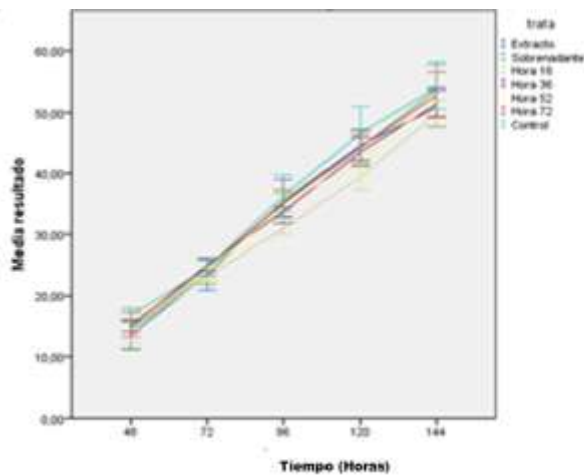


Fig 8. Antagonismo por técnica de Gauze enfrenteado los dos montajes frente al control

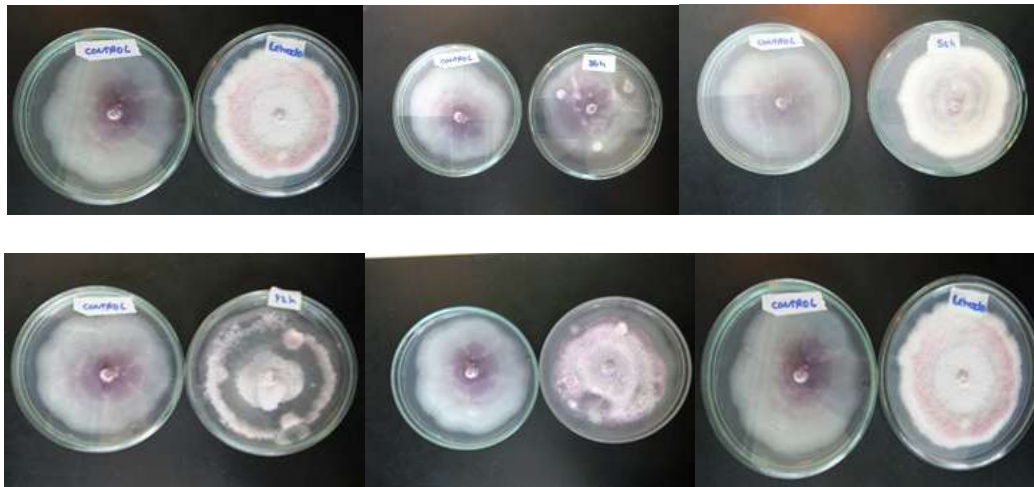


Fig.9 Resultados antagonismo usando la técnica de Gauze

Es importante tener en cuenta que para estos ensayos los extractos no fueron concentrados, ni se hizo purificación y posiblemente se hayan encontrado trazas de otros compuestos producidos en el medio. La única forma de confirmar que realmente el metabolito recuperado, se trataba de violaceína, es por medio de la purificación e identificación por medio de técnicas cromatográficas como lo han reportado Brucker *et al.* (2008).

Shirata *et al.* (2000), encontraron que al realizar la extracción de violaceína, esta fue evaluada como antifúngico frente a diferentes fitopatógenos, entre estos, dos especies del género *Fusarium* (*solani* y *lateritium*), los cuales presentaron resistencia a la violaceína, siendo probable que este metabolito no actúe como antifúngico frente a este género.

7. CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas de crecimiento para ambos microorganismos fueron establecidas en medio PDA a 25°C, obteniendo un crecimiento uniforme de las colonias expresando los pigmentos característicos para cada microorganismo.
- Es posible obtener violaceína de ambas fracciones evaluadas.
- El crecimiento de *Fusarium oxysporum* cepa 310, utilizada en este estudio no se inhibe en presencia de las fracciones sobrenadante ni del extracto crudo, tampoco en interacción con la bacteria, con lo que se afirma que *Janthinobacterium lividum* no posee actividad antagonista frente a este fitopatógeno.

8. RECOMENDACIONES

- Modificar la metodología de extracción de la violaceína, a fin de utilizar diferentes solventes, y de esta manera poder evaluar el mejor solvente para extraer la violaceína, provocando una extracción más efectiva.
- Realizar cromatografía y purificación del metabolito.
- Enfocar estudios en otros metabolitos que son producidos por *Janthinobacterium lividum*, como es el caso de indol 3 -carboxaldehído, para evaluar su actividad antifúngica.
- Evaluar la actividad antagónica de *J. lividum* frente a otros fitopatógenos

9. BIBLIOGRAFÍA (en orden alfabético)

- Agrios G. 2002. Plant Pathology. 5th edición. Limusa. Florida, USA, 522-524 p.
- Alfonso D, Sandoval E. 2008. Evaluación “*in vitro*” de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento. **Tesis de Pregrado**. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, 203 p.
- Asocolflores. 2002.
<http://www.upme.gov.co/...AGRICOLA%20Y%20PECUARIO/Guia%20ambiental%20para%20el%20subsector%20Floricultor.pdf>. Consultado el 12 de Febrero de 2011.
- Asocolflores. 2007. Floriculture for export September 2007.
<http://www.asocolflores.org/asocolflores/servlet/download?idexternalfile=2368name =floriculture.PDF>. 11-2-2008. Consultado el 10 Febrero de 2011.
- Asocolflores. 2009.
http://www.asocolflores.org/Asocolflores_74_para_Web.pdf. Consultado el 10 Febrero de 2011.
- Asocolflores 2010.
http://www.asocolflores.org/Asocolflores_76_para_Web.pdf. Consultado el 12 de Febrero de 2011.
- August P, Grossman T, Minor C, Draper M, McNeil I, Pemberton J, Call K, Holt D, Osburne M. 2000. Sequence Analysis and Functional Characterization of the Violacein Biosynthetic Pathway from *Chromobacterium violaceum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* **2**(4): 513-519. p.
- Becker M, Brucker R, Schwantes C, Harris R, Minbiole K. 2009. The Bacterially Produced Metabolite Violacein Is Associated with Survival of

Amphibians Infected with a Lethal Fungus. *Applied and Environmental Microbiology* . **75** (21): 635–6638 p.

- Blosser R, Gray K. 2000. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods*. **40**: 47–55 p.
- Brenner J, Garrity G, Krieg N, Staley J. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 2 parte3. Springer. USA. 636-642 p.
- Brucker R, Harris R, Schwantes C, Gallaher T, Flaherty G, Lam B, Minbiole K. 2008. Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemistry Ecology*. **34**:1422–1429 p.
- Castellanos O, Fonseca S, Buriticá S. 2009. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de flores y follajes con énfasis en clavel. Ministerio de Agricultura Colombia [en línea] http://www.minagricultura.gov.co/archivos/agenda_prospectiva_de_investigacion_y_desarrollo_tecnologico_para_la_cadena_productiva_de_flores_y_follajes_con_énfasis_en_clavel.pdf Consultado el 29 de mayo de 2011.
- Chernin. L, Wilson. M, Thompson.J, Haran. S, Bycroft.B, Chet. L, Williams. P. & Stewart. G. 1998. Chitinolytic Activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing. *Journal of bacteriology*. **17**: 4435-4441 p.
- Cruz S, Horii S, Ochiai A, Yasuda T, Ishii T. 2008. Isolation and analysis of bacteria associated with spores of *Gigaspora margarita*. *Journal of Applied Microbiology*. **104**:1711–1717 p.
- Duarte M, Hernández M. 1996. Evaluación preliminar de extractos vegetales para el control de *Cladosporium echinulatum*, Berkeley de Vries,

en el cultivo de clavel. **Tesis de Pregrado**. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá D.C, 87 p.

- Dubey C, Suresh M, Singh B, 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Indian Agricultural Research Institute*; **40**:118-127 p.
- Duran N, Justo G, Ferreira C, Melo P, Cordi L, Martins D. 2007. Violacein: Properties and biological activities. *Biotechnology Applied and Biochemistry*; **48**:127–133 p.
- Garcés E, Orozco A, Calderón O. 2001. *Fusarium oxysporum* El hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*; **6** (1):7-23 p.
- García M.D, Uruburu F. 1991. La conservación de cepas microbiana. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universitat de València.; 46100 Burjassot. [en línea] <http://www.uv.es/cect/docs/cons.doc> . Consultado el 13 de Marzo de 2011.
- Gillis M, De Ley A. 2006. The Genera Chromobacterium and Janthinobacterium. *Prokaryotes*; **5**:737–746 p.
- Hutson D, Junshi M. 1998. Fungicidal activity Chemical and Biological Approaches to plant protection. Editorial Villey. 184-186 p.
- Latorre B. 1992. *Enfermedades de las plantas cultivadas*. Tercera Edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile, Chile. 628 p.
- Lauer A, Simon M, Banning J, Lam B, Harris R. 2006. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *The ISME Journal* 2008; 2:145-157 p.



- Leslie J.F, Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing
- Li L, Qu Q, Tian B, Zhang Q. 2005 Induction of Chlamydospores in *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* by Antifungal Compounds Produced by *Bacillus subtilis* C2. *J. Phytopathology*, **153**:686–693 p.
- Linares Linares M Y. 2010. *Fusarium spp*: UN MODELO PARA EL ANÁLISIS DE PATÓGENOS MULTIHOSPEDERO. **Tesis de Maestría**. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 263 p.
- Lu Y, Wang L, Xue Y, Zhang Ch, Xing X, Lou K, Zhang Z, Li Y, Zhang G, Bi J, Su Z. 2009. Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal*; **43**:135–141 p.
- Matz C, Deines P, Boenigk J, Arndt H, Eberl L, Kjelleberg S, Jürgens K. 2004. Impact of Violacein-Producing Bacteria on Survival and Feeding of Bacterivorous Nanoflagellates. *Applied and environmental microbiology*; **70** (3):1593–1599 p.
- McArthur V, Kovacic A, Smith H, 1988. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. *Proc Natl Acad Sci .USA* . **85**: 9621–9624 p.
- Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S. 2007. Violacein and biofilm production *Janthinobacterium lividum*. *Journal of applied of microbiology*; **102**: 992-999 p.
- Reyes T, Rodríguez G, Pupo A, Alarcón L, Limonta Y. 2007. Efectividad in vitro de *Trichoderma harzianum rifai* para el biocontrol de *Rhizoctonia*

solani Kühn y *Pyricularia grisea* SACC. Aislados en el cultivo del arroz (*Oryza Sativa* L.) Fitosanidad; **11**(1):29-33 p.

- Shinoda K, Hasegawa T, Sato H, Shinozaki M, Kuramoto H, Takamiya Y, Sato T, Nikaidou N, Watanabe T, Hoshino T. 2007. Biosynthesis of violacein: a genuine intermediate, protoviolaceinic acid, produced by VioABDE, and insight into VioC function. *Chem Commun (Camb)*; **40**: 4140–4142.p.
- Shirata A, Tsukamoto T, Yasui H, Tamako H, Shoji H, Atsushi K. 2000. Isolation of Bacteria Producing Bluish-Purple Pigment and Use for Dyeing. *Haya Science Firm*; **34**:131-140 p.
- Soto J, Pabón F, Filgueira J. 2009. Relación entre el color de la flor del Clavel (*Dianthus Caryophyllus*) y la tolerancia a patógenos del género Fusarium. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*; **5** (1):116-129 p.

ANEXOS

ANEXO 1: Características macroscópicas de *Janthinobacterium lividum* en los diferentes medios de cultivo

Medio Nutritivo	Medio LB
<p>Glucosa (1%): Buen crecimiento, pigmentación a 48h mayor que en LB, colonias pequeñas brillantes, de color morado a negro, ya que en algunas partes hay mayor concentración del violacein tomando un color negro.</p> 	<p>Glucosa (1%): Buen crecimiento, presenta pigmentación a 48 h, colonias pequeñas brillantes.</p> 
<p>Sacarosa (1%): Crecimiento pero no como en Glucosa, pigmentación débil pero mejor que la presentada en el medio Lb, a medida que se envejece pierde pigmentación, colonias opacas pequeñas.</p>	<p>Sacarosa (1%): Crecimiento, pigmentación débil, colonias opacas y pequeñas.</p>



Glicerol (1%): Buen crecimiento mayor que con los otras fuentes de Carbono , Pigmentación fuerte, colonias pequeñas brillantes.

Glicerol (1%): No hay diferencia lo cual nos indica que con los resultados obtenidos y la bibliografía consultada la mejor fuente de carbono para el crecimiento y adaptación de *Janthinobacterium lividum* es el glicerol.



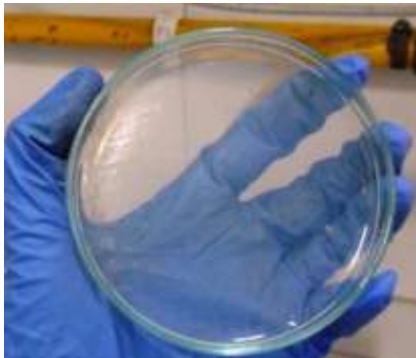
Celulosa (1%): Crecimiento similar al presentado en sacarosa, pigmentación débil, es decir baja concentración de violacein; colonias opacas pequeñas.

Celulosa (1%): Crecimiento no satisfactorio, pigmentación débil , colonias opacas pequeñas.



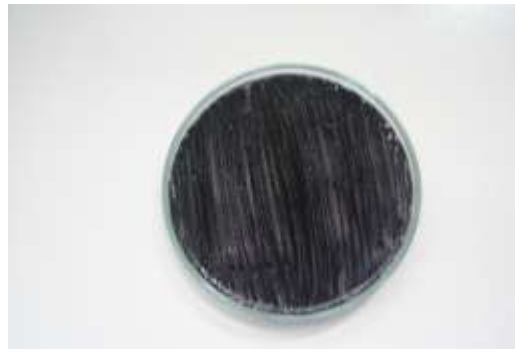
Medio mínimo de sales

Crecimiento lento, no se puede observar características morfológicas de la cepa, colonias blancas pequeñas opacas sin pigmentación



PDA

Crecimiento rápido, produciendo pigmentación fuerte y abundante, colonias pequeñas y brillantes.



ANEXO 2: Medios de cultivo

- **Agar Nutritivo**

COMPONENTES	g/L
Pluripeptona	5.0
Extracto de carne	3.0
Cloruro de Sodio(NaCl)	8.0
Agar	15.

Preparación: Agregar los componentes por litro de agua destilada. mezclar y dejar reposar 5 minutos, calentar suavemente agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos

- **Agar Luria Bertani LB**

COMPONENTES	g/L
Triptona	10
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de Sodio(NaCl)	10

Agregar los componentes al agua destilada, calentar a fuego agitando durante 5 minutos, Autoclavar (15lb 121°C)

- **Medio mínimo de sales MMS**

COMPONENTES	g/l
KH ₂ PO ₄	0.5
NH ₄ Cl	1.0
Na ₂ SO ₄	2.0
KNO ₃	2.0
CaCl ₂	0,001
H ₂ O	6
MgSO ₄	1.0
FeSO ₄	0.0004

- **Agar Avena 30g/L**

COMPONENTES	g/L
Avena comercial en polvo	30
Sacarosa	5
Agar-Agar	15

Preparación: Agregar los componentes al agua destilada, calentar a fuego durante 5 minutos, ajustar el pH a 6.8. Autoclavar (15lb 121°C).

- **Agar Papa Dextrosa PDA**

COMPONENTES	g/L
Agar PDA	39

Agregar los componentes al agua destilada, calentar a fuego durante 5 minutos, Autoclavar (15lb121°C)

- **Agar Czapeck**

COMPONENTES	g/l
KH ₂ PO ₄	1.0
Extracto de levadura	5.0
Sacarosa	30
Solución de Czapeck	10mL
Agar	15

ANEXO 3: Análisis de Varianza (Enfrentamiento dual)

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Hora 48	Inter-grupos	24,889	2	12,444	4,571	,062
	Intra-grupos	16,333	6	2,722		
	Total	41,222	8			
Hora 72	Inter-grupos	49,625	2	24,813	3,722	,089
	Intra-grupos	40,000	6	6,667		
	Total	89,625	8			
Hora 96	Inter-grupos	105,125	2	52,563	10,556	,011
	Intra-grupos	29,875	6	4,979		
	Total	135,000	8			
Hora 120	Inter-grupos	133,764	2	66,882	9,670	,013
	Intra-grupos	41,500	6	6,917		
	Total	175,264	8			
Hora 144	Inter-grupos	65,542	2	32,771	5,921	,038
	Intra-grupos	33,208	6	5,535		
	Total	98,750	8			

ANEXO 4: Análisis de Varianza (Antagonismo por técnica de Gauze).

ANOVA

Crecimiento

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	87,101	6	14,517	,903	,504
Intra-grupos	562,656	35	16,076		
Total	649,757	41			