



“Por un Desarrollo  
Agrario  
Integral y Sostenible”

# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

## FACULTAD DE AGRONOMÍA

### Trabajo de Tesis

**Identificación fenotípica de mecanismo de  
resistencia de *Burkholderia gladiolii* y  
*Burkholderia plantarii* y sensibilidad *in vitro* a  
bactericidas de uso agrícola**

#### **Autores**

**Br. Julio Cesar Escorcía**

**Br. Jeffrey Lumardi Arauz Espinoza**

#### **Asesores**

**Lic. MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez**  
**Ing. MSc. Eliézer Hazael Lanuza Rodríguez**

**Managua, Nicaragua**  
**Marzo, 2023**



“Por un Desarrollo  
Agrario  
Integral y Sostenible”

# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

## FACULTAD DE AGRONOMÍA

### Trabajo de Tesis

**Identificación fenotípica de mecanismo de  
resistencia de *Burkholderia gladiolii*  
*Burkholderia plantarii* y sensibilidad *in vitro* a  
bactericidas de uso agrícola**

#### Autores

**Br. Julio Cesar Escorcía  
Br. Jeffrey Lumardi Arauz Espinoza**

#### Asesores

**Lic. MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez  
Ing. MSc. Eliézer Hazael Lanuza Rodríguez**

Presentado a la consideración del Honorable Comité Evaluador como  
requisito final para optar al grado de Ingeniero en Sanidad vegetal

**Managua, Nicaragua  
Marzo, 2023**

## Hoja de aprobación del Comité Evaluador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el Honorable Comité Evaluador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

***Ingeniero en Sanidad Vegetal***

---

Miembros del Comité Evaluador

---

Presidente (MSc. Markeling Rodríguez)

Secretario (MSc. Jorge Gómez))

---

Vocal (PhD. Ulises Blandón D)

Lugar y fecha \_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo primeramente a nuestro Padre celestial por haberme permitido y guiado durante todo este tiempo que estuve activo como estudiante de esta prestigiosa universidad y así poder dar por concluida mi carrera universitaria siendo una de mis metas y anhelo que me propuse desde el primer momento que decidí formar parte de la comunidad universitaria y así poder prepararme como profesional.

De igual forma dedico de mucho corazón a mi madre Melitina Escorcía Gonzales por haberme brindado todo su apoyo durante este tiempo ya que ese fue uno de sus mejores deseos verme triunfar hasta el final.

A mi hermana Jasmina Escorcía Gonzales a mis tías ya que todas me ayudaron económicamente, proporcionándome necesaria y todo lo que necesité para poder cubrir mis gastos durante el tiempo que estuve sacando todo el pensum académico y la tesis.

*Br. Julio Cesar Escorcía.*

## **DEDICATORIA**

La presente tesis la dedicó primeramente a Dios, por la sabiduría, inteligencia, salud y fuerzas para enfrentar todas las dificultades que se presentaban día a día y porque gracias a él he logrado culminar mi carrera. Con mucho amor y Cariño a mi Esposa Raxela Junieth Castillo Acuña por creer en mí, por ser mi motivación y ayuda incondicional siempre. A mi padre Luis Amado Aráuz Monge por ser mi principal ejemplo para seguir, por ser mi apoyo, por alentarme a seguir adelante a pesar de cualquier circunstancia. A mi Madre Silvia Elena Rizo por darme sus consejos, para hacer de mí, una mejor persona. A mi hermano Luis Danilo Aráuz Espinoza, por brindarme siempre sus conocimientos y cada día alentarme para que siga adelante. A mis hermanas Margarita Del Carmen Aráuz Espinoza y Diana Elizabeth Aráuz Espinoza por su apoyo y confianza hacia a mí.

Y muy especialmente a mi tía Fanny Del Socorro Aráuz Monge, por abrir las puertas de su hogar para que yo pudiera estudiar durante el transcurso de mi carrera Universitaria. Y a toda mi familia en general que son lo mejor y más valioso que Dios me ha dado.

***Br. Jeffrey Lumardi Arauz Espinoza***

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primeramente a mi Dios todo poderoso por darme salud y fortaleza de igual manera por no haberme desamparado en ningún momento de mi vida Él siempre estuvo protegiéndome en los buenos y malos momentos que pase durante todo este trayecto de mi formación profesional.

A mi mama Melitina Escorcía Gonzales que gracias a ella logre dar por finalizada mi meta, a toda mi familia porque ellos siempre estuvieron apoyándome, aconsejándome y dándome ánimos en los malos momentos que pasé en este transcurso de tiempo para que nunca perdiera la perspectiva de seguir adelante en mis estudios universitarios.

A Lic. MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez por haber puesto su confianza en mí y aceptarme como uno de sus tesis y así poder dar mi último paso en nuestro tema de investigación ya que aprendí mucho su enseñanza y todo su valioso tiempo dedicado que me brindo en cada una de las revisiones realizadas del inicio hasta el final de la investigación fueron de gran ayuda para mi formación profesional.

A Ing. MSc. Eliézer Hazael Lanuza Rodríguez de igual forma por haberme brindado todo su apoyo y haberme impartido todos sus conocimientos que estuvieron de su alcance y así poder lograr nuestro objetivo de dar por concluida la tesis.

A mi compañero de trabajo Jeffrey Lumardi Arauz Espinoza por ser un excelente compañero y amigo que juntos logramos a culminar nuestra investigación aportándonos conocimiento para que esto fuera posible.

***Br. Julio Cesar Escorcía***

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por regalarme vida, salud, sabiduría e inteligencia durante estos cuatro años y por darme la fuerza para enfrentar las dificultades que se sobrevinieron.

A la Universidad Nacional Agraria por abrirme las puertas para poder prepararme profesionalmente y poder realizar mi tesis de graduación.

Agradezco a Lic. MSc Isaías Ezequiel Sánchez Gómez por haberme aceptarme como uno de sus tesis, brindado su apoyo, tiempo, conocimiento y guía durante la investigación.

A Ing. MSc Eliezer Hazael Lanuza Rodríguez por su conocimiento y ayuda para poder concluir esta investigación científica.

A Julio Cesar Escorcia por ser un gran compañero y amigo, por su aporte en esta investigación ya que sin su ayuda esto no sería posible.

*Br. Jeffrey Lumardi Arauz Espinoza*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
<b>DEDICATORIA</b>	i
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	vii
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	viii
<b>RESUMEN</b>	viii
<b>ABSTRACT</b>	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. OBJETIVOS</b>	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
<b>III. MARCO DE REFERENCIA</b>	4
3.1 Cultivo del arroz	4
3.2 Daños causados por bacterias en arroz	4
3.3 <i>Burkholderia plantarii</i>	7
3.4 Bactericidas de uso comercial	7
3.5 <i>Bacillus subtilis</i>	8
3.6 Mecanismo de resistencia bacteriana	8
3.7 Antibióticos	10
3.8 Detección fenotípica de mecanismo de resistencia con antibiograma	12
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
4.1 Ubicación del estudio	15
4.2 Obtención del material biológico	15
4.3 Diseño experimental	15
4.4 Identificación fenotípica de mecanismos de resistencia de <i>B. gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i>	15
4.5 Prueba de sensibilidad <i>in vitro</i> a bactericidas de uso comercial	16
4.6 Variables evaluadas	17
4.7 Análisis de datos	18
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	19
5.1 Identificación fenotípica de mecanismos de resistencia de <i>B. gladiolii</i> y <i>plantarii</i>	19
5.2 Sensibilidad <i>in vitro</i> a bactericidas de uso comercial	21
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	25
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	26
<b>VIII. LITERATURA CITADA</b>	27
<b>IX. ANEXOS</b>	33

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Dosis comerciales de bactericidas sintéticos y biológicos para evaluación de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Burkholderia gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i>	17

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Representación esquemática del orden de los antibióticos utilizados para la identificación fenotípica de mecanismos de resistencia de <i>B. gladiolii</i> y <i>plantarii</i>	16
2.	Representación esquemática de la posición de los bactericidas comerciales para prueba de sensibilidad. Bactericidas sintéticos (A), <b>1</b> Sulfato de estreptomicina más oxitetraciclina 500g/200L, <b>2</b> Sulfato de estreptomicina más oxitetraciclina 600g/200L, <b>3</b> Ácido oxínico 1000g/200L, <b>4</b> Ácido oxínico 1500g/200L, <b>5</b> Ácido oxínico + gentamicina 300ml/200L, <b>6</b> Ácido oxínico + gentamicina 500ml/200L. Bactericida biológico ( <i>Bacillus subtilis</i> ), <b>1.5</b> Dosis 1.5L/200L <b>2</b> Dosis 2L/200L	17
3.	Pruebas fenotípicas de mecanismos de resistencia de <i>B. gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i> aisladas de panículas de arroz	19
4.	Aislados de <i>Burkholderia gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i> en medios de cultivo Mueller-Hinton	21
5.	Sensibilidad de aislados de <i>B. gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i> a ácido oxolínico	22
6.	Sensibilidad de aislados de <i>B. gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i> a ácido oxolínico más gentamicina.	22
7.	Sensibilidad por dosis de <i>B. gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i> a ácido oxolínico	23

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Identificación fenotípica de mecanismos de resistencia de <i>B. gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i> mediante método de difusión Bauer - Kirby	33
2.	Pruebas fenotípicas para la identificación de mecanismos de resistencia de <i>B. gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i>	33
3.	Análisis de la varianza del ácido oxolínico frente a aislados de <i>B. gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i>	34
4.	Análisis de la varianza del ácido oxolínico más gentamicina frente a aislados de <i>B. gladiolii</i> y <i>B. plantarii</i>	34

## RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el grano de mayor consumo después del trigo, tiene importancia a nivel mundial porque constituye un alimento básico en la dieta de la población. Las bacterias *Burkholderia glumae*, *B. gladiolii* y *B. plantarii* son importantes en el cultivo de arroz, por provocar manchado y tizón del grano. El objetivo de esta investigación fue generar información sobre identificación fenotípica de mecanismo de resistencia de *B. gladiolii*, *B. plantarii* y sensibilidad *in vitro* a bactericidas de uso agrícola. Los aislados bacterianos de *B. gladiolii* y *B. plantarii* fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología Vegetal de la Universidad Nacional Agraria. La identificación de mecanismo de resistencia y sensibilidad a bactericidas de uso agrícola se realizó por el método de Bauer –Kirby (difusión en agar), se midió el tamaño de los halos de inhibición, se observó el tamaño y forma de los halos de inhibición producidos por la sinergia entre los discos de antibióticos. Se identificaron seis aislados con mecanismo de resistencia AmpC reprimida, de estos cuatro fueron de *B. gladiolii* y dos de *B. plantarii*, se identificó un aislado multirresistente con presencia de AmpC y cinco que no manifestaron mecanismos de resistencia. Los aislados D4 y M4 fueron sensibles al ácido oxolínico en comparación con los aislados T5, T5II, V5, D2 I, V2 y D3. El aislado M4 de *B. gladiolii* fue el más susceptible al ácido oxolínico más gentamicina, mientras que los aislados D4, D2I, T5II, y D3 fueron poco susceptible, a diferencia de los aislados T5 y V2 que no mostraron sensibilidad a dicho producto comercial. La dosis comercial 1.5 kg ha<sup>-1</sup> de ácido oxolínico inhibió el mayor número de aislados en comparación con la dosis 1.0 kg ha<sup>-1</sup>. El producto biológico a base de *Bacillus subtilis* y el producto formulado sulfato de estreptomina más oxitetraciclina no ejercieron efecto inhibitorio sobre los aislados de *B. gladiolii* y *B. plantarii*.

**Palabras clave:** difusión, antibióticos, AmpC, Beta-lactamasas, carbapenemasas, aislados

## ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is the grain with the highest consumption after wheat, it is important worldwide because it constitutes a basic food in the diet of the population. The species of *Burkholderia glumae*, *B. gladiolii* and *B. plantarii* are important bacteria in rice cultivation, for causing spotting and grain blight. The objective of this research was to generate information on the phenotypic identification of the resistance mechanism of *B. gladiolii* and *B. plantarii* and *in vitro* sensitivity to bactericides for agricultural use. The bacterial isolates of *B. gladiolii* and *B. plantarii* were provided by the plant microbiology laboratory of the National Agrarian University. The identification of the mechanism of resistance and sensitivity to bactericides for agricultural use was carried out by the Bauer-Kirby method (agar diffusion), the size of the inhibition halos was measured, and the size and shape of the inhibition halos produced were observed by the synergy between the antibiotic discs. Six isolates with derepressed AmpC resistance mechanism were identified, of these four were from *B. gladiolii* and two from *B. plantarii*, one multiresistant isolate with the presence of AmpC and five that did not show resistance mechanism were identified. Isolates D4 and M4 were sensitive to oxolinic acid compared to isolates T5, T5II, V5, D2I, V2 and D3. The M4 isolate of *B. gladiolii* was the most susceptible to oxolinic acid plus gentamicin, while the D4, D2I, T5II, and D3 isolates were not very susceptible, unlike the T5 and V2 isolates that did not show sensitivity to said commercial product. The 1.5 kg ha<sup>-1</sup> commercial dose of oxolinic acid inhibited the highest number of isolates compared to the 1.0 kg ha<sup>-1</sup> dose. The biologic product based on *Bacillus subtilis* and the formulated product streptomycin sulfate plus oxytetracycline had no inhibitory effect on the *B. gladiolii* and *B. plantarii* isolates.

**Key words:** diffusion, antibiotics, AmpC, Beta-lactamases, carbapenemases, isolates.

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) pertenece a la familia de las gramíneas y se caracteriza por ser uno de los principales granos básicos de mayor importancia en el mundo generando un alto valor socioeconómico de cada país como también un excelente y valioso aporte para el consumo interno de la población. Generalmente el cultivo de arroz se encuentra ubicado en segundo lugar solamente superado por el cultivo de maíz (González, 2016).

Paredes *et al.* (2022), señala que el cultivo del arroz comenzó aproximadamente 10 000 años en muchas regiones húmedas de Asia tropical y subtropical, posiblemente sea la India el país donde se cultivó por primera vez el arroz, esto se debe a que en estas zonas abundaban los arroces silvestres por ende es uno de los países que se vio crecer dicho cultivo, y que probablemente hubo varias rutas por las cuales se introdujeron de Asia a otras partes del mundo. En Nicaragua la producción de arroz representa el 11% del PIB agrícola nacional. Existen actualmente productores que cultivan 97 284 hectáreas, 60% se da en condiciones de secano y un 40% en riego con mayor tecnología. Estos productores de arroz generan unos 30000 empleos anuales (Aguilar, 2017).

Lombeida *et al.* (2016) argumentó que el cultivo se ve afectado por factores que limitan a la producción de arroz como la temperatura, humedad, velocidad del viento, suelos compactos y escasos de agua y, por otra parte, están los originados por insectos, hongos, virus, nematodos y bacterias que se han transformado en una de las dificultades más difícil de controlar para los productores. Giona-Cerezo *et al.* (2020) describió que la resistencia antimicrobiana se define como la capacidad de una bacteria que posee en su material genético para resistir los efectos de diferentes antibióticos, siendo una característica inherente de la bacteria o puede ser una capacidad adquirida durante el proceso infeccioso.

La resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas que ha aumentado por parte de las bacterias a los antibióticos, el aumento se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia teniendo la capacidad de transmitirlo, no sólo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o distintas especies, presentando diferentes mecanismos de resistencia como en el caso de las enzimas hidrolíticas, la modificación del sitio activo, la proteína de unión a la penicilina (PBP), modificación ribosomal,

disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano y la bomba de flujos (Moreno *et al.*, 2009)

En los últimos años algunas especies como *B. gladiolii* (añublo del arroz) y *B. plantarii* (tizón de las plántulas), han venido ocasionando un impacto negativo en la producción de arroz. Ambas especies generan grandes pérdidas económicas anuales en los países productores de arroz, debido a la poca información de los productores respecto a su detección temprana, prevención y control de la enfermedad (Pedraza, 2012). El manejo de *B. gladiolii* y *B. plantarii*, se ha vuelto cada vez más difícil de controlar, por tal razón se han venido planteando diferentes estudios y estrategias con el objetivo de resolver los problemas originados por estas bacterias que afectan en gran escala al cultivo, una de estas prácticas de manejo es el uso de productos químicos que ejercen gran control contra estas enfermedades, pero en algunos casos se han encontrados casos que las bacterias de han creado resistencia a diferentes formulaciones químicas (Ochi *et al.*, 2017). Esta investigación busca sentar bases a partir de la generación de información de las bacterias de *B. gladiolii* y *B. plantarii* sobre la identificación de mecanismos de resistencia y sensibilidad in vitro a bactericidas de uso agrícola.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Generar información sobre identificación fenotípica de mecanismo de resistencia de *Burkholderia gladiolii* y *Burkholderia plantarii* y sensibilidad *in vitro* a bactericida de uso agrícola.

### 2.2 Objetivos específicos

Determinar mediante pruebas fenotípicas mecanismos de resistencia natural o adquiridos de *Burkholderia gladiolii* y *Burkholderia plantarii*.

Evaluar la sensibilidad de *Burkholderia gladiolii* y *Burkholderia plantarii* a dosis de bactericidas comerciales.

### III. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1 Cultivo del arroz

El arroz (*Oryza sativa* L.), es el grano más consumido después del trigo, tiene importancia a nivel mundial principalmente porque es utilizado como una de las bases y fuentes de alimentación para la humanidad, actualmente es cultivado en 113 países, la mayor producción de arroz está ubicada en Asia, el continente americano ocupa el segundo lugar en cuanto a los mayores productores de arroz, se destaca que es uno de los cultivos de los granos básicos que posee una gran demanda en los diferentes mercados de cada país productores de este cultivo (Ube, 2012).

Según Fuentealba-Sandoval *et al.* (2014), recalcó en uno de sus estudios que se han venido observando problemas en la producción del cultivo de arroz, siendo los principales agente causales las especies pertenecientes a *B. gladiolii* y *B. plantarii* en la etapa reproductiva cuando comienza la floración o la iniciación de la panícula.

#### 3.2 Daños causados por bacterias en arroz

Dentro de las principales enfermedades que se presentan en el cultivo de arroz se encuentra el manchado del grano caracterizándose por ser una enfermedad distribuida ampliamente a nivel mundial, causando grandes pérdidas económicas en países productores de arroz. En Nicaragua la presencia de estas enfermedades tanto manchado bacteriano como el tizón del grano, han venido aumentando su desarrollo durante los últimos años, ya que las condiciones adecuadas y la variabilidad de los factores ambientales han permitido el aumento de la bacteria, llegando a causar pérdida hasta de un 30% en la producción de arroz, debido a los problemas causados por *B. gladiolii* y *B. plantarii* (Lombeida, 2016)

La presencia de diferentes patógenos en el cultivo de arroz ha venido siendo uno de los problemas más complicado de resolver para la mayoría de los productores de arroz, siendo las bacterias uno de los problemas que afectan en la mayoría de los países que se dedican a la producción de arroz, debido a que esta planta de arroz es uno de los principales hospederos de las especies *B. gladiolii*, *B. plantarii* y *B. glumae* (Lombeida, 2016).

El añublo de la panícula del arroz presenta síntomas iniciales incluyen una decoloración en la parte basal de la vaina, la cual rápidamente avanza, hasta afectar la totalidad de la misma. Los síntomas del añublo de panícula y pudrición de grano del arroz ocasionados con *B. gladiolii* son similares a los de *B. glumae*. Luego de que las plántulas son cultivadas en el campo, el patógeno puede ser aislado usualmente de las vainas foliares inferiores, donde crece específicamente durante la etapa de macollamiento, destacando que la bacteria puede sobrevivir en el suelo para la siguiente cosecha (Gañán, 2011).

De acuerdo con Azegami *et al.* (1987) el género *Burkholderia* fue reportado y aislado por primera vez en distrito de Kyushu, Japón y desde entonces se ha reportado en importantes zonas productoras de arroz en todo el mundo como en China, Taiwán, Malasia, Las Filipinas, Indonesia, Venezuela, Panamá, Nicaragua, Colombia y Estados Unidos.

Por otra parte Serret-López *et al.* (2020), describió que *Burkholderia* spp, es un género bifuncional, debido a que algunas de sus especies establecen relaciones simbiótico-mutualistas con las plantas, mientras que otras establecen asociaciones simbiótico-patogénicas con plantas, animales y humanos por las que las convierte en bacterias generalista.

El añublo bacterial del arroz se presenta en las plantas con síntomas iniciales que incluyen decoloración en la parte basal de la vaina que avanza rápidamente hasta afectar la totalidad la misma presentando largas y verticales lesiones de color grisáceo rodeado por un color rojizo oscuro siendo los principales agentes causales *B. gladiolii* y *B. glumae* (Peña, 2017).

Quesada-González (2014), mencionó que algunas especies de *Burkholderia* son importantes ya que ocasionan un daño irreversible a la planta entre ellas esta *B. cepacea* asociada a cebolla, *B. andropogonis* que infecta el sorgo y el maíz, *B. caryophylli* que se encuentra en clavel y *B. gladiolii* en arroz, causando pudrición suave y necrosis severa en tejidos.

Según Maeda *et al.* (2006), afirmó en un estudio que las especies de *B. gladiolii* y *B. plantarii* son bacterias muy importantes en el cultivo de arroz, conocidas comúnmente como manchado y tizón del grano, los daños causados por estas bacterias se observan en los granos de la planta, lo que significa que se debe manejar adecuadamente cuando el cultivo este a pocos días o antes

de la floración y así evitar tener problemas de estas enfermedades y pérdidas de producción al momento de la cosecha de arroz.

En otro estudio realizado por Quesada-González (2014), caracterizó que el género *Burkholderia* posee diversos sistemas de secreción que les permite exportar proteínas desde su citoplasma hacia el exterior de la célula bacteriana. En el caso de bacterias fitopatógenas, los sistemas de secreción tipo III son necesarios para causar daño en plantas susceptibles y provocar respuestas de hipersensibilidad en las hojas de plantas no hospederas o en plantas.

De acuerdo a lo escrito por Serret-López *et al.* (2021), la especie de *B gladiolii* se encuentra dividida en cuatro patovares. Por otra parte, en un reporte realizado por Mirambrell, (2015) señalo que *B. gladiolii* al igual que *B. cepacia* su mayor capacidad patogénica es en plantas, pero de igual forma son oportunistas y poseen efectos primarios contra la salud humana.

Cabe mencionar que estas bacterias que afectan el cultivo de arroz tanto el follaje como al igual que el grano, la especie *B. gladiolii* conocida comúnmente como añublo bacterial de la panícula, se manifiesta principalmente en la etapa de floración, provocando infertilidad, decoloración y manchado de la gluma en desarrollo debido a la producción de toxoflavina que producen en la planta (Valdez-Nuñez *et al.*, 2020).

Cuando el añublo bacterial está presente en específicamente en la espiga en la parte donde están pegados los granos de arroz estos toman tonalidades verdes y se encojen tornándose luego amarillo oscuro y finalmente café antes de secarse, desde este instante ya se está ocasionando grandes pérdidas dentro del cultivo (Quesada-González, 2014).

Gañán (2011), describe en un estudio que *B. gladiolii* es una bacteria que comparte muchas características fenotípicas con *B. glumae*, tales como la temperatura de crecimiento, el número de flagelos, producción de toxoflavinas y la producción de síntomas similares en las plantas de arroz, de igual forma presentan características similares en los daños producidos por estas bacterias en las plantas de arroz.

Las especie de *B. gladiolii* según los estudios que se han realizado describen que esta bacteria es ampliamente conocida como una de las bacterias que exhiben una notable divergencia de

nichos ecológicos, es decir, que pueden sobrevivir en restos de cosecha de las plantas hospederas incluso dentro de otras especies (Lee *et al.*, 2021).

### **3.3 *Burkholderia plantarii***

Caracterizada como una de las especies de bacterias gram negativa y anteriormente conocida con el nombre de *Pseudomonas plantarii* mencionado por (Moreira, 2014).

Los estudios realizados sobre *B. plantarii* describen que la aparición de esta enfermedad fue descubierta por primera vez en Japón en el año 1985 desde entonces se ha extendido a países como Estados Unidos, China y Corea en las últimas décadas, siendo un importante patógeno en la parte agrícola, se considera como un biocontaminante cada vez más grave en la agricultura. El primer estudio que se realizó para la detención rápida de *B. plantarii* fue elaborado por Takeuchi en 1997, con el objetivo de la detección específica y rápida de la enfermedad mencionado por (Liu *et al.*, 2018).

La enfermedad causada por *B. plantarii* es una de las especies que afecta el cultivo de arroz, presentando síntomas observados a través de un tizón en las plántulas y la pudrición del grano en más de 13 géneros de poaceae, otra desventaja que se da por parte de esta enfermedad es que contaminan el medio ambiente a través de la producción de propolona (Ochi *et al.*, 2017).

### **3.4 Bactericidas de uso comercial**

De acuerdo con la agricultura moderna los problemas fitosanitarios causados por diferentes patógenos en el cultivo de arroz cada día son a un más difícil de controlar sobre todo los problemas de bacterias, cabe mencionar que a través de diferentes investigaciones se han reportado el uso de diferentes bactericidas utilizados en la parte agrícola. En este estudio se probaron cuatros tipos de tratamientos que de hecho algunos son utilizados en la medicina humana como es el caso de Gentamicina, estreptomycin, Oxitetraciclina, ácido oxolínico y el *Bacillus subtilis* es bactericida que se usa en la agricultura para el control de plagas y enfermedades (Martinez, 2016).

El Ácido Oxolínico (Starner<sup>®</sup> 20 WP) es un bactericida con efecto contra enfermedades causadas por bacterias principalmente de Gram negativas y en menor escala contra Gram

positivas, la función que realiza es que actúa en la síntesis de ácido nucleico inhibiendo la producción de ADN de la bacteria (Gañán, 2011).

Según el estudio realizado por Moreira (2017), observó que uno de los bactericidas más utilizados es el Ácido oxolínico (Starner® 20 WP), se caracteriza por tener buenos resultados en la sensibilidad de bacterias como *Burkholderia spp* en dosis comerciales, esto se debe a que el ingrediente activo de este producto es eficaz a diferentes géneros de bacterias gran negativa, en otros países lo han utilizado en campos con excelentes resultados.

Otro de los tratamientos de uso muy importante contra enfermedades bacterianas es un compuesto a base de sulfato de estreptomicina y oxitetraciclina no estéril esta formulación ayuda a controlar y prevenir enfermedades que afectan los cultivos, se ha utilizado mucho para el control de *Burkholderia spp* en arroz obteniendo buenos resultados contra esta enfermedad (Martinez, 2016).

Báez (2012), describió en un reporte que utilizó antimicrobianos para evaluar mecanismo de resistencia sobre bacterias y resaltó que de los productos utilizado Oxitetraciclina mostró mayores incidencias de resistencia *in vitro*.

### **3.5 *Bacillus subtilis***

Lara-Capistrán (2020), en un estudio menciona que *Bacillus subtilis* es muy utilizado como un excelente control biológico posee estructuras capaces de proporcionar efectos en el control biológico de fitopatógenos a través de funciones como, parasitismo, antagonismo, antibiosis y competencia.

### **3.6 Mecanismo de resistencia bacteriana**

Las bacterias, por su capacidad de adaptación desarrollan mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico (como la falta de pared en el *Mycoplasma* en relación con los betalactámicos). La resistencia adquirida es muy importante desde un punto de vista clínico: debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las

mutantes resistentes (rifampicina, macrólidos), pero la resistencia transmisible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (Daza, 1998).

**Las enzimas hidrolíticas:** Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre los microorganismos. Las Beta-lactamasas son enzimas que hidrolizan la unión peptídica endocíclicas del anillo beta-lactámico, es el mecanismo más frecuente de resistencia antibiótica. Existen continuas mutaciones que producen expresión de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), manifestándose como resistencia a cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona). Para combatir esta resistencia se utiliza un inhibidor enzimático que tiene mayor afinidad a la enzima e impide la destrucción de antimicrobiano y de esta manera permite su acción (Moreno *et al.*, 2009).

**La modificación del sitio activo:** Es un aminoácido que genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano. La Modificación de PBP (proteínas de unión a la penicilina), es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular en bacterias, principalmente en Gram positivas. La modificación ribosomal es debido a que los genes *erm A* y *erm B* modifican el sitio activo del ribosoma, mediante metilación (Moreno *et al.*, 2009).

**Las PBP (proteína de unión a la penicilina):** Es el complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular en bacterias, principalmente en las Gram positivas, si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los beta-lactámicos, estos no pueden actuar y se generan resistencia a ellos (Moreno *et al.*, 2009).

**Modificación ribosomal:** Son los genes *erm A* y *erm B* producen modificación del sitio activo del ribosoma, mediante metilación. Este mecanismo es importante en la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* (Moreno *et al.*, 2009).

**Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano:** Son los cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria. Existe disminución de la expresión de porinas (downregulation) lo que disminuye la susceptibilidad a betalactámicos y fluorquinolonas en *Pseudomonas* (Moreno *et al.*, 2009).

**Bombas de flujo:** Transportan al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Los genes involucrados son MefA (*Streptococcus pneumoniae*), NorA (*Staphylococcus aureus*) y Mex (*Pseudomonas aeruginosa*). Estos genes explican la resistencia a macrólidos en estos patógenos y a fluoroquinolonas. Para combatir este tipo de resistencia se encuentran en estudio la asociación de inhibidor de bombas de flujo junto con el antimicrobiano (Moreno *et al.*, 2009).

### 3.7 Antibióticos

**Cefepima (FEP):** Es una cefalosporina de tercera generación con la farmacocinética y el espectro de actividad similar a la Ceftazidima. Tiene un comportamiento comparable a la Ceftazidima frente a las *Pseudomonas aeruginosa* puede ser más activo que la Ceftazidima frente a los *Enterobacter sp*, debido a la estabilidad mejorada frente a beta-lactamasas. La cefepima inhibe la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse a las proteínas de uniones específicas para la penicilina (PBP) que se encuentran dentro de la pared celular bacteriana. La actividad intrínseca de la cefepima, así como la de otras cefalosporinas y penicilinas, contra un organismo particular depende de su capacidad para obtener acceso a las PBPs, es la que conduce en última instancia a la lisis celular. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médicas, 2012).

**Ceftriazona (CAZ):** Es una cefalosporina de tercera generación muy activa tiene un espectro amplio contra las bacterias Gram negativas aerobias en comparación con las Cefalosporinas de primera o segunda generación, considerándose como menos activa contra organismos procedentes de Gram positivos que las cefalosporinas de primera generación. La Ceftazidima es un antibiótico beta-lactámico como las penicilinas, inhibe la tercera y la última etapa de las síntesis de la pared celular bacteriana por su afinidad por las PBPs específicas que se encuentran dentro de la pared celular bacteriana. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médicas, 2014).

**Ampicilina más ácido clavulánico (AMP):** Es un antibiótico semisintético, aunque es más activo que las penicilinas naturales no son estable frente a las beta-lactamasa producidas por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, con acción bactericida que actúa a nivel de la pared

celular de las bacterias. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBP (proteínas de unión a la penicilina) 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. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médicas, 2004).

**Meropenem (MEM):** Es un antibiótico Semi-sintético de la familia de los carbapenems, inhibe la formación de pared celular, facilitando la lisis de bacteria siendo su efecto bactericida. La interferencia del meropenem con la síntesis de la pared celular tiene lugar en la fases tercera y última de la misma, al unirse de forma preferencial a proteínas bacterianas, denominadas proteínas de unión específicas de las penicilinas (PBPs). El meropenem es una sustancia anfótera que atraviesa fácilmente la membrana externa de la célula. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médicas, 2014).

**Imepenem (IMP):** Es derivado de la tienamicina, considerado como un antibiótico beta-lactámico y es el primer miembro de la familia de los antibióticos carbapenem, se metaboliza rápidamente y causa efectos tóxicos en el túbulo proximal. Posee características que lo convierten en un antibiótico muy efectivo, tales como, penetración más eficiente a través de la pared celular bacteriana, resistencia a las enzimas bacterianas y afinidad por todas las proteínas de unión a las penicilinas (PBPs) bacterianas. Inhibe la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana mediante la unión a determinadas proteínas de unión de las penicilinas (PBPs) que se encuentran dentro de la pared celular bacteriana. Las proteínas de unión a las penicilinas son responsables de varios pasos en la síntesis de la pared celular (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médicas, 2012).

**Cefoxitina (FOX):** Es un antibiótico de amplio espectro de la familia de las cefamicinas, deriva de la cefamicinas C, una sustancia producida por *Streptomyces lactamdurans*. Es un agente bactericida que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. La Cefoxitina tiene actividad en presencia de algunas beta-lactamasas, tanto penicilinasas como cefalosporinasas producidas por bacterias Gram negativas y Gram positivas. La resistencia a la Cefoxitina es mediada principalmente a través de la hidrólisis por beta-lactamasas, la alteración de las

proteínas de unión a penicilina (PBP), y la disminución de la permeabilidad de la pared celular. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médicas, 2014).

**Amoxicilina (AMC):** Es una Penicilina semi-sintética similar a la ampicilina, tiene un espectro de actividad antibacteriana superior al de la penicilina, sin embargo, no es estable frente a las beta-lactamasas. Los antibióticos beta-lactámicos como la amoxicilina son bactericidas. 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, produce la lisis de la bacteria y su muerte. (Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médicas, 2015).

**Ácido Etilendiamino Tetra Acético (EDTA):** Es considerado el agente quelante más usado en química analítica. Se denominan quelantes a las sustancias que tienen la propiedad de fijar los iones metálicos de un determinado complejo molecular. Estas sustancias captan los iones metálicos del complejo molecular al cual se encuentran entrelazados, fijándolos por unión coordinada que se denomina quelación. El EDTA y los iones de calcio forman un complejo estable y la reacción entre ambos continúan hasta alcanzar un equilibrio. El EDTA como agente quelante atrapa los iones metálicos de calcio en forma de quelatos (García, 2001).

### **3.8 Detección fenotípica de mecanismo de resistencia con antibiograma**

Existen métodos para detección de mecanismos de resistencias bacterianas, tales como, microdiluciones en caldos, prueba de difusión de discos de Kirby Bauer, prueba de aproximación de doble disco, prueba de asociación con ácido clavulánico y el método E-test (Vespero *et al.*, 2007).

**Antibiograma para bacterias:** Las pruebas de los antibiogramas determinan la susceptibilidad de un organismo a tratamientos antimicrobianos, esta prueba se puede realizar en bacterias y hongos. En algunos microorganismos los resultados obtenidos permiten predecir los resultados que se puedan obtener con otros fármacos similares. Las pruebas también sirven para determinar el efecto de la combinación de distintos antimicrobianos (Hazen, 2018).

El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa Petri previamente inoculada en los microorganismos, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Cuando el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el antibiótico se difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. La concentración de antibiótico de la interface entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocida que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad al antimicrobiano (García *et al.*, 2012).

**Betalactamasa de espectro extendido (BLEE):** Las betalactamasas son enzimas de espectro extendido (BLEE) que tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia o sensibilidad disminuida a penicilinas, oximinocefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no cefeminas (cefexotina) ni carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico. Otras técnicas basadas en el mismo principio son la utilización de discos combinados de cefalosporinas por ácido clavulánico y su variante en las técnicas de microdilución que permite conocer las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las cefalosporinas solas y en presencia de inhibidor. La técnica de difusión en gradiente (Etest) con tiras combinadas de cefalosporinas con y sin inhibidores es también una prueba útil para la detección de BLEE (Calvo *et al.*, 2011).

**Betalactamasa de Amp C:** Las betalactamasas de la clase molecular C de Ambler (grupo uno de la clasificación de Bush- Jacoby-Medeiros) hidrolizan cefalosporinas de primera y segunda generación, incluidas las cefamicinas y en menor medida las de tercera generación, son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación y los carbapenémicos. La presencia de AmpC plasmídica debe sospecharse cuando estos aislados presenten un patrón de resistencias a betalactámicos (fenotipo AmpC) diferente al de sus respectivos fenotipos salvaje o de resistencia natural siendo los marcadores de mayor utilidad la sensibilidad intermedia o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico y algunas de las cefalosporinas de tercera generación (Calvo *et al.*, 2011).

**Carbapenemasas:** Las bacterias Gram negativas resistentes a los carbapenémicos en los últimos años han producido alarma y preocupación por la dispersión de bacilos con producción de betalactamasas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos y que se han asociado a elementos genéticos transferibles. Desde el punto de vista fenotípico, las enzimas carbapenemasas (KPC) hidrolizan de forma eficiente penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, la posible inhibición por los diferentes inhibidores de betalactamasas, la epidemiología local y la identidad de los microorganismos en el que se pretende detectar o inferir la producción de estas enzimas (Calvo *et al.*, 2011).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Ubicación del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Vegetal del departamento de Protección Agrícola y Forestal (DPAF) de la Universidad Nacional Agraria, ubicado en el km 12 <sup>1</sup>/<sub>2</sub> carretera norte en las coordenadas geográficas 12°08'53.24" latitud norte y 83°09'51.24" latitud oeste.

### 4.2 Obtención del material biológico

Los aislados bacterianos de *B. gladiolii* y *B. plantarii* fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología Vegetal, cumpliendo los criterios de selección tales como, formar parte del cepario del laboratorio, previa identificación con pruebas bioquímicas y confirmación con prueba Polymerase chain reaction (PCR), por sus siglas en inglés.

### 4.3 Diseño experimental

El estudio fue descriptivo y cuantitativo, se realizó identificación de mecanismos de resistencia inducido con antibióticos en placas Petri, en el caso de las pruebas de sensibilidad se hizo en un ambiente controlado con diseño completamente al azar (DCA), se colocaron los discos de antibióticos a dosis baja y alta sugerida por el fabricante sobre la superficie de la placa con medio de cultivo. Se utilizaron cinco repeticiones por cada antibiótico y aislado bacteriano.

### 4.4 Identificación fenotípica de mecanismos de resistencias de *B. gladiolii* y *B. plantarii*

La identificación de mecanismo de resistencia se realizó mediante la medición y observación visual del tamaño y forma de los halos de inhibición producida por la sinergia de los discos de antibióticos (Figura 1). Los antibióticos empleados para la prueba fueron Cefepima (FEP), ceftazidima (CAZ), Ampicilina más ácido clavulánico (AMP), Meropenem (MER), Imepenem (IMP) y el inductor EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), según Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR, 2004)

Los betalactámicos de espectro extendido (BLEE) se encuentran presentes cuando se manifiesta achatamiento de halo de inhibición y sinergia en discos de CAZ, Ampicilina más ácido clavulánico (AMP) y Cefepima (FEP) y ausencia si no hay achatamiento ni sinergia en discos de CAZ, AMP y FEP. En el caso de carbapenemasas se asume la presencia cuando hay

achataamiento de halo de inhibición y sinergia en discos de Meropenem (MER), EDTA e Imepenem (IMP) y ausencia cuando no hay achataamiento ni sinergia en discos de MER, EDTA e IMP (CNDR, 2006).

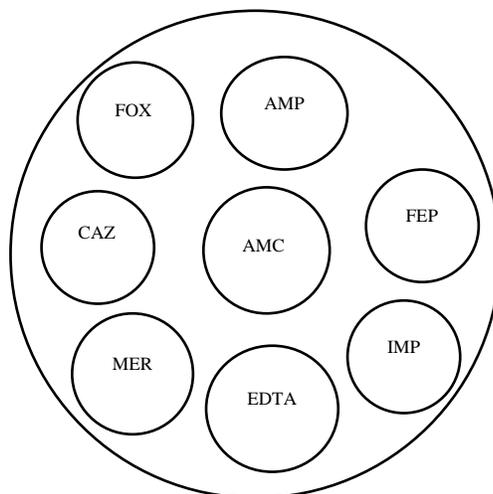


Figura 1. Representación esquemática del orden de los antibióticos utilizados para la identificación fenotípica de mecanismos de resistencia de *B. gladiolii* y *plantarii*.

#### 4.5 Prueba de sensibilidad *in vitro* a bactericidas de uso comercial

Se utilizó el método de difusión en agar que consiste en impregnar discos de papel filtro con las dosis de bactericidas comerciales (Serret-López, *et al.*, 2020). Los bactericidas de uso agrícola fueron: ácido oxolínico, Sulfato de estreptomina más oxitetraciclina, Acido oxolínico más gentamicina y *Bacillus subtilis* a dosis baja y alta recomendada en el producto (Cuadro 1, Figura 2).

Se consideran sensibles los aislados que no crecieron alrededor del disco impregnado con el bactericida produciendo halos de inhibición mayores de 14 mm y resistentes a los aislados bacterianos que presentaron crecimiento bacteriano alrededor del disco impregnados con el bactericida, mostrando halos de inhibición menores de 14 mm (CLSI, 2014).

Cuadro 1. Dosis comerciales de bactericidas sintéticos y biológicos para evaluación de sensibilidad *in vitro* de *Burkholderia gladiolii* y *B. plantarii*

<b>Bactericidas sintéticos</b>	<b>Dosis g/200 l</b>	
	Mínima	Máxima
Sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina	500	600
Ácido oxolínico	1000	1500
Ácido oxolínico + gentamicina	300	500
<b>Bactericida biológico</b>	<b>Dosis l/200 l</b>	
	Mínima	Máxima
<i>Bacillus subtilis</i>	1.5 l	2.0 l

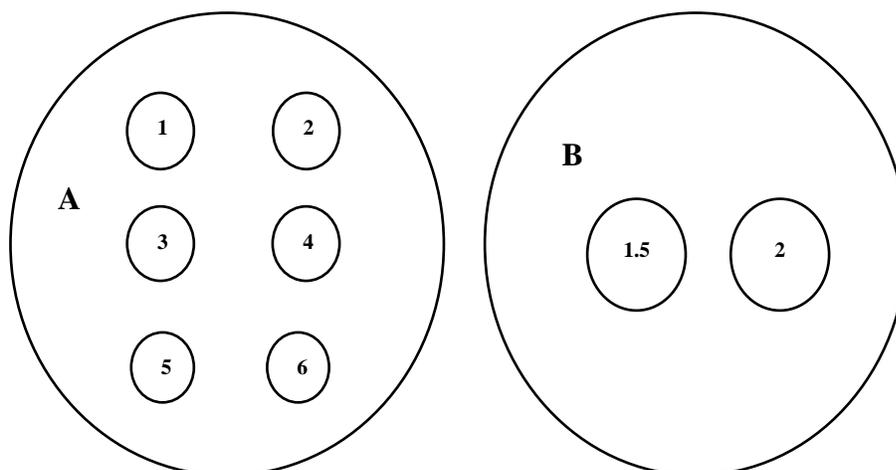


Figura 2. Representación esquemática de la posición de los bactericidas comerciales para prueba de sensibilidad. Bactericidas sintéticos (A), **1** Sulfato de estreptomicina más oxitetraciclina 500g/200L, **2** Sulfato de estreptomicina más oxitetraciclina 600g/200L, **3** Ácido oxolínico 1000g/200 l, **4** Ácido oxolínico 1500g/200 l, **5** Ácido oxolínico + gentamicina 300ml/200 l, **6** Ácido oxolínico + gentamicina 500ml/200 l. Bactericida biológico (*Bacillus subtilis*), **1.5** dosis 1.5 l/200 l **2** Dosis 2 l/200 l.

#### 4.6 Variables evaluadas

Mecanismos de resistencias identificados: se determinó mediante la observación de achatamiento de halos y la sinergia entre discos de antibióticos.

Sensibilidad a bactericidas comerciales: se midió el halo de inhibición producido por los discos de antibióticos, las evaluaciones se realizaron manualmente con una regla milimétrica a las 24 horas.

#### **4.7 Análisis de datos**

Los datos de las variables sensibilidad y mecanismos de resistencia a bactericidas fueron organizados en Microsoft Excel, para determinar el número de aislados que presentaron mecanismos de resistencia se realizó un análisis descriptivo. Para la variable sensibilidad a bactericidas de uso agrícola se realizó análisis de varianza (Andeva) y prueba de separación de medias de Tukey en el Software estadístico InfoStat 2020.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Identificación fenotípica de mecanismos de resistencia de *B. gladiolii* y *plantarii*

Se analizaron 10 aislados de *B. gladiolii* y dos aislados de *B. plantarii*. Se identificaron seis aislados con mecanismo de resistencia AmpC dereprimida, de estos, cuatro fueron de *B. gladiolii* (D2 I, M4, D3 y V5) y dos de *B. plantarii* (T6 y T5 II) un aislado multiresistente con presencia de AmpC (V2) y cinco que no manifestaron mecanismo de resistencia. Por otro lado, en tres aislados de *B. gladiolii* (D2 I, V5 y V2) y dos de *B. plantarii* (T6 y T5 II) se identificó cambios en la permeabilidad de la membrana externa por observarse halos de inhibición pequeños en los discos de Meropenem y halos más grandes en los discos de Imepenem (Anexo 1 y Anexo 2).

La presencia de AmpC fue evidente por la resistencia de la bacteria a Cefoxitina con halos menores a 14 mm, no identificaron carbapenemasas por la ausencia de halos de inhibición menores a 18 mm en los discos de Imepenem y Meropenem, se descarta la posibilidad de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) por la ausencia de halos y sinergia en los discos de ceftazidima, Ampicilina más ácido clavulánico y Cefepime (Figura 3, Anexo 1, Anexo 2). Los cinco aislados que no manifestaron mecanismo de resistencia son considerados como fenotipos salvajes o nativos, por no presentar mecanismo de resistencia.

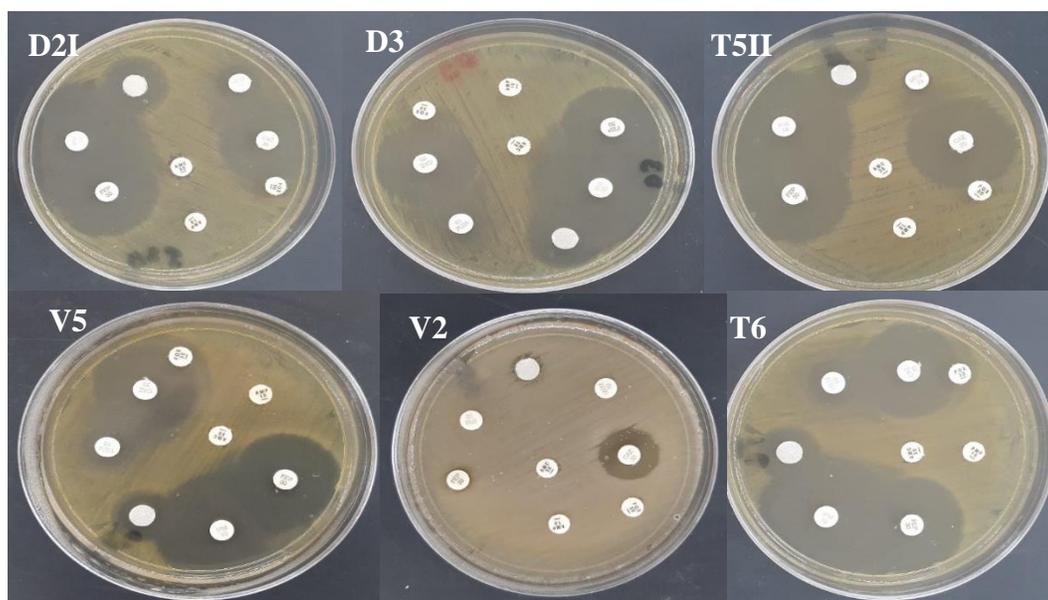


Figura 3. Pruebas fenotípicas para la identificación de mecanismos de resistencia de *B. gladiolii* y *B. plantarii* aisladas de panículas de arroz.

Seral *et al.* (2012) mencionan que en la mayoría de enterobacterias que lo poseen, el gen ampC se encuentran en el cromosoma bacteriano y su expresión es de bajo nivel e inducible como respuesta a la exposición a ciertos  $\beta$ -lactámicos como amoxicilina, ampicilina, cefoxitina, imipenem y ácido clavulánico. El fenómeno de inducción está regulado por un operon amp que requiere la presencia del  $\beta$ -lactámico y al menos cinco genes (ampC, ampR, ampD, ampG, ampE) y está íntimamente relacionado con el reciclaje del peptidoglicano. El mecanismo de inducción de la  $\beta$ -lactamasa AmpC depende del gen ampR, que actúa como activador durante el proceso de inducción y como represor en condiciones normales. Los genes ampC y ampE codifican la síntesis de proteínas de membrana (AmpC y AmpE, respectivamente) y ampD da lugar a una proteína soluble (AmpD) que se libera en el citoplasma. Estudios de la secuencia nucleotídica sugieren que los genes que codifican estas enzimas plasmídicas derivan de genes ampC cromosómicos que poseen algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae y el género *Aeromonas* spp, los que han sido integrados en elementos genéticos transferibles facilitando su difusión a diferentes microorganismos.

Sousa *et al.* (2011), expresan que *Burkholderia cepacia* se caracteriza por su resistencia natural a antibióticos, debido a la capacidad de formar biopelículas y cambiar su envoltura celular para reducir la permeabilidad de la membrana impidiendo así la entrada del antibiótico. Por otra parte Ranjan *et al.* (2014), manifiestan que los mecanismos que le brindan resistencia incluyen la producción de  $\beta$ -lactamasas y otras enzimas, así como la modificación de los puntos objetivo de los antibióticos.

Becka *et al.* (2021), menciona que los miembros del género *Burkholderia* son intrínsecamente resistentes a múltiples fármacos y poseen una carbapenemasa PenA y una  $\beta$ -lactamasa AmpC, lo que hace que el tratamiento de infecciones en humanos debidas a estas especies sea problemático.

Radice *et al.* (2011) manifiestan que la baja permeabilidad de la membrana externa de *B. cepacia* produce  $\beta$ -lactamasas de tipo PEN que hidrolizan cefalosporinas de primera y segunda generación que son específicas de genomoespecies produce PCM-1 (Clase D, tipo OXA), que hidroliza con más eficiencia a Imepenem que a meropenem, por lo que presenta sensibilidad variable a Meropenem.

Segonds *et al.* (2009), demostraron que *B. gladiolii* es susceptible a piperacilina, Imepenem, ciprofloxacina y aminoglucósidos y resistente a ceftazidima, cefepima o aztreonam. Por otra parte, Ruiz *et al.* (2022) manifiestan que *B. gladiolii* es resistente a la gentamicina.

## 5.2 Sensibilidad *in vitro* a bactericidas de uso comercial

En esta prueba se realizaron cinco aislados de *B. gladiolii* con mecanismo de resistencia, dos aislados de *B. gladiolii* sin expresión de mecanismo de resistencia y un aislado de *B. plantarii* (Figura 4). El análisis de varianza demostró diferencia estadística significativa ( $p < 0.0001$ ) entre los aislados que fueron expuestos al ácido oxolínico y la prueba de separación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) indicó que los aislados D4 y M4 fueron sensibles al ácido oxolínico por presentar halos de inhibición mayores a 40 mm, en comparación con los aislados T5, T5II, V5, D2I, V2 y D3 (Figura 5, Anexo 2).

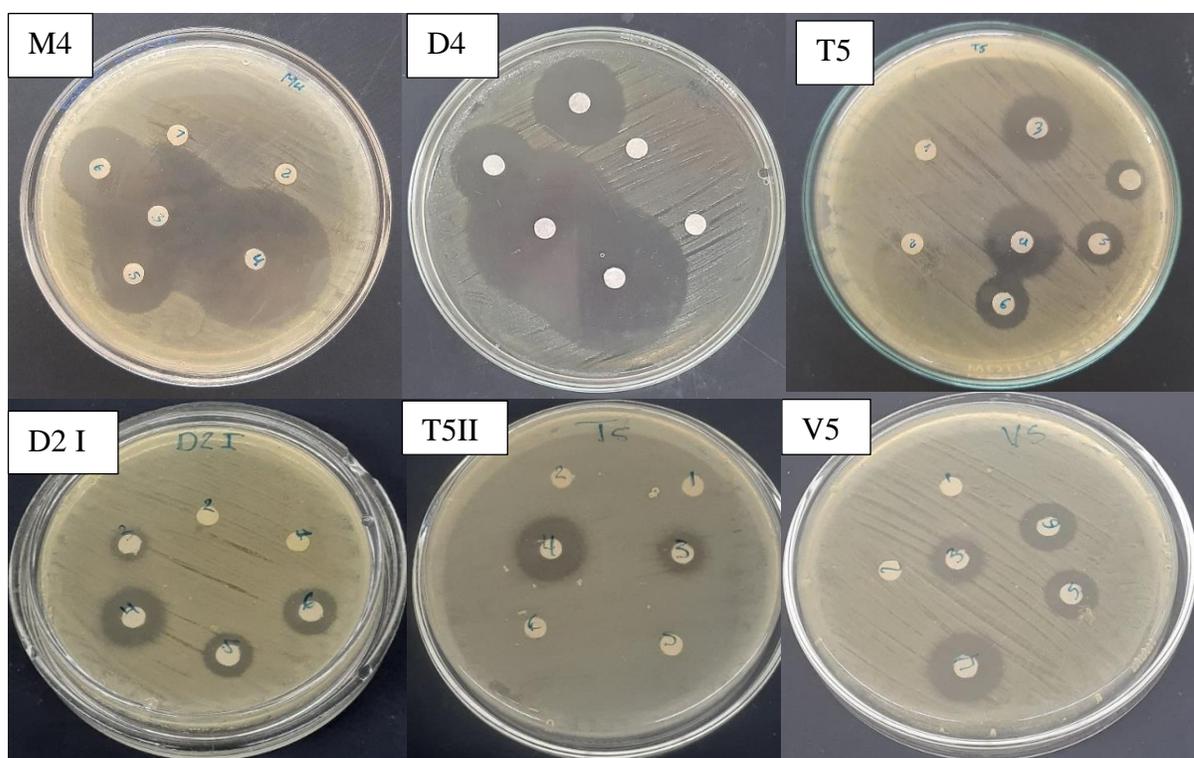


Figura 4. Aislados de *Burkholderia gladiolii* y *B plantarii* en medios de cultivo Mueller-Hinton.

En relación con las dosis de ácido oxolínico el ANDEVA mostro diferencia estadística significativa ( $p = 0.0001$ ) y la prueba de separación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) indica que la dosis comercial de  $1.5 \text{ kg ha}^{-1}$  inhibe el mayor número de aislados en comparación a la dosis comercial  $1.0 \text{ kg ha}^{-1}$  (Figura 6, Anexo 2).

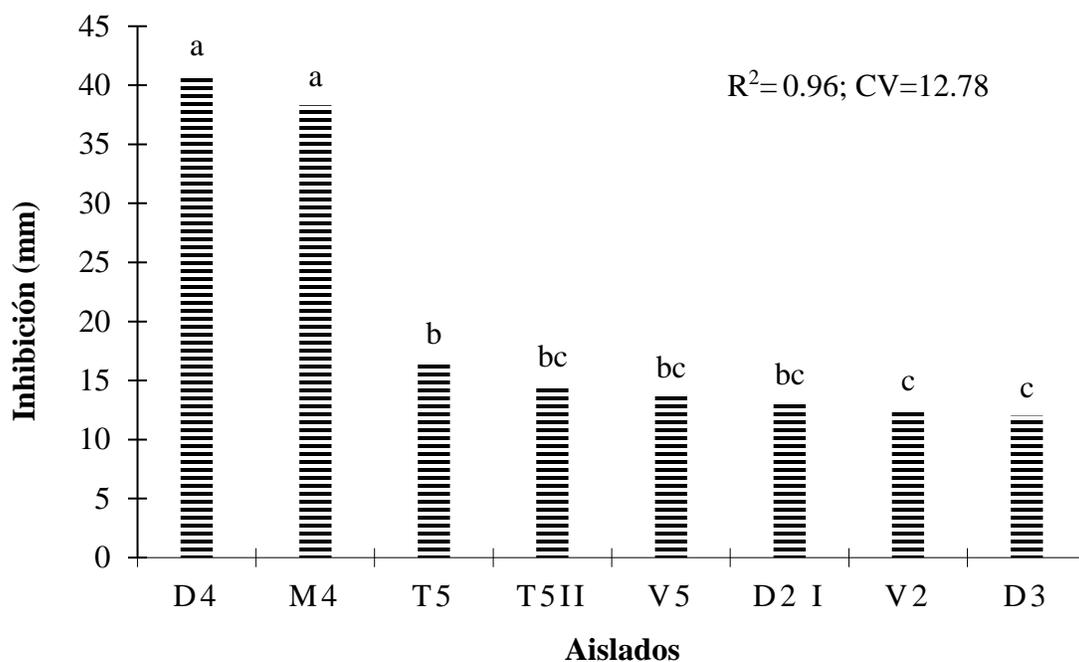


Figura 5. Sensibilidad de aislados de *B. gladiolii* y *B. plantarii* a ácido oxolínico.

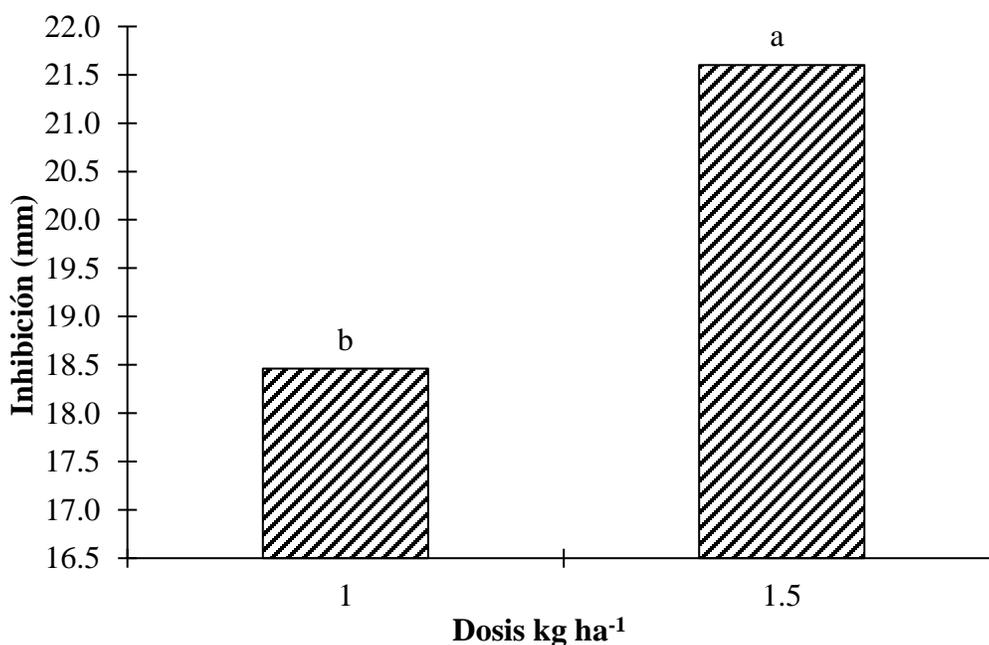


Figura 6. Sensibilidad por dosis de *B. gladiolii* y *B. plantarii* a ácido oxolínico.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre aislados que fueron expuestos a ácido oxolínico más gentamicina y la prueba de separación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) indicó que el aislados M4 fue susceptible al bactericida de uso agrícola, mientras que los aislados V5, T5II, D3, D2I, D4 T5 y V2 no mostraron sensibilidad a dicho producto comercial (Figura 7). El ANDEVA no mostró diferencia estadística significativa ( $p = 0.2970$ ) en las dosis comerciales de  $300 \text{ ml ha}^{-1}$  y  $500 \text{ ml ha}^{-1}$  (Anexo 3). El producto biológico a base de *Bacillus subtilis* y el producto formulado con ingredientes activos sulfato de estreptomicina más oxitetraciclina no ejercieron efecto inhibitorio sobre los aislados de *B. gladiolii* y el aislado de *B. plantarii*.

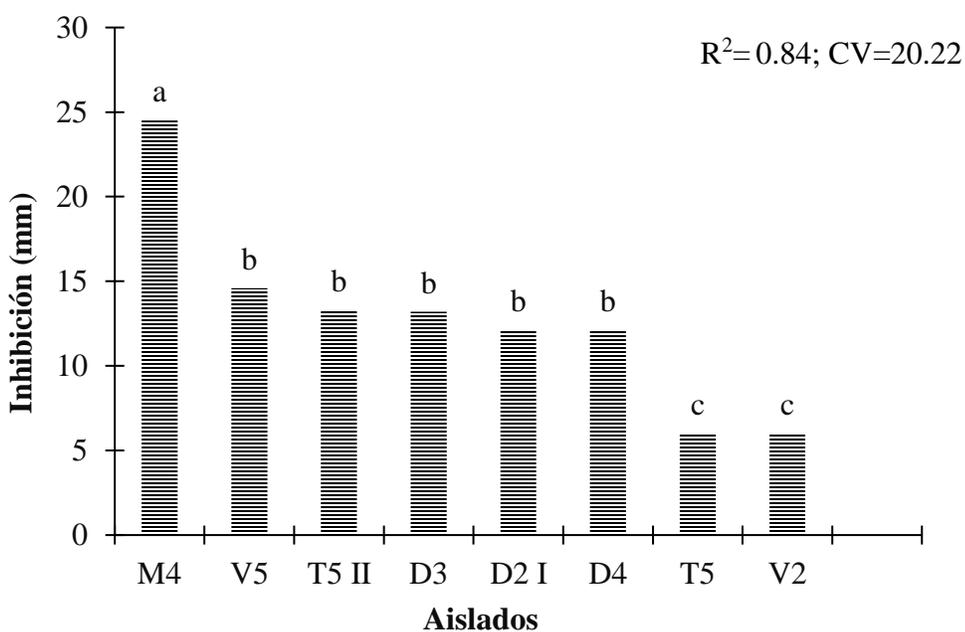


Figura 7. Sensibilidad de aislados de *B. gladiolii* y *B. plantarii* a ácido oxolínico más gentamicina.

Según Gutiérrez (2019), en un estudio realizado utilizó Ácido Oxolínico) y Actybac SC *Streptomyces racemochromogenes* sobre el control de *Burkholderia glumae*, y concluyó que los bactericidas incidieron significativamente sobre control de la enfermedad que se sitúa en la panícula del arroz conocida como añublo bacteriano.

De acuerdo con el estudio realizado por Moreira (2017), quien realizó pruebas de sensibilidad *in vitro* evaluando la eficacia de ácido oxolínico y Estreptomicina más oxitetraciclina resultando

que ambos bactericidas ejercieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *B. glumae* siendo el ácido oxolínico con el mayor porcentaje de inhibición sobre las bacterias.

Valdez-Núñez (2020), manifiesta que al menos siete cepas (46,7%) presentaron resistencia a 10 µg/ml de ácido oxolínico y la sensibilidad a este antibiótico fue variable, en particular para *B. glumae* AMG12-06. Para el caso de aislados de *B. glumae* al aumentar la concentración de ácido oxolínico la mayoría de las cepas se mostraron más o menos sensibles y solo el aislado de *B. gladioli* TUG05-07 puede ser considerada como altamente resistente a este antibiótico.

Serret-López *et al.* (2021), demostraron que los productos ensayados cuprimicin agrícola (200 g/ 100 L), serenade polvo (1 Kg/200 L), bactrol 2X (60 g/100 L), bactriomicin agrícola (400 g/100 L), fungifree biológico (2.5 Kg/200 L), cuprimicin 500 (625 g/100 L), phyton (1.5 mL/1 L), oxiclóruo de cobre (400 g/100 L), kasumin (2L/200 L), final bacter (1.6 Kg/200 L), bacterbest biológico (1L/200 L) y biotermin biológico (3L/200 L) no tuvieron efecto inhibitorio sobre *B. gladioli* (MT672591) aislados de cebolla.

En nuestro país es el primer estudio que se realiza sobre la evaluación de sensibilidad *in vitro* de *B. gladioli* y *B. plantarii* a bactericidas de uso agrícola, destacando a los aislados D4 y M4 perteneciente a *B. gladioli* que fueron sensibles Ácido oxolínico.

## VI. CONCLUSIONES

Se identificaron seis aislados con mecanismo de resistencia AmpC derreprimida, de estos cuatro fueron de *B. gladiolii* y dos de *B. plantarii*, se identificó un aislado multirresistentes con presencia de AmpC y cinco que no manifestaron mecanismo de resistencia.

Los aislados D4 y M4 fueron sensibles al ácido oxolínico en comparación con los aislados T5, T5II, V5, D2I, V2 y D3. El aislado M4 de *B. gladiolii* fue el más susceptible al ácido oxolínico más gentamicina, mientras que los aislados D4, D2I, T5II, y D3 fueron los menos susceptible, a diferencia de los aislados T5 y V2 que no mostraron sensibilidad a dicho producto comercial.

## VII. RECOMENDACIONES

Realizar estudios de mecanismos de resistencia empleando técnicas moleculares con las bacterias *B. gladiolii* y *B. plantarii*.

Emplear en futuros estudios mayor número de productos bactericidas sintéticos y biológicos de uso agrícola en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana contra *B. gladiolii* y *B. plantarii*.

Realizar ensayos en campo e invernadero con los bactericidas Ácido oxolínico y Ácido oxolínico más gentamicina, utilizados en este estudio, para evaluar su comportamiento frente a *B. gladiolii* y *B. plantarii*.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar, B, V., Méndez, C., Treminio, A, E., Loáisiga, V, L. (2017). *Evaluación agronómica de nueve líneas avanzadas de arroz (Oriza sativa L.) y dos testigos comerciales bajo condiciones de riego por inundación, Sébaco, Matagalpa. LA CALERA. 29* 51-56. <https://doi.org/10.5377/calera.v17i29.6524>
- Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuchi, &, Fukazawa, C. (1987). *Pseudomonas plantarii sp. nov. The Causal Agent of Rice Seedling Blight. Systematic Bacteriol.* 37 144-152. <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/37/2/ijsem-37-2-144.pdf?expires=1676669861&id=id&accname=guest&checksum=CE0CC392BD4236127EE81683ACD4E5A4>
- Baez, M., Espinoza, I., Vichi, J., y Martínez, S. (2012). *Estudio de la sensibilidad in vitro frente a diferentes antimicrobianos en cepas de S. suis asociado a Neomunia porcina. Revista Salud Animal. 34(1), 57-62*
- Becka S. A., Zeiser E. T., LiPuma J. J. and Papp-Wallace K. M. (2021). *Activity of Imipenem-Relebactam against Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Burkholderia cepacia Complex and Burkholderia gladioli. American Society for Microbiology. 65(11), 1321-1332.* <https://doi.org/10.1128/AAC.01332-21>
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández Cuenca, F., Mirelis, B., y Navarro, F. (2011). *Detección Fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica, 29 (7), 4-54.* <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Centro colaborador de la administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnologías Médica. ANMAT. (2015). *Amoxicilina. Vademecum.* <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a051.htm>
- Centro colaborador de La Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica ANMAT. (2014). *Cefoxitina, Cefotaxidima y Meropenem. VADEMECUM* <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c045.htm>
- Centro colaborador de La Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica ANMAT. (2012). *Cefepima y Imepenem. VADEMECUM.* <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a019.htm>
- Centro colaborador de La Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica ANMAT. (2004). *Acido Clavulánico + Amoxicilina. VADEMECUM.* <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a019.htm>
- Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (2004). *Manual de procedimiento de Bacteriología Médica.* Litonic. Managua, Nicaragua 273-297
- Clinical and Laboratory Standars Institutes (CLSI), (2014). *Perfomance Standar for*

*Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informacional Supplemen.*  
[https://www.researchgate.net/file/PosFileLoader-.html?\\_=59202-0696b7e4d462166956&assetKey=AS%3A496054988533760%](https://www.researchgate.net/file/PosFileLoader-.html?_=59202-0696b7e4d462166956&assetKey=AS%3A496054988533760%)

Cruz, M, A, K., Machado, M, B, J. (2017). *Automatización en la gestión del proceso de producción de arroz en oro durante las etapas de recepción hasta la entrega del producto terminado, en el Trillo San Juan, del municipio de San Isidro, Matagalpa.* [Ingeniería , Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua].  
<https://repositorio.unan.edu.ni/8208/1/6747.pdf>

Daza, P, R, M. (1998). *Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud.* 22(3),57-67.  
<https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

Fuentealba-Sandoval, V., Finot, V. L., Wilckens, R., & López-Sepúlveda, P. (2014). *Effects of the temperature decrease on the development of the anther wall and pollen grain in (Oryza sativa L).* *Gayana - Botanica*, 199-215. <https://doi.org/10.4667/s0717-66432014000200003>

Galvis, F., Carrillo, M. (2015). *Identificación y caracterización molecular de aislados de burkholderia glumae, agente causante del añublo bacterial en el cultivo de arroz.* *Información Tecnológica*, 26(3), 33-40. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000300006>

Gañán, B, L. (2011). *Manejo integrado del añublo bacterial de la panícula del arroz (Oryza sativa L.) causado por Burkholderia glumae Kurita y Tabei: . Agron*, 19(2), 79–90.  
[https://www.researchgate.net/profile/Lederson\\_Ganan/publication/233992592\\_manejo\\_integrado\\_del\\_anublo\\_bacterial\\_de\\_lapanicula\\_del\\_arroz\\_oryza\\_sativa\\_l\\_causado\\_porburkholderia\\_glumae\\_kurita\\_tabei\\_una\\_revisión/links/09e4150ddcd25a261d000000/manejo-integrado](https://www.researchgate.net/profile/Lederson_Ganan/publication/233992592_manejo_integrado_del_anublo_bacterial_de_lapanicula_del_arroz_oryza_sativa_l_causado_porburkholderia_glumae_kurita_tabei_una_revisión/links/09e4150ddcd25a261d000000/manejo-integrado)

García, D. (2001). *Uso del Ácido Etilendiamino Tetra acético (EDTA) en l terapia Edodóntica. El Odontólogo Invitado.* [https://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado\\_11htm](https://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_11htm)

García, J., Cantón, R., García, E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., y Villa, J. (2012). *Procedimientos en Microbiología. En Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1–54.  
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia8a.pdf>

Giona-cerezo, S., Santos-Preciado, J, I., Marfin-Otero, M, R., Torrez-López, F, J., Alcantar-Curiel, M, D. (2020). *Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzo por contenerla. Gaceta Médica de México.* 156:172-180.  
<https://doi.org/10.24875/GMM.20005624>

- González, B. M., y Alonso, A. M. (2016). *Tecnologías para ahorrar agua en el cultivo de arroz*. *Nova*, 14(26), 111. <https://doi.org/10.22490/24629448.1757>
- Gutiérrez, L. D. F., Espinosa, A. D. (2019). *Evaluación de los bactericidas de oxilobac (Ácido oxolinico) y actybac sc (streptomyces racemochromogenes) para el control de la bacteria Burkholderia glumane como uno de los causantes del añublo bacteriano de la panícula del arroz (Oryza sativa) en el municipio de Campoalegre, departamento Huila*. [Universidad Nacional abierta y a distancia – UNAD]. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/25407/dfgutierrezl.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hazen, K. (2018). *Pruebas de Sensibilidad o antibiogramas*. Manual MSD. University Health System. <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
- Lara-Capistrán, L., Zuleta-Rodríguez, R., Murillo-Amador, B., Romero-Bastidas, M., Rivas-García, T., & Hernández-Montiel, L. G., (2020). *Repuesta agronómica dl chile dulce (Capsicum annuum L.) a la aplicación de Bacillus subtilis y lombricompostos en invernadero*. *Tierra Latinoamericana*, 38(3), 693-704. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3737>
- Lee, H. H., Park, J. W., Jung, H. J., & Seo, Y. S. (2021). *Pan-genome analysis reveals host-specific funtional divengences in Burkholderia gladiolii*. *Micororganismos* 9(6), 1-22. <https://doi.org/10.3390/microorganismos9061123>
- Liu, X., Fan., Matsumoto, H., Nie, Y., Sha, Z., Yi, K., Pan, J., Qian, Y., Cao, M., Wang, Y., Zhu, G., & Wang, M. (2018) *Biotoxin tropolone contamination associated with nationwide occurrence of pathogen Burkholderia plantarii in agricultural environments in China*. *Environmental Science and Technology*, 52(9), 5105—5114. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05915>
- Lombeida La Rosa, A. L., y Cepeda Landin, E. W. (2016). *Diseño de una metodología de evaluación preliminar para el manejo del Añublo Bacterial de la panícula del arroz en el Ecuador*. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/51706>
- Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., Ezaki, T., Vandamme, P., Tsushima, S., & Hikichi, Y. (2006). *Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of Burkholderia plantarii, Burkholderia glumae and Burkholderia gladioli using gyrB and rpoD sequences*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), 1031–1038. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64184-0>
- Martínez, G, N. (2016). *Control de Burkholderia glumae en el cultivo de arroz (Oryza sativa L.) utilizando 02 productos de accion bacterida, en la E.E.A El Porvenir-San Marti*. [https://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/2172/TP\\_AGRO\\_00656\\_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/2172/TP_AGRO_00656_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Mirambrell, V, A. (2015). *Aspecto microbiológico de Burkholderia cepacia complex en pacientes con fibrosis quísticas*. [https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2015/hdl\\_10803\\_329293/amv1de1.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2015/hdl_10803_329293/amv1de1.pdf)
- Moreira, C, R, I. (2017). *Evaluación in vitro de la eficacia de bactericidas sobre la inhibición del crecimiento de Burkholderia glumae*. [Universidad Nacional Agraria Facultad de Desarrollo Rural]. <https://repositorio.una.edu.ni/3622/1/tne10s687.pdf>
- Moreira C, D. (2014). *Deteccao de Burkholderia spp. Asociadas a semente de arroz nacionais e importadas*. [In *Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul Faculdade De Agronomia*]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025> <http://dx.doi.org/10.1038/nature10402> <http://dx.doi.org/10.1038/nature21059> <http://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127> <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Moreno M, C., González E, R., Beltrán, C. (2009). *Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios*. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía De Cabeza y Cuello*. 69. 185-192. <https://www.scielo.cl/pdf/orl/v69n2/art14.pdf>
- Ochi, A., Konishi, H., Ando, S., Sato, K., Yokoyama, K., Tsushima, S., Yoshida, S., Yoshida., Morikawa, T., Kaneko, T., & Takahashi, H. (2017). *Management of bacterial seedling blight diseases in nurseries by irradiating rice seeds with atmospheric plasma*. *Plant pathology*, 66, 67-76. <https://doi.org/10.1111/ppa.12555>
- Paredes, C, M., Becerra, V, V., Geps, P., & Donoso Ñ, G. (2022). *Capitulo 1. Origen del arroz* (p. 55). <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/68050/Capitulo%201.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Pedraza-Herrera, L, A., Bautista, J, P., Cruz-Ramírez, C, A., Uribe-Vélez, D. (2020). *BUN2755 Bacillus strain controls seedling root and bacterial panicle blight caused by Burkholderia glumae*. *Biological Control Elsevier*. 1-32. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104494>
- Peña, G, N, J. (2017). *Aislamiento y determinación de Burkholderia spp., agente causal del añublo bacteriano del arroz en el bajo Piura-Perú*. [Universidad Nacional De Piura Facultad de Ciencias Escuela Profesional de Ciencias Biológica]. <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/UNP/1557/Bio-PE%c3%91-GIR-2017.pdf?Sequence=1&isAllowed=y>
- Quesada-González, A., García-Santamaría, F. (2014). *Burkholderia glumae en el cultivo de arroz en Costa Rica*. *Agronomía Mesoamericana*, (2), 371-381 <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15452>
- Radice, M., Marín, M., Giovanakis, M., Vay, C., Almuzara, M., Limansky, A., Casellas, J, M., Famiglietti, A., Quinteros, M., Bantar, C., Galas, M., Pupko, J, K., Nicola, F., Pasterán,

- F., Soloaga, R., Gutkind, G. (2011). *Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. Revista Argentina de Microbiología. 43 136-153. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v43n2/v43n2a12.pdf>*
- Ranjan, N., Chaudhary, U., Chaudhry D., Ranjan K, P. (2014). *Ventilator-associated pneumonia in a tertiary care intensive care unit: Analysis of incidence, risk factors and mortality*. *Indian Journal of Critical Care Medicine. 18 1-5. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.130570>*
- Ruiz, H, E., Caro, V, M, R., Ortega H, N. (2022). *Resistencia Fenotípica y Genotípica en Los Patotipos Aiec, Stec y Eaec De E. Coli. AN. VET. (MURCIA). 36 0213-5434. <https://doi.org/10.6018/analesvet.540611>*
- Serret-López, M., Aranda-Ocampo, S., Espinosa-Victoria, D., Ortiz-Martínez, L. E., & Ramírez-Razo, K. (2021). *Polyphasic characterization of Burkholderia gladioli isolated from onion and evaluation of its potential pathogenicity for other crops. Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology, 39, 20. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2007-2>*
- Seral, C., Gude, M, J., Castillo, F, J. (2012). *Emergencia de  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. Revista española de quimioterapia. 25(2):89-99. [https://seq.es/wp-content/uploads/2012/06/seq.es\\_seq\\_0214-3429\\_25\\_2\\_seral.pdf](https://seq.es/wp-content/uploads/2012/06/seq.es_seq_0214-3429_25_2_seral.pdf)*
- Segonds, C., Clavel-Batut, P., Thouverez, M., Grenet, D., Coustumier, A, L., & Plesiat, Chabanon, G. (2009). *Microbiological and Epidemiological Features of Clinical Respiratory Isolates of Burkholderia gladioli. Journal of Clinical Microbiology, 47 1510–1516. <https://doi.org/10.1128/JCM.02489-08>*
- Sousa, S, A., Ramos, C, G., & Leitao, J, H. (2011). *Burkholderia cepacia Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. International Journal of Microbiology. 2011 9. doi:10.1155/2011/607575*
- Ube, T, S, E. (2012). *Importancia del magnesio como macroelemento para el desarrollo y rendimiento del cultivo de arroz (Oryza sativa L.)". <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/E-UTB-FACIAG-ING%20AGRON-000207.pdf?sequence=&isAllowed=y>*
- Valdes-Nuñez, R. A., Rios-Ruiz, W. F., Ormeño-Orillo, E., Torres-Chavez, E. E., & Torrez-Delgado, J. (2020). *Genetic characterization of rice endophytic bacteria (Oryza sativa*

*L.) with antimicrobial activity against Burkholderia glumae. Revista Argentina de Microbiologia, 52(4), 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.12.002>*

Vespero, E. C., Perugini, M, R, E. y Sariddakis, H, O. (2007). *Screening and confirmatory assays for detection of ESBLs (extended spectrum  $\beta$ -lactamases) production by klebsiella pneumoniae isolates. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina. 28 (1), 33-18. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ20220607819>*

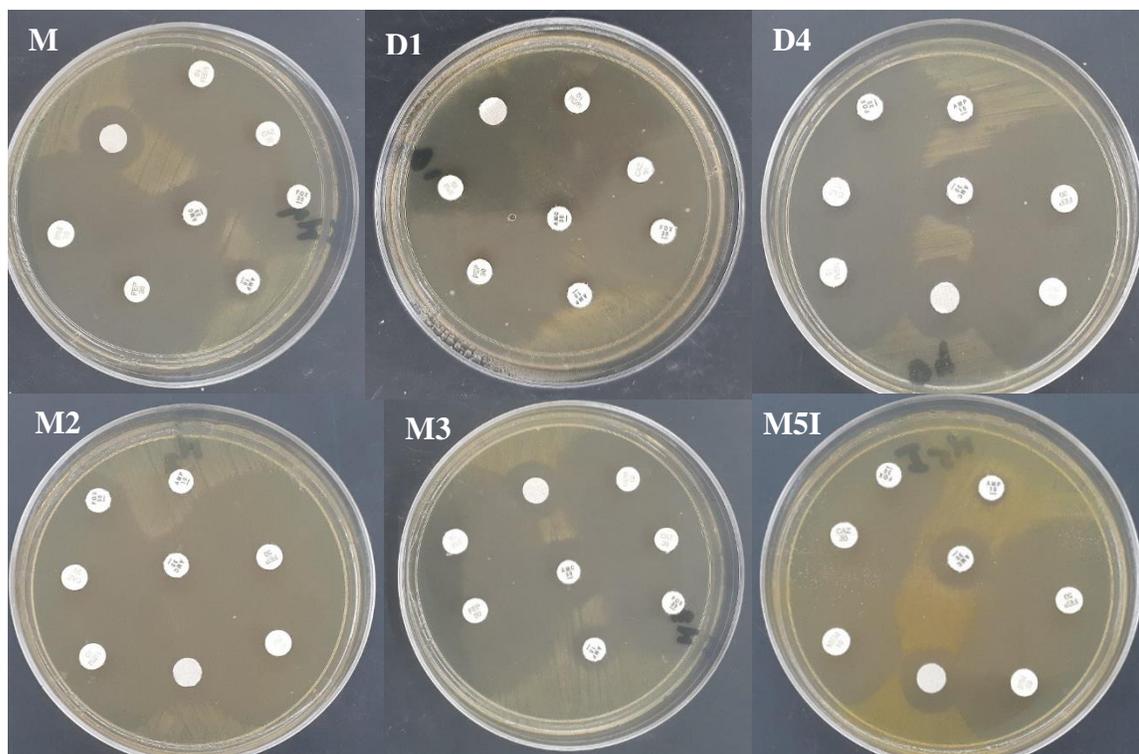
## IX. ANEXOS

Anexo 1. Identificación fenotípica de mecanismos de resistencia de *B. gladiolii* y *B. plantarii* mediante método de difusión Bauer-Kirby.

Código	Medición de halos de inhibición (mm)							
	CAZ	FOX	AMC	AMP	IMP	MER	EDTA	FEP
D4	44	36	17	10	42	38	17	40
D2 I	32	10	8	6	40	10	21	32
T6	32	10	6	6	38	18	28	32
M2	50	12	22	6	42	42	12	46
T5 II	31	6	6	6	40	10	16	32
V5	30	6	6	6	40	12	20	32
V2	19	6	6	6	6	6	10	10
D3	30	6	6	6	40	40	22	30
M4	44	32	20	12	42	42	17	44
D1	34	34	13	6	38	38	20	44
M5 I	40	30	16	10	32	32	16	42
M3	50	32	20	12	36	36	16	52

CAZ: Ceftazidima, FOX: Cefoxitina, AMC: Amoxicilina más ácido clavulánico, AMP: Ampicilina, IMP: Imepenem, MER: Meropenem, EDTA: Acido Etilendiamico Tetra Acético, FEP: Cefepima

Anexo 2. Pruebas fenotípicas para la identificación de mecanismos de resistencia de *B. gladiolii* y *B. plantarii*



Anexo 3. Análisis de varianza del ácido oxolínico frente a aislados de *B. gladiolii* y *B. plantarii*

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Ac. Oxolínico	80	0.96	0.95	12.78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10305.70	8	1288.21	193.09	<0.0001
Aislado	10188.09	7	1455.44	218.15	<0.0001
Dosis	117.61	1	117.61	17.63	0.0001
Error	473.69	71	6.67		
Total	10779.39	79			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.60760

Error: 6.6717 gl: 71

Aislado	Medias	n	E.E.	
D4	40.90	10	0.82	A
M4	38.30	10	0.8	A
T5	16.50	10	0.82	B
T5II	14.60	10	0.82	B C
V5	13.70	10	0.82	B C
D2 I	13.10	10	0.82	B C
V2	12.60	10	0.82	C
D3	12.00	10	0.82	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.15163

Error: 6.6717 gl: 71

Dosis	Medias	n	E.E.	
1.50	21.43	40	0.41	A
1.00	19.00	40	0.41	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Anexo 4. Análisis de la varianza del ácido oxolínico más gentamicina frente a aislados de *B. gladiolii* y *B. plantarii*

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Ac. Oxolínico + Gentamicin	80	0.84	0.82	20.07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2346.75	8	293.34	44.96	<0.0001
Aislado	2339.55	7	334.22	51.23	<0.0001
Dosis	7.201	7.20	1.10	0.2970	
Error	463.20	71	6.52		
Total	2809.95	79			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.56744

Error: 6.5239 gl: 71

<u>Aislado</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
M4	24.50	10	0.81	A
V5	14.60	10	0.81	B
T5II	13.30	10	0.81	B
D3	13.20	10	0.81	B
D2 I	12.10	10	0.81	B
D4	12.10	10	0.81	B
T5	6.00	10	0.81	C
V2	6.00	10	0.81	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*