

## Empleo de una cepa de *Burkholderia cepacia* en el control de la mancha azul en la madera de pino caribe (*Pinus caribaea*)

Ingrist Alemán B., José Antonio Sánchez C., Marco Sealey, Julio Otoniel Rojas y Guillermo López Corcuera\*

Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

Recibido: 16-04-01 Aceptado: 31-10-02

### Resumen

La madera del Pino Caribe (*Pinus caribaea*) está sometida a una serie de ataques microbiológicos, algunos de los cuales causan la pudrición y otros ocasionan cambios de coloración en el tejido de la madera; entre estos uno de los más importantes es la mancha azul o mancha de savia causada por algunas especies de hongos. La utilización de productos químicos para el control de la mancha azul resulta efectiva pero muy tóxica y costosa por lo que se ha profundizado en la búsqueda de métodos biológicos para su control. Se obtuvo una cepa de *Burkholderia cepacia* aislada de muestras de madera tomadas en el aserradero Coforven (Edo. Monagas), que produce un principio activo contra *Lasiodiplodia theobromae*, un hongo aislado de madera de pino manchada de azul. Se determinó que el compuesto activo tiene naturaleza proteica, pierde actividad al exponerse a temperaturas iguales o mayores de 50°C pero la mantiene al conservarse a -20°C.

**Palabras clave:** *Burkholderia cepacia*; mancha azul del pino.

## Use of a strain of *Burkholderia cepacia* for the control of the blue stain in the caribbean pine wood (*Pinus caribaea*)

### Abstract

The wood of the Caribbean Pine (*Pinus caribaea*) endures various microbiological attacks, some causing rotteness and others causing tissue colour changes, being the blue stain or sap stain provoked by certain fungi, one of the most important. Chemical products employed in the control of the blue stain are effective but very toxic and expensive as well. This has encouraged the research for biological control methods. We have isolated a strain of *Burkholderia cepacia* from wood samples obtained in the Coforven sawmill (Monagas State) which produces a principle active against *Lasiodiplodia theobromae* a fungus isolated from blue stained-pine wood. This active compound shows proteinaceous properties, losing its activity when exposed at 50°C or higher, but maintain it if stored at -20°C.

**Key words:** *Burkholderia cepacia*; blue stain of pine.

\* Autor para la correspondencia. Fax: 0274-2401286. E-mail: corcuera@ula.ve

## Introducción

La madera por ser un material de origen orgánico, está expuesta a una serie de ataques causados por sistemas biológicos como bacterias, hongos, insectos, perforadores marinos e incluso animales superiores, o por causas no biológicas como el fuego, desgaste mecánico y la acción de la intemperie (1).

Entre los hongos se encuentran algunos que producen cambios de coloración de los tejidos de la madera y son descritos como hongos manchadores, mientras que los que crecen en la superficie de la madera son llamados mohos. La mayoría de los hongos manchadores y los mohos pertenecen al Phylum Ascomycota y hongos Mitospóricos, muy pocos mohos son del Phylum Zigomycota y son clasificados entre los Mucorales (1).

Las manchas causadas por hongos pueden tener coloraciones negra, azul, roja, castaña, amarilla, marrón y gris pero la más importante en la madera de Pino es la llamada mancha azul o de savia, caracterizada por la tonalidad azul oscuro de la madera atacada (2).

En la actualidad la lista de hongos que causan la mancha azul es muy amplia, los géneros reportados más importantes son: *Diplodia*, *Graphium*, *Hormodendron*, *Hormonema*, *Leptographium*, *Sclerophoma*, *Trichoderma* y *Ceratocystis* (1). En Venezuela las principales especies causantes del manchado azul en la madera de Pino Caribe son *Lasioldiplodia theobromae* y *Trichoderma* sp. (3).

Estos hongos causan la degradación de la albura, consumen los componentes no estructurales de la madera: almidón, lípidos y azúcares solubles. Posteriormente hay una disrupción general del sistema parenquimático en la madera y finalmente, ocurre una degradación parcial de la pared celular, debilitamiento en las fibras enlazantes y cambios adversos en dureza (4).

El azulado, que es la alteración de color pardo azul que adquiere la albura de la madera de coníferas tanto en rolas como en ma-

dera aserrada; se inicia con unas manchas radiales de color oscuro que aparecen en la superficie de la madera atacada. Posteriormente se colorea lentamente toda la sección transversal de la albura a medida que el micelio del hongo invasor penetra hacia el interior de la madera. Las hifas del micelio se desarrollan principalmente en las células de los radios leñosos. Su desarrollo en las traqueidas es mucho menos marcado, puede ocurrir una penetración pasiva en la cual el micelio pasa a través de las punteaduras aureolares y una penetración activa mediante la formación de microhifas (4).

En la industria maderera se utilizan fungicidas para preservar la madera de aquellos hongos que causan manchas o de los que causan pudrición. Existen diferentes tipos de preservadores para impedir el desarrollo de los hongos, todos son sustancias químicas que suelen ser muy tóxicas a los humanos, además de darles características negativas a la madera como olor y colores desagradables. En aserraderos nacionales, para controlar la mancha azul en madera aserrada de Pino Caribe, se emplea Pentaclorofenato de Sodio que reportan como efectivo pero tóxico y muy caro. En algunos países lo consideran cancerígeno, por lo que ha sido sustituido por el Busan 1009 (Metileno-bistiocianato + Tiocianometil benzotiazol). Este agente presenta menor toxicidad que el anterior (5) pero el desarrollo de la mancha azul en la superficie de la madera ocurre unos días después del tratamiento.

Como una alternativa al empleo de los productos químicos ya mencionados, cada día se considera más factible el control biológico. Basados en la existencia de microorganismos capaces de afectar el crecimiento de hongos, ya sea por inhibición o muerte del mismo, nos propusimos en este trabajo la búsqueda de cepas microbianas productoras de metabolitos capaces de impedir el desarrollo de hongos manchadores sobre la madera de Pino Caribe. Hasta donde conocemos esta sería la primera vez que se trata de controlar biológicamente el manchado azul.

## Materiales y Métodos

### Muestras de madera

Se utilizó madera de Pino Caribe (*Pinus caribaea var hondurensis*) sana y manchada de azul, proveniente del aserradero COFORVEN en el estado Monagas. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente aisladas unas de otras, hasta su posterior uso.

### Aislamiento de microorganismos de la madera de Pino Caribe

#### Hongos de crecimiento externo

Sobre las manchas azules presentes en madera contaminada se realizó un raspado con un bisturí estéril, el raspado se agregó en la superficie de cápsulas de Petri de 100 x 15 mm con agar papa-dextrosa (Hi Media). Estas cajas se incubaron en ausencia de luz en una estufa a 30°C durante 5 días hasta observar el crecimiento de hongos.

#### Hongos de crecimiento interno

Se empleó la metodología reportada por Cedeño y col. (6). Para ello pequeños trozos de madera manchada de azul se sumergieron durante 5 min en una solución de hipoclorito de sodio al 0,525%; posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se colocaron directamente sobre la superficie de cajas de Petri con agar papa-dextrosa. Se incubaron en ausencia de luz en una estufa a 30°C durante 5-7 días hasta observar crecimiento de hongos.

### Aislamiento de otros microorganismos

Directamente en el aserradero y de diferentes ambientes, trozos de madera de aproximadamente 3 x 3 x 2 cm y aparentemente libres de mancha azul, se introdujeron en frascos de 100 mL de capacidad que contenían una infusión de papa-dextrosa solidificada con gelatina comercial. Estas muestras se incubaron en la oscuridad en una estufa a 30°C durante 5 días hasta observar crecimiento de microorganismos. Luego se hicieron repiques en medio agar

papa-dextrosa y agar nutritivo y se incubaron en igual condición. Se lograron aislar colonias de hongos y bacterias que se sembraron en cuñas y tacos de los mismos medios conservándose a 4°C hasta su utilización.

### Ensayo de actividad antifúngica contra el hongo causante del manchado azul

Los microorganismos a ensayar aislados de las muestras de madera provenientes del aserradero, dependiendo de si eran hongos o bacterias, fueron sembrados en fiolas de 125 mL con 50 mL de caldo papa-dextrosa o caldo nutritivo respectivamente, e incubados en la oscuridad en una estufa a 30°C con agitación durante 24 h, los cultivos se centrifugaron a 5000 g durante 15 min y luego se filtraron a través de filtros con poros de 0,45 µm de diámetro. Los hongos causantes del manchado azul aislados de madera manchada se sembraron en cápsulas de Petri con agar papa-dextrosa, en el centro de las cuales se colocó posteriormente un disco de papel de filtro de 2 cm de diámetro, impregnado con sobrenadante de los cultivos obtenidos a partir de la madera no manchada. Las cápsulas de Petri se incubaron en la oscuridad en una estufa a 30°C durante 48 h, y se determinó la existencia de halos de inhibición alrededor del papel de filtro.

### Identificación de las bacterias con actividad antifúngica

Para identificar las bacterias presentes en los cultivos, que presentaron actividad antifúngica se realizaron observaciones morfológicas de los cultivos al fresco con microscopio óptico, y también en preparados para microscopía electrónica de transmisión. Además se realizaron las siguientes pruebas: coloraciones con la tinción de Gram, determinación de esporas, motilidad y las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, reducción de nitrato, crecimiento en presencia de NaCl al 6,5%, fermentación de gluconato, xilosa, arabinosa, glucosa, lactosa, uso del citrato, presencia de ureasa y producción de pigmentos (7). Fi-

nalmente en la identificación definitiva se empleó un sistema automatizado con microplacas GN2 MicroPlate de Biolog, INC. Hayward CA. USA, en el que se prueba la habilidad de los microorganismos Gram negativos para oxidar 95 fuentes de carbono. Este conjunto de ensayos permitió identificar la bacteria que tenía actividad antifúngica como *Burkholderia cepacia*.

Se preparó una suspensión bacteriana de cada aislado para su estudio bajo microscopía electrónica de transmisión (TEM), se resuspendieron en buffer fosfato pH 7,0 y se colocaron sobre rejillas cubiertas con Formvar y protegidas contra la oxidación. Luego de decantadas sobre las rejillas, se resuspendieron in situ en una solución de ácido fosfotúngstico al 1% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, sometiendo luego a una deshidratación por vacío progresivo. Luego las muestras se recubrieron con oro mediante un ionizador al vacío y se montaron en bases de aluminio adheridas con una suspensión de plata micelar.

### **Pruebas realizadas para caracterizar el principio activo con actividad antifúngica**

#### **1) Efecto de la temperatura**

Se cultivó *B.cepacia* y se incubaron 100  $\mu$ L de sobrenadante filtrado, a temperaturas de 35, 40, 50, 60, 70, 80 y 95°C durante 30 min. Como control se emplearon 100  $\mu$ L de sobrenadante sin calentar.

#### **2) Efecto del congelamiento**

Muestras de 100  $\mu$ L de sobrenadante filtrado de *B.cepacia* se congelaron a -20°C durante 30 días y se realizaron las pruebas de actividad como ya fue indicado. Los resultados se compararon con sobrenadante obtenido de cultivos frescos y mantenido a 4°C.

#### **3) Efecto de proteasas**

En esta prueba se utilizó una proteasa comercial de *Staphylococcus aureus* y tam-

bién tripsina. Se usó 100  $\mu$ L de sobrenadante filtrado, y en el caso de la proteasa de *S aureus* se añadieron 10  $\mu$ L de la preparación, y para la tripsina apenas trazas. El primero de ellos se incubó a 37°C y el segundo a temperatura ambiente durante 1 h. La actividad se probó como ya fue indicado. Como control se usó sobrenadante sin tratar y también se realizó un ensayo en el que el hongo azul se trató directamente con las proteasas.

#### **4) Efecto del sobrenadante de *B. cepacia* sobre el micelio del hongo de la mancha azul**

En una fiola con 100 mL de sobrenadante filtrado se colocó un trozo de micelio aéreo del hongo causante de la mancha azul proveniente de un cultivo de 48 h en agar papa-dextrosa. Se incubó a 30°C durante 24 h. Al cabo de ese tiempo se recuperó el micelio por centrifugación a 9000 g durante 10 min, se lavó dos veces con agua destilada estéril centrifugando cada vez a 9000 g durante 10 min. Este micelio se sembró en cápsulas de Petri con agar papa-dextrosa y se incubó a 30°C durante 48 h. Como control se usó micelio tratado de igual manera pero con agua esteril en lugar de sobrenadante.

#### **Prueba de actividad antifúngica sobre diversos hongos**

Este ensayo se realizó como ya fue indicado anteriormente pero en esta ocasión los microorganismos de prueba fueron:

*Aspergillus niger*

*Aspergillus orizae* ATCC 11601

*Candida utilis* ATCC 9226

*Curvularia* sp.

*Dedalea sprucei*

*Geotrichum candidum* 13 Lactolabo

*Kluyveromyces fragilis* ATCC 8554

*Saccharomyces cerevisiae*

*Trichoderma harzianum*

*Trichoderma viride* ATCC 9414

## Resultados y Discusión

### Aislamiento de microorganismos de la madera de Pino Caribe

Se raspó la superficie de la madera de pino para obtener los hongos con crecimiento externo se obtuvo un solo hongo en cultivo. Este hongo de crecimiento rápido y abundante en cajas de agar papa-dextrosa fue identificado como *Rhizopus* sp. El cual fue descartado ya que al parecer no es el causante de la mancha azul.

En el caso de las muestras de madera, tratadas para aislar hongos de crecimiento interno, se aisló un hongo negro con abundante micelio aéreo de aspecto algodonoso, septado y formador de clamidosporas. Por este mismo método (6) otros autores obtuvieron un hongo con características similares que identificaron como *Lasiodiplodia theobromae* agente causal de la mancha azul en la madera de pino. Este hongo cuando era cultivado en cajas de Petri con agar papa-dextrosa, producía al comienzo colonias blancas que luego eran grises terminando en gris oscuro. Al observar muestras de estas colonias con el microscopio óptico, se observó la presencia de picnidios y dentro de ellos los conidios que en un comienzo eran hialinos y posteriormente adquirieron coloración marrón y con un septo en la parte central. Este conjunto de características nos permite suponer, que el hongo aislado por nosotros a partir de la madera manchada de azul es *L. theobromae*.

En el medio con gelatina papa-dextrosa sembrado directamente en el aserradero a partir de las muestras de madera, salvo en dos casos siempre crecieron hongos en la superficie del medio. Se tomó nota del aspecto superficial y la morfología de las colonias, y se aislaron un total de 17 cepas de las cuales 5 eran levaduras, 4 hongos y 6 bacterias con morfología de bacilos y coco bacilos. En los dos casos en que sólo se aislaron bacterias, la madera se encontraba en un suelo fangoso y no estaba tratada con preservativo

alguno. Además como algo particular el medio pasó al estado líquido como si la gelatina hubiera sido hidrolizada.

### Búsqueda de microorganismos con actividad antifúngica sobre *Lasiodiplodia theobromae*

De todos los microorganismos (bacterias y hongos) aislados, los únicos que mostraron actividad antifúngica produciendo un halo inhibitorio de casi 3 cm de diámetro sobre el crecimiento del hongo aislado por nosotros, fueron los que en un principio denominamos cepas 5 y 14 constituidas por bacilos y que casualmente provenían de aquellos medios en los que no hubo crecimiento de hongos. Estas cepas fueron las únicas que se conservaron para los ensayos posteriores.

### Identificación taxonómica de las cepas 5 y 14

En las pruebas realizadas ambas cepas dieron los mismos resultados, por lo que suponemos que la cepa 5 y 14 podrían corresponder a un mismo microorganismo. A partir de ese momento decidimos emplear sólo una de ellas quedándonos con la cepa 14. Los resultados se presentan en la Tabla I. Al observar la bacteria por la técnica de microscopía electrónica de transmisión se pudo observar una forma bacilar con un diámetro promedio de 0,2  $\mu\text{m}$  y una longitud variable entre 2 y 3  $\mu\text{m}$ . Se observó que la cubierta celular o pared se encuentra plegada irregularmente y de su superficie emergen numerosas estructuras flagelares en forma individual o en paquetes. Finalmente con las microplacas GN2 se pudo identificar la cepa 14 como *Burkholderia cepacia*, antiguamente se denominaba como *Pseudomonas cepacia* (8).

### Aparición de la actividad antifúngica

Para posteriores ensayos se obtuvo el principio activo libre de células y para ello se comenzó determinando en que momento de la fase de crecimiento comienza a detectarse

la actividad del compuesto antifúngico de *B. cepacia*.

Al crecer en caldo nutritivo presentó una velocidad de crecimiento de  $0,4 \text{ h}^{-1}$ , y un tiempo de generación de 2,5 h alcanzándose la fase estacionaria luego de 25 horas de crecimiento. Diferentes muestras fueron tomadas a lo largo del cultivo detectándose la actividad antifúngica recién a partir de las 20 h y aumentando hasta alrededor de las 24 h. Podemos afirmar que los elementos responsables de la actividad antifúngica parecen de origen extracelular ya que es excretado al medio y su producción comienza a partir del fin de la fase exponencial incrementándose en la fase estacionaria. No es descartable que el compuesto se produzca desde el comienzo de la fase de crecimiento, pero su concentración no sea lo suficientemente elevada como para poder ser detectada por el método empleado.

#### Caracterización parcial del compuesto antifúngico

En relación a la estabilidad térmica la actividad fue detectable hasta los  $40^\circ\text{C}$ , temperaturas mayores inactivaron el sobrenadante. También comprobamos que el compuesto mantiene su actividad después de un mes de almacenamiento a  $-20^\circ\text{C}$ , lo que favorecería la posibilidad de conservar preparaciones del mismo durante tiempos largos sin pérdida de actividad. Inferimos que el compuesto antifúngico es de naturaleza proteica ya que la tripsina y proteasas proveniente de *S. aureus* eliminaron la capacidad de inhibir el crecimiento de *L. theobromae*. Finalmente suponemos que el efecto es de naturaleza fungostática, ya que luego de resuspender el micelio aéreo del hongo en el sobrenadante de cultivo de *B. cepacia* éste pudo posteriormente reanudar el crecimiento. Esto indica que el compuesto antifúngico no ataca al hongo ya crecido, y es necesario que éste se encuentre en crecimiento activo para que pueda ser afectado.

Tabla 1  
Características fisiológicas y bioquímicas de las cepas 5 y 14

Coloración de Gram	-
Producción de Esporas	-
Motilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Fermentación de:	
Xilosa	-
Arabinosa	-
Glucosa	+
Lactosa	-
Gluconato	-
Empleo del Citrato	+
Ureasa	+
Nitrato Reductasa	+
Crecimiento en NaCl 6,5%	+
Producción de: Piocianina	-
Fluoresceína	-

#### Efecto del extracto activo sobre otros microorganismos

Al ensayar el extracto activo sobre diferentes microorganismos se encontró que había efecto inhibitorio sobre todos los hongos estudiados, solo en *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis* no se detectó la formación de halos inhibitorios. El extracto de la cepa de *B. cepacia* provocó un efecto cuantificable sobre los hongos filamentosos. Existen diversos reportes en los que la industria agrícola considera a *B. cepacia* como un posible agente de control biológico (9, 10-17). Además tiene una extraordinaria versatilidad metabólica y puede degradar substratos aromáticos presentes en herbicidas y pesticidas, algunos con potencial carcinogénico utilizándolos como fuentes de carbono. Uno de estos compuestos degradados por esta bacteria es 2, 4, 5 clorofenoxi acetato (2, 4, 5-T), un potente herbicida que

no se degrada con facilidad y persiste largos periodos de tiempo en el ambiente (12).

*B cepacia* puede antagonizar y reprimir muchos patógenos de plantas. Previene la roña causada en hojas y tallos por el hongo *Alternaria* sp. al inhibir la germinación de sus esporas. Ataca el hongo *Aphanomyces euteiches*, el cual causa la podredumbre de raíces en guisantes y alfalfa (14, 15). También puede prevenir las enfermedades que especies de *Pythium* ocasionan en pepinos y guisantes (16). Para prevenir estas enfermedades, *B. cepacia* provee un ambiente aparentemente amigable en comparación a los potentes y tóxicos fungicidas que no pueden ser degradados en el ambiente.

En la industria forestal especies de hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocarpum* y *Botrytis* ocasionan grandes pérdidas económicas. Estos hongos de amplia distribución impiden la germinación adecuada de las semillas e incluso en ocasiones logran matar las plántulas recién transplantadas. Se conoce una cepa de *B cepacia* que es una exitosa inoculante en semillas y raíces, suprimiendo estos hongos en una variedad de coníferas (17).

Según la literatura revisada, no se encontró referencia al uso de *B. cepacia* como control biológico contra el hongo responsable del manchado azul de la madera, y podría ser una alternativa eficaz además de amigable con el ambiente, en la lucha contra este hongo que ocasiona pérdidas considerables en la industria maderera.

Antes del empleo definitivo de cualquiera de estas cepas bacterianas habría que considerar sus efectos sobre la salud humana, ya que *B cepacia* está asociada con un incremento en la enfermedad y muerte de pacientes con fibrosis cística (18, 19, 20). Esta observación hace que la dispersión deliberada de la misma en el ambiente se considere con cuidado. Parece evidente que la aplicación agrícola de *B. cepacia* ocasionaría una contaminación de tierras y aguas incrementándose la exposición a los humanos. Re-

cientemente, en un intento de establecer el riesgo representado para los humanos por *B. cepacia*, se compararon dos aislados de origen clínico de dos pacientes con fibrosis cística y dos aislados provenientes de las raíces de plantas de arroz y maíz (21). Se estudiaron varias características fenotípicas de las cepas en cuestión y se concluyó que son completamente diferentes las aisladas de la rizosfera de aquellas de origen clínico. Entre las diferencias importantes está que las cepas aisladas de la rizosfera no son capaces de adherirse a células uroepiteliales humanas. Posteriormente varios de estos autores (13) compararon las secuencias del rDNA ribosomal 16S y se encontró que los secuencias de los aislados clínicos eran idénticas entre si pero diferentes a la de los aislados del suelo. Esto se consideró como una evidencia de divergencias evolutivas entre los aislados de la rizosfera y su contraparte clínica. Por supuesto el análisis de tan sólo 4 aislados no es suficiente para recomendar una aplicación segura de cepas provenientes de la rizosfera.

La bacteria se encuentra tan presente en la naturaleza que hay quien afirma que la misma se encuentra en el suelo, pantanos, bajo las uñas de humanos, en cada papa y cebolla en las tiendas. Es importante establecer la potencial patogenicidad (bioseguridad), de las cepas aisladas del ambiente para el hombre y los animales. Desde un punto de vista taxonómico *B cepacia* pertenece al menos a cinco genomovars (22) y aparentemente las cepas a ser empleadas en la agricultura pertenecen al grupo V siendo el genomovar III probablemente el patógeno (23).

## Conclusiones

Se aisló a partir de muestras de madera aparentemente sana de Pino Caribe, una cepa de *Burkholderia cepacia*. Esta cepa produce un compuesto con actividad fungistática contra una gran cantidad de hongos filamentosos. También tiene actividad contra *Lasiodiplodia theobromae* al menos uno de los hongos causante de la mancha azul en la madera aserrada de Pino Caribe.

Esta cepa bacteriana, luego de estudios adicionales que determinen su inocuidad para el hombre podría ser utilizada con éxito como un control biológico en el combate contra la mancha azul, siendo así una alternativa al empleo de los muy tóxicos funguicidas de origen químico.

### Referencias Bibliográficas

1. EATON R.A., HALE M.D. **Wood. Decay pest and protection**, Chapman and Hall, Great Britain, pp.131-145, 1993.
2. **Grupo Andino. Manual para la preservación de la madera**, Carvajal, Colombia, 1988.
3. HOLMQUIST O. Caribbean pine sudden wilt. A new and destructive disease in Venezuelan plantations. **American Society of Phytopathology, Caribbean Branch. XXXII Annual Meeting**, Mérida (Venezuela), 1992.
4. ENCINAS O. Development and significance of attack by *Lasiodiplodia theobromae* (pat) Griff. & Maubl in Caribbean Pine wood and some other wood species (Doctoral Theses), Swedish University of Agricultural Sciences, pp.120, 1996.
5. **Buckman Laboratories. Softwood product data**, USA, 1993.
6. CEDEÑO L., MOHALI S., PALACIOS-PRU, E. **Interciencia** 21: 264-271, 1996.
7. **BBL**. Manual de procedimientos de laboratorio y de productos, Editores Asociados, España, 1974.
8. YABUCHI E., KOSAKO Y., OYAIZU H., YANO I., HOTTA H., HASHIMOTO Y., EZAKI T., ARAWAKA M. **Microbiol Immunol** 36: 1252-1275, 1992.
9. GOVAN J., HUGHES J., VANDAMME P. **J Med Microbiol** 45: 395-407, 1996.
10. McLOUGHLIN T.J., QUINN J.P., BETTERMANN A., BOOKLAND R. **Appl Environ Microbiol** 58: 1760-1763, 1992.
11. HOMMA Y., SATO Z., HIRAYAMA F., KANNO K., SHIRAHAMA H., SUZUI T. **Soil Biology and Biochemistry** 21: 723-728, 1989.
12. SANGODKAR U., CHAPMAN P., CHAKRABARTY A. **Gene**: 71: 267-277, 1988.
13. TABACCHIONI S., VISCA P., CHIARINI L., BEVIVINO A., DI SERIO C., FRANCELLI S. **Res Microbiol** 146: 531-542, 1995.
14. BOWERS J., PARKE, J. **J Phytopathology** 83: 1466-1473, 1993.
15. KING E., PARKE J. **Soil Biology and Biochemistry** 28: 306-312, 1996.
16. CARTWRIGHT D., CHILTON C., BENSON, D. **Appl Microbiol Biotechnol** 43: 211-216, 1995.
17. REDDY M. Status on commercial development of *Burkholderia cepacia* for biological control of fungal pathogens and growth enhancement of conifer seedling for a global market. Washington: US Forest Service general technical report PNW. Report N° 389, 1997.
18. SAJJAN U.S., SUN L., GOLDSTEIN R., FORSTNER J.F. **J Bacteriol** 177: 1030-1038, 1995.
19. EDITORIAL. **Lancet** 329: 1385-1386, 1992.
20. GOVAN J., DERECHTIC V. **Microbiological Reviews** 60: 539-574, 1996.
21. BEVIVINO A., TABACCHIONI S., CHIARINI L., CARUSI M., DEL GALLO M., VISCA, P. **Microbiology** 140: 1069-1077, 1994.
22. VANDAMME P., HOLMES B., VANCNNEYT M., COENYE T., HOSTE B., COOPMAN, R., REVETS H., LAUWERS S., GILLIS M., KERSTERS K., GOWAN J.R.W. **Int J Syst Bacteriol** 47: 1188-1200, 1997.
23. HOLMES A., GOVAN, J.R.W., GOLDSTEIN R. **Emer Infect Dis** 4: Abril-Junio, 1998. Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol4no2/holmes.htm>