

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Efecto de Ocho Bactericidas Sobre Cepas de *Pseudomonas syringae* Aisladas de Plantaciones de Melón del Valle de Zacapa

Trabajo de graduación presentado por Laura Susana Vergara Barrios
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica

Guatemala,

1998

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



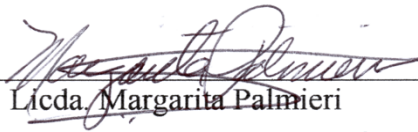
Efecto de Ocho Bactericidas Sobre Cepas de *Pseudomonas syringae* Aisladas de Plantaciones de Melón del Valle de Zacapa

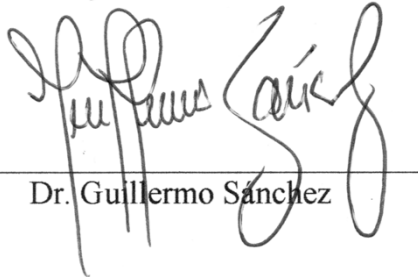
Trabajo de graduación presentado por Laura Susana Vergara Barrios
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica

Guatemala,


1998

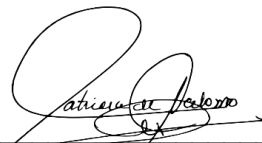
Vo. Bo.

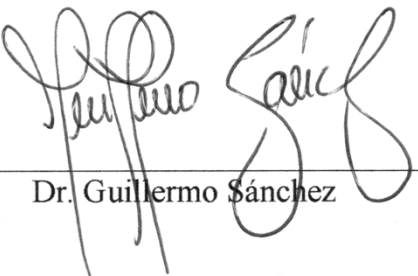
f) 
Licda. Margarita Palmieri

f) 
Dr. Guillermo Sánchez

Tribunal Examinador:

f) 
Licda. Margarita Palmieri

f) 
Licda. Patricia Palacios de Palomo

f) 
Dr. Guillermo Sánchez

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala, 25 de 09 de 1998

PREFACIO

Agradezco a mis padres por todos sus sacrificios, apoyo, cariño, comprensión y confianza que tuvieron en mí siempre.

Agradezco al Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones y al grupo de profesionales que a lo largo de mi carrera contribuyeron a mi formación.

Agradezco muy en especial a Licda. Margarita Palmieri por su apoyo, paciencia, y conocimientos transmitidos en su asesoría, al Dr. Guillermo Sánchez por su tiempo, conocimientos y valiosa asesoría; al Dr. Roberto Molina por su ayuda en el área estadística.

Agradezco también al gremio melonero de Guatemala por el suministro de los bactericidas utilizados en el proyecto.

Finalmente, pero lo más importante le doy las gracias Dios por quien todo es posible.

ÍNDICE

PREFACIO	v
ÍNDICE	vi
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	4
III. OBJETIVOS	5
IV. HIPÓTESIS.....	6
V. MARCO TEÓRICO.....	7
A. Melón.....	7
B. Bacterias fitopatógenas del melón.....	10
C. Bactericidas evaluados sobre <i>Pseudomonas syringae</i> pv. cucubrita en melón.....	36
D. Evaluación de la sensibilidad bacterial frente a bactericidas por el método de difusión de disco, SSD.	42
VI. METODOLOGÍA	45
A. Materiales y métodos.....	45
B. Análisis estadístico	47
VII. RESULTADOS	48
VIII. DISCUSIÓN.....	54
IX. CONCLUSIONES	61
X. RECOMENDACIONES	63
XI. BIBLIOGRAFÍA	64

XII. ANEXOS	70
A. Datos de áreas de inhibición (mm ²).....	70
B. Gráficas de inhibición de bactericidas vrs. área de inhibición (mm ²).....	73
C. Resultados del análisis estadístico de varianza ANDEVA de tres factores	77
D. Materiales, reactivos y métodos	83

LISTA DE CUADROS

1. Contenido nutricional de Melón Cantaloupe	8
2. Consumo de frutas frescas per cápita en los Estados Unidos, 1995	8
3. Porcentajes de dosis recomendadas (RDA) para beta-caroteno (valor de vitamina A) y ácido ascórbico (Vitamina C) contenidos en las 10 frutas más comunes para los Estados Unidos	9
4. Situación del cultivo del melón, producción y exportaciones para Guatemala	10
5. Agentes inactivantes para algunos agentes bactericidas	28
6. Cuadro de composición y dosis recomendada de los bactericidas a ser analizados en el estudio.....	37
7. Rectas de regresión lineal obtenidas de las interacciones aislado bacterial (colonia) y bactericida.....	48
8. Resultados del análisis estadístico ANDEVA en respuesta a la variable de área promedio de inhibición	49
9. Resultados del análisis estadístico de comparación múltiple de medias entre colonias por el método de Duncan	49
10. Resultados del análisis estadístico de comparación múltiple de medias entrebactericidas por el método de Duncan ($\alpha = 0.01$)	50
11. Resultados del análisis estadístico de comparación múltiple de medias entre las distintas concentraciones por el método de Duncan ($\alpha = 0.01$).....	50

LISTA DE FIGURAS

1. Diagrama general de la envoltura celular de una bacteria Gram-Negativa	14
2. Manchas angulares típicas en el haz de la hoja del melón.....	16
3. Exudado acuoso característico de la mancha angular en el envés de la hoja de melón.....	16
4. Mancha bacteriana del fruto en melón, <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> subsp. <i>citrulli</i>	18
5. Planta de melón infectada con <i>Erwinia tracheiphila</i> , Marchitamiento Bacterial	19
6. Pudrición blanda bacteriana causada por <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> en cultivo de melón	21
7. Estructura de la Estreptomicina	30
8. Estructura de la Eritromicina	31
9. Estructura de la Oxitetraciclina.....	31
10. Diagrama de las formas de interpretar los resultados obtenidos de las pruebas de sensibilidad.....	44
11. Método de difusión en disco para determinar la inhibición.....	46
12. Resultados obtenidos del análisis estadístico del área de inhibición promedio por colonia.....	51
13. Resultados del análisis del área de inhibición vrs concentración del bactericida ..	51
14. Resultados del análisis de cada bactericida según área de inhibición promedio (mm ²)	52
15. Resultados del análisis de interacciones entre colonia (A) y bactericida (B) en base al área promedio de inhibición (mm ²).....	52

16. Resultados del análisis de interacción entre colonia (A) y concentración del bactericida (C).....	53
17. Resultados del análisis de interacción entre bactericida (B) y concentración (C).	53

RESUMEN

En este trabajo de investigación se llevaron a cabo pruebas de sensibilidad bacteriana por difusión de disco para evaluar la eficacia de 8 bactericidas de distinto principio activo sobre el crecimiento “*in vitro*” de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans (Smith & Bryan), PSL, agente causal de la mancha angular del melón, enfermedad bacteriana de mayor importancia sobre esta y otras cucúrbitas en el valle de Zacapa, Guatemala.

Los bactericidas evaluados fueron Agrimicín, Farmacina, Bacter-Stop, Kocide, Phyton, Timsen, Vanodine y Kilol los cuales fueron utilizados como agente de inhibición bacteriana en la prueba de sensibilidad por difusión de disco, para esta se trabajó con soluciones bacterianas provenientes de distintas fincas meloneras a una concentración de 10^{-8} CFU sobre agar Müller-Hinton utilizando discos estériles de 6 mm de diámetro impregnados con los distintos agentes bactericidas a cinco diferentes concentraciones 0.0, 0.25, 0.75, 1.25 y 2.0 tomando como la unidad la dosis media recomendada por la casa comercial de cada producto bactericida.

Los resultados de las pruebas del laboratorio indican que los bactericidas que tienen como principio activo algún antibiótico son los más efectivos, como lo son: El Agrimicín, Farmacina, y Bacter Stop; seguidos por compuestos como El Timsen, Vanodine y Kilol. Los compuestos de cobre como Kocide no mostraron inhibición *in vitro* por el método de difusión de disco, sin embargo, sí son efectivos con el método de contacto, mientras que el compuesto a base de sulfato de cobre. $5H_2O$, Phyton, no muestra inhibición *in vitro* sobre *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans. (PSL), por el método de difusión discal o de contacto.

ABSTRACT

In this research work, disk diffusion bacterial sensitivity tests were carried out to evaluate the efficacy of 8 bactericides of different active ingredients on the *in vitro* growth of *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans (Smith & Bryan), PSL, causal agent of the angular spot of the melon, this bacterial disease is the most important disease in cucurbits in the Zacapa valley of Guatemala.

The bactericides evaluated were Agrimicín, Farmacina, Bacter-Stop, Kocide, Phyton, Timsen, Vanodine and Kilol which were used as a bacterial inhibition agent in the disc diffusion sensitivity test, for this we worked with bacterial solutions from different Melon farms at a concentration of 10^{-8} CFU on Müller-Hinton agar using 6 mm diameter sterile discs impregnated with the different bactericidal agents at five different concentrations 0.0, 0.25, 0.75, 1.25 and 2.0 using the recommended average dose by the commercial house of each bactericidal product as a unit.

The results of the laboratory tests indicate that the bactericides that have an antibiotic as their active ingredient are the most effective, such as: Agrimicín, Farmacina, and Bacter-Stop; followed by compounds such as Timsen, Vanodine and Kilol, copper compounds like Kocide did not show inhibition *in vitro* by the disc diffusion method, however, they are effective with the contact method, while the copper sulfate based compound. $5H_2O$, Phyton, shows no *in vitro* inhibition on *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans. (PSL), by the disc or contact diffusion method.

I. INTRODUCCIÓN

En Guatemala el cultivo de melón se desarrolla en dos regiones bien diferenciadas, siendo estas el litoral del Pacífico y el valle del Motagua en Zacapa. El volumen global de producción durante 1996-97 experimentó un incremento porcentual de 14.2% con relación a la temporada anterior y se pronostica para 1998 y 1999 un incremento del 15 al 20%, pues se han incorporado nuevas áreas de cultivo para la siembra de esta hortaliza, que anteriormente constituían terrenos espinosos subutilizados (AGEXPRONT, 1996).

El sector de exportaciones agrícolas no tradicionales ha tenido un fuerte crecimiento en la última década, remontándose casi en un 70% en los últimos cuatro años, incluyendo a las hortalizas clasificadas como una de las categorías con más éxito (AGEXPRONT, 1996). El área cultivada actualmente de melón es de 1,564 hectáreas, con un rendimiento promedio de 18 Tm/ha. Esta cifra, aún cuando algunos productores la consideran satisfactoria, se encuentra por debajo de los rendimientos en países más desarrollados, que es de 25 Tm/ha. Este diferencial de producción se debe a varios factores, siendo los más importantes, las plagas y enfermedades (AGEXPRONT, 1996).

Los principales mercados para la exportación del melón son los Estados Unidos a donde se destina el 85% de la producción guatemalteca y Europa que consume el 15% restante (AGEXPRONT, 1996). Según el Banco de Guatemala, el total de divisas obtenidas en 1995 por la exportación de melones fue de 40 millones de dólares, cifra que como ya se mencionó va en aumento cada año.

Los suelos del valle del Motagua han sido utilizados por varios años y de manera consecutiva para la siembra del melón, incrementándose el riesgo de que plagas diversas puedan acentuarse, perjudicando así la productividad del cultivo. Las condiciones ambientales propias de la época lluviosa han favorecido el apareamiento de importantes enfermedades bacterianas, consideradas de alto riesgo para la producción melonera. Esta situación ha motivado el interés del gremio melonero por conocer más acerca de los factores que intervienen en este fenómeno, importando no solo la identificación y caracterización de las enfermedades bacterianas sino también los métodos de control químico utilizados para su manejo. El empleo del control químico debe estar enmarcado dentro de un programa bien establecido de manejo integrado de plagas (MIP).

El conocimiento de las causas que ocasionan los daños bacterianos en el melón y los medios para prevenir estos daños, son de suma importancia para la producción exitosa de esta hortaliza que se ha convertido en uno de los productos no tradicionales de mayor auge y con mayor impacto socioeconómico en el país. Es importante conocer cuáles son las bacterias fitopatógenas que causan el mayor daño y evaluar cómo se comportan frente a distintos bactericidas para así poder hacer uso de los bactericidas de una manera eficaz y reducir los efectos nocivos sobre el medioambiente en general. Conocer la efectividad de bactericidas de reciente ingreso al mercado agrícola permite tener opciones diversas de control químico en el campo, para poder ser incorporados a los programas fitosanitarios utilizados.

Los cultivadores de melón tienen que eliminar y combatir una gran variedad de agentes patógenos durante cada cosecha, siendo las enfermedades bacterianas cada vez más difíciles de controlar. Las bacterias de mayor preocupación para el gremio melonero son *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* y *Erwinia tracheifila*, de las cuales la que mayor pérdida en la productividad origina es la primera, causante de la mancha angular de la hoja.

El control de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas es difícil ya que la gama de bactericidas con los que se cuenta no es muy amplia reduciéndose a antibióticos y compuestos de cobre. Existe una serie de productos que recientemente han sido recomendados como bactericidas por casas comerciales a los cuales no se ha evaluado su efectividad sobre el patógeno. Estos productos bactericidas incluyen diversos ingredientes activos desde compuestos de yodo, productos de amonio cuaternario hasta compuestos naturales. Por todo esto es necesario evaluar el poder bactericida de estos químicos alternativos, para poder combinar su uso con compuestos antibióticos y lograr un mejor control de las enfermedades bacterianas y retardar la inducción de mecanismos de resistencia en las bacterias, lo cual hasta la fecha no ha sido evaluado con bacterias fitopatógenas en melón presentes en Guatemala.

En este trabajo se analiza, bajo condiciones “*in vitro*”, el efecto bactericida de ocho distintos productos antibacteriales, comparándose su efectividad frente a la bacteria más problemática en el cultivo del melón, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, organismo causal de la mancha angular de la hoja en cucurbitáceas. Este análisis es de suma importancia, pues las extensas y cada vez mayores áreas sembradas de melón, requieren la aplicación de químicos costosos cuya efectividad debe ser evaluada. Aplicaciones de bactericidas poco efectivos pueden reducir la rentabilidad del cultivo por pérdidas en rendimientos causados por el daño bacteriano a la planta y por el incremento en costos debido a las aplicaciones adicionales de pesticidas químicos sin ningún efecto.

Sin embargo, no es solamente el alto costo del uso de pesticidas un factor significativo para las empresas meloneras, sino también es de importancia el impacto ambiental que trae consigo el uso indiscriminado de éstos, pues los patógenos a los cuales se quiere eliminar pueden adquirir resistencia a los pesticidas, llegando éstos a perder su efectividad en el control de plagas. Esto implica aplicaciones cada vez más concentradas y frecuentes de pesticidas, generándose una mayor contaminación del ambiente en general e inducción de mecanismos de resistencia. Esta resistencia ha sido comprobada en especies de

Xantomonas campestris y *Pseudomonas syringae* a compuestos de cobre y estreptomicina (Cooksey, 1990). Por todos estos factores se hace necesaria la evaluación descrita en este documento.

El manejo ideal para todo tipo de enfermedad en las plantas debe ser un tratamiento basado en medidas preventivas en lugar de curativas. Sin embargo, las enfermedades bacterianas de desarrollo externo pueden ser controladas por medio de medidas curativas como aplicaciones de antibióticos al follaje, aunque no por esto se debe de descartar o minimizar la importancia de las prácticas preventivas utilizadas en el manejo integrado de cultivos agrícolas.

II. JUSTIFICACIÓN

Se vio la necesidad de evaluar “*in vitro*” la efectividad de los productos antibacteriales utilizados en el campo, para tratar la enfermedad bacterial “Mancha angular de la hoja” en cucurbitáceas provocada por *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans, ya que esta enfermedad bacterial produce muchas pérdidas económicas en la industria melonera del Valle de Zacapa en Guatemala, reduciendo el rendimiento promedio por hectárea de manera considerable.

El cultivo de melón que se ha convertido en uno de los productos no tradicionales de mayor auge y con mayor impacto socioeconómico en el país, es importante conocer más acerca de la susceptibilidad de la bacteria que causa el mayor daño en las plantaciones de melón, *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans, y evaluar cómo se comporta frente a los distintos bactericidas, para poder determinar cuál de estos es el más adecuado en el control bacterial.

También es importante la evaluación de los bactericidas en distintas concentraciones para poder hacer uso de estos de una manera eficaz y reducir los efectos nocivos sobre el medioambiente en general, optimizando la dosis empleada, que sea suficiente para que pueda combatir la infección bacteriana, evitar dosis escasas que permitan desarrollar alguna resistencia bacteriana o que la dosis sea exagerada como para provocar toxicidades en medio ambiente o al consumidor final.

Conocer la efectividad de bactericidas de reciente ingreso al mercado agrícola permite tener opciones diversas de control bacteriano en el campo, para poder incorporar estos nuevos bactericidas en los programas fitosanitarios.

III. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar y analizar el efecto de distintos bactericidas empleados en el cultivo del melón sobre el crecimiento “*in vitro*” de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans, causante de la mancha angular de la hoja en cucurbitáceas.

B. Objetivos específicos

1. Comparar el efecto “*in vitro*” de 8 bactericidas con diferentes principios activos (antibiótico, compuestos de cobre, yodo, amonio cuaternario, extracto de cítricos) frente a aislados de bacterias *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans, PSL.

2. Comparar y relacionar el comportamiento “*in vitro*” de 4 aislados (colonias) de PSL obtenidos de distintas plantaciones de melón frente a los diferentes bactericidas.

3. Evaluar el efecto de la concentración de cada uno de los bactericidas sobre el crecimiento “*in vitro*” de PSL.

4. Determinar si existen interacciones significativas entre las colonias seleccionadas y los bactericidas a 5 concentraciones diferentes.

5. Evaluar la posibilidad de resistencia a productos químicos comúnmente utilizados en base a los resultados obtenidos en las pruebas de crecimiento “*in vitro*”.

IV. HIPÓTESIS

La bacteria *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans exhibe grados variables de sensibilidad cuando su crecimiento “*in vitro*” es comprometido con agentes bactericidas distintos.

El crecimiento “*in vitro*” de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans, en las pruebas de sensibilidad a bactericidas, se ve afectado por la localidad de donde fue obtenido el aislado o colonia.

La concentración del bactericida tiene un efecto significativo sobre el crecimiento “*in vitro*” de PSL.

V. MARCO TEÓRICO

A. Melón

1. Características generales.

El melón pertenece a la familia de las calabazas o Cucurbitáceas, siendo su probable lugar de origen África o Asia (Agrios, 1991). Los melones (*Cucumis melo*) se agrupan en tres categorías: muskmelons, verdaderos cantaloupes (*C. cantalupensis*) y melones de invierno (*C. inodorus*). Este último grupo incluye las clases Honeydew, Casaba, Crenshaw, Santa Claus, Persian y Juan Canary. También es posible cruzar los distintos tipos de melones entre sí con lo cual resultan variedades con características de ambos grupos, llamados tipos mixtos o exóticos. Dentro de los tipos exóticos se pueden mencionar Carnival, Solaris F, Verdol F, Iberix, Goliat F y Amur (Montalvo, 1982). En Guatemala se siembra comercialmente el melón tipo Cantaloupe y el Honeydew, aunque en el pasado reciente también se ha incrementado la siembra de sandía.

En el melón se pueden obtener varias frutas de una planta en un primer ciclo reproductivo, en el cual se obtiene mayor calidad de fruta (alto contenido de azúcar y mayor tamaño) dependiendo del estado de salud de la planta se puede obtener frutos aceptables en una segunda cosecha (Montes, 1991). Este sistema de producción no se practica en Guatemala pues solo se da un ciclo reproductivo que dura aproximadamente de 70-85 días. Sin embargo, en Guatemala el melón se siembra dos veces al año en forma consecutiva de agosto a diciembre y de enero a mayo.

2. Calidad nutricional, importancia y consumo.

Las cucúrbitas en general no son una fuente de calorías o proteínas significante, sin embargo, pueden ser fuentes importantes de fibra dietética, minerales, pro-vitamina A (beta-caroteno) y vitamina C (Adams & Richardson, 1981).

Función e importancia de vitamina A y C: La vitamina A sintetizada a partir de la pro-vitamina A es partícipe del ciclo visual manteniendo la estructura de las células visuales y su regeneración constante, su deficiencia causa lo que se conoce como ceguera nocturna (Ganguly, 1989; Goodman, *et al.*, 1991). La vitamina A mantiene la salud de las membranas mucosas en la nariz, tráquea y pulmones, porque es vital en la síntesis de los mucopolisacáricos, responsables de mantener saludables a las membranas epiteliales. Al mismo tiempo está involucrada en el crecimiento fetal (Heiby, 1988) y actúa como sustancia inhibitoria de actividades cancerígenas.

La vitamina C previene el avance de neoplasias cervicales intra epiteliales las cuales se convierten eventualmente en carcinomas. Además de todas las funciones de la vitamina A, se ha descubierto recientemente que tanto la vitamina A como la E, juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer pues previenen la oxidación lipídica a través de la regulación de la diferenciación y comunicación de células cancerosas (Lester, G., 1997).

El contenido nutricional de los melones basado en las normas y conceptos de la “U.S. Food and Drug Administration”, ha sido registrado como bajo en calorías, grasa y sodio y como una buena fuente de potasio y Vitamina C, siendo también una excelente fuente de pro vitamina A o beta-caroteno (Cuadros 1 y 3). El melón ocupa el segundo lugar en consumo de frutas frescas per cápita para los Estados Unidos, según estudios realizados en 1995, véase el Cuadro 2.

Cuadro 1. Contenido nutricional de Melón Cantaloupe

Tamaño de porción = 1 taza (236 gr)	Cantidad por ración	% del requerimiento diario (%)
Calorías	71	--
Calorías de grasa	0	--
Grasa total	0 g	0
Sodio	28 g	1
Potasio	593 g	15
Carbohidratos totales	23 g	7
Fibra dietética	2 g	8
Azúcares	19 g	--
Proteína	2 g	--
Vitamina A	--	160
Vitamina C	--	130
Calcio	--	4
Hierro	--	9

(Fuente: Adams and Richardson, 1981)

Cuadro 2. Consumo de frutas frescas per cápita en los Estados Unidos, 1995.

Posición	Grupo de frutas	Consumo (kg/cápita)
1	Banano	12.6
2	Melón^x	11.6
3	Cítricos	11.4
4	Manzanas	8.9
5	Uvas	3.3
6	Melocotones	2.5
7	Fresas	1.8
8	Peras	1.6
9	Piña	0.9
10	Ciruela	0.7

x = incluye melones tipo muskmelon, honeydew y watermelon

(Fuente: Lucier, 1995)

Cuadro 3. Porcentajes de dosis recomendadas (RDA) para beta-caroteno (valor de vitamina A) y ácido ascórbico (Vitamina C) contenidos en las 10 frutas más comunes para los Estados Unidos.

Grupo de frutas	Porcentaje RDA/236 g cada porción de fruta fresca	
	Vitamina A	Vitamina C
Manzana	5	16
Banano	9	39
Uvas	5	16
Muskmelon	160	131
Naranjas	9	197
Melocotones	35	16
Peras	1	16
Piña	4	67
Ciruelas	14	0
Fresas	3	232

(Fuente: Adams and Richardson, 1981)

La importancia del melón también radica en investigaciones realizadas sobre “fitoquímicos”, compuestos presentes en las plantas de reconocido valor nutricional, siendo además considerados como compuestos prometedores contra la lucha de enfermedades humanas. En los melones existen muchos fitoquímicos con grandes beneficios potenciales para la salud. Tres de estos compuestos encontrados en melón son: cucurbitacin- β , litio y zinc, los cuales son prometedores en la prevención del cáncer, lucha contra depresión, caspa, úlceras y en la estimulación del sistema inmunológico. Aunque no se sabe de manera certera el modo de acción de estos fitoquímicos, si es que éstos actúan por sí solos o en sinergismo con otros fitoquímicos o fitonutrientes, su biodisponibilidad o requerimientos mínimos o máximos, sí se ha logrado constatar que son necesarios para muchos procesos metabólicos y para la lucha de muchas enfermedades como el cáncer (Lester, 1997).

No está claro qué fitoquímicos o fitonutrientes son agentes con actividades anti cancerígenas y si son agentes primarios preventivos de cáncer, lo que sí está claro es que el consumo de frutas y vegetales es recomendable ya que se han establecido relaciones positivas entre la disminución de posibilidades de contraer cáncer con el consumo de frutas y vegetales (Lester, 1997).

3. Cultivo del melón en Guatemala.

La polinización del melón se lleva a cabo naturalmente por abejas y la viabilidad de las semillas puede durar hasta 5 años a 4°C. El melón puede ser cultivado en una amplia variedad de suelos siendo los suelos con textura franca los que producen mayores rendimientos y mejor calidad de fruta. El terreno debe tener un buen drenaje y el pH debe ser mayor de 5.8, preferentemente cercano a 6.2. El espaciamiento entre plantas debe ser de 0.30-0.50 m, sembradas en tablones de 1.0 a 1.5 m de ancho. No se recomiendan suelos pesados orgánicos y debe estar libre de nemátodos y de sustancias tóxicas.

La temperatura adecuada de crecimiento no debe ser menor de 55°- 80° ya que temperaturas por debajo de los 12 grados centígrados causan el “chilling-injury”, en donde los tejidos de la planta se tornan necróticos y mueren. Las principales características del cultivo del melón en Guatemala pueden observarse en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Situación del cultivo del melón, producción y exportaciones para Guatemala

Zona de siembra:	Litoral del pacífico y valle del Motagua.
Área cultivada	1564 hectáreas (AGEXPRONT, 1996)
Época de siembra	Agosto a diciembre Enero a mayo
Tipos de melón	Honeydew y cantaloupe
Rendimiento por hectárea (1996)	18 toneladas / hectárea
Mercados de exportación	Estados Unidos 85% Europa 15% (AGEXPRONT, 1996).
Divisas obtenidas de exportación	40 millones de dólares (Banco Guatemala, 1995).
Principal bacteria problemática	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. lachrymans.

Desde 1995 se reportaron los primeros daños bacterianos, los cuales no sucedían con anterioridad y que año con año se tornan más agresivos ocasionando mayores pérdidas económicas, este tipo de daño disminuye el rendimiento por hectárea cosechada afectando a la industria melonera y a la economía guatemalteca. En algunos campos afectados los brotes de bacterias han ocasionado pérdidas económicas de hasta un 40%.

B. Bacterias fitopatógenas del melón

1. Características generales.

Las bacterias son organismos microscópicos, conociéndose alrededor de 1600 especies. La gran mayoría de las bacterias son estrictamente saprofitas y como tales benefician al ser humano porque ayudan a la descomposición de grandes cantidades de materia orgánica producidas por él mismo y su industria, como productos de desecho o como resultado de la muerte de plantas y animales. Existen alrededor de 200 especies de bacterias patógenas de plantas, (Castaño, 1994) que son responsables de fuertes pérdidas económicas en la agricultura como consecuencia de su ataque a las plantas cultivadas. Todas estas especies son parásitos no obligatorios y se pueden cultivar artificialmente y ser evaluadas en medios nutritivos.

Las bacterias son células procariotas simples, de un solo cromosoma, carecen de membrana nuclear o de organelos internos como mitocondrias y cloroplastos. Al carecer de clorofila dependen de otros seres para nutrirse de los alimentos carbonados que ellas no pueden tomar de la atmósfera (Karp, 1991). Las bacterias y organelos celulares tienen mucho en común y es así que los antibióticos que afectan a las bacterias también inhiben mitocondrias, cloroplastos, pero no interfieren con las otras funciones de las células de plantas eucarióticas (Castaño, 1994). Las bacterias se multiplican con rapidez sorprendente y su significancia como patógenos se atribuye principalmente al hecho de que producen enormes cantidades de células en períodos muy cortos de tiempo. Pueden dividirse a razón de 20 minutos bajo condiciones favorables.

Enfermedades bacterianas ocurren en cualquier lugar que sea húmedo o caluroso, afectan a casi todas las clases de plantas, y bajo condiciones ambientales favorables, pueden ser extremadamente destructivas (Castaño, 1994).

Las bacterias fitopatógenas que, según reportes verbales de técnicos de campo, afectan al melón en Guatemala, en el valle del Motagua, Zacapa son: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* y *Erwinia tracheiphila*, causantes de la mancha angular y marchitez bacteriana, respectivamente, siendo sin embargo la de mayor importancia en cuanto a pérdidas en rendimiento, la mancha angular. El clima de Zacapa favorece el crecimiento bacteriano en la época de invierno ya que, la diseminación de la bacteria se facilita por salpicaduras o arrastre de agua o por contaminación con instrumentos infectados.

a. Reproducción.

Las bacterias fitopatógenas se reproducen mediante el proceso asexual conocido como fisión binaria o fisión. Este proceso consiste en el crecimiento interno de la membrana celular hacia el centro de la célula, formando una división transversal membranosa que divide al citoplasma en dos partes aproximadamente iguales. Dos capas de material de la pared celular adyacentes a la pared celular externa son secretadas o sintetizadas entre las dos capas de la membrana. Cuando la formación de estas dos paredes de la célula finaliza, las dos capas se separan dividiendo las dos células aparte. Cuando la pared celular y el citoplasma sufren el proceso de fisión el material nuclear se organiza en una estructura circular similar a un cromosoma, que se duplica y se distribuye igualmente entre las dos células formadas (Castaño-Zapata, 1994).

Las bacterias causan daños en las plantas a través de varios mecanismos: 1. Por el alto número de bacterias que se acumulan dentro de la planta estas llegan a tapan los haces vasculares, al mismo tiempo la acumulación de desechos metabólicos provoca la disminución del suministro de alimento y otros factores limitantes, la reproducción decrece y puede detenerse. 2. Pueden también ser patogénicas por la producción de toxinas, por ejemplo, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* que ataca el frijol, produce la substancia phaseolotoxina, tóxica para los tejidos de la planta. En otras palabras, el mecanismo de patogenicidad bacteriana no sólo se debe por el taponamiento de haces vasculares y daños causados por la acción física ejercida por el número de bacterias, sino también por mecanismos específicos de ataque a los tejidos vegetales (Castaño-Zapata, 1994).

Las bacterias alcanzan a producir cambios químicos en su ambiente y dentro de la planta. Estos cambios las hacen poseer gran importancia en el mundo en general y en el desarrollo de enfermedades de plantas en particular (Castaño-Zapata, 1994).

Las bacterias patógenas pueden dividirse en dos grupos: a) comunes, que frecuentemente se pueden aislar de las plantas y crecen en medios estándares y b) fastidiosas, las que son poco comunes y que generalmente no crecen en medios estándares, teniendo requisitos nutricionales muy específicos de crecimiento “*in vitro*”.

El control bacteriano se dificulta en la medida que las bacterias pueden sobrevivir en condiciones extremas y pueden llegar a crear resistencia a antibióticos. Los antibióticos

antibacteriales más usados en la agricultura son las formulaciones de estreptomicina o de estreptomicina y oxitetraciclina. El caldo bordolés es también muy utilizado para tratamientos bacteriales (Agrios, 1991).

b. Diseminación.

La diseminación de bacterias patógenas en los campos de cultivo se realiza principalmente mediante el agua, insectos y otros animales incluyendo el ser humano. Aún las bacterias que poseen flagelos se mueven solamente a distancias muy cortas por sus propios medios (Castaño-Zapata, 1994).

2. Características de los principales géneros de bacterias fitopatógenas.

Las bacterias se pueden identificar y diferenciar en base a características de la colonia en ciertos medios a base de agar, y varias pruebas claves tales como la tinción de Gram y crecimiento anaeróbico. Las características de la tinción de Gram están relacionadas con las propiedades estructurales químicas de la pared celular y esta característica sirve como un paso rápido y básico en la identificación de bacterias patogénicas de plantas (Castaño, 1994).

La mayoría de bacterias patogénicas, son gram-negativas. Todas las especies de bacterias fitopatógenas, hasta donde se tiene conocimiento y, a excepción de las especies del género *Erwinia*, son aeróbicas. A continuación, se presentan en forma resumida algunas características de cada género, presentando una mayor información acerca del género *Pseudomonas* pues a este pertenece la bacteria a ser evaluada: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

a. *Erwinia*.

Son varillas rectas gram negativas que miden entre $0.5 - 1.0 \times 1.0 \times 3.0 \mu\text{m}$. Se mueven mediante varios flagelos peritricos. Las especies de *Erwinia* son las únicas bacterias patógenas de plantas que son aeróbicas facultativas. Algunos autores retienen el nombre de *Erwinia* para aquellas bacterias que causan necrosis o marchitamiento como *E. amylovora*, y *E. tracheiphila*, pero incluyen a las especies que causan pudriciones suaves como *E. carotovora* en un género nuevo, *Peccobacterium* (Castaño, 1994).

b. *Xanthomonas*.

Tienen forma de varillas rectas y miden entre $0.4 - 1.0 \times 1.2 - 3.0 \mu\text{m}$. Se mueven por intermedio de un flagelo polar. El crecimiento sobre medio de extracto de levadura-dextrosa-agar (YDC) es generalmente de color amarillo por la producción del pigmento xanthomonadina. La mayoría crecen muy despacio, desarrollándose en colonias visibles en un espacio de 3-7 días. Todas las especies son patógenas de plantas y se encuentran solamente en asociación con plantas o material vegetal. Son gram-negativas (Agrios, 1991). En cucúrbitas, producen el daño en los frutos conocida como roña o sarna bacteriana, siendo el organismo causal *Xanthomona campestris* pv. *cucurbita*. Esta bacteria suele transmitirse por medio de semilla.

c. *Clavibacter*.

En el tomate la enfermedad se produce por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y se le conoce como “chancro bacteriano”. Es una bacteria gram-positiva, estrictamente aeróbica y de crecimiento lento en medios de cultivo standard. En la parte exterior de los tallos se producen ulceraciones de gran longitud, que se rajan quedando la fisura de color negro. Al cortar longitudinalmente los tallos aparecen los haces vasculares con una decoloración negruzca. Al arrancar una hoja o tallo se ve perfectamente este oscurecimiento; produce fasciación o agalla foliosa (Agrios, 1991).

d. *Pseudomonas*.

Estas bacterias gram negativas con forma de varillas rectas a curvadas, miden entre 0.5 –1.0 x 1.5 – 4.0 μm . Se mueven por medio de uno a muchos flagelos polares. Muchas especies son habitantes comunes del suelo o de agua fresca y ambientes marinos. La mayoría de las especies patogénicas infectan plantas; pocas infectan animales o humanos. (Castaño, 1994).

Las bacterias del género *Pseudomonas* atacan a cucurbitáceas, tomate, frijoles y berenjena, entre otras plantas. En cucurbitáceas la enfermedad se denomina “mancha angular” siendo responsable la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. En las hojas se forman manchas húmedas de 2 a 3 mm de diámetro que al estar limitadas por las nervaduras tienen forma angular, de color gris en la parte superior de la hoja y brillante o verde más intenso en el envés. Al final estas manchas se tornan necróticas y llegan a desprenderse quedando la hoja agujereada. En los frutos se forman manchitas pardas que exudan una especie de goma. Se introduce a las plantas por las estomas cuando la temperatura está entre 24 y 27°C. Si la temperatura es mayor de 30°C, se paraliza la enfermedad.

1) *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

Bacteria responsable de la enfermedad bacterial conocida como “mancha angular de la hoja” y causante de las mayores pérdidas económicas en la cosecha de melón debido a la reducción en rendimientos por infección con esta bacteria.

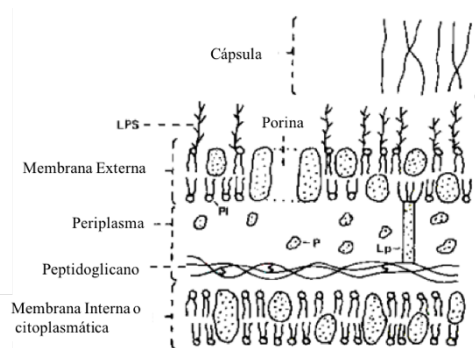
a) Composición de la envoltura celular.

Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*, es una bacteria fitopatógena gram negativa, por lo que tiene la estructura de pared que se presenta en la Figura 1. La membrana citoplasmática de una bacteria gram negativa tiene una forma característica de tipo sándwich, que aparentan ser dos capas electro densas con un espacio menos denso en medio de estas. La capa clara que se encuentra inmediatamente después de la membrana citoplasmática se llama espacio periplásmico, en donde se encuentran enzimas solubles y otros componentes que pueden ser liberados si se somete la célula a un shock osmótico no letal. La capa electro densa, inmediatamente después del espacio periplásmico, mide aprox. 2 nm. de ancho y representa los componentes de peptidoglicanos de la pared, la cual constituye el 5% o menos de la masa de la pared y contribuye a la consistencia de esta. La membrana exterior con un ancho de 6 -10 nm, ha sido la más difícil de caracterizar, es

básicamente una bicapa lipídica, hidrofóbica en el interior con grupos hidrofílicos hacia los dos exteriores, conteniendo también componentes protéicos. Véase Figura 1 (Franklin & Snow, 1989).

De las partes observadas en la Figura 1, la membrana citoplasmática esta involucrada en la respiración, transporte de electrones e incorporación de nutrientes. Los espacios periplásmicos son reservorio metabólico del material de la pared celular mientras que la membrana externa está involucrada en la incorporación de nutrientes, metabolismo de lípidos y mantenimiento de la integridad celular. La cápsula bacterial está compuesta principalmente por una matriz de polisacáridos, que en el caso de *Pseudomonas syringae* producen cantidades considerables de homopolisacáridos extracelulares como el alginato (Sigeo, 1993).

Figura 1. Diagrama general de la envoltura celular de una bacteria Gram-Negativa.



LPS, Lipopolisacáridos; Lp, Molécula de Lipoproteína de unión; PI, Fosfolípidos; P, Proteína (Sigeo, 1993).

3. Clasificación de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas.

Las bacterias pueden causar el desarrollo de casi cualquier tipo de síntomas sobre las plantas que ellas atacan. La mayor diversidad de síntomas es causada por especies del género *Pseudomonas*, seguido por *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Agrobacterium* y *Streptomyces* (Castaño-Zapata, 1994).

Se acostumbra agrupar las enfermedades bacterianas en tres diferentes tipos de acuerdo con los síntomas que presentan las plantas afectadas, siendo estos: 1) marchitamiento como consecuencia de la invasión de los tejidos vasculares, obstruyendo los vasos conductores de nutrientes; 2) tizones, pudriciones y manchas foliares en los que el tejido parenquimatoso es destruido y, 3) un desarrollo exagerado celular llamado hiperplasia (Álvarez, 1979).

Los síntomas permiten en muchos casos identificar en forma práctica algunas enfermedades. En algunos casos las pudriciones bacterianas son de consistencia suave y frecuentemente malolientes (Álvarez, 1979). Cualquier tipo de síntoma puede ser causado por patógenos bacteriales de varios géneros y cada género contiene algunas especies capaces de causar diferentes tipos de enfermedades. Sin embargo, las especies de *Agrobacterium* pueden causar solamente agallas o proliferación de órganos. Por otro lado, especies de *Corynebacterium*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* también pueden causar agallas.

Algunas *Xanthomonas* inducen la formación de chancros, manchas, tizones foliares y marchitamientos vasculares (Castaño-Zapata, 1994).

a. Enfermedades bacterianas de las cucurbitáceas.

Existen más de 200 enfermedades de las cucurbitáceas de diferente etiología. El manejo efectivo de las enfermedades persigue tomar las mejores decisiones posibles para disminuir el riesgo de pérdidas severas durante el ciclo del cultivo. Las estrategias empleadas en el manejo de estas afecciones se basan principalmente en la prevención de la enfermedad y en métodos para disminuir el esparcimiento de la enfermedad.

Dentro de las enfermedades provocadas por bacterias en la familia cucúrbita se conocen: la mancha angular de la hoja, mancha del fruto, pudrición de la plántula, mancha bacterial de la hoja, necrosis de la cáscara del melón, pudrición común o suave, marchitamiento bacterial y pudrición parda (Martyn, *et al.*, 1993). A continuación, se mencionan los síntomas y características de las enfermedades bacterianas más importantes para melón.

1) Mancha angular de la hoja.

Esta es la enfermedad más común causada por bacterias en un amplio rango de cucúrbitas, tanto en lugares templados como en lugares húmedos y semihúmedos. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen en las hojas, infectándose posteriormente la fruta y contaminándose la semilla (Zitter *et al.*, 1996).

La mancha angular de las cucúrbitas es causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith and Bryan) (PSL) Young *et al.* Siendo esta una bacteria aeróbica, gram-negativa, que posee de uno a 5 flagelos polares y produce un pigmento verde fluorescente en el medio B de King. Se multiplica en los espacios intracelulares de las hojas y coloniza la superficie entera de la hoja, esparciéndose de planta a planta por salpicadura, insectos o herramientas contaminadas (Zitter, *et al.*, 1996).

a) Síntomas.

La mancha angular aparece como una pequeña lesión húmeda en las hojas. La lesión usualmente se expande hasta que es delimitada por las venas secundarias grandes de las hojas, lo cual le da una apariencia angular a la lesión como se muestra en las Figuras 2 y 3. Acompañando a la humedad que se observa en la lesión, también hay un exudado claro o lechoso que se colecta en una gota en forma de lágrima (por eso su nombre *lachrymans*) en la superficie baja de la lesión (Zitter, *et al.* 1996). El exudado se seca y forma una costra blanca delgada en o adyacente a la lesión. En las hojas las lesiones se secan, tornándose café y desprendiéndose de la hoja. En cultivos susceptibles las lesiones casi siempre tienen un margen amarillo mientras que en cultivos resistentes las lesiones son mucho más pequeñas sin el margen amarillo. Las hojas que están altamente infectadas se tornan amarillas entre las regiones de lesiones y más tarde tienen una apariencia agujereada, con manchas pequeñas distribuidas sobre la superficie de la hoja, (Figuras 2 y 3). Las lesiones también se desarrollan en pecíolos, tallos y frutas, en los cuales la costra blanca formada por el exudado también es evidente.

En la fruta las lesiones aparecen como manchas húmedas pequeñas y circulares de 1-3 mm de diámetro, comúnmente con un centro de color bronceado claro. La pudrición de la fruta puede penetrar profundamente, causando una pudrición interna que llega a los haces vasculares en la región placentar. La infección de la fruta causa humedad y coloramiento café de los tejidos infectados, frecuentemente predisponen al fruto a la pudrición suave bacteriana, causada por bacterias del género *Erwinia*. Las frutas que se infectan cuando inmaduras, llegan a ser deformes y curvadas.

Bajo buenas condiciones de desarrollo, las guías de cucúrbitas de crecimiento indeterminado como pepino, ayote y melones continúan creciendo lejos de las hojas viejas infectadas, produciendo suficientes nuevas guías para soportar el desarrollo normal de la fruta. Algunos tipos de pepino de crecimiento determinado, son atacados más severamente por mancha angular de la hoja. Ocasionalmente en infecciones severas, los ápices de las guías, son invadidos sistémicamente, apareciendo humedad y clorosis seguida por una detención en el crecimiento de la planta amarillamiento y dejan de crecer (Zitter *et al.*, 1996).

Figura 2. Manchas angulares típicas en el haz de la hoja del melón.



Fuente: Elaboración propia

Figura 3. Exudado acuoso característico de la mancha angular en el envés de la hoja de melón



Fuente: Elaboración propia

b) Organismo causal.

La bacteria que produce esta enfermedad, *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans es un organismo gram-negativo, de tipo bacilo que no forma esporas, mide 0.8 x 1-2 μm , y posee de uno a cinco flagelos polares para su motilidad. Como otros patovares de *P. syringae*, PSL produce un pigmento verde fluorescente difusible en medio sensible y tiene varias características distintivas del grupo *P. syringae*. Esta se distingue de otros patovares principalmente por su rango de hospederos en cucurbitáceas (Zitter *et al.*, 1996).

c) Ciclo de la enfermedad y epidemiología.

P. syringae pv. lachrymans es estable en la semilla y la contaminación puede permanecer en esta hasta la germinación, etapa en la cual los cotiledones se ven infectados. La bacteria coloniza la superficie de las hojas y al alcanzar poblaciones altas penetra por las estomas o heridas resultado de abrasiones, multiplicándose en los espacios intracelulares de las hojas. Es llevada de una hoja a otra y de una planta a otra por lluvia, insectos, trabajadores y maquinaria. La dispersión aumenta cuando el follaje está húmedo debido a lluvia o rocío. Los vientos en los suelos arenosos, que pueden llevar partículas de infección, son particularmente efectivos en la dispersión de la enfermedad, así como la irrigación con agua contaminada con la bacteria. Sobre la planta la bacteria es lavada desde las hojas a las flores y frutas jóvenes. La bacteria que alcanza los tejidos placentales se depositará en la semilla en desarrollo, donde infestará la cubierta de la semilla. *P. syringae* pv. lachrymans sobrevive en residuos de cultivos infectados y puede persistir alrededor de 2.5 años en hojas secas (Zitter *et al.*, 1996).

2) Pudrición bacteriana del fruto o mancha acuosa bacteriana del fruto.

Enfermedad bacteriana causada por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*, 1978), Hu *et al.*, 1991. Fue renombrada y ahora se le conoce como *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*, 1978; Willems *et al.*, 1992). El síntoma característico de la mancha acuosa bacteriana en la sandía es un color verde olivo oscuro en la superficie de los frutos. La lesión aparece como un área húmeda pequeña pero luego se expande rápidamente a toda la superficie del fruto. También puede causar pudrición de las plántulas recién germinadas.

a) Síntomas.

La mancha bacteriana del fruto en melón y sandía ocurre en plántulas de cucurbitáceas, en el tejido más suculento debajo de los cotiledones y las hojas. (Webb y Goth, 1965). Las lesiones en el hypocófito pueden resultar en daños y muerte prematura de las plántulas. Ambas lesiones son de apariencia acuosa, luego toman coloración café oscura y se extienden a lo largo de la vena principal. En las hojas verdaderas se observan manchas pequeñas oscuras y rodeadas por un halo clorótico muy pronunciado. En algunas especies se presentan lesiones en forma de V, desde el margen de la hoja hasta la vena principal, las cuales llegan a traslaparse constituyéndose en una importante fuente de inóculo. (Latin y Hopkins, 1995).

Los síntomas de plántulas y hojas en otras cucurbitáceas son similares a los de la sandía. Los síntomas en la fruta de melón consisten en hoyos empapados de agua en la superficie de la fruta, la sintomatología se observa mucho después de haberse producido la infección, se inicia con una pequeña lesión de apariencia grasosa en las áreas de mayor succulencia, las cuales se agrandan rápidamente y llegan a tomar una coloración verde oscura con márgenes irregulares, en pocos días pueden llegar a cubrir la totalidad de la superficie del fruto. Con la edad el centro de la lesión se puede tornar café y romperse (Latin y Hopkins, 1995).

Figura 4. Mancha bacteriana del fruto en melón, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*



Fuente: Schaad *et al.*, 1978

b) Ciclo de la enfermedad y epidemiología.

La enfermedad puede ser introducida al campo por semilla infectada, plántulas infectadas, melones y otras plantas pertenecientes a la familia de las cucurbitáceas, otros hospederos alternos.

Las plantulas enfermas que se llevan al campo comercial representan un alto potencial de inóculo, es la forma más común de dispersar la enfermedad, debido a las condiciones de temperatura y humedad relativa que se presentan en los invernaderos son las óptimas para el desarrollo y crecimiento de la bacteria (Latin y Hopkins, 1995).

3) Marchitamiento bacterial.

La marchitez bacteriana de las cucurbitáceas afecta a muchas especies de cucurbitáceas. Los pepinos y los melones son más susceptibles a la enfermedad. Poco se sabe sobre el agente causal *Erwinia tracheiphila* (Smith) Bergey, Harrison, Breed, Hammer & Huntoon. Su distribución es mayormente en Norte América, Asia, África y Europa.

a) Síntomas.

El síntoma más temprano de la enfermedad es dejar caer una o más hojas seguidas por la caída y el marchitamiento de todas las hojas de la vid infectada. La marchitez progresa a través de brotes laterales que involucran a toda la planta. Las hojas marchitas giran y se secan y los tallos infectados se vuelven pálidos y se vuelven suaves. Antes de marchitarse y secarse, las hojas de melón y pepino se vuelven de color verde opaco. Toda la planta se marchita 2 semanas después de la infección. Más tarde, las plantas marchitas se secan y mueren.

Figura 5. Planta de melón infectada con *Erwinia tracheiphila*, Marchitamiento Bacterial



Fuente: T.A. Zitter, Cornell University.

b) Ciclo de la enfermedad y epidemiología.

La bacteria puede sobrevivir 1-2 meses después de que la planta muere. Su supervivencia de la bacteria sobrevive el invierno en el tracto digestivo de los escarabajos adultos. En primavera, los escarabajos infectados se alimentan de hojas sanas propagando de nuevo la enfermedad, depositando las bacterias en los vasos de xilema. Después de esto, las bacterias se multiplican rápidamente produciendo polisacáridos, liga en abundancia y la formación de tilosa da como resultado el bloqueo del sistema vascular que dificulta el flujo normal de agua y nutrientes. Los escarabajos prefieren plantas marchitas para alimentarse, lo que resulta en un aumento en el número de escarabajos contaminados y mayor propagación de la marchitez bacteriana.

Es causado por *Erwinia tracheiphila*, causando síntomas variables en cada cultivo. Dentro de los síntomas característicos se incluye el marchitamiento de las guías del cultivo, las cuales exhiben lesiones como manchas de color café y luego se convierten en necróticas, proceso que es irreversible. Esta enfermedad puede aparecer en cualquier estado de la planta pero es más en plantas jóvenes.

4) Necrosis de la cáscara o corteza del fruto.

Es causada por *Erwinia* sp y *Erwinia carnegiana* (Standring, 1942), se nombró también como *Pectobacterium carnegiana* (Standring, 1942). En la sandía los síntomas causan una necrosis café y seca en el interior de una mancha anillada, aunque rara vez se extiende hacia la carne del fruto. El área afectada puede variar desde una pequeña mancha (2-3 mm diámetro) hasta la superficie entera. En algunos casos la necrosis es sistémica.

a) Síntomas.

El primer síntoma de la necrosis bacteriana de *carnegia* es una pequeña mancha circular coloreada, generalmente con un margen empapado de agua, en la superficie del tronco y las ramas. Debajo de la decoloración de la superficie, los tejidos parenquimatosos blandos se empapan de agua después de la invasión bacteriana y, posteriormente, de marrón a casi negro. A medida que la infección progresa, la mancha se agranda y adquiere un tono violáceo. En los casos en que la infección avanza rápidamente, la parte central de la mancha se rompe y exuda un líquido marrón. La rápida destrucción de los tejidos se acompaña de "sangrado", pero una descomposición interna más lenta puede preceder a la exudación. Los tejidos podridos se secan, se rompen en pedazos granulares a grumosos y caen al suelo, dejando desnudos los hilos estelares leñosos (Lightle, *et al.*, 1942).

5) Pudrición blanda bacteriana.

Enfermedad causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones, 1901) Bergey *et al.*, 1923. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones, 1901) Bergey *et al.*, 1923. El síntoma característico de esta enfermedad es la pudrición blanda del fruto, frecuentemente maloliente.

a) Síntomas.

Los primeros síntomas de la enfermedad en las plantas son el crecimiento deficiente y el amarillamiento de las hojas. Pequeñas lesiones empapadas de agua aparecen en los tubérculos y las bases del tallo. Si las condiciones favorecen el desarrollo de la enfermedad (cálida y húmeda), la lesión se agranda rápidamente y produce un decaimiento blando. A menudo comienza en el exterior de las bases de los pecíolos de las hojas debajo de la línea del suelo, y puede extenderse hacia adentro a cierta distancia a través de los tallos antes de que las hojas comiencen a amarillear.

Las podredumbres pueden progresar hacia arriba de los tallos, entubar las hojas, y también pueden progresar hacia los tubérculos. Las raíces se vuelven infecciosas transparentes y viscosas antes de descomponerse completamente.

La pudrición blanda se manifiesta como un área de la fruta empapada de agua, desarrollándose muy rápidamente para completar el ablandamiento y el colapso de los tejidos. Se ha informado de manchas marrones en los tipos de melón cantaloupe y honeydew. Las lesiones son típicamente lisas, firmes y de color amarillo-marrón. Las lesiones pueden extenderse de uno a dos milímetros en la epidermis, a veces ingresando a la cavidad de la fruta. Los síntomas son menos visibles en los melones de malla.

Figura 6. Pudrición blanda bacteriana causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* en cultivo de melón.



Fuente: Foto de Tom Isakeit, 1997

4. Unión de bacterias a la superficie de las plantas.

La unión de las bacterias a las superficies foliares y raíces de las plantas puede ser una colonización benéfica o causa de una enfermedad bacteriana. El proceso por el cual se lleva a cabo una colonización benéfica es muy diferente al proceso de infectividad, sin embargo, ambos casos dependen de la habilidad de producir polisacáridos (Rudolph *et al.*, 1994; Lindow, 1991) y de la movilidad, siendo estas características muy importantes tanto en la colonización benéfica como para iniciar una infección (Vande Broek and Vanderleyde, 1995). Es muy importante entonces conocer estos pasos de unión bacteria-superficie planta para facilitar el desarrollo de agentes efectivos en el biocontrol. Para un biocontrol eficiente, el agente de control debe competir por las mismas fuentes nutricionales en las mismas localidades. Debe también ocupar el mismo nicho que el microorganismo que controla, sin embargo, los micronichos de los distintos microorganismos son muy específicos siendo entonces muy pocos organismos que pueden ser utilizados en el biocontrol (Romantschuk, *et al.*, 1997).

La unión inicial de células bacterianas a la superficie de la hoja es frecuentemente caracterizada por una fase generalmente inespecífica y reversible, seguida normalmente por pasos irreversibles, que en ciertos casos es sumamente específica para algunas bacterias. Tanto la superficie de la planta como la superficie de la bacteria poseen cargas superficiales netas negativas en un ambiente acuoso y las fuerzas electrostáticas tienden a mantenerlas separadas. La célula bacteriana cargada negativamente se convierte en una barrera de energía para la unión con la superficie de la planta. Grupos positivos que se encuentran presentes en cualquiera de las superficies pueden funcionar como puentes iónicos de unión, así como cationes divalentes, o moléculas con las cuales se establezcan puentes de hidrógeno o fuerzas de van de Walls (3-4 Å). Adicionalmente sustancias hidrofóbicas en la superficie de la planta y regiones hidrofóbicas de las proteínas superficiales de las bacterias favorecen un contacto más cercano y llegan a facilitar las interacciones subsecuentes (Romantschuk, 1992).

Luego de la unión inicial “accidental” se llevan a cabo pasos de unión sumamente específicos de los cuales se conocen los detalles moleculares de reconocimiento de superficies de la planta hospedera de tan solo algunos sistemas. Varias estructuras superficiales bacteriales y moléculas liberadas por las bacterias aparentan tener la función de adhesinas. Estas estructuras incluyen: (a) proteínas, los filamentos y el pili (b)

polisacáridos, tales como fibras de celulosa y (c) pequeñas moléculas solubles tales como β -1-2-glucano (Romantschuk, 1992). En *Pseudomonas syringae* se ha visto que el pili y la habilidad de adherencia son un factor de virulencia directamente involucrado con la habilidad de colonización de la bacteria (Romantschuk, 1992).

5. Control de enfermedades bacterianas.

Los factores abióticos inductores de enfermedades pueden ser de naturaleza física o mecánica, siendo los más importantes luz, temperatura, humedad, aire, pH y desbalances nutricionales, entre otros (Agrios, 1991). Distintos organismos patógenos como bacterias, virus u hongos entre otros también son capaces de inducir diversas enfermedades en las plantas.

Lo ideal es proteger las plantas antes de que enfermen y no tener que tratarlas una vez que hayan sido infectadas. Sin embargo cuando ya se ha contraído la enfermedad es necesario, de ser posible, erradicar al patógeno o por lo menos disminuir su severidad para evitar pérdidas mayores en producción.

El método de control más eficiente implica el uso de compuestos químicos que son tóxicos a los patógenos. Estos compuestos inhiben la germinación, el desarrollo y la reproducción de los patógenos o bien son completamente letales a ellos. Dependiendo a qué patógeno estén dirigidos los agentes químicos o pesticidas se clasifican en: fungicidas (hongos), bactericidas (bacterias), viricidas (virus), nematocidas (nematodos), herbicidas (plantas parásitas superiores) (Agrios, 1991).

Existen compuestos químicos que controlan las enfermedades del follaje y los demás órganos de la planta que se encuentran por arriba del nivel del suelo, mientras que otros protegen las semillas, tubérculos y bulbos de las infecciones a los frutos. Aunque la gran mayoría de pesticidas son de acción local, también existen productos sistémicos que son absorbidos y translocados en el interior de las plantas (Agrios, 1991).

La mayoría de bactericidas tienen un efecto protector por lo que deben aplicarse sobre la superficie de las plantas que presentan los síntomas característicos del patógeno, para prevenir de esta forma la infección que este pudiera ocasionar. El contacto de bactericidas con las bacterias puede inhibir su propagación o bien ocasionar su muerte (Agrios, 1991).

Cuando el suelo está infestado de bacterias fitopatógenas, se puede esterilizar con vapor, calor o productos químicos tales como formaldehído y cloropicrina. Este tratamiento sólo es práctico y económico en invernaderos o áreas pequeñas de propagación (Agrios, 1991).

Las semillas contaminadas superficialmente pueden desinfectarse con hipoclorito de sodio, soluciones de HCl o sumergiéndolas durante varios días en una solución débil de ácido acético. Estos tratamientos son inefectivos cuando el patógeno se encuentra dentro de la cubierta de la semilla y en el estado embrionario. Es común que el tratamiento de las semillas con agua caliente no controle a las enfermedades bacterianas debido al punto térmico de muerte relativamente alto de las bacterias (Agrios, 1991).

Entre los productos químicos usados en aspersiones foliares los compuestos de cobre son los que han dado mejores resultados. Sin embargo aún estos productos no controlan bien a las enfermedades bacteriales si las condiciones ambientales favorecen el desarrollo y diseminación de la bacteria. Los productos frecuentemente empleados para el control de muchas manchas foliares y lesiones causadas por bacterias son productos a base de cobre y antibióticos, algunos de los cuales son absorbidos por la planta y se distribuyen sistémicamente. Estos productos se pueden aplicar como aspersiones o en inmersiones para trasplante. Los antibióticos utilizados en agricultura son formulaciones de estreptomicina y oxitetraciclina (Castaño, 1994).

En Guatemala existen relativamente pocos productos químicos efectivos contra bacterias que se utilizan en el cultivo del melón, limitándose mayormente a productos cúpricos y antibióticos. El control de bacterias en melón se lleva a cabo principalmente a base de antibióticos como el Agrimicin 100 y compuestos cúpricos a base de sulfato e hidróxido de cobre. Recientemente se han promocionado otros antibióticos como Bacter-Stop y Farmacina, aunque también han surgido compuestos de cobre como Phyton, compuestos a base de amonio cuaternario como Timsen, compuestos a base de extracto de cítricos como Kilol. Todos estos se denominan bactericidas, sin embargo su efectividad no ha sido evaluada. Casas distribuidoras de agroquímicos están promocionando para su aplicación en la agricultura compuestos utilizados comúnmente como desinfectantes en crianzas de animales, como es el caso del Vanodine, a base de yodo. Todos estos productos, si bien no han sido evaluados en melón para el control de bacterias, son conocidos agentes bacteriostáticos.

Es necesario e importante tener cuidado con la dosificación y mezcla de bactericidas y fungicidas, ya que la hoja de la planta de melón es muy sensible a la fitotoxicidad (Montes, 1991).

La resistencia de *Pseudomonas syringae* pv. tomato a cobres y a estreptomicina ha sido reportada en la literatura (Cooksey, 1990). Por esta razón hay que aplicar los productos que contienen estos químicos con consideración pues su uso indebido e indiscriminado provoca inducción de mecanismos de resistencia en las bacterias.

a. Agentes de control bacteriano.

El control químico de bacterias se lleva a cabo por dos agentes de control que son: (1) bactericidas, los cuales pueden ser compuestos orgánicos e inorgánicos; (2) antibióticos, que son compuestos antibacteriales producto de acción microbial. El uso de estos dos tipos de agentes de control se amplía a continuación.

La inhibición “*in vitro*” es muy distinta de la inhibición “*in vivo*”, así los bactericidas deben su efecto bactericida a varios factores. En el caso de bactericidas inorgánicos donde el Cu^{+2} es el agente tóxico, existe una inhibición directa del crecimiento bacteriano por muerte celular, siendo el cobre tóxico al incorporarse a la membrana celular. El cobre provoca la salida masiva de iones de potasio (K^{+}) y la entrada de Ca^{+2} y Cu^{+2} (Sigeo, 1991). En otros casos el bactericida no actúa directamente sobre la bacteria de manera que no

presenta inhibición “*in vitro*”, pero parece que de manera indirecta inhiben el desarrollo de la enfermedad, mediada a través del metabolismo de la planta. Un ejemplo de esto es el Probenazole, el cual actúa a través del proceso de reconocimiento planta-patógeno volviendo la interacción incompatible en *Pseudomonas syringae* (Sekizawa & Wakabayashi, 1990).

En la mayoría de los casos los agentes de control químico actúan a nivel de la superficie de la planta, más que de manera sistémica y controlan las enfermedades previniendo la colonización epifítica y la propagación de la bacteria. Los agentes antibacteriales químicos pueden controlar enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas por acción bacteriostática o bactericida.

Bacteriostasis o efecto bacteriostático: es el término utilizado para describir la inhibición de crecimiento por un agente cuando esta es medida bajo condiciones donde el crecimiento ocurriría normalmente. Este efecto es reversible cuando se remueve o neutraliza el agente ya que las células comienzan su crecimiento y reproducción (Bloomfiel, 1991, ed. Denyer & Hugo, 1991).

Efecto bactericida: ocurre cuando las células bacteriales que son expuestas a un agente no se pueden recuperar después de remover o neutralizar el agente. Esto es debido al proceso letal e irreversible que se lleva a cabo en la célula (Bloomfiel, 1991, ed. Denyer & Hugo, 1991).

Algunos agentes de control microbial poseen principalmente mecanismos de acción bactericida como el yodo y cloro, mientras que otros poseen efecto bacteriostático o efecto bactericida dependiendo de su concentración. Para evaluar los mecanismos de acción de estos agentes es importante considerar que un daño celular puede resultar en bacteriostasis, dependiendo de la habilidad de las células a recuperarse del daño producido (Bloomfiel, 1991, ed. Denyer & Hugo, 1991).

1) Factores que afectan la actividad bacteriana.

Una interpretación precisa de los resultados de inhibición bacterial dependen del entendimiento claro de los factores que afectan a la actividad antibacterial de los distintos agentes bactericidas en relación con los efectos bioquímicos. En muchos casos estos factores se investigan a fondo al tratar de elucidar los mecanismos de acción. Los factores que afectan la actividad antibacterial son:

a) Concentración de agentes antibacterianos.

La actividad de los agentes antibacterianos puede ser afectada profundamente por cambios relativamente pequeños en la concentración. El exponente de concentración (η) usado para análisis cuantitativos da una relación entre la actividad y concentración. El exponente de concentración para bactericidas como amonio cuaternario es de 1; para fenoles es de 6 y para alcoholes de 10, lo que indica que tiene mayor actividad antibacteriana (Denyer & Hugo, 1991).

b) Temperatura.

La actividad de los agentes antibacteriales usualmente aumenta geométricamente con el incremento de temperatura, sin embargo, también aumenta la reproducción bacteriana con el aumento de esta.

c) Número de organismos (concentración de bacteria).

En general la actividad del agente antibacteriano disminuye al aumentar la cantidad del inóculo. El efecto de este factor varía dependiendo de los diferentes agentes antibacteriales, pero es importante que los estudios de actividad antibacteriana se lleven a cabo con la misma concentración de bacteria (Bloomfield, 1991, ed. Denyer & Hugo, 1991).

d) pH del medio.

El pH del medio puede afectar la actividad antimicrobiana de varias maneras: (1) Afectando la actividad del agente antimicrobiano, algunos agentes son ácidos débiles o bases débiles y se ha observado que la mayoría de los agentes son más activos en su forma no iónica, dependiendo la actividad de éstos en el pKa, en relación con el pH del medio en suspensión; (2) Produciendo cambios en la distribución de cargas en la superficie de la membrana de la célula bacteriana y afectar así el ingreso de agentes antibacterianos que posean algún tipo de carga (Bloomfield, 1991, ed. Denyer & Hugo, 1991).

e) Constituyentes del medio en suspensión.

Todos los constituyentes del medio en suspensión deben ser considerados factores que intervienen en la actividad antibacteriana. Por ejemplo, la materia orgánica tiene un efecto neutralizante sobre formulaciones desinfectantes. En general los agentes que poseen una tensión superficial por debajo de la concentración crítica de la micela (CMC) tienen un efecto surfactante en la superficie de la célula y aumentan la permeabilidad. Agentes que provoquen concentraciones mayores que el CMC producen una reducción de la concentración del agente antibacteriano en la fase acuosa dando como resultado una disminución en la actividad antibacteriana. Los cationes metálicos y agentes quelantes como EDTA pueden tener un efecto marcado en la actividad (Bloomfield, 1991, ed. Denyer & Hugo, 1991).

f) Otros factores.

Más que todo en los estudios “*in vitro*” deben de considerarse muchos otros factores que dependen de cada análisis en particular. Investigaciones de laboratorio sugieren que se pierde la actividad de los agentes como un resultado de la adsorción de éstos en las superficies de los recipientes. También se debe considerar como reductores de la sensibilidad frente a bactericidas, al crecimiento de organismos como biofilms en las superficies del vidrio (Denyer & Hugo, 1991).

2) Factores que afectan la actividad bacteriana frente a bactericidas.

La susceptibilidad de las bacterias frente a distintos agentes bactericidas, la cual se representará en los resultados como área de inhibición “*in vitro*”, depende de varios que

deben ser considerados cuando se desea hacer una comparación de control bacteriano entre los agentes antibacteriales. Dentro de estos factores están:

- Especie del microorganismo.
- Composición química del microorganismo.
- Fase de crecimiento, especialmente en lo que concierne a la variación en susceptibilidad de las células jóvenes comparada con la de células viejas, o diferencias entre células de la misma edad. Las bacterias jóvenes, por lo general son más susceptibles que las viejas.
- Estructuras especiales: Esporas, cápsulas, pilis.
- Antecedentes del cultivo: pueden seleccionarse las formas resistentes u originarse por la exposición gradual a los agentes tópicos.
- Variación bacteriana por diferencias en susceptibilidad.
- Número de bacterias en la muestra de prueba (concentración bacteriana).
- Temperatura ambiental.
- Concentración del agente bacteriostático.
- Composición química del agente bacteriostático, propiedades físicas y modo de acción.

Es obvio que, si tantos factores influyen en la susceptibilidad frente a los agentes bactericidas, es muy difícil escoger el mejor método o conseguir las condiciones óptimas para evaluar el efecto bacteriostático. Debe recordarse también que estos factores se refieren al uso de los agentes químicos y bacterias en un ambiente “*in vitro*” y que cuando se prueban éstos “*in vivo*”, existen otros muchos factores que deben considerarse y que afectan en la respuesta frente a los agentes bactericidas.

3) Desventajas del uso de agentes químicos de control.

El uso de agentes químicos de control tiene varias desventajas, que son: costo y efectividad, efectos ambientales, fitotoxicidad, desarrollo de resistencia e inaccesibilidad al patógeno; a continuación, se amplía cada uno de ellos.

a) Costo y efectividad.

Especialmente cuando se aplican antibióticos, estos deben ser previamente evaluados contra la bacteria a tratar, para asegurar su control efectivo ya que son efectivos únicamente sobre un grupo reducido de bacterias. Se requiere de un plan de aplicación controlado y bien establecido, previo al tratamiento, y aún más debe considerarse el costo de los antibióticos pues está muy por encima de los demás compuestos bactericidas. El uso de compuestos de cobre debe seguir un plan de aplicación bien controlado también ya que la ineffectividad del tratamiento se debe en su mayoría de veces por aplicaciones fuera de tiempo (Legard & Schwartz, 1987). Más aún en la época de invierno, la acción de los bactericidas se ve disminuida debido a que las aplicaciones se diluyen con las lluvias. Todos estos factores aumentan los costos y disminuyen la efectividad antibacterial (Siegee, 1990).

b) Efectos ambientales.

El tratamiento con agentes químicos de control es mayormente no selectivo, causando una erradicación general que incluye organismos patógenos como no patógenos. Los no patógenos pueden ser organismos benéficos de actividad antagónica, componentes del control natural de los microorganismos patógenos (Siegee, 1990).

c) Fitotoxicidad y peligros al consumidor.

El uso de tratamientos inorgánicos como compuestos que contienen cobre y antibióticos puede causar daño a la planta de cultivo y puede contaminar la superficie o el interior de esta, provocando que este producto no pueda ser consumido por hombres o animales. Es por esta razón que productos diversos como el mercurio y DDT han sido prohibidos en el pasado (Siegee, 1990).

d) Desarrollo de resistencia.

Una de las mayores limitaciones en el uso de antibióticos o compuestos inorgánicos es el comprobado desarrollo de resistencia bacterial. Casos específicos de resistencia en el grupo de *Pseudomonas syringae* puede encontrarse en el patovar tomate resistentes a compuestos de cobre (Bender & Cooksey, 1986) y cepas de *patovar papulans* resistentes a estreptomycin (Burr, *et. al* 1988). La resistencia a antibióticos adquirida por bacterias (fitopatógenas y no patógenas) debido al uso frecuente de antibióticos en forma de spray representa también un riesgo potencial ya que es posible la transferencia de resistencia hacia bacterias patógenas de animales y humanos (Siegee, 1990).

e) Inaccesibilidad al patógeno.

Con algunos agentes de control, las aplicaciones a través de aspersiones son efectivas únicamente si la bacteria a la cual debe controlar infecta en la superficie de la planta ya que de otra manera el producto no entra en contacto con el organismo a controlar. Si el fitopatógeno es inaccesible al contacto directo con el bactericida es necesario utilizar otros métodos de control (Siegee, 1990). Este caso es representativo de pudriciones bacteriales que ocurren en las partes subterráneas de muchos cultivos, tales como pudriciones por *Erwinia* y roñas por *Streptomyces*.

4) Compuestos neutralizantes de agentes bactericidas.

Existen algunos compuestos que, al encontrarse en solución durante la evaluación del efecto de los distintos bactericidas, pueden llegar a inactivarlos y favorecer la recuperación de las bacterias. En el Cuadro 5. se muestra una lista de agentes inactivantes para los agentes bactericidas.

Cuadro 5. Agentes inactivantes para algunos agentes bactericidas

Agente antimicrobial	Agente inactivante o neutralizante
Fenoles o cresoles	Diluciones, Tween 80
p-hidroxibenzoatos	Diluciones, Tween 80
Cloruros e Ioduros	Tiosulfato de sodio, sulfato de sodio, caldo nutritivo
Glutardehido, Formaldehido	Glicina, Dimedona y morfolina
Compuestos amonio cuaternario	Lubrol y lecitina,
Clorohexanos	Tween 80 y lecitina
Compuestos de mercurio	Ácido triglicólico
Bronpol	Cisteína

(Denyer & Hugo, 1991)

6. Mecanismos de acción de compuestos químicos en el control de bacterias.

Existen diversos mecanismos por los cuales los agentes químicos lesionan las células bacterianas “*in vitro*”. Entre estos mecanismos se incluyen: (1) destrucción o desintegración de su organización, (2) interferencia en la síntesis de proteínas y el crecimiento y (3) interferencia sobre el uso de energía (Cooksey, 1990). Existe un gran número de productos químicos que coagulan las proteínas, como por ejemplo, las existentes en el protoplasma celular. La acción de los metales pesados parece actuar sobre la actividad enzimática (Pfizer, 1992). Sin embargo se desconocen los mecanismos detallados mediante los cuales actúan la mayoría de los compuestos químicos sobre el control de las enfermedades bacteriales en las plantas. Es probable que algunos de estos compuestos disminuyan el grado de las infecciones al incrementar la resistencia del hospedero ante el patógeno (alterando la constitución de la pared celular del hospedero, limitando la disponibilidad de coenzimas esenciales o alterando la velocidad de dirección de su metabolismo) (Cooksey, 1990).

La mayoría de los compuestos químicos se aplican debido a su toxicidad directamente sobre los patógenos y son efectivos sólo como sustancias protectoras a nivel de los puntos de entrada a la planta de estos últimos. Dichos compuestos inhiben la síntesis de algunas sustancias de la pared celular del patógeno o bien actúan como disolventes de sus membranas celulares. Pueden también formar complejos químicos con algunas de sus coenzimas esenciales, inactivándolas de esta manera o bien inactivan las enzimas, produciendo así la precipitación general de sus proteínas. Es importante conocer el modo de acción del agente bactericida con el que se trabaje para que tanto su aplicación como efecto sobre la bacteria sean conocidos y se pueda optimizar el control bacteriano.

a. Antibióticos.

Son generalmente considerados como compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por unos microorganismos y son tóxicos a otros grupos de ellos; a bajas concentraciones pueden inhibir actividades metabólicas de los mismos (Fravel, 1988). La mayoría de los antibióticos que se conocen en la actualidad son sustancias producidas por actinomicetos y algunos hongos como el *Penicillium*. Estos compuestos son bastante tóxicos a las bacterias, incluso a los espiroplasmas, fitoplasmas y algunos hongos. Las fórmulas químicas de los antibióticos son complejas y casi siempre sin relación entre ellas.

Los antibióticos son absorbidos y translocados sistémicamente por las plantas actuando sobre el patógeno o directamente sobre el hospedero (Todar, 1996).

La mayoría de microorganismos que producen antibióticos son resistentes a la acción de sus propios compuestos, aunque éste sí puede actuar contra líneas bacterianas cercanas, sin embargo, pueden ser afectados por otro tipo de antibiótico. El mecanismo por el cual una bacteria es resistente al antibiótico producido por ella no es conocido (Todar, 1996).

1) Modo de acción.

En general los antibióticos combaten a la bacteria inhibiendo su reproducción. Su acción bactericida es muy efectiva, sin embargo, se ha demostrado que las bacterias logran adquirir resistencia a éstos y en estos casos la dosis mínima efectiva tiene que ser mayor cada vez. Las colonias de bacterias resistentes a antibióticos no evolucionan independientemente, pero se ha descubierto que son capaces de transmitir información de generación en generación (Cooksey, 1990).

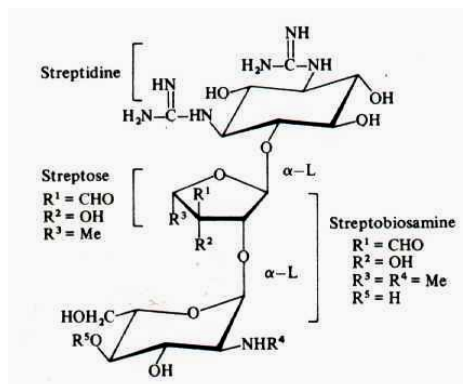
En los organismos gram-positivos la pared celular está compuesta en un alto porcentaje por polímeros mucopéptidos con azúcares aminados unidos a polipéptidos. Estos mucopéptidos contienen ácido N-acetil murámico el cual está unido a un difosfato, normalmente uridina. La mayoría de antibióticos que, como la penicilina, son producidos por fermentación o semisíntesis, parecen actuar de manera similar. Los antibióticos son absorbidos por la pared celular e inhiben las enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular. Existe una colección de precursores de la pared celular como nucleótidos de cistidina y uridina, resultando en una inhibición de la síntesis de ácido murámico. Todo esto da como resultado una bacteria desnuda, carente de pared celular y poseedora solamente membrana celular, llamada protoplasto. El protoplasto vive y posee metabolismo, pero no es capaz de multiplicarse y reproducirse (Gebhardt & Anderson, 1965).

a) Estreptomina.

La estreptomina, descubierta en 1943 por Albert Schatz, es producida por el actinomiceto *Streptomyces griseus*. (Schatz, *et al.*, 1944). La estreptomina para usos agrícolas o el sulfato de este antibiótico se vende bajo el nombre de Agrimicina, Fitomicina, Orto-estreptomina y Agri-step; teniendo todos estos productos una gran actividad sobre una amplia variedad de bacterias fitopatógenas. La estreptomina se encuentra clasificada dentro de los amiloglicósidos, cuya estructura se muestra en la Figura 7.

La estreptomina elimina a dos tipos importantes de bacterias como lo son *Mycobacterium tuberculosis* y *Haemophilus influenzae*, ninguna de las cuales es afectada por la penicilina. Este antibiótico tiende a inducir cepas estreptomina-resistentes. El uso de este antibiótico como tratamiento para una enfermedad específica es impredecible. La estreptomina es frecuentemente utilizada junto con las sulfonamidas y también como una ayuda en terapias de penicilina en ciertas enfermedades (Gebhardt & Anderson, 1965).

Figura 7. Estructura de la Estreptomina.



(Wallace, *et. al.* 1979)

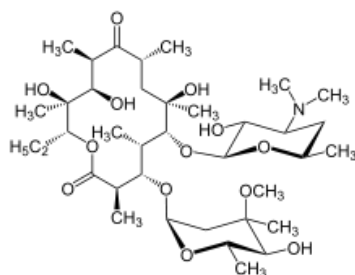
La estreptomina probablemente tiene dos o más mecanismos de acción para eliminar microorganismos. Este antibiótico daña la membrana celular y también interfiere en la síntesis proteica. El daño a la membrana celular permite la pérdida de potasio, aminoácidos y de 5'-ribonucleótidos. Indudablemente la estreptomina debe también alterar o destruir el sistema enzimático de la síntesis de proteínas o actuar directamente sobre los ribosomas (Gebhardt & Anderson, 1965).

El mecanismo por el cual la estreptomina y otros amiloglicósidos causan la muerte bacteriana fue examinado por Davis en 1987, donde él propone que: 1. Una pequeña cantidad de antibiótico ingresa a la célula por un mecanismo desconocido y causa una lectura errónea en los ribosomas; 2. La proteína originada de esta mala lectura es incorporada dentro de la membrana citoplasmática creando canales que permiten que más moléculas de antibióticos ingresen a la célula y aumenten el efecto; 3. La concentración de antibiótico alcanza niveles que llegan a bloquear la síntesis futura de más proteínas; 4. El bloqueo irreversible del ribosoma resulta en la muerte de la célula, aunque este modo de acción es sólo una teoría propuesta (Franklin & Snow, 1989).

b) Eritromicina.

Es un antibiótico producto metabólico de *Streptomyces erythraeus*, descubierto en 1952 por Mc Guire *et al.*, Es extremadamente activo contra las bacterias tipo cocos gram positivos e inhibe también algunos bastones gram-negativos. Es moderadamente activo a ciertas cepas de microorganismos los cuales se han vuelto resistentes a la penicilina y estreptomina. La actividad antibiótica se pierde a pH 6 o menores y por encima de pH 8.0 (Gebhardt & Anderson, 1965).

Figura 8. Estructura de la Eritromicina.



(Mc Guire *et al.*, 1952)

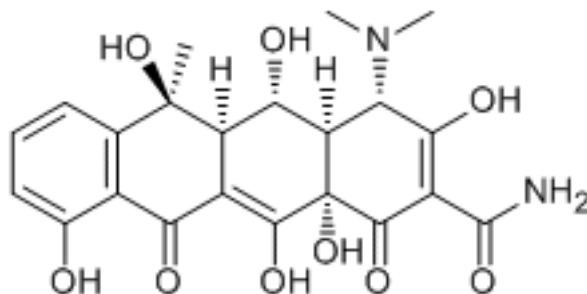
c) Oxitetraciclina.

Producto del metabolismo de *Streptomyces rimosus*, un antibiótico de la familia de las tetraciclinas, se da a conocer en 1950 por Finlay *et al.* La nomenclatura genérica de estos compuestos se deriva de las sustituciones de 4 anillos en el núcleo hidronaftaceno. La oxitetraciclina tiene el grupo oxidrilo en la posición 5. Robert B Woodward, trabajo en su estructura química.

La oxitetraciclina es fundamentalmente un bacteriostático y se cree ejerce su efecto antimicrobiano debido a que inhibe la síntesis de proteínas; sin embargo a altas concentraciones se observa un efecto bactericida. Es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro que ejerce su acción por inhibición de la síntesis proteica impidiendo la relación codón-anticodón bajo la dirección del ácido ribonucleico mensajero. El antibiótico penetra en el interior de la planta a través de los estomas de las hojas trasladándose rápidamente al resto de los tejidos; a la célula bacteriana accede por difusión pasiva y transporte activo. Una vez en el interior de la célula se une a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano bloqueando la fijación del aminoacil-tRNA al sitio aceptor (A) del complejo formado por el mRNA y la subunidad 50S del ribosoma. Su actividad bacteriostática se basa en que impide la adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento.

La oxitetraciclina es activa contra una variedad de organismos Gram-positivos y gramnegativos. Los medicamentos del grupo de las tetraciclinas tienen espectro antimicrobiano similar, siendo comunes las resistencias cruzadas entre ellas (Rodríguez, *et al.* 1998).

Figura 9. Estructura de la Oxitetraciclina.



(Finlay *et al.* 1950., Robert B Woodward)

2) Resistencia bacterial.

Existen dos categorías de resistencia: intrínseca (insusceptibilidad intrínseca) y adquirida. El término de resistencia intrínseca es utilizado para aquellos casos en los cuales son partes inherentes de las células las responsables de prevenir la acción antimicrobial. La resistencia adquirida, en contraste, es aquella en la que células originalmente susceptibles originan cepas resistentes. Esta resistencia se puede deber a la incorporación de plásmidos y transposones o por mutaciones cromosomales (Chopra, 1991).

La resistencia adquirida por bacterias a antibióticos ha sido demostrada plenamente (Kagiwata, 1991). Organismos que antes eran sensibles a cierto antibiótico, llegan a tornarse resistentes al compuesto químico con la exposición repetida al mismo. En la resistencia adquirida se dan cambios en el genoma bacterial, llevándose a cabo por dos procesos dentro de la bacteria: (1) mutación y selección, normalmente referida como una evolución vertical y, (2) intercambio de genes entre especies, normalmente llamada evolución horizontal (Todar, 1996).

Una de las formas más comunes como una bacteria puede volverse resistente a determinado antibiótico es inactivando al bactericida o impidiendo el ingreso de éste a la célula (Cooksey, 1990). En *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* se reportó resistencia a estreptomycin a finales de los ochenta (Burr, *et al.* 1988).

Antibióticos y químicos utilizados en dosis subletales para el crecimiento bacterial provocan la selección de cepas de microorganismos resistentes, siendo necesarias dosis mayores de antibióticos o químicos para inhibir su crecimiento. Algunas veces esta resistencia a las drogas se incrementa hasta 10 o 20 veces más que la dosis inicial. Así, cuando un organismo inicialmente susceptible a dos microgramos de estreptomycin es expuesto continuamente a dosis de uno y medio microgramos, las colonias sobrevivientes logran adquirir resistencia hasta 10 y 20 microgramos de estreptomycin. Algunas cepas resistentes pierden características normales como la producción de pigmento, actividad enzimática, aunque sigan siendo patogénicas (Geebhardt & Anderson, 1965).

b. Compuestos de cobre y metales.

Roberto Koch observó la acción nociva de algunos metales cuando se encuentran en solución acuosa que penetran la membrana microbiana por el fenómeno de ósmosis y modifican el protoplasma. En ciertos casos esta acción se ejerce aún en proporciones infinitesimales, como lo demostró Naegeli al estudiar las propiedades nocivas del agua destilada que contiene aún trozos de diversos metales (plata, cobre, etc.). A este fenómeno se denominó fuerza oligo-dinámica. Estudios recientes han permitido establecer que en el agua se encuentran además de cobre, otros metales en cantidades de 0.00005 mg de metal por ml (Pfizer, 1992).

La pasta bordelesa conocida como caldo bordelés, es el producto de reacción entre el sulfato de cobre y el hidróxido de calcio, controlando la mayoría de manchas foliares bacterianas, aunque puede ocasionar quemaduras en las hojas y frutos. La fitotoxicidad de

la pasta bordelesa disminuye al incrementar la proporción de cal con respecto al sulfato de cobre. Para controlar enfermedades bacterianas también se pueden utilizar compuestos que contengan el cobre fijado, como oxiclورو de cobre, hidróxido de cobre y sulfato básico de cobre. Bactericidas que contienen hidróxido cúprico tienen la ventaja de ser solubles en agua.

Dentro de las marcas comerciales de bactericidas para melón que contienen cobre están: Phyton 27 (sulfato de cobre pentahidratado) Kocide (hidróxido de cobre) y Agrimicin (sulfato de cobre tribásico + estreptomycin y oxitetraciclina).

1) Modo de acción.

En el caso de bactericidas inorgánicos donde el Cu^{+2} es el agente tóxico existe una inhibición directa del crecimiento bacteriano llevando consigo la muerte celular. El cobre es tóxico al incorporarse a la membrana celular, lo cual provoca la salida masiva de iones de potasio K^+ y la entrada de Ca^{+2} y Cu^{+2} (Sige, 1991).

Según algunos reportes recientes de la literatura, la inhibición del crecimiento bacteriano a través del método de difusión discal no ha tenido muy buenos resultados para estudios con compuestos cúpricos, sin embargo, esta es clara a través del método de contacto (Kagiwata, 1992).

2) Resistencia bacterial.

Los bactericidas han sido utilizados para el control de enfermedades en plantas por varias décadas, sin embargo la resistencia a bactericidas por parte de las bacterias patógenas no fue estudiada detenidamente sino hasta mediados de la década de los ochenta, cuando fue detectada la resistencia al cobre en *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Bender & Cooksey, 1986).

Mientras que los mecanismos de resistencia a antibióticos han sido de cierta manera comprensibles y objeto de estudio de muchos (Foster, 1983; Chopra, 1988), se sabe poco acerca de las bases genéticas y bioquímicas de los mecanismos de resistencia para otros agentes antibacteriales como lo son desinfectantes, antisépticos e iones metálicos. Sin embargo en años recientes ha aumentado el interés y conocimiento de estos procesos sobre agentes no-antibióticos.

La resistencia a cobres determinada por el plásmido pPT23 para *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Bender & Cooksey, 1986) sobre la cepa PT14 se evaluó con el agente bactericida Kocide 101, comprobando la resistencia adquirida de estas (Cooksey, 1990).

La forma como las células de *Pseudomonas syringae* pv. tomato se tornan resistentes al cobre es a través de la acumulación de este metal afuera de las células por medio de proteínas periplásmicas ligadoras de cobre (Cooksey, 1991). La resistencia a cobre implica una disminución en la incorporación de este metal al interior de la célula, ya sea por la desensibilización de la membrana a este compuesto o por evacuación del cobre a través de proteínas reguladoras ligadoras de cobre. Esta incorporación ha sido comparada contra

una incorporación normal en células susceptibles y se ha observado que estas últimas incorporan hasta tres veces más este metal (Cervantes & Silver, 1996).

c. Iódoforos.

Los iodóforos son aquellas sustancias que se producen cuando reacciona el yodo con surfactantes etoxilatados, los cuales se estabilizan por lo general con ácidos o tampones ácidos. Son sustancias solubilizadoras del yodo que actúan como portadoras de la molécula del yodo. Esta mezcla permite obtener un producto con todas las características microbicidas del yodo, pero suprimiendo sus efectos indeseables. La potencia microbicida del yodo en un iodóforo depende de poder obtener un complejo adecuado del yodo con el solubilizante y sobre todo preservar la estabilidad de la molécula para que el yodo pueda actuar de manera libre (Pfizer, 1992).

Los iodóforos poseen un espectro de actividad muy amplio frente a bacterias, esporos, microbacterias, hongos y virus, por lo que han sido ampliamente utilizados.

1) Modo de acción.

El yodo (I_2) es uno de los germicidas más potentes conocidos. Su acción es muy rápida, pero en contacto con suero, sangre o tejidos precipita las proteínas y se transforma en yoduro inactivo.

En el compuesto Vanodine, el yodo forma un complejo con el portador, llamado núcleo, de tal forma que se liga al solubilizante en forma de agregados micelares, dentro de los que el yodo queda atrapado cuando el complejo se pone en solución. El yodo es liberado lentamente hacia el exterior por dispersión micelial rompiéndose las ligaduras que sostienen el yodo. El yodo pasa a la fase acuosa en forma molecular I_2 , su forma activa microbicida. Esta fracción liberada se denomina yodo libre y es aproximadamente el 80% del yodo total contenido en el complejo. Por ser poco soluble en agua el yodo se prepara en soluciones alcohólicas o en forma de derivados más solubles.

Esta manera particular de retener el yodo dentro del complejo permite una menor pérdida del yodo (expresada en una menor presión de vapor) reducción del olor característico del yodo, disminución de la reactividad con metales y de la capacidad de coloración. El tiempo de actividad aumenta y la solubilidad en agua es excelente (Pfizer, 1992).

El yodo actúa disminuyendo los requerimientos de oxígeno de los microorganismos aerobios, interfiriendo a nivel de la cadena respiratoria por bloqueo del transporte de electrones a través de reacciones electrofílicas con enzimas. También interactúa preferentemente con las proteínas de la membrana citoplasmática de las bacterias, precipitándolas (Rodríguez, 1998).

2) Resistencia bacterial.

No se ha determinado la resistencia a yodo para las bacterias del género *Pseudomonas* (Rodríguez, 1998).

d. Derivados del amonio cuaternario.

Son bactericidas de amplio espectro. Estas sustancias poseen como estructura básica el propio amonio NH_4 en el que cada H es sustituido por cuatro radicales R_1 , R_2 , R_3 y R_4 . Fueron desarrollados desde 1935 (Rodríguez, 1998).

Este grupo de desinfectantes es muy conocido y muy utilizado, pertenece al tipo de productos germicidas-detergentes por su actividad surfactante que permite una acción emulsificante y humectante. Como es un desinfectante catiónico, se disocia en solución y adquiere una electro-carga positiva, combinándose por este motivo con proteínas, grasas y algunos fosfatos. Esta característica lo hace menos efectivo en presencia de materia orgánica y aguas duras. No debe entrar en contacto con jabones ya que éstos son surfactantes aniónicos (electro-carga negativa) y se inactivan mutuamente. Son bactericidas efectivos contra gram positivos y gram negativos, pero para estos últimos se requieren mayores concentraciones; no son fungicidas y los virus son resistentes (Pfizer, 1992).

1) Modo de acción.

El mecanismo de acción consiste en producir cambios en la permeabilidad de la membrana celular produciendo pérdida de los componentes esenciales y, por lo tanto la muerte de las bacterias. En solución esta molécula se disocia en dos partículas, el anión X^- y el catión que involucra al N^+ , en la parte catiónica existe una parte no polar, hidrofóbica, que son las cadenas carbonadas representadas por R_1 , R_2 , R_3 y R_4 y otra parte cargada eléctricamente, hidrofílica, el N^+ . Para que la actividad antibacteriana sea notable debe haber un correcto balance entre la porción hidrofílica y la hidrofóbica. Para esto, uno de los grupos R debe tener un largo de cadena entre 8 a 18 átomos de carbono (Rodríguez, 1998).

Cuando las bacterias son expuestas a agentes de este tipo, el grupo cargado positivamente se asocia con los grupos fosfatos, cargados negativamente, de los fosfolípidos de la membrana, mientras que la porción no polar penetra hacia el interior hidrófobo de la membrana. Esto provoca la desorganización de la membrana que altera su característica de permeabilidad selectiva. Se pierde el contenido intracelular a la vez que puede ingresar el amonio cuaternario y tiene entonces además acción sobre las proteínas desnaturalizándolas.

La actividad de los compuestos de amonio cuaternario es mayor con un pH alcalino y se reduce en presencia de materia orgánica por reacción química o por fenómeno de adsorción. Tienen el inconveniente de absorberse sobre sustancias como algodón, caucho y materiales porosos (Pfizer, 1992).

2) Resistencia bacterial.

Varios compuestos activos derivados del amonio cuaternario poseen menos capacidad inhibitoria sobre *Pseudomonas* spp. que sobre *Bacillus* spp., debido a la presencia de lipoproteínas y lipopolisacáridos en la capa externa del peptidoglicano. En *Pseudomonas*

spp., un contenido más alto de fosfolípidos y lípidos neutros, incrementa la resistencia a estos productos (Rodríguez, 1998).

Los compuestos del amonio cuaternario han sido bien documentados por su eficacia y facilidad de uso. Generalmente no son caros y proporcionan buenos resultados en el medio ambiente de la planta de incubación. Estos no tienen efecto residual cuando son utilizados en superficies difíciles. El mayor y único problema con su uso es que no muestran una destrucción uniforme contra *Aspergillus*; también han tenido problema para el tratamiento de *E. coli* y *Pseudomonas*, lo que generalmente lleva a aumentar las dosis de aplicación, no siendo esto la solución adecuada (Spielholz, 1999).

Se sospecha que los compuestos de amonio cuaternario desarrollan microorganismos resistentes a ellos después de largos períodos de uso. Esto es una situación obvia cuando los mismos microorganismos empiezan a reaparecer y se tornan cada vez más difíciles de eliminar. Habitualmente *E.Coli*, *Pseudomonas* y *Aspergillus*. Los fabricantes de estos compuestos han tratado de eliminar este problema agregando cadenas cuaternarias adicionales. Los fabricantes se refieren a estas mejoras en sus compuestos como “segunda”, “tercera”, “cuarta” o “nueva generación” de cuaternarios (Spielholz, 1999).

Ha sido reportada la resistencia bacteriana determinada por plásmido a varios cationes orgánicos sobre *Staphylococcus aureus* (Lyon & Skurray 1987).

C. Bactericidas evaluados sobre *Pseudomonas syringae* pv. cucubrita en melón

En Guatemala existen relativamente pocos productos químicos efectivos contra bacterias, que se utilizan en el cultivo del melón, limitándose mayormente a productos cúpricos y antibióticos. El control de bacterias en melón se lleva a cabo principalmente con bactericidas a base de antibióticos como estreptomycin y tetraciclina, así como bactericidas con compuestos de cobre a base de oxiclورو de cobre e hidróxido cúprico. Últimamente casas comerciales han promocionado bactericidas alternativos que puedan ser utilizados junto con los anteriores o incluso substituir a stos. Dentro de los nuevos bactericidas se encuentran productos que poseen extractos naturales de cítricos como el Kilol, bactericidas con base de amonio cuaternario como el Timsen y bactericidas con base de yodo como el Vanodine. Estos últimos son productos relativamente nuevos a los cuales es necesario evaluar y comparar su efecto bactericida. A continuación se describen los principios activos de manera general y la composición química de cada producto bactericida.

También es de mucha importancia conocer el modo de acción el agente bactericida para conocer su relación con el medio ambiente y los efectos secundarios que puede ocasionar su uso irracional. En el Cuadro 6 se muestran los bactericidas incluidos en el presente estudio y a los cuales se evaluará su efecto bactericida “*in vitro*” sobre *Pseudomonas syringae* aisladas del melón. En ella se describe el porcentaje del principio activo en cada formulación y la dosis recomendada por la casa comercial distribuidora del producto. A esta concentración se trabajarán los análisis.

Cuadro 6. Cuadro de composición y dosis recomendada de los bactericidas a ser analizados en el estudio “*in vitro*” de inhibición de crecimiento bacterial.

Bactericida	Compuesto activo	% P/P	Dosis recomendada
Agrimicin 100	Sulfato de estreptomycin	15.0	prevenir 200 ppm (120 g/100 l)
	Oxitetraciclina	1.5	
Bacter-Stop	Sulfato de estreptomycin	12.6	1 kg/ 1000 litros
	Oxitetraciclina	6.7	
Farmacina	Clorhidrato de oxitetraciclina	6.03	200 g/100 litros
Kocide	Hidróxido cúprico	77.0	1.75 a 2.5 kg/ha
Phyton 27	Sulfato de cobre . 5H ₂ O	24.0	1.5 cc/litro
Timsen	n-alkil dimetil bencil amonio	40.0	400 ppm (1g/litro de agua)
Vanodine	Yodo	5.0	1 ml/750 ml
Kilol L DF 11%	Extracto de semilla de cítricos	11.0	2.5-5 ml/l de agua (1.5 a 3 l/Ht)

1. Antibióticos

a. Agrimicin 100

Es una formulación basada en sulfato de estreptomycin y terramicina (oxitetraciclina) no estériles, adecuadamente diluidos para controlar y prevenir las enfermedades de las plantas producidas por bacterias y por algunos hongos. Actúa de forma sistémica con lo cual se obtiene una protección interna y externa de la planta. La terramicina aumenta la efectividad de la estreptomycin y ayuda a retardar el desarrollo de las bacterias resistentes. La estreptomycin, además de ser bactericida, inhibe el desarrollo de muchos hongos (Pfizer, 1992).

1) Composición de fórmula

Estreptomycin (sulfato)	15.0 %
Terramicina (oxitetraciclina)	1.5 %
ingredientes inertes	83.5 %
TOTAL	100 %

2) Dosis recomendada

Para prevenir	200 ppm	120 g en 100 l de agua
Para combatir	400 ppm	240 g en 100 l de agua

(Pfizer, 1992)

b. Farmacina 5%

Farmacina 5% es un bactericida agrícola de amplio espectro, diseñado para ayudar a prevenir las infecciones bacterianas, y en el caso de que estas ocurran, actuar como bactericida para detener y eliminar las infecciones de este tipo de patógenos.

Este bactericida contiene: antibiótico, nutrientes, salicilato de potasio, ácidos fulvicos los cuales actúan tanto a nivel del patógeno como a nivel fisiológico de las plantas, las induce a que se defiendan por sí mismas, evitando o disminuyendo considerablemente las lesiones que las bacterias fitopatógenas le puedan causar; eso lo hacen a través de una gran variedad de mecanismos, que incluyen el salicilato como parte del proceso de defensa química de las plantas y como mensajero endógeno que activa la síntesis de sustancias que dan resistencia a los tejidos contra el ataque de patógenos (Fagro, 1990).

La oxitetraciclina es un antibiótico de amplio espectro que elimina directamente las bacterias fitopatógenas al inhibir la síntesis de proteínas a nivel de ribosomas por acción de la oxitetraciclina. Todos los demás componentes inducen los mecanismos naturales de defensa bioquímica de las plantas por la acción del salicilato de potasio. Fortalece el vigor de la planta aumentando el área foliar, la producción de clorofila y favoreciendo la fotosíntesis (Nitrógeno y Magnesio) y la síntesis de proteínas (Azufre) en los tejidos vegetales. Se logra una mejor penetración y translocación del antibiótico y los nutrientes con la acción de los ácidos fúlvicos

1) Composición de fórmula

Clorhidrato de Oxitetraciclina	6.03 %
--------------------------------	--------

2) Dosis recomendada

1 kg de Farmacina por 1000 l de agua

c. Bacter-Stop

Es un antibiótico de baja toxicidad elaborado con sulfato de estreptomicina y clorhidrato no estéril, usado para controlar y prevenir enfermedades de plantas producidas por bacterias. Contiene 4 nutrientes que dan fortaleza a los tejidos vegetales y que permiten crear una barrera física contra la invasión del patógeno (potasio, calcio, cobre y boro).

La estreptomicina como la oxitetraciclina inhiben la síntesis de proteínas en los ribosomas de las bacterias.

Bacter-Stop es compatible con la mayoría de los agroquímicos que existen, excepto con el caldo de bordes y productos de reacción alcalina (Fagro, 1990).

1) Composición de fórmula

Sulfato de estreptomicina	12.6 %
Oxitetraciclina	6.7 %

2) Dosis recomendada

200 g de Bacter-Stop en 100 l de agua.

2. Compuestos de cobre

a. Python 27

Es un polímero orgánico-metálico con acción preventiva y curativa de enfermedades bacterianas y fungosas. Actúa de modo sistémico a base de sulfato de cobre pentahidratado, propuesto como una nueva alternativa en el manejo de plagas (Marketing Arm International Inc, 1997).

El modo de acción bactericida es a través de la destrucción de la pared celular e inhibición del proceso reproductivo de hongos y bacterias (Marketing Arm International Inc, 1997). Fue registrado en el EPA (Environmental Protection Agency) No. 49538-2. Permite que las moléculas de cobre (normalmente no absorbibles por el follaje del cultivo) puedan ser fácilmente absorbidas a través de todos los tejidos de la planta y transportado por la corriente de savia de tal manera que el ingrediente activo protege las plantas y no sea lavado por las lluvias. El ingrediente activo del phyton 27 es sulfato de cobre pentahidratado.

Aplicación: Actúa contra una amplia gama de enfermedades bacterianas y fungosas en cultivos ornamentales, frutales, hortalizas y cultivos extensivos. Producto sistémico de amplio espectro y no deja residuos peligrosos ni olores.

1) Composición de fórmula

	% P/V
Sulfato de cobre pentahidratado	24.0 %
Ingrediente inerte	76.0 %
TOTAL	100 %
Cobre metálico	5.5 %

2) Dosis recomendada

1.0	cc/litro de agua (mínima)
1.5	cc/litro de agua (media)
2.0	cc/litro de agua (máxima)

Recomendaciones: Usarlo inmediatamente después de su preparación. El pH debe ser de 4.5 - 5.5 (4.7 = pH óptimo).

a. Kocide 101

Fungicida agrícola preventivo, compatible con la mayoría de los productos formulados comercialmente como aceites, coadyuvantes, insecticidas comunes y otros fungicidas. (Griffin,1980).

El modo de acción de Kocide se basa en el ion cobre (Cu^{++}) es toxico para todas a células, debido a que reacciona con los grupos sulfhidrilo de ciertos aminoácidos y causa la desnaturalización de las proteínas y enzimas de la célula (Agris, 1991).

Los cobres tienen un amplio espectro de acción, incluyendo acción bactericida y son muy persistentes en el suelo ya que el ion Cu^{++} no se degrada como sucede con los productos orgánicos (DUPONT, 1990).

1) Composición de fórmula

Hidróxido cúprico	77 %
Ingrediente inerte (agente mojable, dispersante)	23 %
TOTAL	100 %

2) Dosis recomendada

1.75 a 2.5 kg de kocide / hectárea sembrada

3. Bactericidas orgánicos

a. Kilol L DF – 100 11% L.S.

Bactericida y fungicida sistémico de origen orgánico natural de amplio espectro germicida. Con efectos de prevención y curación. Su ingrediente activo lo constituye el extracto de semilla de cítricos (100% natural), constituido por ácidos grasos, aminoácidos, bioflavonoides (vitamina P), carbohidratos, grupo metil-hidroxi no identificado, proteína, peptinas, vitamina C y vitamina E.

Según información en el boletín técnico del producto el mecanismo de acción del Kilol frente a los microorganismos fitopatógenos es muy complejo ya que provoca una inhibición y cambios complejos en la permeabilidad de la membrana celular, de tal modo que decodifica e interfiere en los mensajes químicos de las enzimas y de las proteínas desdobladoras de los nutrientes esenciales de los microorganismos fitopatógenos (Tecún, 1990).

De igual modo el Kilol L DF-100 11% trabaja sobre el dióxido de carbono de la célula microbiana reduciendo y oxidando con altísima potencia y eficacia, dañando el citoplasma y la pared celular, impidiendo así la multiplicación y la aparición de cepas resistentes (Tecún, 1990). Para la preparación de la mezcla se recomienda acidificar el agua con ácido cítrico a pH 2.5-5.0 y su aplicación rápida después de preparada la mezcla. No causa resistencia en microorganismos (Tecún, 1989).

1) Composición de fórmula

El ingrediente activo es un extracto de semilla de cítricos.

2) Dosis recomendada

2.5 a 5 ml/litro de agua potable 1.5 a 3 litros / hectárea

4. Derivados del amonio cuaternario

a. Timsen

Fungicida y bactericida a base de amonio cuaternario de amplio espectro para el área agrícola. Controla las enfermedades en todos los estadios de desarrollo del cultivo. Eficaz en la desinfección de suelos y esquejes. Si se aplica como tratamiento post cosecha aumenta la duración de la flor y previene el taponamiento de los tallos (United Promotions Inc, 1995). La solución de Timsen entra en contacto con los microorganismos causando la anulación de las cargas negativas existentes a su alrededor y provocando la apertura incontrolada de los poros citoplasmáticos; pérdida de elementos esenciales (nitrógeno y fósforo) e ingreso de las cadenas de carbono del radical alquilo. Todos estos efectos causan la destrucción de la membrana y del núcleo celular, asegurando la total eliminación del microorganismo sin la posibilidad de crear resistencia al producto (Superb, 1996).

Tiene una acción translaminar 100%, por lo que se recomienda una aspersión total del follaje y asegurar que todas las partes de la planta estén en contacto con el producto. Posee un efecto tensoactivo que facilita su penetración. Trabaja en un pH de 3-11. Incompatible con jabones aniónicos o sustancias de igual naturaleza. El producto no debe aplicarse con paños u otras fibras textiles humedecidas en la solución. No pierde sus propiedades en presencia de oxígeno o rayos ultravioleta. Sus soluciones mantienen su actividad por largos períodos sin alterarse y en cualquier tipo de almacenamiento se mantiene estable (Superb, 1996). Los registros para el Timsen son: Registro FDA FR 12460; Registro EPA 507-3.

1) Composición de fórmula

	% P/P
Ingrediente activo	
n-alquil	
(60% C14, 30% C16, 5% C12, 5% C18)	
dimetil bencil amonio	40.00 %
Ingrediente inerte (urea estabilizada)	60.00 %
TOTAL	100.00 %

2) Dosis recomendada

400 ppm (1 g de timsen /l de agua)

5. Iódoforos

a. Vanodine

Es una solución de un complejo iodo-surfactante para uso microbicida general eficaz y sumamente estable. Es poseedor de un amplio espectro microbicida, de acción rápida,

eficaz en presencia de materia orgánica y aguas duras. Sus características de solubilidad y estabilidad permiten mayor disponibilidad de yodo activo durante más tiempo. El yodo es un elemento altamente reactivo por lo cual puede ser un buen germicida. La forma activa desinfectante del yodo es I_2 . Anteriormente el uso del yodo estuvo restringido debido a su baja solubilidad, alta acción corrosiva sobre metales, inactivación en presencia de materia orgánica, inactivación en medio alcalino, acción irritante y causa de alergias (Pfizer, 1992).

Para controlar todos estos factores indeseables se desarrollaron los iodóforos, sustancias solubilizadoras del yodo que actuarán como portadoras de las moléculas. Los iodóforos combinan la acción microbicida del yodo con el efecto sinergizante del tensoactivo, donde la eficacia está dada por la cantidad de yodo libre disponible para atacar los gérmenes. Cuando el yodo ha sido liberado del tenso-activo hacia la fase acuosa tiende a disociarse en formas inactivas: $I_2 \rightarrow I^- \quad IO^- \quad IO_3^-$, donde I_2 es la única forma que tiene acción microbicida. Para mantener la estabilidad del I_2 es necesario mantener un pH ácido en el medio de acción, siendo por eso que la eficacia de un iodóforo depende de la cantidad y calidad de los ácidos presentes en la fórmula (Pfizer, 1992).

1) Composición de fórmula

Yodo total (g/kg)	25.0
Yodo disponible (g/kg)	20.0
Acidez total (%)	28.0
Ácido sulfúrico (%)	8.0
Ácido fosfórico (%)	12.5

2) Dosis recomendada

1 cc de vanodine por 750 l de agua

D. Evaluación de la sensibilidad bacterial frente a bactericidas por el método de difusión de disco, SSD.

1. Generalidades.

El método de difusión discal para pruebas de susceptibilidad permite la categorización de aislados bacteriales como susceptibles, resistentes o intermedios-tolerantes. Para la optimización de resultados existen discos comerciales de papel filtro impregnados con cantidades específicas de un agente antimicrobial, los cuales son incubados sobre la superficie del agar previamente inoculado con el organismo con el que se desea experimentar (Woods & Washington, 1995). La droga o sustancia bactericida se difunde a través del agar. Mientras la distancia de recorrido del agente desde el disco aumenta, la concentración del agente antimicrobial disminuye logarítmicamente, creando un gradiente de concentración del agente alrededor de cada disco en el agar (Woods & Washington, 1995).

Las bacterias que no se ven afectadas por el agente químico bactericida continúan su multiplicación y no forman halos de inhibición alrededor del disco. En áreas donde la concentración del agente es inhibitoria no ocurre crecimiento, formándose zonas de inhibición alrededor de cada disco (Woods & Washington, 1995).

El método de difusión discal ha sido estandarizado para pruebas rápidas de crecimiento bacteriano frente a antibióticos. El diámetro de la zona de inhibición es influenciado por la razón de difusión del agente antimicrobial a través del agar, el cual puede variar entre los diferentes bactericidas. El tamaño del halo es inversamente proporcional a la concentración mínima necesaria para la inhibición (Woods & Washington, 1995).

El agar Müller-Hinton para pruebas de difusión discal ha sido seleccionado por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) por varias razones, entre ellas: (1) demuestra una buena reproducibilidad entre placa y placa, (2) es bajo en sulfonamidas, trimetropina e inhibidores de tetraciclina, (3) permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas no fastidiosas y (4) existen muchos datos y experiencia reportada en este medio (Woods & Washington, 1995).

El agar Müller-Hinton tiene un pH de 7.2 a 7.4 a temperatura ambiente, el cual debe medirse en las placas solidificadas por lo que es necesario dejar que se solidifique en el extremo del electrodo de pH. Un pH fuera del rango puede afectar los resultados de susceptibilidad. Por ejemplo, si este se encuentra muy bajo, compuestos como los aminoglicósidos y macrólidos pueden aparentar una disminución en su potencia mientras que compuestos como las penicilinas aparentan una actividad excesiva. Efectos opuestos se observan si el pH es muy alto (Woods & Washington, 1995). Las placas de agar deben utilizarse frescas o con un máximo de 7 días conservadas en refrigeración para evitar pérdida de humedad. La profundidad de agar debe estar alrededor de 3-4 mm ya que si esta es menor se pueden reportar resultados de falsa-susceptibilidad, mientras que si está por encima de esta profundidad pueden ser reportados resultados falso-resistentes.

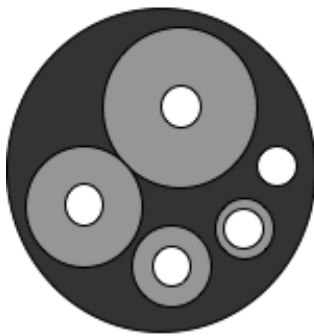
2. Interpretación.

Cuando se trabaja con diferentes concentraciones de agentes bactericidas, se reporta como:

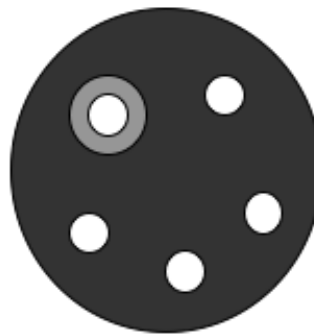
- Susceptible: si existe una zona inhibición alrededor de cada disco.
- Moderadamente resistente: si existe zona de inhibición solamente alrededor del disco de mayor concentración.
- Resistente: si no hay zona de inhibición alrededor del disco. Puede ser también que el agente bacteriostático no sea efectivo para combatir la bacteria (Figura 10).

Para comparar y correlacionar los datos se utilizaron curvas de regresión de las áreas de inhibición obtenidas para cada aislado bacterial frente a cada uno de los ocho bactericidas, en cada placa se analizó un bactericida, donde cada disco se impregnó con distintas concentraciones del bactericida.

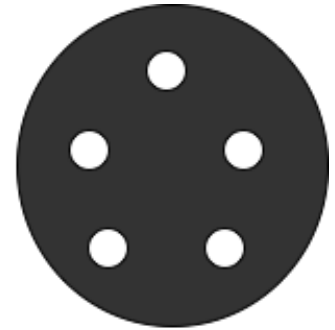
Figura 10. Diagrama de las formas de interpretar los resultados obtenidos de las pruebas de sensibilidad “*in vitro*” a través de difusión en disco.



Susceptible



Moderadamente resistente



Resistente

VI. METODOLOGÍA

Se llevó a cabo la determinación de la efectividad de ocho agentes bactericidas evaluando la inhibición “*in vitro*” del crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* a través del método de difusión de disco sobre agar Müller-Hinton.

A. Materiales y métodos

1. Materiales experimentales.

a. Colonias de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, PSL.

Los aislados de PSL, se obtuvieron de 4 localidades distintas, de muestras sintomáticas provenientes de distintas plantaciones de melón ubicadas en el valle de la Fragua en Zacapa y las cuales emplean distintos programas de control fitosanitario. Los códigos asignados a las colonias evaluadas provienen de un estudio previo de identificación de bacterias fitopatógenas por lo que han sido denominadas 8C, 35C, 38C y 51C.

b. Bactericidas.

Se evaluaron 8 agentes bactericidas con distintos ingredientes activos siendo éstos: Agrimicin, Bacter-Stop, Farmacina, Kocide, Phyton, Timsen, Vanodine y Kilol. Los distintos principios activos incluyen antibióticos, compuestos de cobre, compuestos de amonio cuaternario, compuestos de yodo y compuestos a base de extractos naturales respectivamente.

c. Concentración

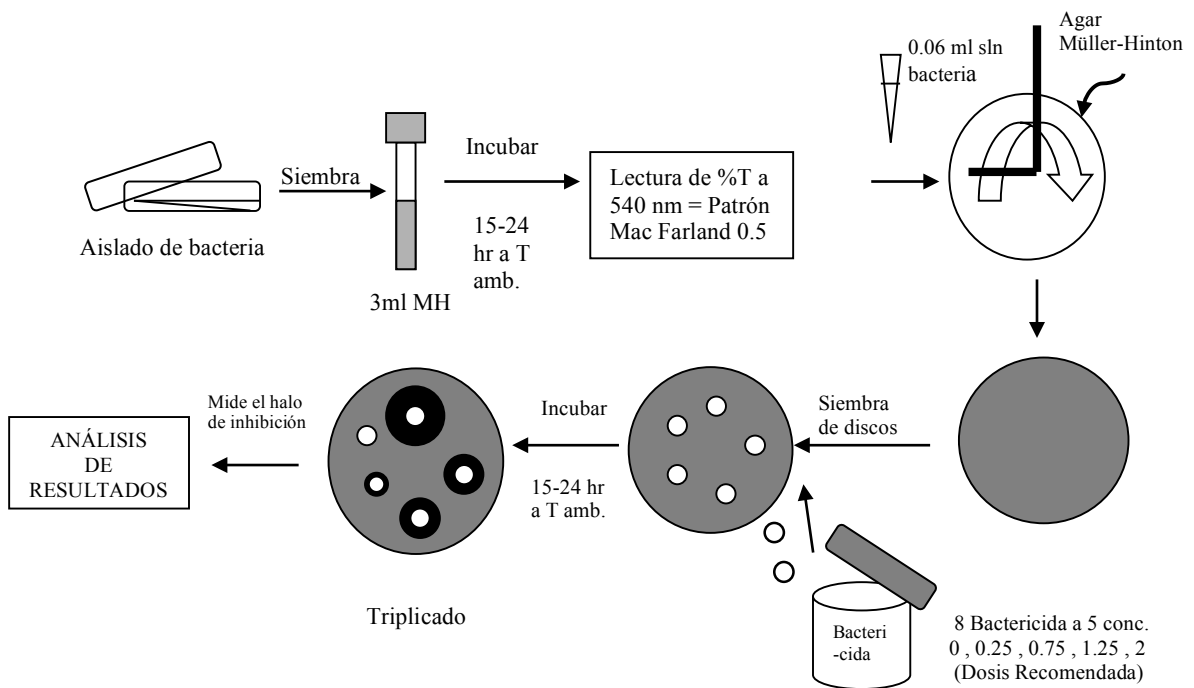
Se evaluaron 5 concentraciones (0.0, 0.25, 0.75, 1.25, 2.0) tomando como unidad la dosis media recomendada para cada bactericida descrita en el Cuadro 6, se trabajó en triplicado tomando de cada halo de inhibición tres medidas del diámetro para luego obtener un promedio y calcular luego el área de inhibición.

2. Prueba de sensibilidad por difusión de disco, SDD.

El procedimiento general de la prueba de sensibilidad por difusión de disco se aprecia en la Figura 11. Como paso inicial, dos o tres colonias frescas (24-48 hr) de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* seleccionadas para este estudio se inoculan en tubos de ensayo de vidrio conteniendo 3 ml de caldo nutritivo Müller-Hinton. Las soluciones bacteriales se incuban hasta alcanzar una turbidez equivalente a la turbidez del patrón McFarland 0.5 (Anexo D), para lo cual es necesario hacer lecturas de transmitancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. También se pueden hacer

comparaciones visuales con el patrón. Esta solución bacteriana se siembra uniformemente sobre la placa de agar Müller-Hinton (MH) y luego se colocan encima discos de papel filtro impregnados con la solución bactericida deseada. Se incuba de 15-24 hrs. a temperatura ambiente y luego se mide el diámetro del halo de inhibición en tres sentidos distintos. Se calcula el área de inhibición promedio y a estos datos se les aplica el análisis estadístico ANDEVA para poder relacionar y comparar entre sí a los distintos bactericidas evaluados. En la Figura 11 se muestra el diagrama de la metodología de difusión en disco que se utilizó.

Figura 11. Método de difusión en disco para determinar la inhibición “*in vitro*” de bactericidas, SDD.



3. Diseño experimental.

El experimento de pruebas de sensibilidad tuvo como fuentes de variación a (A) bacteria o colonia aislada de cada una de las empresas participantes. (B) Bactericida: Ocho compuestos bactericidas previamente mencionados, (Cuadro 6) y (C) Concentración: cinco diferentes concentraciones (0.00, 0.25, 0.75, 1.25 y 2.0), tomando como la unidad la concentración media recomendada por la casa comercial.

En cada bloque de tratamiento se usó como control positivo discos estándar impregnados con estreptomycin (10 µg) de la casa comercial DIFCO, y control negativo discos de agua estéril fueron incluidos en todas las placas petri. Los resultados representan el área en mm² del halo de inhibición.

El crecimiento de las bacterias sometidas al efecto bactericida de los productos evaluados se comparó con el crecimiento de las mismas establecidas en medio de cultivo libre del agente químico (testigo absoluto). Se trabajó cada resultado en triplicado y se aplicó el análisis de varianza ANDEVA de tres vías o fuentes de variación.

B. Análisis estadístico

El diseño experimental es completamente al azar con tres repeticiones. Se evalúa si existen diferencias o interacciones significativas entre colonias, bactericidas y concentraciones aplicando a los resultados de área de inhibición un análisis de varianza de tres vías o fuentes, ANDEVA. Este permite determinar cuantitativamente la existencia de diferencias o interacciones significativas. El modelo que se obtuvo de este análisis es del siguiente tipo:

$$\emptyset_{ijkl} = \mu_i + A_i + B_j + (AB)_{ij} + C_k + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + E_{ijkl}$$

En el cual \emptyset es el área de inhibición “*in vitro*”, A = colonia, B = bactericida y C = concentración. Esto implica que el crecimiento “*in vitro*” de la bacteria es afectado por el bactericida (B_j), la concentración del bactericida utilizado (C_k), por la interacción entre bactericida y su concentración ($(AB)_{ij}$), la interacción de la colonia y concentración de bactericida ($(AC)_{ik}$), la interacción entre bactericida y concentración del mismo ($(BC)_{jk}$), la interacción entre los tres factores ($(ABC)_{ijk}$) donde E_{ijkl} es el término del error indeterminado. Se evalúan las diferencias estadísticamente significativas a través de pruebas de comparación de medias de Duncan, este análisis permite categorizar las diferencias entre las fuentes de evaluación (A, B, C).

VII. RESULTADOS

El Cuadro 7 muestra las ecuaciones de las rectas de regresión lineal obtenidas entre las interacciones de bactericida y colonia. Los coeficientes de regresión demuestran la relación lineal existente entre las colonias y las concentraciones de los distintos bactericidas, con excepción de la colonia 38C frente a Agrimicin donde el coeficiente de correlación es 0.7856. En tres de las cuatro colonias el bactericida Phytón no muestra inhibición; en el caso de Kocide la inhibición bacteriana es muy poca en tres de cuatro colonias y nula en la colonia 35 C. En el Anexo B se grafican estas regresiones.

Cuadro 7. Rectas de regresión lineal obtenidas de las interacciones aislado bacteriana (colonia) y bactericida¹

	8 C	35 C	38 C	51 C
Agrimicin	$y = 213.81x + 98.07$ $R^2 = 0.9149$	$y = 283x + 36.152$ $R^2 = 0.9525$	$y = 192.99x + 140.03$ $R^2 = 0.7856$	$y = 246.94x + 53.272$ $R^2 = 0.9584$
Bacter-Stop	$y = 120.81x + 52.554$ $R^2 = 0.9291$	$y = 241.18x + 74.172$ $R^2 = 0.9497$	$y = 158.43x + 101.78$ $R^2 = 0.8471$	$y = 265.17x + 108.09$ $R^2 = 0.9333$
Farmacina	$y = 91.432x + 41.062$ $R^2 = 0.9739$	$y = 237.09x + 53.202$ $R^2 = 0.9665$	$y = 90.947x + 27.009$ $R^2 = 0.9287$	$y = 218.22x + 86.307$ $R^2 = 0.9573$
Kocide	$y = 22.513x + 31.208$ $R^2 = 0.9529$	$y = 33.166$ $R^2 = \#N/A$	$y = 2.0294x + 32.427$ $R^2 = 0.7406$	$y = 23.241x + 34.628$ $R^2 = 0.9674$
Phytón	$y = 33.166$ $R^2 = \#N/A$	$y = 1.3536x + 32.622$ $R^2 = 0.642$	$y = 33.166$ $R^2 = \#N/A$	$y = 33.166$ $R^2 = \#N/A$
Timsen	$y = 58.731x + 59.883$ $R^2 = 0.8593$	$y = 59.547x + 60.641$ $R^2 = 0.8535$	$y = 51.325x + 49.248$ $R^2 = 0.9246$	$y = 79.559x + 45.939$ $R^2 = 0.9665$
Vanodine	$Y = 61.705x + 35.885$ $R^2 = 0.9628$	$y = 188.55x + 40.912$ $R^2 = 0.9956$	$y = 77.024x + 43.933$ $R^2 = 0.9849$	$y = 126.69x + 37.204$ $R^2 = 0.9958$
Kilol	$Y = 23.549x + 38.331$ $R^2 = 0.9425$	$y = 58.531x + 33.869$ $R^2 = 0.9564$	$y = 34.662x + 30.385$ $R^2 = 0.9819$	$y = 39.093x + 42.545$ $R^2 = 0.9555$

R^2 = coeficiente de correlación; N/A= No existe nivel de correlación

El análisis de varianza (ANDEVA) efectuado a las tres fuentes de variación y sus interacciones (Cuadro 8) muestra que todas estas fuentes (colonia, bactericida y concentración) afectan significativamente a un $\alpha = 0.01$; siendo también significativas las interacciones entre estas y los halos de inhibición desarrollados en las pruebas de sensibilidad

¹ Las gráficas de estas interacciones se presentan en el Anexo B.

Cuadro 8. Resultados del análisis estadístico ANDEVA en respuesta a la variable de área promedio de inhibición²

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrados	F- Razón
A (COLONIA)	3	247179.9	82393.3	116.65
B (BACTERICIDA)	7	3712103	530300.4	750.76
AB	21	543900	25900	36.67
C (CONCENTRACIÓN)	4	2659509	664877.3	941.28
AC	12	180987.5	15082.29	21.35
BC	28	1789896	63924.87	90.5
ABC	84	264544.1	3149.335	4.46
ERROR	320	226033.8	706.3555	
TOTAL(Adj)	479	9624156		

Al efectuar la prueba de comparación múltiple de medias a la variable colonia, se determinó la existencia de tres grupos estadísticos distintos. Las colonias 8 C y 38 C fueron las menos susceptibles y de comportamiento distinto cada una, mientras que las colonias 35 C y 51C se comportan de manera similar por lo que pertenecen al mismo grupo estadístico (Cuadro 9). Al aplicar a los datos de áreas de inhibición “*in vitro*” obtenidas el análisis estadístico ANDEVA de tres vías, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\emptyset = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + C_k + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde \emptyset = área de inhibición “*in vitro*”; A = colonia; B = bactericida; C = concentración; AB = interacción de colonia-bactericida; AC = interacción entre colonia-concentración; BC = interacción entre bactericida-concentración y ABC = interacción de colonia-bactericida-concentración.

Cuadro 9. Resultados del análisis estadístico de comparación múltiple de medias entre colonias por el método de Duncan.

COLONIA	Área de inhibición promedio (mm ²)	Prueba de medias ¹ ($\alpha = 0.01$)
1. 8 C	111.73	a.
3. 38 C	121.78	b.
4. 51 C	161.28	c.
2. 35 C	161.88	c.

¹ Cada letra corresponde a un grupo estadístico diferente de acuerdo a la prueba de Duncan

Al efectuar la prueba de comparación múltiple de medias a la variable bactericida se determinó que todos se comportan distintamente y se categorizan en grupos estadísticos distintos (Cuadro 10). Donde se observa que los más efectivos son los compuestos

² El análisis estadístico y valores de interacciones obtenidos por el análisis ANDEVA se muestra en el Anexo C.

antibióticos y los cobres son los menos efectivos, los cuales tiene un área de inhibición promedio escasa alrededor de 40 mm².

Cuadro 10. Resultados del análisis estadístico de comparación múltiple de medias entre bactericidas por el método de Duncan ($\alpha = 0.01$).

BACTERICIDA	Área de inhibición Promedio (mm ²)	Prueba de medias ¹ ($\alpha = 0.01$)
A (5) Phyton	33.3178	a.
B (4) Kocide	43.01146	b.
C (8) Kilol	69.39727	c.
D (6) Timsen	106.8745	d.
E (7) Vanodine	135.9522	e.
F (3) Farmacina	192.7644	f.
G (2) Bacter-Stop	251.087	g.
H (1) Agrimicin	280.937	h

¹Cada letra corresponde a un grupo estadístico diferente de acuerdo a la prueba de Duncan

Como era de esperarse se determinó una inhibición creciente a mayor concentración de bactericidas situándose en grupos estadísticos cada una de las concentraciones evaluadas (Cuadro 11).

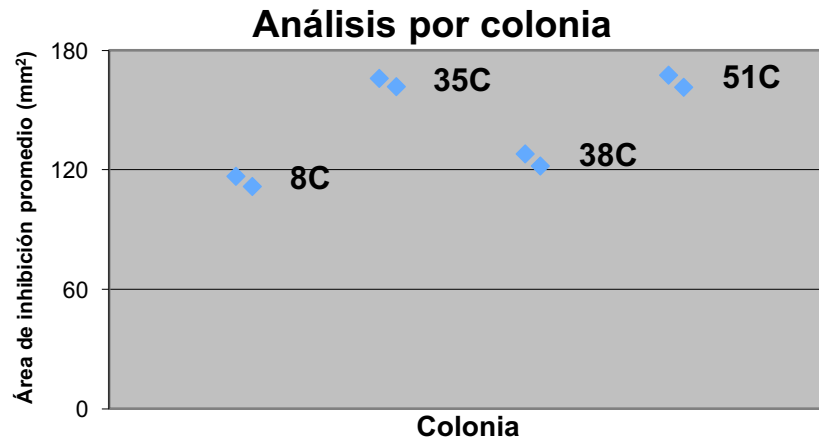
Cuadro 11. Resultados del análisis estadístico de comparación múltiple de medias entre las distintas concentraciones por el método de Duncan ($\alpha = 0.01$).

CONCENTRACIÓN	Área de inhibición Promedio (mm ²)	Prueba de medias ¹ ($\alpha = 0.01$)
A (1) 0.00	33.17	a.
B (3) 0.25	85.50	b.
C (4) 0.75	139.71	c.
D (2) 1.25	197.22	d.
E (5) 2.00	240.24	e.

¹Cada letra corresponde a un grupo estadístico diferente de acuerdo a la prueba de Duncan

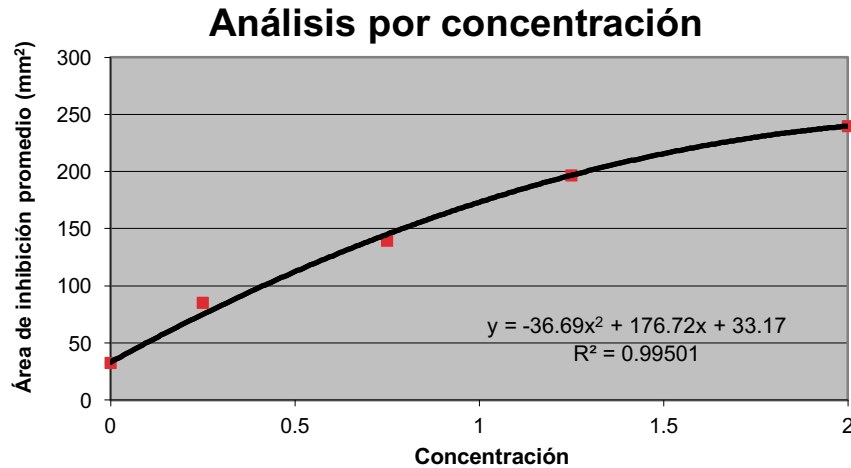
La Figura 12 muestra de una manera gráfica la diferencia promedio que existen entre las cuatro colonias evaluadas, los datos promedio son los que se presentan en el Cuadro 9.

Figura 12. Resultados obtenidos del análisis estadístico del área de inhibición promedio por colonia.



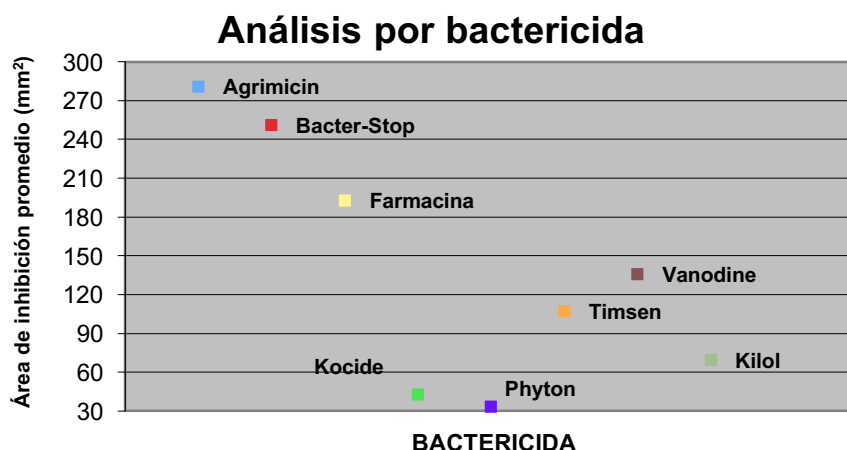
El área de inhibición promedio con respecto a la concentración de manera general se observa gráficamente en la Figura 13, de donde se puede ver que el área de inhibición promedio es proporcional a la concentración de la bactericida utilizada, a mayor concentración mayor es el área de inhibición, con un coeficiente polinomial de correlación de 0.995, donde la ecuación polinomial es $y = -36.69x^2 + 176.72x + 33.17$

Figura 13. Resultados del análisis del área de inhibición vs concentración del bactericida.



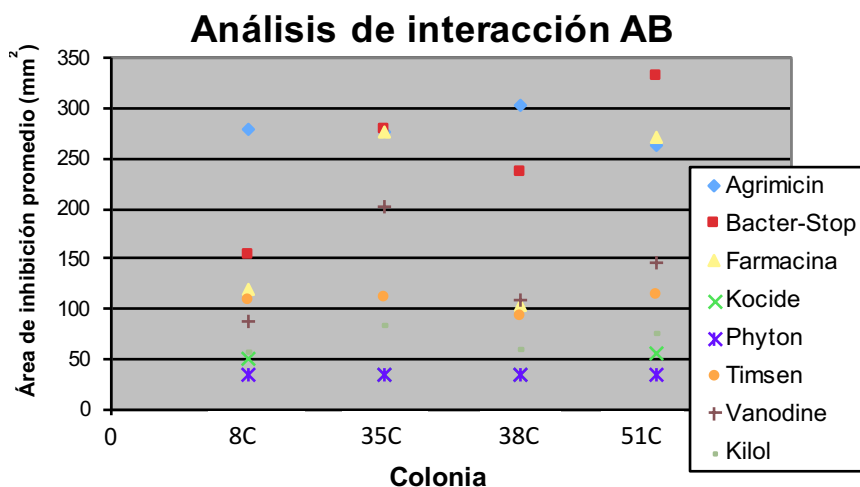
Los resultados obtenidos en el Cuadro 10 se muestran de una forma gráfica a continuación (Figura 14), siendo más fácil visualizar el orden de la efectividad del bactericida de manera general, se observa que los bactericidas a base de antibióticos como el Agrimicin, Bacter-Stop y Farmacina son los más efectivos seguidos por los bactericidas Vanodine, Timsen, Kilol y por último los bactericidas a base de compuestos cúpricos como el Kocide y Phyton.

Figura 14. Resultados del análisis de cada bactericida según área de inhibición promedio (mm²).



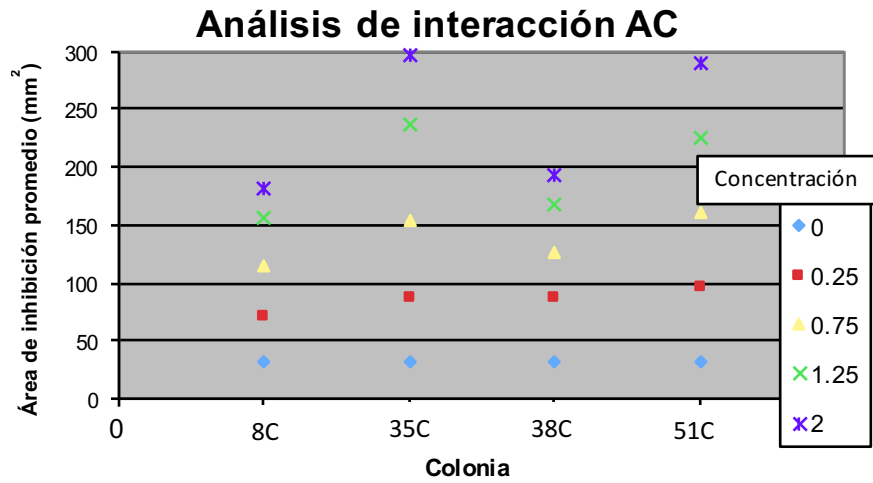
En las Figuras 15 y 17 se muestran los comportamientos de las distintas interacciones entre las fuentes de variación evaluadas, siendo estas: colonia x bactericida (Figura 15), colonia x concentración (Figura 16), bactericida x concentración (Figura 17). Como se aprecia en la Figura 15 el bactericida más efectivo fue el Agrimicin para todas las colonias con excepción de la 51 C en la cual el Agrimicin se situó por debajo de Bacter-Stop. Se observa también que los compuestos como Vanodine, Timsen y Kilol tuvieron un efecto inhibitorio intermedio mientras que los compuestos cúpricos no mostraron mayor capacidad de inhibición del crecimiento bacterial “*in vitro*”.

Figura 15. Resultados del análisis de interacciones entre colonia (A) y bactericida (B) en base al área promedio de inhibición (mm²).



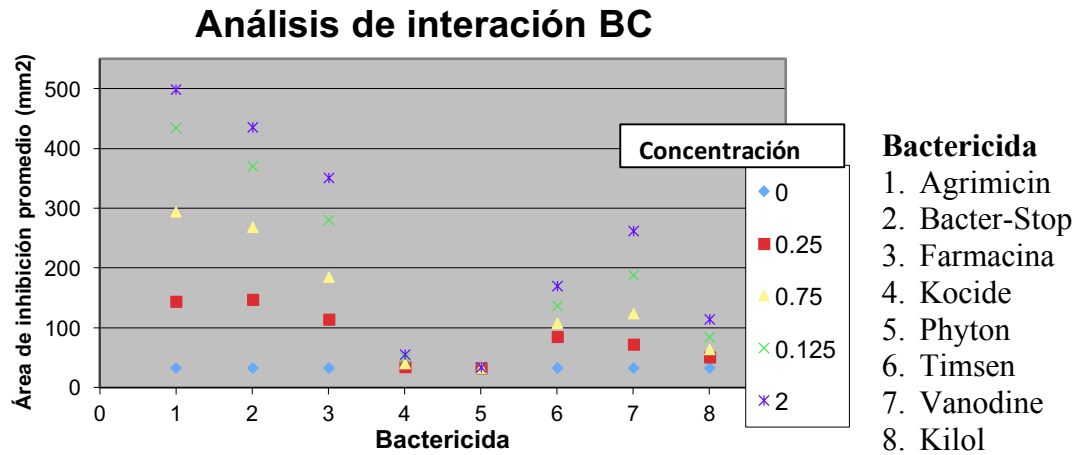
Como se observa en la Figura 16 las colonias que respondieron mejor a las distintas concentraciones empleadas son la 35C y 51C quienes exhibieron halos de inhibición cercanos a los 300 mm² en la solución más concentrada.

Figura 16. Resultados del análisis de interacción entre colonia (A) y concentración del bactericida (C).



La Figura 17 muestra los resultados obtenidos de la interacción entre bactericida y concentración donde se observa que para todos los bactericidas el efecto de la concentración es el mismo, mientras más concentrado, mayor inhibición.

Figura 17. Resultados del análisis de interacción entre bactericida (B) y concentración (C).



VIII. DISCUSIÓN

La estrategia más común que se ha utilizado por más de 100 años para controlar enfermedades causadas por distintos patovares de *Pseudomonas syringae* es rociar bactericidas en forma de spray. Dentro de estos productos se incluyen varios compuestos cúpricos como hidróxido de cobre, sulfato de cobre, amoníaco de cobre y sales cúpricas de ácidos grasos y otros metales pesados. Estos fueron por muchos años los únicos bactericidas registrados y de uso permitido en la mayoría de cultivos. En los últimos 20 años se han introducido más los bactericidas a base de antibióticos. Dentro de las prácticas en el manejo de agroquímicos que se recomiendan en los últimos años es el uso alterno de compuestos antibióticos y compuestos de cobre. El uso de antibióticos se encuentra bajo estrictas normas de restricción en países desarrollados o prohibido como en Australia, debido a que éstos inducen mecanismos de resistencia (Bashan, 1995).

La mayoría de veces el uso de compuestos de cobre en aplicación por aspersión no logra controlar en su totalidad los brotes bacterianos causados por *patovares* diversos de *Pseudomonas syringae*. Esto hace necesario aumentar la dosificación, que por lo general se encuentra en sus máximos niveles lo cual es indeseable para el cultivo del melón debido a que es muy sensible a la fitotoxicidad.

En la actualidad en Guatemala, las cepas de bacterias no son controladas en el campo a través de aplicaciones estándar de compuestos de cobre, ni son evaluados compuestos alternativos que puedan intercalarse con el uso de antibióticos.

Para llevar a cabo la comparación de los ocho distintos agentes de control bacteriano sobre la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* aislada de hojas infectadas de melón provenientes de la zona de Zacapa, se utilizó el método de difusión en disco como se muestra en la sección de metodología VI.A.2. El efecto que se obtiene en las pruebas “*in vitro*” de difusión en disco depende de muchos factores, por lo que se establecieron condiciones adecuadas para obtener una buena reproducibilidad y para poder comparar los resultados entre sí. El factor que se destinó como variable de respuesta para comparar los efectos de sensibilidad “*in vitro*” es el área de inhibición promedio.

Del análisis estadístico, Cuadro 8, se interpreta que tanto los factores individuales “colonia”, “bactericida” y “concentración”, como las interacciones entre ellos son significativas y afectan al área de inhibición bacteriana obtenida. Por lo tanto estos factores no pueden ser descartados como factores de influencia, el modelo que se obtiene, es el más completo pues incluye todas las fuentes de variación posibles, siendo todas ellas estadísticamente significativas. Este resultado es de gran importancia para el gremio

melonero pues ofrece evidencia que la selección del bactericida a ser utilizado puede tener un impacto significativo en el nivel de control bacteriano alcanzado. También demuestra que la concentración empleada es de extrema importancia por lo que la dosificación correcta de los productos es crítica para lograr un manejo satisfactorio de la mancha angular. El papel fundamental de la dosificación correcta de los productos bactericidas cobra mayor significancia si se considera que la literatura reporta (Lambert y O'Grady, 1992). Que las posibilidades de resistencia adquirida en bacterias fitopatógenas aumentan con la sub dosificación de los bactericidas, principalmente antibióticos.

El análisis de los datos permite tener resultados con un límite de confianza mayor del 99% pues la F calculada es muchísimo mayor que la F teórica. Como se puede observar en el Cuadro 7, la variable de mayor importancia es concentración ($F_{\text{calculada}} = 941.28$) seguida del tipo de bactericida ($F_{\text{calc.}} 750.76$). Sin embargo aunque basándose en el ANDEVA se logra determinar que las tres fuentes de variación muestran diferencias altamente significativas, no nos indica qué tan diferentes son estas entre sí, por lo que se utiliza la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan. Los resultados de este análisis (Cuadros 9, 10 y 11) permite establecer grupos estadísticos entre tratamientos (colonia, concentración y bactericida) con diferencias estadísticamente significativas. Cada factor considerado afecta el área de inhibición en distinto grado y esta es analizado a continuación.

En el Cuadro 7, se observa el área de inhibición promedio de las cuatro colonias (8 C, 35 C, 38 C y 51 C), de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans aisladas de distintas fincas meloneras del Valle de Zacapa. A estos resultados se les aplicó un análisis de comparación múltiple de medias de Duncan, (Cuadro 9) y se lograron establecer tres grupos estadísticos basados en la sensibilidad bacteriana *in-vitro* frente a los ocho agentes bactericidas evaluados. Se obtuvo dentro de un mismo grupo estadístico, con prácticamente el mismo diámetro promedio de inhibición, las colonias 35 C (161.88 mm^2) y 51 C (161.27 mm^2) provenientes de las fincas meloneras Agrifresco y Altobaso respectivamente. Estas son las colonias bacterianas cuyas respuestas a los bactericidas originaron las mayores áreas de inhibición por lo que son las más susceptibles de las colonias evaluadas. En el segundo lugar se encuentra la colonia 38 C proveniente de Coagro seguida por la colonia 8 C, proveniente de Protisa. El halo de la colonia 8 C es aproximadamente 90% del halo obtenido en la colonia 38 C, estas últimas dos presentan susceptibilidades muy similares, pero no lo suficientemente significativas como para que puedan ser clasificadas dentro de un mismo grupo estadístico. Estos resultados indican que, bajo las condiciones de este estudio, el aislado bacteriano menos susceptible a los bactericidas (en una forma general) es el 8 C. La información generada de esta investigación también demuestra que dentro de la población de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans presente en el valle de La Fragua, existe una respuesta variable a los bactericidas. Las colonias 8 C y 38 C, en comparación a las otras colonias evaluadas, (35 C y 51 C) exhiben un comportamiento que indica diferencias en la susceptibilidad frente a los bactericidas entre colonias evaluadas y se podrían clasificar como colonias menos susceptibles. Este podría ser un resultado de los distintos programas de control químico que se llevan a cabo en cada plantación melonera los cuales incluyen distintas frecuencias de aplicación y dosificaciones de los productos bactericidas. No se puede hacer una clasificación de susceptibilidad o resistencia bacteriana

a los productos evaluados pues no se cuenta con una cepa control susceptible de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans que pueda servir como referencia de susceptibilidad para estos estudios. Sin embargo basándose en los resultados obtenidos, (Figura 12) donde se ven claramente las diferencias en susceptibilidades entre los aislados bacteriales analizados, se puede sugerir entonces la posibilidad de que existan indicios de resistencia en las cepas 8 C y 38 C. En la literatura se reporta la resistencia a estreptomycin y cobres en *Pseudomonas syringae* pv. syringae, causante de la mancha bacterial en fríjol (Sundin & Bender, 1993). El efecto de bactericida Kocide 101 fue evaluado y se comprobó la resistencia adquirida a cobre en *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Cooksey, 1990).

Como se esperaba en este estudio, la respuesta inhibitoria “*in vitro*” promedio de las colonias bacteriales frente a las distintas concentraciones es proporcional (Figura 13). Esta relación no es lineal sino más bien una ecuación polinomial, donde la ecuación calculada que se basa en áreas de inhibición promedio es:

$$y = - 36.69 x^2 + 176.72 x + 33.17 \text{ con un coeficiente de correlación } R^2 = 0.995$$

Esta ecuación polinomial muestra que a mayor concentración del agente bacteriostático la respuesta inhibitoria “*in vitro*” es mayor. Esta proporcionalidad se puede observar también en la Figura 16 y 17 donde se analiza el área de inhibición promedio vrs. cada colonia y vrs. cada uno de los bactericidas respectivamente.

Evaluando el efecto individual de los ocho bactericidas a través del análisis estadístico ANDEVA se observa que cada uno tiene un efecto diferente (Figura 14), siendo esta diferencia significativa estadísticamente, según lo muestran los análisis de comparación de medias de Duncan (Cuadro 10). El orden de efectividad “*in vitro*” sobre *Pseudomonas syringae* obtenido es el siguiente: (1) Agrimicin 100, (2) Bacter-Stop, (3) Farmacina 5%, (4) Vanodine, (5) Timsen, (6) Kilol, (7) Kocide 101 y (8). Phyton 27. De manera general los antibióticos son los que presentan una mayor inhibición “*in vitro*” de *PSL*, mientras que los compuestos de cobre son los menos efectivos bajo estas condiciones de análisis. Estos resultados indican que en los planes de manejo de la mancha angular en melón, los antibióticos deben jugar un papel importante en los programas de manejo integrado de plagas, MIP.

Al analizar el efecto de cada uno de los bactericidas frente a los cuatro aislados bacteriales se observa que es el bactericida Agrimicin 100 es el más efectivo en casi todas las colonias. Sin embargo en el caso de la 51 C ocupa un segundo lugar en efectividad, (Figura 15), siendo más susceptible a los compuestos antibióticos Bacter-Stop y de igual manera a Farmacina 5%. De estos resultados se puede inferir que esa colonia es mejor inhibida por el antibiótico oxitetraciclina, ya que para una misma colonia bacterial existen diferencias de susceptibilidad frente a distintos antibióticos (Bauer *et. al*, 1966). Para la colonia 8 C y 38 C el tratamiento a base de oxitetraciclina no resulta ser más efectivo que con estreptomycin. La colonia 35 C es de igual manera susceptible frente a estos dos antibióticos (estreptomycin y oxitetraciclina). Las variaciones en susceptibilidad a estreptomycin detectada en este estudio pueden, como ya se mencionó, sugerir la presencia de cepas *PSL* resistentes a este antibiótico. En la literatura se encuentran reportes de

Pseudomonas syringae resistentes a estreptomycin (Sm^r), particularmente en *Pseudomonas syringae* de manzana (*P.s.* pv. *papulans*) (Burr, *et al.* 1988) y plantas leñosas (Scheck, *et al.*, 1992). En los estudios de Burr, *et al.* 1988, se determinó que las cepas Sm^r contenían un plásmido ausente en las cepas susceptibles. Estos estudios concuerdan con investigaciones hechas en *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en los cuales también se encontró un plásmido asociado con resistencia a estreptomycin (Minsavage, *et al.*, 1990 in Coosksey, 1990). Esta característica aparenta ser transferible entre bacterias de diferentes especies, ya que secuencias genéticas Sm^r determinantes homólogas han sido detectadas en *Erwinia amylovora*, *P.s.* pv. *syringae*, *P.s.* pv. *papulans* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Chiou y Jones, 1993; Minsavage, *et al.*, 1990; Sundin y Bender, 1993 in Sundini y Bender, 1995). Sundini y Bender (1995) afirman que segmentos genéticos transferibles entre organismos distintos, llamados transposones, están ampliamente diseminados, por lo que las bacterias fitopatógenas a plantas pueden ser de gran importancia como reservorios de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos, tanto para bacterias fitopatógenas como para bacterias patógenas de humanos o animales. Es más, la persistencia de plásmidos conteniendo los determinantes genéticos de resistencia, aún ante la ausencia de factores de selección, aparenta ser común en bacterias (Cooksey, 1990). Estas mutaciones pueden tener importantes implicaciones en la efectividad de aplicaciones de antibióticos no sólo contra *PSL*, sino también sobre otro tipo de microorganismos que puedan adquirir esta resistencia, las cuales permanecen estables en el tiempo lo que requiere de mayores dosis para su control. Los usuarios de antibióticos deben estar informados de la estabilidad y la posible transferencia de la resistencia a otros microorganismos, por las implicaciones que esta resistencia pueda tener en la agricultura.

Son entonces los bactericidas que tienen como principio activo un agente antibiótico (Agrimicin 100, Farmacina 5%, Bacter-Stop) los más efectivos frente a los 4 aislados de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Como se observa en el Cuadro 10, los tres antibióticos evaluados en este estudio fueron los bactericidas más efectivos, aunque estadísticamente diferentes entre sí. Las áreas de inhibición mayores se observaron en la colonia 35 frente Agrimicin 100. El bactericida Farmacina 5% tiene el segundo lugar en efectividad seguido por Bacter Stop. El efecto inhibitorio de antibióticos sobre bacterias ha sido ampliamente evaluado desde los años sesentas a través de pruebas de sensibilidad (Shahidi & Ellner, 1969) y existen condiciones de análisis estándar establecidas (NCCLS, 1993).

De los resultados de efectividad “*in vitro*” el compuesto Vanodine ocupa el cuarto lugar en la prueba de Duncan, aunque se obtuvo evidencia de alta variabilidad entre los efectos inhibitorios a las cuatro colonias evaluadas. El mayor efecto inhibitorio de Vanodine se observó frente a la colonia 35 C, luego para la colonia 51 C. Los halos de inhibición variaron entre aproximadamente 200 mm² (35C), 145 mm² (51 C) y 85 mm² (8 C) (Figura 15). Sin embargo, Vanodine, que comúnmente se utiliza y comercializa para desinfección en áreas de crianza de animales y en otras áreas de procesos (dilución 1:1000) resulta ser una buena alternativa para el control de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* “*in vitro*” y en dosis menores a las que se recomiendan en el control de bacterias de animales (1:750). En la literatura no se encontraron reportes de bactericidas agrícolas con yodo como principio activo por lo que se recomiendan estudios

posteriores “*in vivo*” con Vanodine para evaluar el efecto de este bactericida sobre plantas, y poder determinar efecto bactericida vrs. fitotoxicidad ocasionada sobre la planta de melón y su impacto sobre el consumidor.

El bactericida Timsen ocupa el 5 lugar en efectividad “*in vitro*” de los 8 bactericidas analizados (Cuadro 10), este funcionó de manera similar en las cuatro colonias (Figura 15), con halos de inhibición aproximados de 100 mm². Las pruebas de difusión de disco son utilizadas primordialmente para la evaluación de antibióticos por lo que bactericidas inorgánicos como el Timsen podrían exhibir halos de inhibición pequeños sin esto significar necesariamente una menor efectividad que otros compuestos antibacteriales, como la estreptomycin. Para evaluar la efectividad del Timsen como agente bacteriostático se podrían diseñar ensayos en los cuales una suspensión bacteriana se ponga en contacto directo con suspensiones del producto a distintas concentraciones por un tiempo determinado. La prueba de efectividad consistiría en evaluar la cantidad de colonias bacterianas viables obtenidas de las suspensiones bacterianas con el bactericida presente y compararlas con una colonia control.

Timsen es un producto que actúa a través de la anulación de las cargas negativas del exterior de las células y ocasiona un descontrol osmótico, provocando la pérdida de elementos esenciales como nitrógeno y fósforo, destruyendo la membrana de los microorganismos (Superb, 1997). Esta es la razón por la cual tiene un efecto similar en todas las colonias ya que el modo de acción no es específico. La casa comercial Superb propone al producto Timsen como una buena alternativa para el control bacteriano ya que al destruir completamente la membrana tiene un efecto bactericida efectivo, eliminando la posibilidad de inducir mecanismos de resistencia. Sin embargo, ya que existe evidencia de resistencia a compuestos de amonio cuaternario en otras bacterias distintas a *Pseudomonas* como *Staphylococcus aureus* (Lyon & Skurray 1987), se recomienda la evaluación “*in vivo*” de este compuesto y un seguimiento del comportamiento y susceptibilidad de las bacterias tratadas con Timsen en el campo.

En sexto lugar de efectividad según el análisis de comparación múltiples de medias de Duncan (Cuadro 10), se encuentra el compuesto bactericida Kilol con un área inhibición promedio de 69.39 mm². Este es un compuesto a base de extracto de semilla de cítricos y actúa inhibiendo y originando cambios en la permeabilidad de la membrana celular. Este compuesto interfiere en los mensajes químicos de las enzimas y de las proteínas desdobladoras de los nutrientes esenciales de los microorganismos fitopatógenos (Tecún, 1990). Es a su vez un agente altamente oxidante del citoplasma y de la pared celular, lo cual impide la multiplicación y por consiguiente evita el apareamiento de cepas resistentes, factor muy importante y deseado para los métodos de control químico. Los resultados bajo las condiciones de este estudio indican que este agente bactericida es más efectivo “*in vitro*” por el método de difusión en disco que productos a base de formulaciones de cobre con efectos bactericidas comprobados, sin embargo, puede ser que siguiendo otros métodos de análisis “*in vivo*” los resultados puedan variar.

El compuesto Kocide 101, a base de hidróxido cúprico no muestra bajo las condiciones de este estudio gran inhibición sobre la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv.

lachrymans, como se esperaba. Kagiwata 1992, reporta en la literatura que el método mas adecuado para evaluar la sensibilidad bacterial “*in vitro*” de compuestos cúpricos es el método de contacto directo. Esta baja inhibición de organismos bacteriales se puede deber a que el hidróxido de cobre requiere de condiciones un poco ácidas para dejar el catión cobre libre y formar agua. Sin embargo, el pH del medio en el cual se llevó a cabo el experimento es mas bien un poco alcalino (7.2 – 7.4), por lo que se recomienda llevar a cabo pruebas de contacto a pH un poco ácido (6.0), en las cuales la solución bacterial tiene contacto directo con el agente bactericida, para poder confirmar los resultados obtenidos acerca de compuestos de cobre. El efecto positivo de inhibición de compuestos de cobre sobre bacterias ha sido ampliamente estudiado tanto en invernaderos “*in vivo*” como en el laboratorio “*in vitro*” en los cuales utilizan Agrimicin 100 como control positivo de inhibición (Khlaif, 1994).

El producto Phyton muestra inhibición nula para la mayoría de las colonias a excepción de la colonia 35C, donde la inhibición es mínima por lo que no puede decirse que el Phyton bajo estas condiciones de análisis y estudio sea un agente bactericida. Este producto a base de sulfato de cobre penta hidratado no muestra inhibición bacterial “*in vitro*” por el método de difusión discal (Figuras 14, 15 y 16). El motivo más probable por el cual el Phyton 27 no es efectivo es que el pH del medio Müller-Hinton (7.2 - 7.4) neutraliza el pH efectivo establecido para la solución de Phyton, que es mas bien ácido, y para el cual el límite máximo es de 5.5. El pH ácido favorece la existencia del catión cobre en solución, el cual es el elemento tóxico siendo éste el que se incorpora a la membrana y causa el descontrol osmótico en las células bacterianas produciendo la muerte. Si el medio en el que se llevó a cabo el análisis es más bien básico, lo que se favorece es la disminución de este catión en solución a medida en que el cobre (Cu^+) se combina con el ion hidroxilo (OH^-) para formar hidróxido de cobre de una forma estable (CuOH), dando como resultado la ineffectividad del agente bactericida. También la ineffectividad del bactericida Phyton puede adjudicarse a la posibilidad de que este compuesto presente un coeficiente de difusión muy bajo que, para el caso de la prueba de difusión de disco, ha sido descrita como una de las limitantes del método (Bloomfiel, 1991, *in*. Denyer & Hugo, 1991). Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que los resultados poco satisfactorios obtenidos con el cobre en este estudio sean reflejo de mecanismos de resistencia a compuestos de cobre, ya que en la literatura se encuentran descritas y evaluadas la resistencia de *Pseudomonas* hacia cobre (Cooksey, 1990).

En resumen, en este trabajo se logró detectar que colonias obtenidas de distintas localidades del valle de la Fragua, Zacapa, exhiben una respuesta diferencial a la presencia de distintos agentes bactericidas. También se logró determinar que los agentes bactericidas evaluados tienen grados de efectividad distintos bajo el ambiente “*in vitro*” y la metodología empleada. Se demostró a su vez que la concentración juega un papel importante en la capacidad de los agentes bactericidas por lo que la dosificación correcta de los antibacteriales debe ser aplicada con precisión en los programas de manejo fitosanitario.

El factor crucial que se debe evitar cuando utilizan controles químicos sobre enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas es el desarrollo de resistencia de estas

a los bactericidas, las cuales probablemente han evolucionado de manera indetectable desde hace treinta años pues no fue hasta hace quince años que se empezaron a detectar globalmente organismos resistentes a cobres y con una mayor demora a otros agentes bactericidas (Bashan, 1995). Se sabe que el desarrollo de mecanismos de resistencia en las comunidades bacteriales no requieren de una evolución independiente, pues dentro de estas comunidades existen intercambios de información genética entre cepas e incluso entre especies y géneros (Cooksey, 1990); es aquí donde existe el problema para los humanos pues puede que dentro de las bacterias que evolucionan cooperativamente se encuentren bacterias patógenas de animales o incluso de humanos.

IX. CONCLUSIONES

El área de inhibición bacterial fue significativamente afectada por el aislado bacteriano analizado, el bactericida evaluado y la concentración de este, $\alpha = 0.01$. El modelo de ecuación obtenido del análisis estadístico ANDEVA es el siguiente:

$$\emptyset = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + C_k + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde \emptyset = área de inhibición “*in vitro*”, **A** = colonia, **B** = bactericida, **C** = concentración, **E** = error indeterminado.

De los análisis de comparación múltiples se agrupan los aislados de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans, *PSL*. en 3 categorías donde las colonias 35 C y 51 C se categorizan dentro de un mismo grupo, luego en otra categoría la 38 C seguida por la 8 C.

Las colonias 35C y 51C son las más susceptibles frente a efectos de bactericidas “*in vitro*”; La colonia 38 C presentó una susceptibilidad bacteriana “*in vitro*” más cercana al promedio; La colonia 8 C, presenta menor susceptibilidad bacteriana “*in vitro*” frente a los agentes bactericidas por lo que podría ser clasificada bajo las condiciones de estudio como moderadamente resistente.

Los aislados de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans, *PSL*, responden de manera significativamente distinta a los 8 bactericidas y sus concentraciones, con un nivel de significancia, $\alpha = 0.01$

La concentración es determinante sobre el efecto inhibitorio de los agentes bactericidas.

De los análisis de comparación múltiple de medias de Duncan se determina que los bactericidas evaluados tienen distintos grados de efectividad sobre el crecimiento “*in vitro*” de las bacterias estudiadas, a excepción del Kocide y Phyton que por no tener mayor efecto de inhibición pueden agruparse dentro de una misma categoría.

El orden de efectividad “*in vitro*” sobre *Pseudomonas syringae* obtenido a través del método de difusión discal es: (1) Agrimicin 100, (2) Bacter-Stop, (3) Farmacina 5%, (4) Vanodine, (5) Timsen, (6) Kilol, (7) Kocide 101 y, (8). Phyton 27.

Las formulaciones a base de antibióticos, Agrimicin 100 y Bacter-Stop son las más efectivas para el control “*in vitro*” de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans por el método de difusión de disco.

Agrimycin 100 es el compuesto antibiótico más efectivo para las colonias 8 C, 35 C y 38 C.

Las colonias tienen distinto grado de susceptibilidad frente a Bacter-Stop considerando primero las más susceptibles el orden es el siguiente: 51 C, 35 C, 38 C, 8 C.

La interacción colonia x bactericida ofrece evidencia de resistencia o tolerancia de las colonias 8 y 38 C a oxitetraciclina presente en el producto farmacina 5% comparadas contra las colonias 35 C y 51 C.

Es necesario llevar a cabo evaluaciones de campo con los productos alternativos Vanodine (uso veterinario), Timsen y Kilol, ya que sí muestran inhibición “*in vitro*” de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans.

Los aislados bacteriales, al mostrar un comportamiento diferencial a los bactericidas, dan indicios del desarrollo de resistencia a algunos de los productos evaluados (antibióticos).

X. RECOMENDACIONES

Es importante utilizar la dosis adecuada y exacta del agente bactericida para obtener un control efectivo de *PSL* y no inducir mecanismos de resistencia por sub dosificaciones o toxicidad por sobredosis.

El producto Kocide, a base de hidróxido de cobre muestra muy poca inhibición “*in vitro*” por el método de difusión de disco, sin embargo, se recomienda su evaluación por el método de contacto directo en solución a pH de 6.0.

Se recomienda hacer pruebas de contacto directo para la evaluación del efecto bactericida “*in vitro*” de Phyton 27 en soluciones bacteriales a un pH de 5.

Es importante utilizar la dosis adecuada y exacta del agente bactericida, principalmente para compuestos antibióticos o cúpricos, para obtener un control efectivo y no inducir mecanismos de resistencia por sobre o sub-dosificaciones.

Es importante llevar a cabo evaluaciones de campo o invernadero “*in vivo*” con los productos alternativos como Vanodine, Timsen, ya que muestran inhibición “*in vitro*” de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans.

Es necesario evaluar fitotoxicidad vs. impacto al consumidor de productos alternativos como Timsen, Vanodine y Kilol.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, C.F.; M. Richardson. 1981. *Nutritive value of foods*. USDA Home and Garden Bul. 72 Government Printing Office, Washington D.C. págs 32-33.
- AGEXPRONT. 1996. *Exportaciones agrícolas no-tradicionales: Situación actual y estrategia Futura*. Ruta III. FAO, Agexpront. 178 págs.
- Agrios, G. 1991. *Fitopatología*. 2da ed. Editorial Limusa. México. 756 págs.
- Baker, K., Cook, R. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. San Francisco: W. H. Freeman. 433 págs.
- Bauer, A., W. Kirby; J. Sherris y M. Truck. 1966. *Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method*. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496 págs.
- Bender, C., D. Cooksey. 1986. *Indigenous plasmids in Pseudomonas syringae pv. tomato: Conjugative transfer and role in copper resistance*. J. Bacteriol. 165:534-41 págs.
- Branson, D. 1980. *Methods in clinical bacteriology: A manual and test procedures*. Publisher Charles C, Thomas. USA. 213 págs.
- Bashan, Y. 1995. *Alternative strategies for controlling plant disease caused by pseudomonas syringae*. The Center for Biological Research of the Northwestt (CIB), México. 23000 B.C.S. 108: 821-829 págs.
- Bergey, D. H., Harrison, F., Breed, R. S., Hammer, B. W., and Huntoon, F. M. 1923. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1st ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD
- Burr, T., J. Norelli; B. Datz; W. Wilcox; S. Hoying. 1988. *Streptomycin resistance of Pseudomonas syringae pv. papulans in apple orchards and its association with a conjugative plasmid*. Phytopatology 78: 410-13 págs.
- Castaño, J. 1994. 2da ed. *Principios básicos de fitopatología*. Zamorano Academic Press. Honduras. 518 págs.
- Castaño, Jairo; Zapata; del Rio Mendoza.L. 1994. *Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica*. 3ra edd. Universidad de Cornell Zamorano Academic Press. 290 págs.
- Cervantes, C., S. Silver. 1996. *Metal resistance in pseudomonads: Genes and mechanisms*. ASM Press, Washington. ed. by Nakazawa *et al.* 398-403 págs.
- Chopra, I. 1991. *Bacterial resistance to disinfectants, antiseptics and toxic metal ions*. Society for Applied Bacteriology. ed S. Denyer, W. Hugo. 45-63 págs.

- Cooksey, D. 1990. *Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria*. Annu. Rev. Phytopathology. Annual Reviews Inc. USA .28: 201-19 págs.
- Denyer, S., Hugo, W. 1991. *Mechanisms of action of chemical biocides, their study and exploitation*. USA. Blackwell Scientific Publications. 360 págs.
- Dupont, 1990. *Ficha técnica Kocide 101*. Registro GUA 396-164. 2 págs.
- Difco, 1986. *Antimicrobial susceptibility test system*. Difco laboratories. Technical Information # 0344.
- Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures*. 1991. 9th ed. Difco Laboratories. USA. 350 págs.
- Eckert, R., E. Ogawa. 1988. *Post-harvest disease control*. Annu. Rev. Phytopathology. Annual Reviews Inc. USA. 26:453-469. págs.
- Franklin, T. J., G. A. Snow. 1989. *Biochemistry of antimicrobial action*. 4ta ed. Gran Bretaña, St Edmundsbury Press. 240 págs.
- Fagro. 1990. *Ficha Técnica Bacter-Stop*. RSCO-MEZC-1305-305-003-026. 1 pág
- Fravel, D. 1988. *Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases*. Annu. Rev. Phytopathol. Annual Reviews Inc. USA. 26:75-91 págs.
- Ganguly, J. 1989. *Biochemistry of Vitamin A*. CRS Press, Inc. Florida, USA. 213 págs.
- Gebhardt, L., D. Anderson. 1965. *Microbiology*. MOSBY. USA. 488 págs.
- Gilmore, R., Under Siege, 1990. *U.S. Food Safety*. Nature Biotechnology, 22: 1503-1504 págs.
- Goodman A., T. Rall, A. Nies, P. Taylor. 1991. Goodman y Gilman: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 8va. ed. Editorial Media Panamericana, México D.F. 1751 págs.
- Gómez, K; A. Gómez. 1984. *Statistical procedures for agricultural research*. 2th edd. John Willey & Sons. USA. 680 págs.
- Hopkins DL, 1991. *Chemical control of bacterial fruit blotch of watermelon*. Florida State Horticultural Society Proceedings, 104:270-272 págs.
- Hopkins DL, 1993. *Field spread of bacterial fruit blotch of watermelon*. Phytopathology, 83:466 págs.
- Hopkins DL; Thompson CM; Elmstrom GW, 1993. *Resistance of watermelon seedlings and fruit to the fruit blotch bacterium*. HortScience, 28(2):122-123 págs.

- Hopkins DL, 1994. *Spread of bacterial fruit blotch of watermelon in the greenhouse*. Phytopathology, 84:775 págs.
- Hopkins DL, 1995. *Copper-containing fungicides reduce the spread of bacterial fruit blotch of watermelon in the greenhouse*. Phytopathology, 85:510 págs.
- Heiby, W. 1988. *The reverse effect: How vitamins and minerals promote health and cause disease*. MediScience Publishers. USA. págs 261-293.
- Isakeit T; Black MC; Barnes LW; Jones JB, 1997. *First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli**. Plant Disease, 81(6):694 págs; 1 ref.
- Jones, R. N. 1983. *Antimicrobial susceptibility testing: a review of changing trends, quality control guidelines, test accuracy, and recommendations for testing of beta-lactam drugs*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1:1-24.
- Lambert, H., F. O'Grady. 1992. *Antibiotic and chemotherapy*. 6th ed. Churchill Livingstone, Londres. 1020 págs.
- Latin RX; Hopkins DL, 1995. *Bacterial fruit blotch of watermelon. The hypothetical examination becomes reality*. Plant Disease, 79(8):761-765 págs.
- Lester, G.E. y Whitaker, B.D. 1996. *Gamma-ray-induced changes in hypodermal mesocarp tissue plasma membrane of pre and poststorage muskmelon*. Physiol. Plant., 98, 265-270.
- Lester G.E., Eischen F., 1996. *Beta-carotene content of postharvest orange-flesh muskmelon fruit: effect of cultivar, growing location and fruit size*. Plant Foods Hum Nutri. 49:191-197
- Lester, G.E. 1998. *Physicochemical characterization of hybrid honeydew muskmelon fruit (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naud.) following maturation, abscission, and postharvest storage*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123:126–129.
- Lightle, P. C., E.T. Standring; J.B. Brown, 1942. *A bacterial necrosis of the giant cactus*. Phytopathology 32:303-313.
- Lucier, G., Plummer, C.S. Johnson, D. Love, J. 1996. *Vegetables and specialties, Situation and outlook report*. United States. Department of Agriculture. Economic Research Service, United States. World Agricultural Outlook Board, 55 páginas.
- Lucier, G.; Pollack, S. y Pérez, A. 1997. *Penetración de las importaciones en la industria de frutas y hortalizas de los Estados Unidos*. Servicio de Investigación Económica, Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos, Informe sobre la situación y perspectivas de las hortalizas, noviembre

- Lyon, B.; R. Skurray. 1987. Antimicrobial resistance of staphylococcus aureus: genetic basis. *Microbiological reviews* 51, 88-134 págs.
- Matsen, J. M., M. J. H. Koepcke, and P. G. Quie. 1969. *Evaluation of the Bauer-Kirby-Sherris-Turck single-disc diffusion method of antibiotic susceptibility testing*, págs. 445-453. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1968.
- McDougal, L. K., and C. Thornsberry. 1984. *New recommendations for disk diffusion antimicrobial susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci*. *J. Clin. Microbiol.* 19:482-488.
- Mc Guire JM. Ilotycin. 1952. *A new antibiotic. Antibiotics & Chemotherapy*; 2:281.
- Montalvo. 1982. *Olericultura*. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana Departamento de Agricultura. 350 págs.
- Murray, P. R., J. R. Zeiting, and D. J. Krogstad. 1982. *Reliability of disc diffusion susceptibility testing*. *Infect. Control* 3:230-237.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984. *Approved standard M2-A3. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests*, 3rd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- Kader, A., R. Kasmire, F. Mitchell, M. Reid, N. Sommer, J. Thompson. 1985. *Postharvest technology of horticultural crops*. Regents of Univ. of California. USA. 192 págs.
- Kagiwata, T. 1991. *Antibiotics resistance of pseudomonas syringae pv. lachrymans, the test of resistant cultivars and effective bacteriocides of the disease*. *Journal of agricultural science*. 36: 4, 227-291 págs.
- Khalif, H., H. Abu-Blan. 1994. *Effectiveness of selected fungicides and bacteriosides in inhibiting pseudomonas syringae pv. lachrymans "in vitro" and in controlling the pathogen in green houses*. *Distrat, series B, 21 B: 4* 115-125 págs.
- Montes, A. 1991. *Olericultura I*. Escuela Agrícola Panamericana Departamento de Horticultura. Honduras. 220 págs.
- NCCLS (National committee for clinical laboratory standards). 1993. *Approved Standar M2-A5. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test*, 5th ed. NCCLS. Villanova, Pa.
- Nakazawa, T., K. Furukawa, D. Haas; S. Silver. 1996. *Molecular biology of pseudomonas*. Washington, American society for Microbiology. 527 págs.

- Pfizer. 1992. *Manual de desinfección y desinfectantes*. División de Salud Animal, Pfizer S.A. 55 págs.
- P. J. Wright. 1998. *A soft rot of calla (Zantedeschia spp.) caused by Erwinia carotovora subspecies carotovora*, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 26:4, 331-334, DOI: 10.1080/01140671.1998.9514072
- Romantschuk, M. 1992. *Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces*. Ann. Rev. Phytopathology. Annual Reviews Inc. USA. 30:225-43 págs.
- Rubio, J R. 1982. *Manual agrícola Superb*. Litografía Profesional, Guatemala. 590 págs.
- Rodolph, K., T. Burr, J. Mansfield, D. Sted, A. Vivian, y J. Kietzell. 1997. *Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1020 págs.
- Rodríguez, E. 1998. *La desinfección como práctica útil en la lucha contra las infecciones animales*. Bioseguridad. 2:Nº6
- Rodríguez, M., J. Gundian, J. Barreto, N. Lim, A. Areu, y A. Prado. 1998. *Tetraciclinas*. Acta Medica. 8(1):75-9 págs.
- Schaad NW; Sowell G Jr; Goth RW; Colwell RR; Webb RE, 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. citrulli subsp. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology, 28(1):117-125 págs.
- Schatz A, Bugie E, Waksman SA. 1944. *Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram positive and Gram-negative bacteria*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 55:66-69.
- Sekizawa Y., K. Wakabayashi. 1990. *Bactericides: In methods in phyto bacteriology*, ed. Z. Klement; K. Rodolph, D. C. Sands. Budapest: Akademiai Kiado.
- Shahidi, A., P. Ellner. 1969. *Effect of mixed cultures on antibiotic susceptibility testing*. Applied Microbiology. 18: Nov. 766-770 págs.
- Sigee, D. 1993. *Bacterial plant pathology: Cell and molecular aspects*. Cambridge University press. Great Britain. 920 págs.
- Somodi GC; Jones JB; Hopkins DL; Stall RE; Kucharek TA; Hodge NC; Watterson JC, 1991. *Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida*. Plant Disease, 75(10):1053-1056 págs.
- Spielholz, B. 1999. *Propiedades de los desinfectantes para planta de incubación*. Avicultura profesional. 17: Nº4.

- Sundin, G., L. Bender. 1993. *Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in pseudomonas syringae pv. syringae*. Appl. Environ. Microbiol. 59:1018-1024 págs.
- Tecún, 1990. *Boletín informativo: Acción bactericida y fungicida del Timsen*. Ediciones tecún. 10 págs.
- Todar, K. 1996. *Bacteriology 330 lecture topics: Bacterial resistance to antibiotics*. University of Wisconsin Department of Bacteriology. CALS Pathogen/Pest Resistance.
- Vande Broek, A. Venderleyden, J. 1985. *Role of bacterial motility, chemotaxis and attachment in bacteria-plant interactions*. Molec. Plant-Microbe interact. 8:800-810 págs.
- Wallace, B., P. Tai; D. Davis. *Streptomycin and related antibiotics*. New York, ed. F. Hahn. 376 págs.
- Willems A; Goor M; Thielemans S; Gillis M; Kersters K; Ley Jde, 1992. *Transfer of several phytopathogenic Pseudomonas species to Acidovorax as Acidovorax avenae subsp. avenae subsp. nov., comb. nov., Acidovorax avenae subsp. citrulli, Acidovorax avenae subsp. cattleyae, and Acidovorax konjaci*. International Journal of Systematic Bacteriology, 42(1):107-119 págs.
- Webb RE; Goth RW, 1965. *A seedborne bacterium isolated from watermelon*. Plant Disease Reporter, 49:818-821 págs.
- Woods, G., J. Washington. 1995. *Antimicrobial agents and susceptibility testing*. USA. 1327-1341 págs.
- Zitter, T., D. Hopkins., C. Thomas. 1996. *Compendium of cucurbit diseases*. APS Press, USA. 87 págs.

XII. ANEXOS

A. Datos de áreas de inhibición (mm²)

Datos de área de inhibición en mm² obtenidos para los cuatro aislados bacteriales (8C, 35C, 38 C, 51 C) frente a los agentes bactericidas antibióticos (Agrimicin 100, Bacter-Stop y Farmacina 5%) a distintas concentraciones * (0, 0.25, 0.75, 1.25, 2) ³

COLONIA	Agrimicin 100			Bacter-Stop			Farmacina 5%		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
*Concentración	0.00			0.00			0.00		
C 8	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 35	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 38	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 51	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
*Concentración	0.25			0.25			0.25		
C 8	188.73	146.66	192.72	56.85	86.68	75.95	94.99	48.21	59.01
C 35	81.18	73.40	67.44	94.99	150.52	184.61	205.21	93.48	201.09
C 38	218.10	235.89	259.12	143.20	172.77	176.63	50.24	42.26	44.16
C 51	78.63	117.51	76.08	161.45	231.38	233.17	150.26	188.73	196.84
*Concentración	0.75			0.75			0.75		
C 8	303.80	298.63	298.63	132.67	165.18	209.46	129.59	81.18	106.89
C 35	231.38	228.65	288.42	184.74	201.09	427.43	273.57	264.15	319.43
C 38	314.13	351.75	391.58	283.39	278.48	278.48	75.95	66.01	75.95
C 51	303.80	278.48	236.42	351.75	314.13	397.54	273.57	235.89	319.30
*Concentración	1.25			1.25			1.25		
C 8	415.27	397.41	421.35	231.51	235.89	235.89	197.10	165.18	161.32
C 35	409.57	471.33	537.53	363.00	452.29	497.23	368.82	392.11	452.29
C 38	409.31	433.52	421.35	298.63	340.76	351.75	196.84	113.04	205.21
C 51	427.69	464.98	351.75	579.40	421.35	439.73	363.00	346.19	397.54
*Concentración	2.00			2.00			2.00		
C 8	510.84	465.11	458.51	240.54	249.70	308.83	240.54	188.73	209.46
C 35	544.92	537.79	579.40	503.97	504.36	523.92	464.98	490.76	517.18
C 38	471.33	484.15	471.33	357.31	374.25	391.58	205.21	180.88	209.46
C 51	471.33	523.92	517.45	675.62	586.66	510.58	530.66	510.58	464.85

³ Las concentraciones de bactericidas utilizadas toman como unidad la dosis media recomendadas por las casas comerciales (Cuadro 6).

Datos de área de inhibición en mm² obtenidos para los cuatro aislados bacteriales (8, 35, 38, 51) frente a los agentes bactericidas con principio activo de cobre (Phyton y Kocide 101) a distintas concentraciones * (0, 0.25, 0.75, 1.25, 2) ⁴

COLONIA	Kocide			Phyton		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
* Concentración						
	0.00			0.00		
C 8	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 35	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 38	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 51	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
* Concentración						
	0.25			0.25		
C 8	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 35	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 38	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 51	33.17	33.17	54.56	33.17	33.17	33.17
* Concentración						
	0.75			0.75		
C 8	50.24	52.40	36.70	33.17	33.17	33.17
C 35	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 38	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 51	50.24	44.16	59.01	33.17	33.17	33.17
* Concentración						
	1.25			1.25		
C 8	89.36	56.72	50.24	33.17	33.17	33.17
C 35	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 38	33.17	33.17	34.93	33.17	33.17	33.17
C 51	63.59	81.18	63.59	33.17	33.17	33.17
* Concentración						
	2.00			2.00		
C 8	94.99	70.98	54.56	33.17	33.17	33.17
C 35	33.17	33.17	33.17	42.26	33.17	33.17
C 38	33.17	33.17	46.18	33.17	33.17	33.17
C 51	78.50	86.68	68.43	33.17	33.17	33.17

⁴ Las concentraciones de bactericidas utilizadas toman como unidad la dosis media recomendadas por las casas comerciales (Cuadro 6).

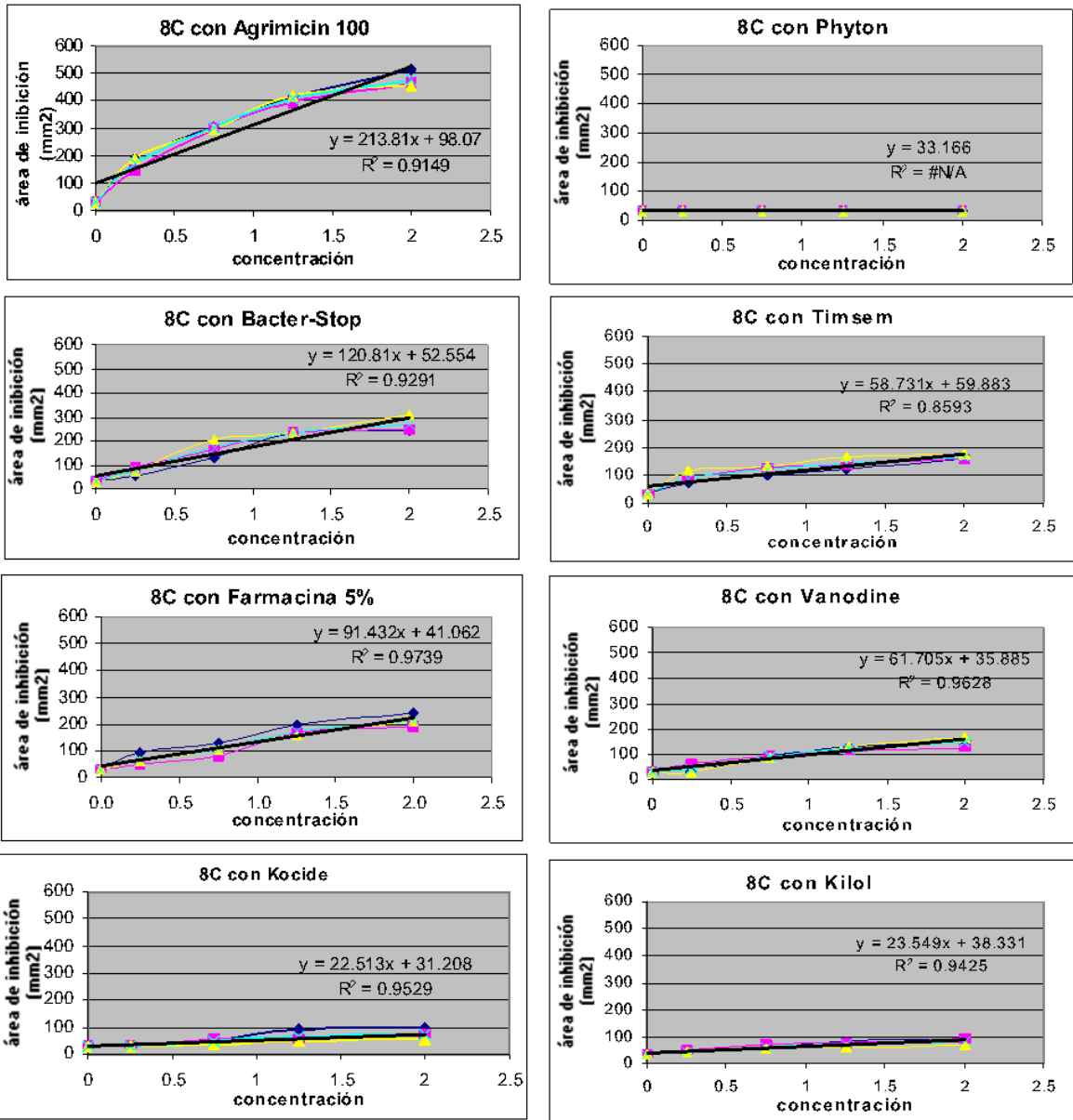
Datos de área de inhibición en mm² obtenidos para los cuatro aislados bacteriales (8, 35, 38, 51) frente a los agentes bactericidas con principio activo de amonio cuaternario, yodo y extracto de cítricos (Timsen, Vanodine, Kilol) a distintas concentraciones * (0.0, 0.25, 0.75, 1.25, 2)⁵

COLONIA	Timsen			Vanodine			Kilol		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
* Concentración	0.00			0.00			0.00		
C 8	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 35	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 38	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
C 51	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17	33.17
* Concentración	0.25			0.25			0.25		
C 8	70.85	87.46	113.04	33.17	63.72	33.17	44.16	50.24	42.26
C 35	70.98	78.63	122.79	78.50	122.79	109.97	61.30	56.72	61.30
C 38	44.16	94.99	94.99	46.45	75.95	94.99	33.17	36.70	38.47
C 51	48.21	113.04	89.49	63.72	81.18	70.98	68.56	66.01	50.24
* Concentración	0.75			0.75			0.75		
C 8	97.93	126.12	132.67	94.99	92.17	84.00	54.69	70.85	52.40
C 35	92.17	116.25	157.59	146.93	197.36	172.77	68.56	63.59	78.50
C 38	52.40	116.25	110.10	97.93	100.87	113.04	38.47	63.59	56.85
C 51	52.40	125.99	116.25	106.89	116.25	161.45	70.98	73.53	78.50
* Concentración	1.25			1.25			1.25		
C 8	122.79	139.60	165.18	132.67	109.97	132.80	81.18	78.50	59.01
C 35	97.93	139.60	197.10	268.80	268.80	294.11	86.68	94.99	103.95
C 38	59.01	132.67	139.60	125.99	143.07	161.58	73.53	79.02	84.00
C 51	143.20	150.26	157.59	201.48	231.38	184.74	92.43	78.50	101.00
* Concentración	2.00			2.00			2.00		
C 8	157.59	157.59	176.76	157.59	126.12	165.18	86.68	92.17	63.59
C 35	116.25	157.59	222.48	433.65	346.71	477.80	129.59	173.03	176.63
C 38	103.95	172.77	172.77	165.18	180.62	235.89	101.00	101.00	92.43
C 51	196.84	196.84	213.85	268.80	293.46	293.59	107.15	107.02	143.20

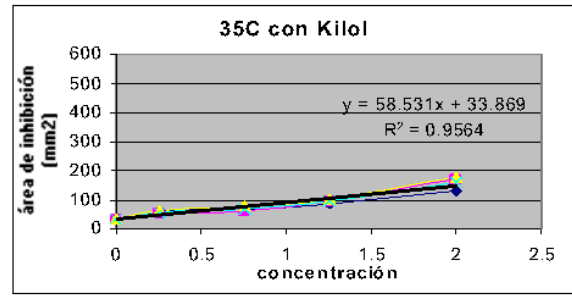
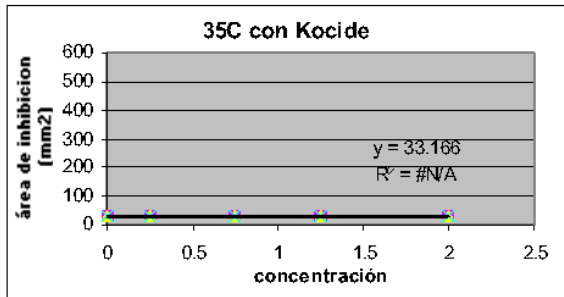
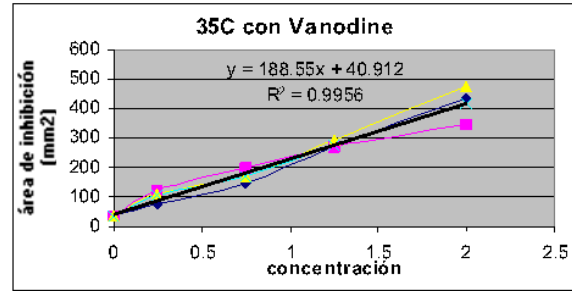
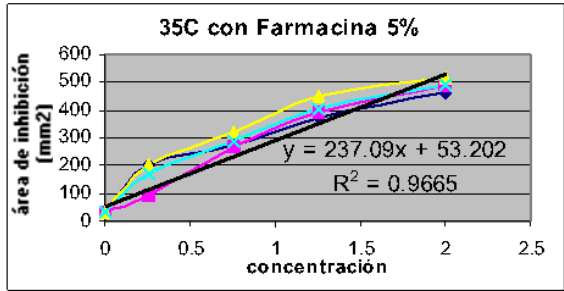
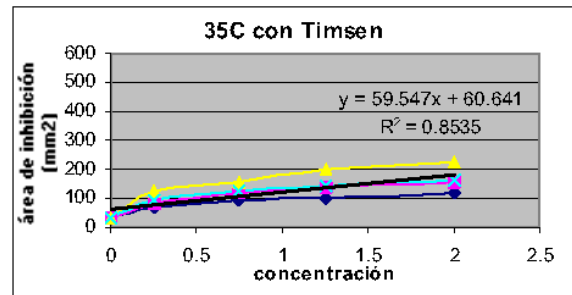
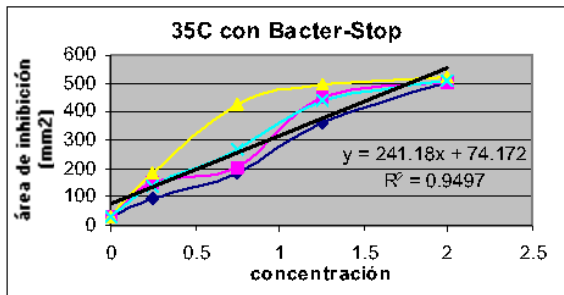
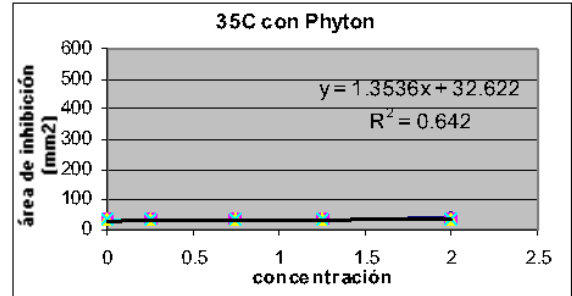
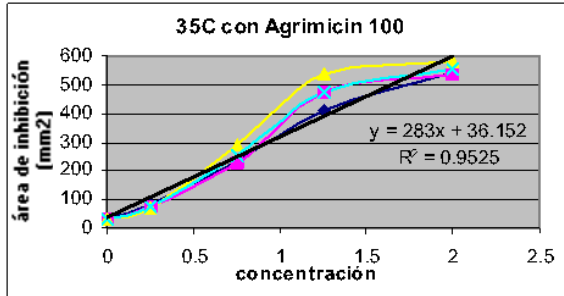
⁵ Las concentraciones de bactericidas utilizadas toman como unidad la dosis media recomendadas por las casas comerciales (Cuadro 6).

B. Gráficas de inhibición de bactericidas vs. área de inhibición (mm²)

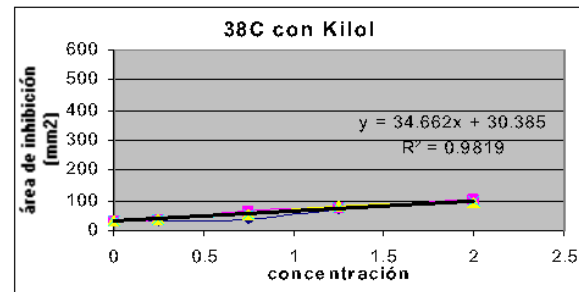
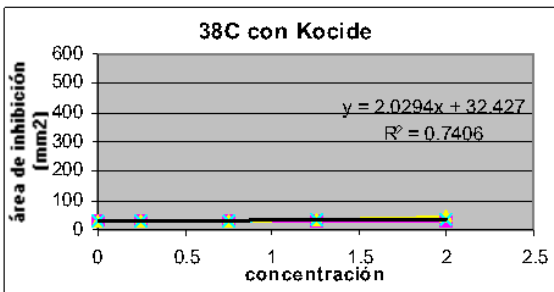
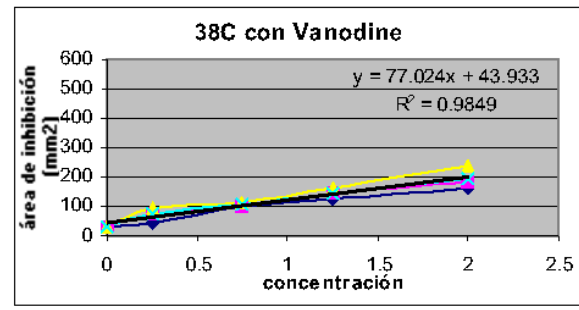
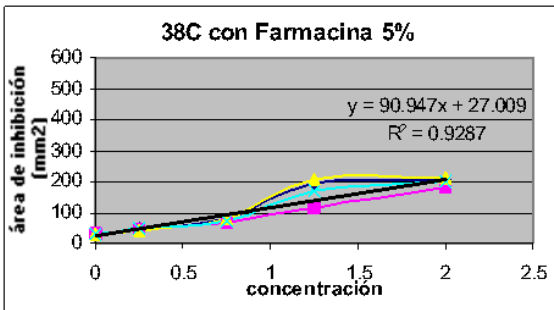
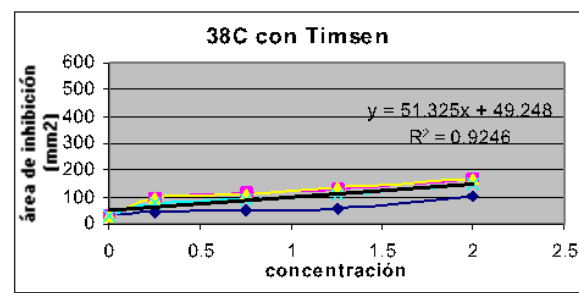
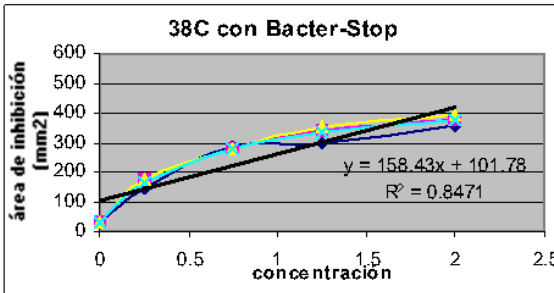
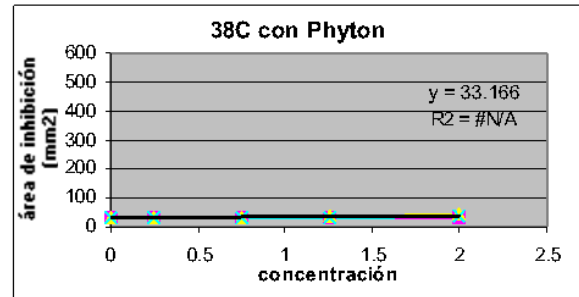
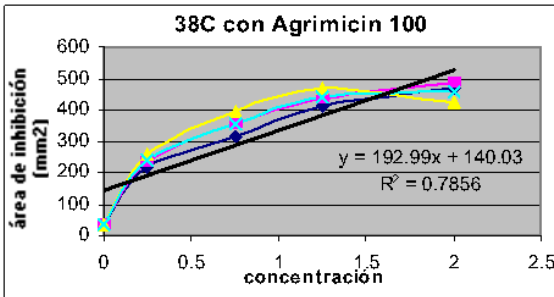
En las ocho gráficas a continuación se muestra la inhibición de las diferentes concentraciones de bactericida (Agrimicin 100, Bacter-Stop, Farmacina 5%, Kocide, Phyton, Timsen, Vanodine y Kilol) hacia aislado bacterial 8 C.



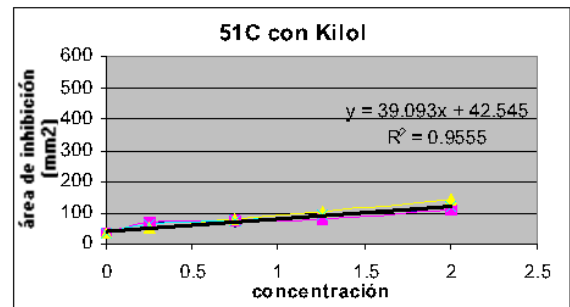
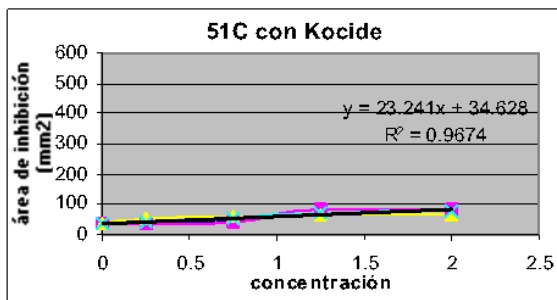
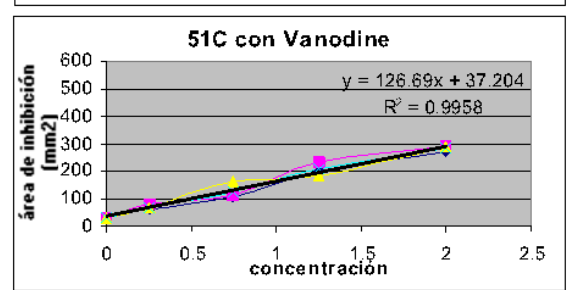
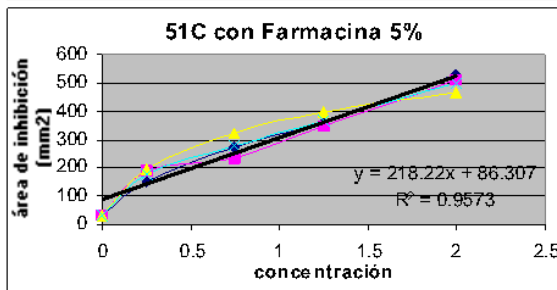
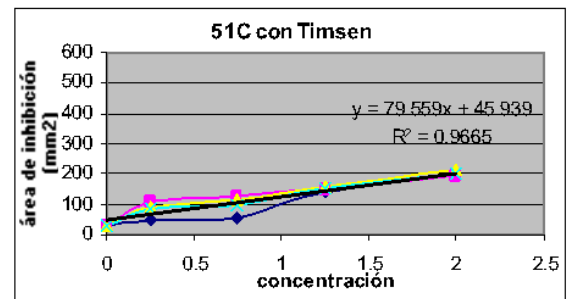
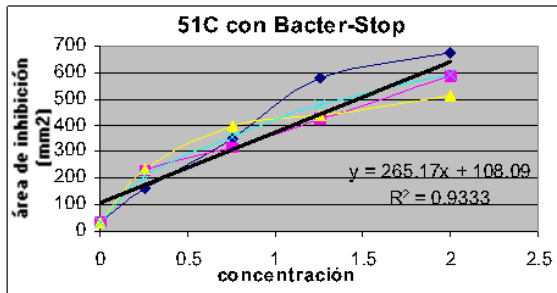
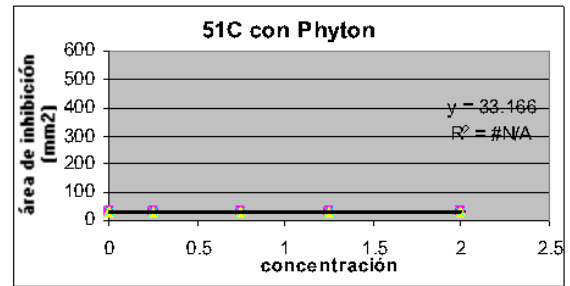
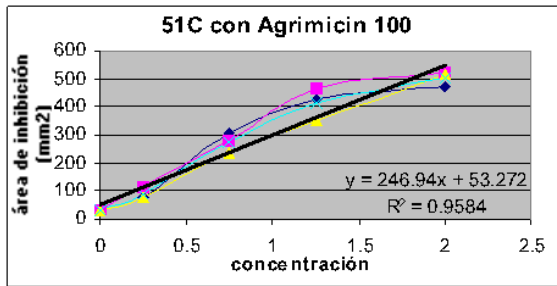
En las ocho gráficas a continuación se muestra la inhibición de las diferentes concentraciones de bactericida (Agrimicin 100, Bacter-Stop, Farmacina 5%, Kocide, Phyton, Timsen, Vanodine y Kilol) hacia aislado bacterial de *Pseudomonas syringae* pv. 35 C.



En las ocho gráficas a continuación se muestra la inhibición de las diferentes concentraciones de bactericida (Agrimicin 100, Bacter-Stop, Farmacina 5%, Kocide, Phytol, Timsen, Vanodine y Kilol) hacia aislado bacterial 38 C.



En las ocho gráficas a continuación se muestra la inhibición de las diferentes concentraciones de bactericida (Agrimicin 100, Bacter-Stop, Farmacina 5%, Kocide, Phyton, Timsen, Vanodine y Kilol) hacia aislado bacterial 51 C.



C. Resultados del análisis estadístico de varianza ANDEVA de tres factores

Los factores incluidos en el análisis son: A (colonia) B (bactericida) C (concentración): Este análisis da resultados tanto de los factores individuales como de las posibles interacciones entre ellos.

-----**Unweighted Means ANOVA**-----

Date/Time 06-10-1998 10:12:34
 Data Base Name C:\ncss\laura
 Description Imported from C:\NCSS\LAURA.TXT

Analysis of Variance Report

ANOVA Table for Response Variable: AREAPROM

Source	DF	Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob>F	Error Term
A (COLONIA)	3	247179.9	82393.3	116.65	0.0000	ERROR
B (BACTERI)	7	3712103	530300.4	750.76	0.0000	ERROR
AB	21	543900	25900	36.67	0.0000	ERROR
C (CONCEN)	4	2659509	664877.3	941.28	0.0000	ERROR
AC	12	180987.5	15082.29	21.35	0.0000	ERROR
BC	28	1789896	63924.87	90.50	0.0000	ERROR
ABC	84	264544.1	3149.335	4.46	0.0000	ERROR
ERROR	320	226033.8	706.3555			
TOTAL (Adj)	479	9624156				

Expected Mean Squares

Source DF Expected Mean Squares (S stands for sigma-squared or Error).

A	3	S+bcnA
B	7	S+acnB
AB	21	S+cnAB
C	4	S+abnC
AC	12	S+bnAC
BC	28	S+anBC
ABC	84	S+nABC
S	320	S

-----Unweighted Means ANOVA-----

Date/Time 06-10-1998 10:12:34
 Data Base Name C:\ncss\laura
 Description Imported from C:\NCSS\LAURA.TXT

Means & Effects for Y = AREAPROM

Term	Count	Mean	Std.Error	Effect
ALL	480	139.1678		139.1677
A: COLONIA				
1	120	111.7284	2.426169	-27.43927
2	120	161.8803	2.426169	22.71254
3	120	121.784	2.426169	-17.38363
4	120	161.2781	2.426169	22.11038
B: BACTERICIDA				
1	60	280.937	3.431121	141.7693
2	60	251.087	3.431121	111.9193
3	60	192.7644	3.431121	53.59674
4	60	43.01146	3.431121	-96.1562
5	60	33.3178	3.431121	-105.8499
6	60	106.8745	3.431121	-32.29318
7	60	135.9522	3.431121	-3.215469
8	60	69.39727	3.431121	-69.77039
C: CONCENTRACION				
1	96	33.16626	2.712539	-106.0014
2	96	85.49731	2.712539	-53.67034
3	96	139.7125	2.712539	.5448608
4	96	197.2203	2.712539	58.05264
5	96	240.242	2.712539	101.0743
AB: COLONIA, BACTERICIDA				
1,1	15	279.8089	6.862242	26.31122
1,2	15	155.2425	6.862242	-68.40526
1,3	15	118.7792	6.862242	-46.54592
1,4	15	50.34467	6.862242	34.77248
1,5	15	33.16625	6.862242	27.28771
1,6	15	109.8041	6.862242	30.36884
1,7	15	88.33431	6.862242	-20.17862
1,8	15	58.34731	6.862242	16.38931
2,1	15	276.7008	6.862242	-26.94865
2,2	15	279.1765	6.862242	5.376999
2,3	15	276.1718	6.862242	60.69478
2,4	15	33.16625	6.862242	-32.55776
2,5	15	33.77245	6.862242	-22.2579
2,6	15	111.2563	6.862242	-18.33073
2,7	15	201.1781	6.862242	42.51332
2,8	15	83.61996	6.862242	-8.489861
3,1	15	304.0698	6.862242	40.51645
3,2	15	236.4464	6.862242	2.742989
3,3	15	104.3134	6.862242	-71.06736
3,4	15	34.15186	6.862242	8.524033
3,5	15	33.16625	6.862242	17.23207
3,6	15	92.87423	6.862242	3.383369
3,7	15	109.4028	6.862242	-9.165718
3,8	15	59.84753	6.862242	7.833885

Term	Count	Mean	Std.Error	Effect
AB: COLONIA, BACTERICIDA				
4,1	15	263.1685	6.862242	-39.87888
4,2	15	333.4827	6.862242	60.28528
4,3	15	271.7932	6.862242	56.91837
4,4	15	54.38306	6.862242	-10.73878
4,5	15	33.16625	6.862242	-22.26194
4,6	15	113.5633	6.862242	-15.42154
4,7	15	144.8936	6.862242	-13.16901
4,8	15	75.77432	6.862242	-15.73335
AC: COLONIA, CONCENTRACION				
1,1	24	33.16625	5.425079	27.43925
1,2	24	70.28477	5.425079	12.22671
1,3	24	115.4441	5.425079	3.170807
1,4	24	157.4334	5.425079	-12.34766
1,5	24	182.3135	5.425079	-30.4892
2,1	24	33.16625	5.425079	-22.71255
2,2	24	88.07798	5.425079	-20.13187
2,3	24	154.6487	5.425079	-7.776352
2,4	24	237.2962	5.425079	17.36339
2,5	24	296.2121	5.425079	33.2576
3,1	24	33.16625	5.425079	17.38361
3,2	24	87.54931	5.425079	19.43561
3,3	24	127.6743	5.425079	5.34536
3,4	24	167.483	5.425079	-12.35366
3,5	24	193.0473	5.425079	-29.81107
4,1	24	33.16625	5.425079	-22.1104
4,2	24	96.07724	5.425079	-11.53046
4,3	24	161.0831	5.425079	-.7398071
4,4	24	226.6687	5.425079	7.338043
4,5	24	289.3951	5.425079	27.0428
BC: BACTERICIDA, CONCENTRACION				
1,1	12	33.16625	7.67222	-141.7693
1,2	12	144.6217	7.67222	-82.64495
1,3	12	293.8046	7.67222	12.32275
1,4	12	434.2522	7.67222	95.26257
1,5	12	498.8402	7.67222	116.829
2,1	12	33.16625	7.67222	-111.9194
2,2	12	147.3475	7.67222	-50.0691
2,3	12	268.6935	7.67222	17.06162
2,4	12	370.6181	7.67222	61.47849
2,5	12	435.6096	7.67222	83.44826
3,1	12	33.16625	7.67222	-53.59676
3,2	12	114.5391	7.67222	-24.55493
3,3	12	185.1237	7.67222	-8.185532
3,4	12	279.8852	7.67222	29.06818
3,5	12	351.1076	7.67222	57.26888
4,1	12	33.16625	7.67222	96.15619
4,2	12	34.94885	7.67222	45.60774
4,3	12	40.97809	7.67222	-2.578232
4,4	12	50.45261	7.67222	-50.6115
4,5	12	55.51149	7.67222	-88.5743
5,1	12	33.16625	7.67222	105.8498
5,2	12	33.16625	7.67222	53.51878
5,3	12	33.16625	7.67222	-.6964188

Term	Count	Mean	Std.Error	Effect
BC: BACTERICIDA,CONCENTRACION				
5,4	12	33.16625	7.67222	-58.2042
5,5	12	33.92399	7.67222	-100.4681
6,1	12	33.16625	7.67222	32.29316
6,2	12	85.71764	7.67222	32.51349
6,3	12	108.0084	7.67222	.5890274
6,4	12	137.0425	7.67222	-27.88467
6,5	12	170.4377	7.67222	-37.51115
7,1	12	33.16625	7.67222	3.215454
7,2	12	72.87962	7.67222	-9.402229
7,3	12	123.7193	7.67222	-12.77777
7,4	12	187.9476	7.67222	-6.057282
7,5	12	262.0483	7.67222	25.02176
8,1	12	33.16625	7.67222	69.77038
8,2	12	50.75789	7.67222	35.03096
8,3	12	64.20646	7.67222	-5.735672
8,4	12	84.39841	7.67222	-43.05151
8,5	12	114.4574	7.67222	-56.01423
ABC: COLONIA, BACTERICIDA,CONCENTRACION				
1,1,1	3	33.16625	15.34444	-26.3112
1,1,2	3	176.0363	15.34444	20.31596
1,1,3	3	300.3497	15.34444	4.502411
1,1,4	3	411.34	15.34444	-9.436462
1,1,5	3	478.1522	15.34444	10.92923
1,2,1	3	33.16625	15.34444	68.40527
1,2,2	3	73.15765	15.34444	9.42791
1,2,3	3	169.1021	15.34444	-6.917709
1,2,4	3	234.4316	15.34444	-27.99438
1,2,5	3	266.3549	15.34444	-42.92098
1,3,1	3	33.16625	15.34444	46.54594
1,3,2	3	67.40097	15.34444	14.62032
1,3,3	3	105.8878	15.34444	-8.421555
1,3,4	3	174.5316	15.34444	-19.02074
1,3,5	3	212.9094	15.34444	-33.72378
1,4,1	3	33.16625	15.34444	-34.77246
1,4,2	3	33.16625	15.34444	-21.34252
1,4,3	3	46.44583	15.34444	-5.03627
1,4,4	3	65.43848	15.34444	20.00032
1,4,5	3	73.50652	15.34444	41.15102
1,5,1	3	33.16625	15.34444	-27.2877
1,5,2	3	33.16625	15.34444	-12.07515
1,5,3	3	33.16625	15.34444	-3.019249
1,5,4	3	33.16625	15.34444	12.49921
1,5,5	3	33.16625	15.34444	29.88301
1,6,1	3	33.16625	15.34444	-30.36882
1,6,2	3	90.44944	15.34444	-10.42447
1,6,3	3	118.9057	15.34444	4.796951
1,6,4	3	142.5211	15.34444	14.89674
1,6,5	3	163.9778	15.34444	21.09973
1,7,1	3	33.16625	15.34444	20.17863
1,7,2	3	43.34944	15.34444	5.861
1,7,3	3	90.38403	15.34444	11.11182
1,7,4	3	125.1421	15.34444	-2.839912
1,7,5	3	149.6297	15.34444	-34.31148

Term	Count	Mean	Std.Error	Effect
ABC: COLONIA, BACTERICIDA, CONCENTRACION				
1, 8, 1	3	33.16625	15.34444	-16.38929
1, 8, 2	3	45.55181	15.34444	-6.382828
1, 8, 3	3	59.31111	15.34444	2.98381
1, 8, 4	3	72.89597	15.34444	11.8952
1, 8, 5	3	80.81139	15.34444	7.893189
2, 1, 1	3	33.16625	15.34444	26.94867
2, 1, 2	3	74.00718	15.34444	-46.2465
2, 1, 3	3	249.4852	15.34444	-32.30687
2, 1, 4	3	472.8098	15.34444	25.43039
2, 1, 5	3	554.0356	15.34444	26.17389
2, 2, 1	3	33.16625	15.34444	-5.376984
2, 2, 2	3	143.3715	15.34444	-11.93369
2, 2, 3	3	271.0867	15.34444	-17.92
2, 2, 4	3	437.5067	15.34444	21.43561
2, 2, 5	3	510.7516	15.34444	13.79482
2, 3, 1	3	33.16625	15.34444	-60.69476
2, 3, 2	3	166.5944	15.34444	-11.22014
2, 3, 3	3	285.7182	15.34444	24.96353
2, 3, 4	3	404.4059	15.34444	23.74992
2, 3, 5	3	490.9739	15.34444	23.20137
2, 4, 1	3	33.16625	15.34444	32.55777
2, 4, 2	3	33.16625	15.34444	28.19448
2, 4, 3	3	33.16625	15.34444	9.809723
2, 4, 4	3	33.16625	15.34444	-24.80453
2, 4, 5	3	33.16625	15.34444	-45.75763
2, 5, 1	3	33.16625	15.34444	22.25791
2, 5, 2	3	33.16625	15.34444	19.67723
2, 5, 3	3	33.16625	15.34444	7.321709
2, 5, 4	3	33.16625	15.34444	-17.81803
2, 5, 5	3	36.19722	15.34444	-31.43901
2, 6, 1	3	33.16625	15.34444	18.33074
2, 6, 2	3	90.79834	15.34444	20.83076
2, 6, 3	3	122.0021	15.34444	17.38824
2, 6, 4	3	144.8761	15.34444	-13.91155
2, 6, 5	3	165.4387	15.34444	-42.63834
2, 7, 1	3	33.16625	15.34444	-42.51331
2, 7, 2	3	103.7508	15.34444	-14.22276
2, 7, 3	3	172.3511	15.34444	-8.817673
2, 7, 4	3	277.2358	15.34444	6.699036
2, 7, 5	3	419.3862	15.34444	58.85449
2, 8, 1	3	33.16625	15.34444	8.489876
2, 8, 2	3	59.76903	15.34444	14.92033
2, 8, 3	3	70.21389	15.34444	-.4388962
2, 8, 4	3	95.20306	15.34444	-20.7814
2, 8, 5	3	159.7475	15.34444	-2.190132
3, 1, 1	3	33.16625	15.34444	-40.51643
3, 1, 2	3	237.7024	15.34444	50.51229
3, 1, 3	3	352.4868	15.34444	30.20408
3, 1, 4	3	438.0518	15.34444	-6.97953
3, 1, 5	3	458.9415	15.34444	-33.22045
3, 2, 1	3	33.16625	15.34444	-2.742973
3, 2, 2	3	164.1958	15.34444	12.0533
3, 2, 3	3	280.1142	15.34444	20.71597
3, 2, 4	3	330.376	15.34444	-13.24785

Term	Count	Mean	Std.Error	Effect
ABC: COLONIA, BACTERICIDA, CONCENTRACION				
3,2,5	3	374.3796	15.34444	-16.77831
3,3,1	3	33.16625	15.34444	71.06737
3,3,2	3	45.55181	15.34444	2.804E-02
3,3,3	3	72.63431	15.34444	-29.3838
3,3,4	3	171.6969	15.34444	-7.383629
3,3,5	3	198.5177	15.34444	-34.3278
3,4,1	3	33.16625	15.34444	-8.524017
3,4,2	3	33.16625	15.34444	-12.35862
3,4,3	3	33.16625	15.34444	-4.297607
3,4,4	3	33.755	15.34444	4.515656
3,4,5	3	37.50555	15.34444	20.66473
3,5,1	3	33.16625	15.34444	-17.23206
3,5,2	3	33.16625	15.34444	-19.28405
3,5,3	3	33.16625	15.34444	-5.193802
3,5,4	3	33.16625	15.34444	12.50522
3,5,5	3	33.16625	15.34444	29.20489
3,6,1	3	33.16625	15.34444	-3.383354
3,6,2	3	78.04208	15.34444	-13.1109
3,6,3	3	92.91349	15.34444	-6.439987
3,6,4	3	110.4233	15.34444	-.2652054
3,6,5	3	149.826	15.34444	23.19964
3,7,1	3	33.16625	15.34444	9.165733
3,7,2	3	72.45986	15.34444	6.693977
3,7,3	3	103.9471	15.34444	1.431808
3,7,4	3	143.546	15.34444	-5.498543
3,7,5	3	193.895	15.34444	-11.79285
3,8,1	3	33.16625	15.34444	-7.83387
3,8,2	3	36.11	15.34444	-24.53375
3,8,3	3	52.9657	15.34444	-7.036377
3,8,4	3	78.84889	15.34444	16.35389
3,8,5	3	98.14681	15.34444	23.05026
4,1,1	3	33.16625	15.34444	39.87888
4,1,2	3	90.74078	15.34444	-24.58192
4,1,3	3	272.8966	15.34444	-2.399719
4,1,4	3	414.807	15.34444	-9.014679
4,1,5	3	504.2317	15.34444	-3.882858
4,2,1	3	33.16625	15.34444	-60.28525
4,2,2	3	208.6652	15.34444	-9.547546
4,2,3	3	354.4711	15.34444	4.121765
4,2,4	3	480.1583	15.34444	19.80649
4,2,5	3	590.9524	15.34444	45.90434
4,3,1	3	33.16625	15.34444	-56.91835
4,3,2	3	178.6093	15.34444	-3.428108
4,3,3	3	276.2546	15.34444	12.84193
4,3,4	3	368.9064	15.34444	2.654388
4,3,5	3	502.0293	15.34444	44.85014
4,4,1	3	33.16625	15.34444	10.7388
4,4,2	3	40.29667	15.34444	5.506668
4,4,3	3	51.13403	15.34444	-.4758453
4,4,4	3	69.45069	15.34444	.2884445
4,4,5	3	77.86765	15.34444	-16.05824
4,5,1	3	33.16625	15.34444	22.26196
4,5,2	3	33.16625	15.34444	11.68201
4,5,3	3	33.16625	15.34444	.8913651

Term	Count	Mean	Std. Error	Effect
ABC: COLONIA, BACTERICIDA, CONCENTRACION				
4, 5, 4	3	33.16625	15.34444	-7.186485
4, 5, 5	3	33.16625	15.34444	-27.64899
4, 6, 1	3	33.16625	15.34444	15.42155
4, 6, 2	3	83.58069	15.34444	2.704666
4, 6, 3	3	98.21224	15.34444	-15.74517
4, 6, 4	3	150.3493	15.34444	-.720047
4, 6, 5	3	202.5082	15.34444	-1.661118
4, 7, 1	3	33.16625	15.34444	13.16902
4, 7, 2	3	71.95834	15.34444	1.667793
4, 7, 3	3	128.1949	15.34444	-3.725983
4, 7, 4	3	205.8663	15.34444	1.639282
4, 7, 5	3	285.2821	15.34444	-12.75035
4, 8, 1	3	33.16625	15.34444	15.73336
4, 8, 2	3	61.60069	15.34444	15.99622
4, 8, 3	3	74.33514	15.34444	4.491447
4, 8, 4	3	90.6457	15.34444	-7.467781
4, 8, 5	3	119.1238	15.34444	-28.75345

D. Materiales, reactivos y métodos

1. Materiales y reactivos

a. Equipo

- 1) Campana de flujo laminar
- 2) Incubadora
- 3) Campana de extracción de gases (Labconco, Corporation)

b. Materiales

- 1) Balanza analítica (Sartorius Basic B120S).
- 2) Balanza semianalítica (Mettler P1200. Mettler InstrumentsAG.).
- 3) Micropipetas 200-500 µl
- 4) Baño térmico (Shaking water bath 25. Precision).
- 5) Bulbos para aspiración para pipetas pasteur y serológicas
- 6) Cronómetro-alarma VWR brand-3 canales
- 7) Desecador (Carbonato de calcio).
- 8) Equipo para filtración (Millipore.).
- 9) Espátula de metal.
- 10) Pinzas de plástico NALGENE descartables
- 11) Esparcidor de células SCIENCE WARE
- 12) Filtros de 0.45µm (Millipore.).
- 13) Discos de 6 mm (1/4" diametro) de papel en blanco estériles TAXCO o papel de blotting
- 14) Discos de 6 mm (1/4" diametro) con estreptomycin 10 µg
- 15) Algodón en bola
- 16) Regla milimétrica

c. Reactivos

- 1) Agar Müller-Hinton sin NaCl (Diagnostics Pasteur, Marne-la-Coquette, France)
- 2) Caldo Müller-Hinton (Diagnostics Pasteur, Marne-la-Coquette, France)
- 3) Tripticasa soya (Tryptic Soy) o Agar sangre, ácido sulfúrico
- 4) Cloruro de Bario
- 5) Cloruro de Sodio
- 6) Ácido Cítrico
- 7) Agua destilada
- 8) Kocide
- 9) Kilol (Distribuidora Tecun)
- 10) Fiton (Agribodegas)
- 11) Agrimicin 500 (Pfizer)
- 12) Timsen (Superb)
- 13) Vanodine
- 14) Bacter-Stop
- 15) Farmacina 5%

d. Cristalería

- 1) Cajas Petri de (40 o 165 mm), vol 60 o 70 ml
- 2) Tubos de ensayo 15, 20 ml (Pyrex o Kimax.)
- 3) Balones volumétricos de 25, 50 y 250 ml \pm 0.03 ml, 24/40. (Pyrex.)
- 4) Beakers de 50, 100 y 400 ml. (Pyrex o Kimax.)
- 5) Pipetas graduadas serológicas de 1 (1/100), 5 (1/10) y 10 (1/10) ml, TD 20°C. (Pyrex.)
- 6) Pipetas manuales. 3 y 5 ml, TD 20°C. (Pyrex.)
- 7) Pipetas pasteur de vidrio (Pyrex) y de plástico (Beral, Inc.)
- 8) Probetas de 25, 50 y 100 ml. TC a 20°C. (Pyrex.)

2. Evaluación de sensibilidad bacterial “*in vitro*” por difusión de disco

a. Material

- 1) Tubo con 3 ml de caldo de Müeller-Hinton inoculados con la bacteria a analizar (2-4 hr 37°C)
- 2) Caldo para dilución (agua o solución salina)
- 3) Cajas petri pre-secadas (30 min en la incubadora). No sobre secar los platos.
- 4) Tubo de 0.5 ml 1% Cloruro de Bario ($BaCl_2$) y 99.5 ml 1% Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), elaboración mensual.
- 5) Dispensador de células SCIENCEWARE Bel-Art.
- 6) Caja petri 150 x 15 mm, con Agar de Müeller-Hinton, MH.
- 7) Tubo con 3 ml de agar acuoso 1.5%.

b. Método

- 1) Inocule 3 ml del caldo nutritivo con la colonia bacterial deseada, use varias colonias para obtener una susceptibilidad representativa.
- 2) Incube hasta alcanzar la turbidez equivalente a 0.5 Mc-Farland a 35°C, realizar lecturas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, utilice como blanco agar MH y distintas concentraciones de Mc. Farland para obtener una curva (La concentración que debe tener el cultivo es alrededor de 10^7 - 10^9 UFC/ml).
- 3) Diluya si es necesario con caldo estéril, agua, o solución salina para obtener una pequeña turbidez visible, si es posible que coincida con la turbidez estándar de la solución de BaCl₂-H₂SO₄ (0.5 Mc-Farland).
- 4) La inoculación de la bacteria es la variable más importante en las pruebas *in vitro* de sensibilidad.
- 5) La inoculación debe producir un crecimiento uniforme. Se ha de repetir si se da un crecimiento aislado de colonias o un crecimiento masivo.
- 6) Tome 0.06 ml de solución bacteriana y distribúyala con un esparcidor de células SCIENCEWARE estéril sobre la caja petri de agar pre-secada
- 7) Dejar las cajas petri inoculadas a temperatura ambiente de 5 a 15 minutos para que seque.

c. Patrón Mc Farland

1) Preparación:

- a) Agregue 0.5 ml de 0.048 M BaCl₂ ,1% o (0.5 ml de 1.175% BaCl₂*2H₂O)
- b) 99.5 ml de 0.36 N H₂SO₄. (H₂SO₄ al 1%)
- c) 100 ml de solución (patrón Mc-Farland)

Mezcle la solución y divida en 4 ó 6 fracciones en tubos tapados y guárdese en la oscuridad, este estándar puede guardarse por 6 meses. Para poder ser comparados con la turbidez bacterial, estos deben tener el mismo volumen de la solución bacterial con la que se compara.

La turbidez del patrón 0.5 Mc-Farland (10^8 CFU/ml), puede verificarse midiendo la absorbancia A_{625} con un espectrofotómetro en una celda de 1 cm, la cual debe estar entre 0.08 a 0.10 unidades de absorbancia (DIFCO, 1986).

d. Soluciones bactericidas

Se prepararán soluciones en agua destilada, tomando como la unidad la dosis media recomendada por la casa de distribución. Se evaluarán 5 concentraciones, 0.00, 0.25, 0.75, 1.25, 2.00 veces la dosis media recomendada. El crecimiento bacterial bajo estas concentraciones se comparará al crecimiento de bacterias no expuestas a bactericida alguno (testigo absoluto). En el Cuadro 6 se muestran las dosis recomendadas para cada bactericida

e. Preparación de discos

- 1) Cortar círculos de papel de blotting de 6 mm de manera estéril o comprarlos comercialmente TAXCO.
- 2) Sumergirlos con pinzas en solución de bactericida con la concentración deseada y secarlos o quitarles el exceso de fluido.

f. Aplicación de los discos:

- 1) Tomar el disco preparado con las pinzas estériles y presionarlo suavemente contra el medio cultivado
- 2) Invierta la caja petri e incube por 30 min. (la inversión es opcional). Mida el círculo de inhibición que se forma después de las 15 hr del sembrado.
 - No coloque los discos juntos ya que puede haber traslape de inhibición.
 - La eritromicina y la lincomicina neutralizan sus efectos, no los coloque juntos.
 - La inactivación de los discos comerciales se da más que todo por la humedad y no por la temperatura, manténgalos en desecador a -20° C para mayor estabilidad.

g. Interpretación

Cuando se trabaja con diferentes concentraciones de agentes bactericidas, se reporta como:

- 1) Susceptible: si existe una zona inhibición alrededor de cada disco.
- 2) Moderadamente resistente: si existe zona de inhibición solamente alrededor del disco de mayor concentración.
- 3) Resistente: si no hay zona de inhibición alrededor del disco. Puede ser también que el agente bacteriostático no es efectivo para combatir la bacteria.

