



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL**

MANEJO ALTERNATIVO DEL CÁNCER BACTERIANO (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) EN JITOMATE

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN
PROTECCIÓN VEGETAL**

PRESENTA

VÍCTOR CANO HERNÁNDEZ



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

Chapingo, Estado de México, Diciembre del 2016



Tesis realizada por Víctor Cano Hernández bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: 
DR. CLEMENTE VILLANUEVA VERDUZCO

ASESOR: 
DRA. EVERT VILLANUEVA SÁNCHEZ

ASESOR: 
DRA. GLORIA HUMBERTA CALYECAC CORTERO

ASESOR: 
M. C. RENÉ CANO HERNÁNDEZ

ASESOR: 
DRA. MA. DE JESÚS JUÁREZ HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme brindado la oportunidad de alcanzar el grado académico de Maestro en Ciencias en Protección Vegetal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me brindó para realizar mis estudios de maestría.

Al programa de Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

A mi comité Asesor: Dr. Clemente Villanueva Verduzco, Dra. Evert Villanueva Sánchez, M en C. René Cano Hernández, Dra. Ma. De Jesús Juárez Hernández, Dra. Gloria Calyecac por su tolerancia, confianza y guía en la elaboración de este trabajo.

A los profesores de este programa por compartir su conocimiento, tiempo y experiencia para mi formación académica.

Al personal que labora en: La empresa BYOSS S.A. de C.V. y el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM.

A todas las personas que no he nombrado pero que de una o de otra forma contribuyeron en mi formación.

A mis compañeros de estudio y de trabajo, en especial a aquellos que lograron considerarme su amigo.

DEDICATORIA

A DIOS

Que me ha dado la oportunidad para llegar y lograr mis metas.

A MIS PADRES

León Salvador Cano Gallegos

Leonor Hernández Yescas

Quienes me dieron la vida y la libertad para vivirla, que me han enseñado con sus hechos y convicciones que existir es madurar y que madurar es amarse uno a si mismo infinitamente.

A MI ESPOSA

Melva

Que me ha apoyado en todo momento para lograr mis metas.

A MI HIJO

Emiliano

Con todo mi amor y a modo de buen ejemplo. Ya que ha venido a llenar mi vida de alegría, haciéndome más feliz con sus ocurrencias.

A MIS HERMANOS

Con cariño y gratitud, por todo el apoyo que recibí.

A todos los que de alguna u otra forma estuvieron conmigo

A MIS SUEGROS Y CUÑADOS

Por el apoyo brindado.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de la presente tesis nació el 14 de mayo de 1987. En 2002 ingresa a la Universidad Autónoma Chapingo, de donde egresa en el 2009 con el título de ingeniero agrónomo especialista en parasitología agrícola. En el 2010 prestó sus servicios a la empresa privada PAFFA S.A. de C.V. y en el 2012 al comité del sistema producto aguacate del Estado de México y a la empresa Moléculas Naturales S.A. de C.V. Ha participado en diversos cursos, congresos, reuniones y simposios, como asistente y ponente. En enero de 2015 ingresa al departamento de Parasitología Agrícola para iniciar estudios de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal en la Universidad Autónoma Chapingo.

CONTENIDO

	PAG.
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xv
CAPITULO GENERAL	
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	1
2.1. Cultivo del jitomate.....	1
2.2. Importancia nacional del jitomate.....	2
2.2.1. Producción nacional de jitomate.....	2
2.2.2. Mercado nacional.....	3
2.3. Aspectos Generales.....	4
2.3.1. Manejo de jitomate.....	4
2.4. Plagas y enfermedades del jitomate.....	5
2.4.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	5

2.4.2. Distribución de la enfermedad.....	6
2.4.3. Principales características de la bacteria.....	6
2.4.4. Síntomas ocasionados por la bacteria.....	7
2.4.5. Ciclo de la enfermedad.....	8
2.4.6. Manejo de la enfermedad.....	9
2.5. Bioplaguicidas.....	10
2.5.1. Características y clasificación de los bioplaguicidas.....	10
2.5.2. Los bioplaguicidas en México.....	11
2.5.2.1. Extractos vegetales.....	11
2.5.2.2. Control de plagas y enfermedades con extractos botánicos.....	13
2.5.3. El Ajo (<i>Allium sativum</i> L.) como planta con potencial bioplaguicida.....	13
2.6. Biodegradabilidad.....	14
2.6.1. Método OCDE 301-A.....	14
2.7. Prueba OCDE 208-Ecotoxicidad.....	15
2.8. Determinación de efectividad de sustancias germicidas por ensayo rápido de reto microbiano.....	16

2.9. Síntesis orgánica de moléculas.....	17
3. LITERATURA CITADA.....	18
CAPITULO I EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD BIOLOGICA DEL EXTRACTO DE AJO	
1. INTRODUCCIÓN.....	22
2. OBJETIVO.....	23
3. HIPÓTESIS.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1. Localización del experimento.....	24
4.1.1. Variedad utilizada y establecimiento del almacigo.....	24
4.1.2. Suspensión bacteriana.....	26
4.1.3. Inoculación de la suspensión bacteriana.....	27
4.1.4. Diseño experimental y análisis estadístico.....	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6. CONCLUSIONES.....	34
7. LITERATURA CITADA.....	35

CAPITULO II BIODEGRADABILIDAD AEROBIA DEL EXTRACTO DE AJO HIDROSOLUBLE BASADA EN EL PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR INTERNACIONAL OECD 301-A

1. INTRODUCCIÓN.....	37
2. OBJETIVO.....	38
3. HIPÓTESIS.....	39
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
4.1. Caracterización del extracto de ajo.....	39
4.2. Análisis de biodegradabilidad.....	43
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	46
6. CONCLUSIONES.....	51
7. LITERATURA CITADA.....	51

CAPITULO III EVALUACION DE LA ECOTOXICIDAD DEL EXTRACTO DE AJO BASADA EN EL PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR INTERNACIONAL OECD 208

1. INTRODUCCIÓN.....	52
2. OBJETIVO.....	53
3. HIPÓTESIS.....	54
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54

4.1. Caracterización del extracto de ajo.....	55
4.2. Descripción de las variedades de semillas utilizadas.....	56
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
6. CONCLUSIONES.....	67
7. LITERATURA CITADA.....	68
ANEXOS.....	69

LISTA DE CUADROS

CAPITULO I	PAG.
Cuadro 1. Tratamiento evaluados en la prevención de la infección por <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	26
Cuadro 2. Tratamientos evaluados.....	29
Cuadro 3. Análisis de varianza de los tratamientos en relación a la inoculación de <i>Clavibacter</i> sp.	30
Cuadro 4. Comparación de medias de infección total de los tratamientos evaluados.....	31
 CAPITULO II	
Cuadro 1. Compuestos presentes en las soluciones preparadas para el estudio de biodegradabilidad.....	40
Cuadro 2. Demanda química de oxígeno (DQO mg O ₂ L ⁻¹) inicial para el extracto de ajo y los controles de procedimiento OCDE 301-A biodegradabilidad.....	44
Cuadro 3. Resultados de la demanda química de oxígeno (DQO) obtenidos durante el estudio de biodegradabilidad.....	47

CAPITULO III

Cuadro 1.	Control de toxicidad utilizado para germinación de semillas a diferentes diluciones (prueba OECD 301-A).....	55
Cuadro 2.	Promedio de germinación de las semillas de jitomate a diferentes diluciones del control de toxicidad (cuadro 1) resultante de la prueba OECD 301-A.....	62
Cuadro 3.	Promedio de germinación de las semillas de lechuga a diferentes diluciones del control de toxicidad (cuadro 1) resultante de la prueba OECD 301-A.....	63
Cuadro 4.	Datos obtenidos de la prueba de germinación de semillas de jitomate a diferentes diluciones del control de toxicidad.....	65
Cuadro 5.	Datos obtenidos de la prueba de germinación de semillas de lechuga a diferentes diluciones del control de toxicidad.....	65
Cuadro 6.	Análisis de varianza germinación de semillas de jitomate.....	66
Cuadro 7.	Análisis de varianza germinación de semillas de lechuga.....	66

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO GENERAL	PAG.
Figura 1. Distribución Global de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (extraído de EPPO, acceso 14/05/2016).....	6
Figura 2. Síntomas de <i>Clavibacter</i> sp. De izquierda a derecha y de arriba a abajo, a) Síntomas en hojas (Intagri, 2016). b) Planta con síntomas avanzados (Ing. Damián García 2016) c) Corte transversal de una hoja mostrando los haces vasculares necrosados (EPPO, 2016) y d) fruto con el síntoma de “ojo de pájaro” (EPPO, 2016).....	8
Figura 3. Figura 3. Ciclo de la enfermedad de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en plantas de jitomate (De León et al., 2011).....	9

CAPITULO I

Figura 1.	Inoculación de la suspensión con <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> a 1.5×10^8 UFC mL ⁻¹ , De izquierda a derecha de arriba-abajo a) Dosis de extracto de ajo e yodo, b) Instrumentos utilizados para inocular, c) Punción de daño, d) <i>Clavibacter</i> sp. en solución, e) Aspersión de tratamiento, f) Sellado.....	28
Figura 2.	Grafica de distribución (Valor Ftab.).....	31
Figura 3.	Grafica de la agrupación Tukey para tratamientos.....	33

CAPITULO II

Figura 1.	Matraces conteniendo el extracto de ajo y controles de la prueba OECD 301-A biodegradabilidad aerobia.....	42
Figura 2.	Analizador de Carbono orgánico.....	42
Figura 3.	Observación gráfica de los resultados de la demanda química de oxígeno (DQO) obtenidos durante el estudio de biodegradabilidad.....	48
Figura 4.	Observación grafica del grado de biodegradabilidad de los blancos o controles del inóculo (promedios) usada para comparación del grado de biodegradabilidad del extracto de ajo (sustancia problema).....	49

Figura 5.	Observación grafica del grado de biodegradabilidad (promedios) del extracto de ajo (sustancia problema).....	49
Figura 6.	Observación grafica del grado de biodegradabilidad de la sustancia de referencia (acetato de sodio).....	50
CAPITULO III		
Figura 1.	Aspecto del producto hidrosoluble de extracto de ajo.....	56
Figura 2.	Semillas de lechuga bola.....	57
Figura 3.	Semillas de jitomate saladette CID F1.....	58
Figura 4.	Semillas en cajas Petri. De arriba a abajo: a) Lechuga. b) jitomate.....	59
Figura 5.	Semillas de jitomate germinadas de arriba – abajo, de izquierda a derecha a) control de toxicidad al sin dilución, b) control de toxicidad a dilución del 50 %, c) control de toxicidad a dilución del 25 %, d) control de toxicidad a dilución del 10 %, e) control de toxicidad a dilución del 5%, f) control de toxicidad a dilución del 1 %.....	60

Figura 6.	Semillas de lechuga germinadas. De arriba - abajo, de izquierda a derecha a) control de toxicidad al sin dilución, b) control de toxicidad a dilución del 50 %, c) control de toxicidad a dilución del 25 %, d) control de toxicidad a dilución del 10 %, e) control de toxicidad a dilución del 5%, f) control de toxicidad a dilución del 1 %.....	61
Figura 7.	Control de semillas de A) lechuga y B) jitomate germinadas.....	61
Figura 8.	Germinación promedio de semillas de jitomate y lechuga a diferentes diluciones del control de toxicidad (cuadro 1) resultante de la prueba OECD 301-A.....	64
Figura 9.	Grafica de distribución, donde se observa el valor de F tabulada igual a 3.326, para germinación de semillas de jitomate.....	67

MANEJO ALTERNATIVO DEL CÁNCER BACTERIANO (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) EN JITOMATE

ALTERNATIVE MANAGEMENT OF BACTERIAL CANCER (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*) IN TOMATO

Víctor Cano Hernandez¹, Dr. Clemente Villanueva Verduzco²

RESUMEN

La investigación se realizó en 3 etapas; en la primera se evaluó la efectividad biológica del extracto de ajo estandarizado para prevención de infección bacteriana (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*); en la segunda etapa se comprobó la biodegradabilidad del extracto estandarizado de ajo de síntesis orgánica. En la última etapa se determinó la ecotoxicidad bajo procedimientos de estándares internacionales OECD. La aplicación del extracto se suma a las combinaciones de estrategias en un programa de manejo de esta enfermedad. Dado que el uso de este extracto previno la propagación de la enfermedad cuando se indujo la infección artificialmente.

Palabras clave: cáncer, bacterias, prevención, sanidad, OECD.

ABSTRACT

The investigation was carried out in 3 stages; in the first the biological efficiency of the standardized garlic extract for the prevention of bacterial infection (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) was evaluated; in the second stage the biodegradability of the standardized garlic extract of organic synthesis was checked. In the last stage the ecotoxicity was determined under OECD standard international guidelines. The application of the extract adds to the combinations of strategies used in the management program for this disease since its use prevented the spread of the disease when the infection was artificially induced.

Keywords: cancer, bacteria, prevention, health plant, OECD.

¹Tesista

²Director

CAPITULO GENERAL

1. INTRODUCCION

El ser humano ha utilizado en el transcurso de los siglos más de 7000 especies de plantas comestibles. En la actualidad más de 50% de los requerimientos humanos en proteína y calorías están proporcionados tan sólo por tres especies vegetales: maíz, trigo y arroz. A su vez, solamente 30 especies de plantas cubren el 95% de las necesidades en energía alimentaria del mundo. No obstante, es necesario que la investigación agrícola se enfoque a la una sanidad vegetal más amigable con el ambiente y en nuevas especies hortícolas potenciales que servirán para alimentación de la humanidad (Tavares y Tavares, 2007).

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Cultivo del jitomate

Los precios del tomate rojo saladette (jitomate) en los meses de marzo a junio fueron en promedio a \$ 269 por kilogramo (SNIIM, 2016).

Cifras reportadas por la división estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT), entre el 2007 y el 2012 la producción mundial de tomate rojo en fresco reportó una Tasa Media Anual de Crecimiento (TMAC) de 2.75 %, obteniendo hasta el año 2012 un aumento

en la producción de 17.68 % respecto al 2007, debido al aumento en los rendimientos y en el área cosechada de la hortaliza en el mundo, los tres principales países productores de tomate rojo en fresco en el año 2012: China (50 millones de toneladas), Estados Unidos (13.2 millones de toneladas) y Turquía (11.3 millones de toneladas). Siendo los principales países importadores de tomate rojo son Estados Unidos, Rusia, Alemania, Francia y el Reino Unido, y en contraparte los países exportadores de esta hortaliza son México, Países Bajos, España, Turquía y Jordania (FAOSTAT. 2016).

2.2. Importancia nacional del jitomate

Datos de la balanza comercial agropecuaria reportados por el Banco de México, muestran el crecimiento de las exportaciones de tomate rojo, alcanzando un máximo histórico entre (1994-2013) de 2,065 millones de dólares en el año 2011, en línea con la especulación que se presentó a escala mundial. En esos 17 años, la exportación de jitomate reportó una TMAC de 7.4 % y una tasa acumulada desde 1994 del 350.6 %. La mayor TMAC se registró entre 2000-2006, cuando avanzó a un ritmo de 15.9 % (BANXICO 2014)

Las cifras del Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI) confirman que el volumen de las exportaciones en 2011 no fue la causa del aumento en el valor de las ventas de jitomate al exterior y el precio promedio de 2011 fue 1.38 US\$.kg y fue superior en 26 % a la media del período 2003-2013. (SIAVI, 2016).

2.2.1. Producción nacional de jitomate

En México, en los últimos seis años (2007-2012) se han sembrado y cosechado en promedio 55 mil hectáreas de tomate rojo (jitomate), con una producción promedio de 2.28 millones de toneladas. La producción de jitomate del 2007 al 2012 presentó una TMAC de 2.65 %, alcanzando en el 2012 una producción de

2.84 millones de toneladas, que representó un aumento acumulado en la producción de 17 % comparado con la producción de 2007. Los rendimientos en toneladas por hectárea cosechada presentaron una tendencia creciente, pasando así de un rendimiento de 37.4 en 2007 a 51.38 toneladas por hectárea en 2012. (Financiera Rural, 2014).

La producción del tomate rojo en México se divide en dos ciclos (SIAP. 2016). Por ejemplo, para el año agrícola 2014, en el año agrícola (OI +PV) la siembra inició en octubre de 2013 y terminó en marzo de 2014.

Considerando los ciclos primavera-verano y otoño-invierno, los principales estados productores son Tamaulipas (30 %), Sinaloa (10 %), Zacatecas, Guanajuato y Jalisco (SIAP. 2016).

2.2.2. Mercado nacional

El mercado del tomate bola producido en Sinaloa en el ciclo otoño-invierno y que es comercializado en las diferentes centrales de abasto de la República Mexicana durante el mes de febrero y la primera quincena de marzo, en su mayoría tuvieron una disminución en su precio en las diferentes presentaciones de venta. Por ejemplo a inicios de febrero el tomate bola sinaloense se comercializó la caja de 14kg en el mercado de abasto de Cd. Juárez en \$227 caja⁻¹ (\$16.21 kg⁻¹) y en la segunda semana de marzo se mantuvo constante en un precio de \$120 caja⁻¹ (\$8.57 kg⁻¹), lo que representó un decremento en el precio del tomate bola de \$107 caja⁻¹ (\$7.64 kg⁻¹) en tan solo un mes. Por otro lado la caja de tomate bola sinaloense de 15 kg en el mercado de la central de abastos de León se ha mantenido constante a un precio de \$210 caja⁻¹ (\$8.07 kg⁻¹). En la central de abastos de Iztapalapa en La Ciudad de México fluctuó en el mes de febrero entre los \$130 y \$140 caja⁻¹ de 10kg y en la segunda semana de marzo estuvo constante en un precio de \$120 caja⁻¹ de 10kg (Financiera rural, 2014).

2.3. Aspectos Generales

Planta de porte erecto o semierecto, arbustivo, cultivo de tipo anual. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas), el fruto es una baya ovalada, redonda o periforme de tamaño variable, la temperatura óptima de desarrollo se sitúa en 23 °C durante el día y entre 13 -17 °C durante la noche, la humedad relativa optima oscila entre un 60 y 80 %, requiere una luminosidad de 0.85 MJ/m². La planta de jitomate se puede cultivar en cualquier tipo de suelo, pero se prefieren suelos profundos y bien drenados. Lo ideal es un suelo ligeramente ácido, con un pH de 6.2 a 6.8 (Financiera Rural, 2014).

2.3.1. Manejo de jitomate

Esta hortaliza es una de las pocas que tiene dos tipos de crecimiento, determinado e indeterminado, el primer tipo es sembrado principalmente en sistemas a campo abierto donde las extensiones de siembra son grandes, algunos productores no colocan soportes y lo dejan a nivel de suelo, pero otros si optan por usar soportes para el tutoreo de las plantas. Los materiales de crecimiento indeterminado, son utilizados en sistemas bajo invernadero aunque algunas variedades también pueden sembrarse a campo abierto, donde las plantas se llevan a uno o dos tallos. Conforme crece la planta va formando los racimos, a diferencia de las variedades determinadas donde el crecimiento es arbustivo. En las variedades de invernadero es más común que se realicen prácticas de poda (eliminación de los brotes laterales) que en las de campo abierto (Nuez, 2001).

2.4. Plagas y enfermedades del jitomate

Las plagas más comunes son: Mosca blanca vector del virus del rizado amarillo del tomate conocido como “virus de la cuchara”. Trips vectores del virus del bronceado del tomate, pulgón, minador de hoja, polilla del tomate, araña roja (Financiera Rural, 2014).

Las enfermedades principales: Oidiopsis, podredumbre gris, mildiu, *Fusarium oxysporum*, cáncer bacteriano *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, peca bacteriana *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, mancha bacteriana *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, marchites bacteriana *Ralstonia solanacearum* (Financiera Rural, 2014).

De todos los patógenos, el cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) es una de las bacterias que tienen la capacidad de terminar con los cultivos por completo, por lo que en algunos países está considerada como una plaga de importancia cuarentenaria, en México está reportada como una plaga A2 (presente pero delimitada a algunas regiones), tiene la característica de transmitirse por semilla o de manera mecánica, herramientas de trabajo y labores culturales (EPPO, 2016).

2.4.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

El cáncer bacteriano ocasionado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, fue reportado por primera vez en USA en 1909, después en 1977 y en el año de 1992, en jitomate en los invernaderos de Grand Rapid en Minnesota. Actualmente, esta enfermedad se puede encontrar en todas las regiones donde se cultive esta hortaliza. La principal forma de diseminación de la bacteria es por medio de la semilla, posteriormente infecta en las primeras etapas de crecimiento de las plantas provocando marchitez y muerte temprana, en muchos de los casos los cultivares no alcanzan a llegar a la cosecha por los

daños que ocasiona de manera epidémica en todo un invernadero y en campo abierto (Hausbeck *et al.* 2000).

2.4.2. Distribución de la enfermedad

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, se encuentra distribuida prácticamente en todas las zonas donde se cultiva jitomate (Figura 1), (EPPO, 2016).

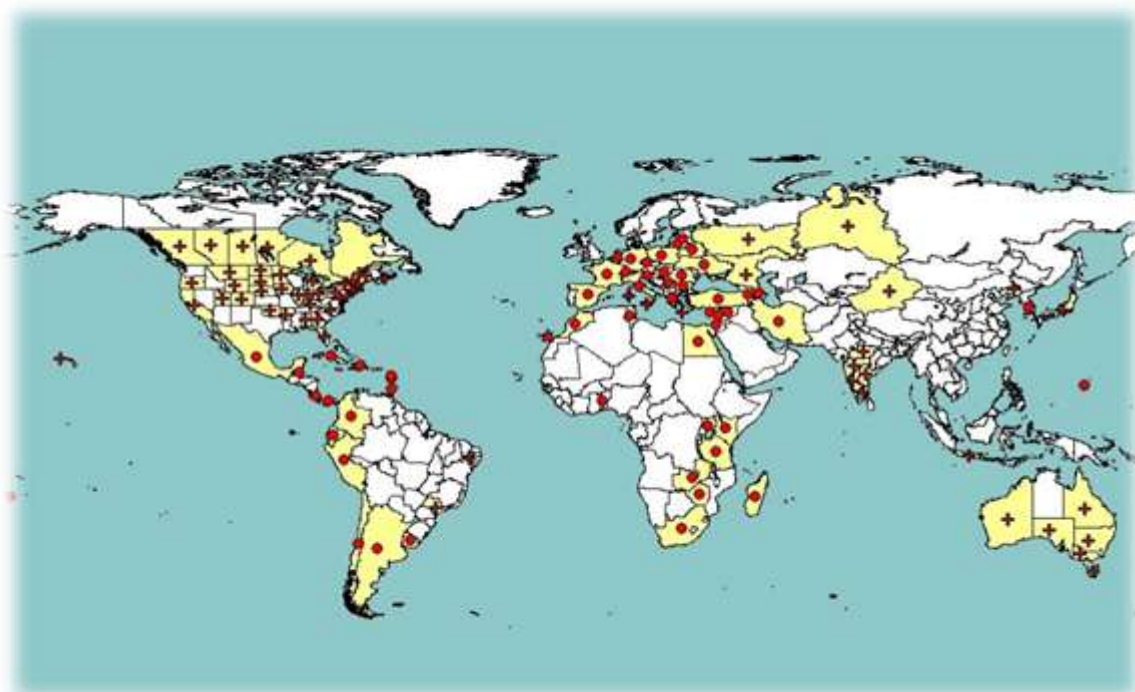


Figura 1. Distribución Global de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (extraído de EPPO, acceso 14/05/2016)

2.4.3. Principales características de la bacteria

Las células bacterianas tienen forma recta, ligeramente curvada o de varilla, miden 1.5 - 4 por 0.5 - 0.9 μm . La bacteria es Gram positiva de crecimiento aeróbico, forma colonias amarillas en medio de cultivo levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC), colonias mucoides cuando es cultivada a 30°C,

ureasa negativa, oxidasa negativa, sin formación de esporas y sin crecimiento a 40°C (Agrios, 2005).

2.4.4. Síntomas ocasionados por la bacteria

Los síntomas en jitomate inician por la parte basar de las hojas donde se observa un color amarillo que conforme avanza cambia a color café mostrando las quemaduras en los bordes de las hojas (Figura 2a) que se extienden a toda la hoja matando la planta por completo (Figura 2b). Las hojas se curvan hacia el haz quedando adheridas a la planta. En los tallos se observa una necrosis de color parda en los haces vasculares (Figura 2c), ocasionando taponamientos. En el fruto se observa una mancha oscura rodeada de un halo blanco, conocido como “ojo de pájaro” (Figura 2d).



Figura 2. Síntomas de *Clavibacter* sp. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: a) Síntomas en hojas (Intagri, 2016). b) Planta con síntomas avanzados (Ing. Damián García 2016) c) Corte transversal de una hoja mostrando los haces vasculares necrosados (EPPO, 2016) y d) fruto con el síntoma de “ojo de pájaro” (EPPO, 2016).

2.4.5. Ciclo de la enfermedad

La semilla de jitomate contaminada con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es la principal fuente de diseminación de la enfermedad. En cultivos establecidos, las labores culturales son la forma en la cual se contagia de planta a planta. Las plantas se muestran asintomáticas hasta los periodos de mayor estrés nutricional como son la floración y el más crítico que es amarre y llenado de fruto, en este periodo es frecuente encontrar los primeros síntomas de la enfermedad: necrosis en los bordes de las hojas, que avanzan rápidamente hasta quemar la planta por completo. Cuando ya se tienen antecedentes de la presencia del cáncer bacteriano existe una alta posibilidad de que se repita presencia de la enfermedad en el siguiente ciclo, debido a que la bacteria sobrevive en los residuos de cosecha y puede sobrevivir en el suelo hasta por 2 años (Ramírez y Sainz, 2006) (Figura3).

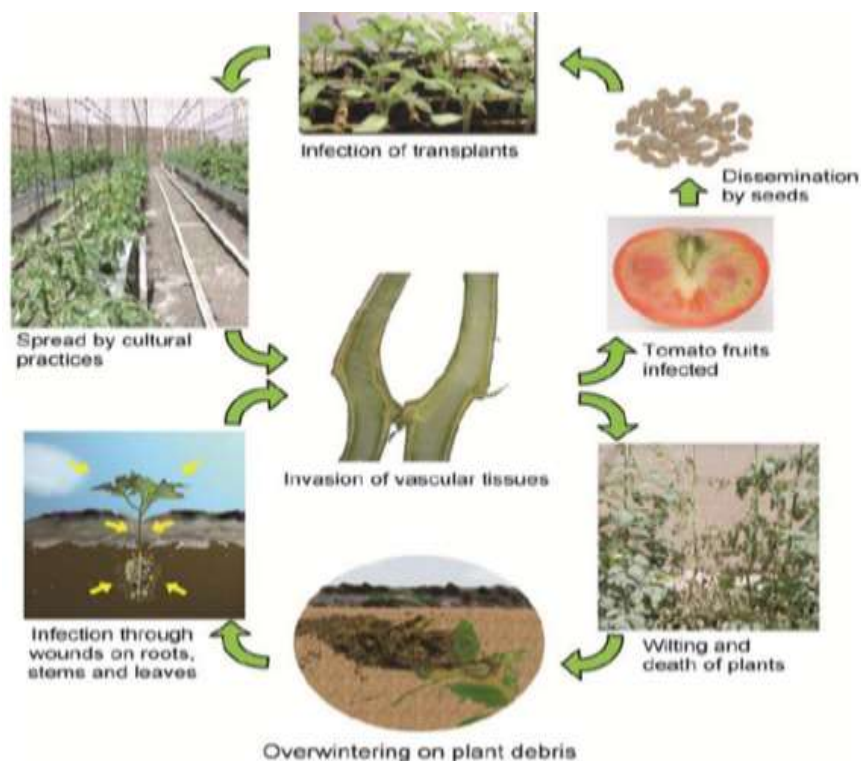


Figura 3. Ciclo de la enfermedad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas de jitomate (De León *et al.*, 2011)

2.4.6. Manejo de la enfermedad

El manejo de la enfermedad se ha hecho principalmente con medidas preventivas como el tratamiento hidrotérmico de la semilla, eliminando residuos de cosecha, desinfección de herramientas y con aplicaciones preventivas de cobres y productos antibióticos (Ramírez *et al.*, 2009). Los productos químicos utilizados para el manejo de esta bacteria solo eliminan las bacterias que se encuentran en la superficie para reducir el riesgo de infección y diseminación. Los productos cúpricos, tienen buen efecto bactericida pero no tienen la capacidad de penetrar a la planta para eliminar la bacteria y eliminar la infección, por lo que solo se recomiendan como preventivos o como selladores de heridas cuando se realizan podas o cuando cae granizo. Los antibióticos en jitomate están restringidos y solo la Kasugamicina tiene registro en este cultivo para el manejo de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* una bacteria Gram negativa (DEAQ, 2015). Se han hecho pruebas *in vitro* con otros ingredientes

activos como Estreptomicina, Gentamicina y Oxitetraciclina, de los cuales se ha observado efecto mínimo de control sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con los dos primeros antibiótico individualmente, por otra parte la combinación de Oxitetraciclina + Estreptomicina ha mostrado un mejor efecto de control (ADAMA, 2016)

2.5. Bioplaguicidas

Los bioplaguicidas o plaguicidas biológicos son, como su nombre lo indica agentes de origen biológico para el manejo de plagas. Una de sus principales características es de que no son productos químicos. Consecuentemente son reconocidos como aceptables para el ambiente. Sin embargo, el nombre plaguicida, aunque está asociado con métodos biológicos o “naturales” para el manejo de plagas, tiende a dar la impresión de ser derivados de plaguicidas químicos, aunque ellos tengan un modo de acción completamente diferente (Gelernter y Evans, 1999)

2.5.1. Características y clasificación de los bioplaguicidas

Prager y Castellanos (1990), mencionan que los bioplaguicidas son una herramienta importante para la recuperación y mantenimiento del equilibrio ecológico de los agroecosistemas existentes.

Los bioplaguicidas pueden ser microorganismos (bacterias, hongos, entomopatógenos, virus de la poliedrosis nuclear), macroorganismos (parasitoides, depredadores), semioquímicos (feromonas, repelentes) y sustancias bioactivas (minerales, extractos de algas, extractos de plantas, aceites vegetales). Los bioinsecticidas incluyen organismos entomopatógenos y

entomófagos; además de compuestos con actividad insecticidas derivados de plantas (Neem, *Chrysantemus* sp., *Tagetes* sp.) metabolitos de actinomicetos y plantas transgénicas (CATIE, 2002).

2.5.2. Los bioplaguicidas en México

El incremento de bioplaguicidas en el mercado nacional es lento pero continuo, en el cultivo de maíz se han empleado organismos entomopatógenos, siendo *Bacillus thuringiensis* el bioinsectiida de mayor aceptación (CATIE, 2002).

2.5.2.1. Extractos vegetales

El uso de los extractos de plantas data de miles de años atrás, ya que eran usados por los egipcios, chinos, indios, griegos e incluso, Cristóbal Colón descubrió América mientras buscaba un camino más corto para encontrar hierbas y especias que hoy son de uso cotidiano (Kamel. 2004).

Un extracto es un concentrado hidroalcohólico de elementos solubles constituido por una mezcla de principios farmacológicamente activos y sustancias inertes, que proceden de la totalidad o de partes de una planta fresca tratada inicialmente por infusión, y posteriormente por maceración en frío, son productos obtenidos por el tratamiento de materiales vegetales con solventes apropiados como agua, alcohol o éter que luego se concentran hasta un determinada consistencia (Piñeros *et al.*, 1992).

La preparación y el uso de extractos como fermentados, decocciones e infusiones con plantas silvestres, hortalizas y hojas de árboles son importantes en el manejo de enfermedades y de insectos. Ellos actúan de dos formas, como

reforzantes o nutrientes que fortifican y estimulan su crecimiento, y a la vez repelen, atraen, inhiben o estimulan a insectos y patógenos respectivamente, con la aplicación de estos extractos se disminuye la proliferación de organismos nocivos para los cultivos. Estos productos actúan en estos organismos por contacto, ingestión, repelencia, disuasión, anti alimentarios o alteración del comportamiento (Mejía, 1995).

Piñeros y colaboradores (1992), mencionan que para obtener extractos de diferentes plantas hay que identificar los siguientes parámetros:

Características de los extractos. Unos son de color café amarillento, otros son rojizos, los extractos bien formulados son de color medianamente oscuro; cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros. Algunos extractos tienen un excelente índice de disolución. Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que le ha dado su origen (Miño, 2000).

Métodos de obtención de los Extractos. Miño (2000) menciona que la preparación de extractos es a través de:

- 1. HIDROLATO.** Es la extracción en la que se combina la infusión, se obtienen los principios activos, cuando la o las partes de las plantas empleadas son blandas y frágiles, además una gran parte de los principios volátiles, la maceración (se obtienen todos los principios activos solubles en agua fría) y la filtración permite la obtención de las sales minerales y vitaminas que posee la planta y demás sustancias que no pueden obtenerse mediante presión, se puede utilizar agua o alcohol-agua como solvente.
- 2. FERMENTADOS.** Conocido también como purín. Extracto obtenido a partir de la fermentación en frío del material vegetal,

que se remueve para su oxigenación (fermentado aeróbico) y por último se filtra para obtener la parte líquida de este proceso. Fermentado anaeróbico, es un extracto obtenido a partir de la fermentación en frío del material vegetal, que se deja en reposo, sin acceso a oxígeno y por último se filtra para obtener la parte líquida de este proceso.

3. **PRESURIZADO.** Es el extracto obtenido al colocar las plantas desmenuzadas en determinada cantidad de agua en una olla a presión durante 10 minutos sin despresurizar para luego filtrarlo.

2.5.2.2. Control de plagas y enfermedades con extractos botánicos

El uso de plantas en el control de las plagas se practica desde la antigüedad y forma parte de las tradiciones agrícolas en muchos lugares del mundo. Estas sustancias tienen un amplio espectro de acción y matan insectos beneficiosos como plagas, por lo que hay un grupo de riesgos asociados a éstas que están limitando su uso en los sistemas de producción orgánicos (Dudley, 1988).

2.5.3. El Ajo (*Allium sativum* L.) como planta con potencial bioplaguicida

Características de la planta. Pertenece a la familia de las liliáceas, el género *Allium* cuenta con unas 270 especies, son plantas perennes de hasta 1.5 m de altura, entre los componentes activos se puede mencionar los siguientes: Fructosanas (75 %), Aceite esencial (garlicina,

alíina o sulfóxido de alilcisteína que hidrolizada por la alinasa produce alicina) responsable del característico olor del ajo, que rápidamente se transforma en disulfuro de alilo, pequeñas cantidades de vitaminas (A, B1, B2, B6, C), adenosina y sales minerales (hierro, sílice, azufre, yodo). Ácidos: ascórbico, aspártico, aloético, fórmico, glutámico, esteárico y palmítico (Gracia, 2003). El olor que lo caracteriza es debido a un aceite esencial volátil producido por una encima sobre un glucósido, que más tarde hidrolizado produce al mismo tiempo una fructosa por lo que, tienen un sabor azucarado, este cuerpo volátil es el **disulfuro de dialilo** (Gracia, 2003).

Usos. Conforme a lo expuesto por Mejía (1995) el ajo se emplea en la medicina tradicional como desinfectante, estimulante y como digestivo disminuyendo las infecciones gastrointestinales. En cultivos agrícolas o plantas de jardín es muy esparcido su uso de acción insecticida para controlar y repeler pulgones, chinches, moscas, zancudos, nematodos y hasta hongos y bacterias. Asociado con otras plantas sirve de repelente contra cortadores de hoja, además a los extractos de ajo y cebolla se le ha encontrado efecto anti-fúngico en especial contra *Cándida lusitaniae* (Gracia, 2003). La adición de ajo y cebolla inhibe el crecimiento de levaduras a concentraciones superiores a 4 ppm durante al menos 60 días, por debajo de estas concentraciones se observa que en menos de 5 % de los casos comenzaría el crecimiento antes de 20 horas y con una probabilidad del 95 % comenzaría dentro de las primeras 147 horas (Gracia, 2003).

2.6. Biodegradabilidad

2.6.1. Método OCDE 301-A

La biodegradabilidad es un parámetro determinante en el comportamiento ambiental de las sustancias químicas y una propiedad deseable de los

productos que se liberan en grandes cantidades al medio natural, tales como pesticidas, detergentes, materiales de embalaje, etc. Mediante el proceso conocido como biodegradación, los microorganismos transforman los compuestos orgánicos, la mayoría de las veces en productos menos tóxicos que los compuestos originales. La biodegradación puede ser primaria y conducir a simples alteraciones estructurales del compuesto, o bien implicar su conversión a productos inorgánicos de bajo peso molecular y constituyentes celulares, en cuyo caso se denomina 'biodegradación última' o 'mineralización' (OCDE, 1992).

Compuesto orgánico + O₂ + Microorganismos = CO₂ + H₂O + sales + biomasa

Esta prueba emplea matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 mL hasta 2 L, en los cuales se colocan por lo general 250 mL de medio mineral e inóculo de microorganismos más las sustancias blanco, de referencia y de estudio. Pudiendo llegar el aforo hasta 1 L (Anexo 2), el inóculo de microorganismos utilizado normalmente son: sedimentos lacustres, lodos activos de plantas de tratamiento de aguas, o inóculo comercial. Los matraces se incuban a una temperatura de 22 °C ± 2°C y bajo agitación constante, con su respectivo testigo.

2.7. Prueba OCDE 208-Ecotoxicidad

Los ensayos de ecotoxicidad tienen por objetivo evaluar la toxicidad de compuestos contaminantes, estableciendo sus límites o valores de referencia, de manera que puedan establecerse niveles que no representen riesgo para la salud humana ni medioambiental. Cuando se trata de determinar estos valores en muestras de suelo, la tendencia actual es considerar que la presencia de diferentes contaminantes en este medio, aunque se encuentren en bajas concentraciones, pueden presentar efectos acumulativos y/o sinérgicos, que

pueden suponer un riesgo para la salud humana o medioambiental. (OECD, 208)

La importancia que actualmente tiene el mantenimiento de la calidad del medio ambiente se ve reflejada en la normativa de la Unión Europea y de los diferentes países miembros. En los últimos años, esta preocupación ha dado lugar al desarrollo de nuevos ensayos que no solo contemplan el análisis químico de las muestras, sino que se trata de valorar el impacto de los contaminantes o sus mezclas, sobre los organismos vivos. Así, los bioensayos descritos en las normativas OECD 208 (Ensayo de emergencia y crecimiento de semillas en plantas terrestres) y OECD 207 (Ensayo de toxicidad aguda en lombriz de tierra), se utilizan para la valoración ecotoxicológica en suelos contaminados, y están recogidos en el Decreto Real 9/2005 de 14 de Enero.

2.8. Determinación de efectividad de sustancias germicidas por ensayo rápido de reto microbiano

La eliminación adecuada de los microorganismos constituye una fase importante en distintas áreas y equipos de producción agrícola e industrialización de frutas y hortalizas, ya que en estos productos y superficies pueden convertirse en un vehículo de microorganismos patógenos que pueden afectar a la sanidad de los cultivos y al consumidor, por lo tanto los procesos de esterilización y desinfección juegan un papel muy importante. La diferencia entre estos dos procesos radica en que la esterilización es un término absoluto, es decir, implica la muerte o eliminación total de cualquier microorganismo, mientras que la desinfección involucra, por lo general, la destrucción de microorganismos pero no de esporas (en un tiempo menor a 5 min.), un desinfectante no necesariamente mata a todos los microorganismos presentes en la superficie sobre la cual ha sido aplicado, pero sí disminuye la población a

niveles que permiten tener buenas condiciones para evitar la contaminación e infección (NMX-BB-040-SCFI-1999).

Para determinar la actividad antimicrobiana de una sustancia química u orgánica y estas puedan obtener el calificativo de desinfectante, se utiliza el método establecido en la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999. “Métodos generales de análisis y determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas” en el cual se determina el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos (cuenta inicial) cuando se ponen en contacto con el desinfectante (durante 20 segundos y el tiempo especificado por el fabricante), bajo condiciones de pruebas específicas para posteriormente determinar el número de microorganismos sobrevivientes (cuenta final). La prueba tiene una duración de 5 a 7 días.

Para que una sustancia se considere un buen producto desinfectante, el porcentaje de reducción del número inicial de microorganismos obtenido debe ser del 99.999 % a los 30 segundos de contacto con el desinfectante (NMX-BB-040-SCFI-1999).

2.9. Síntesis orgánica de moléculas

La síntesis orgánica es la construcción planificada de moléculas orgánicas mediante reacciones químicas. A menudo las moléculas orgánicas pueden tener un mayor grado de complejidad comparadas con los compuestos completamente inorgánicos. La síntesis de compuestos orgánicos se ha convertido en uno de los ámbitos más importantes de la química orgánica.

Existen dos campos de investigación principales dentro del campo de la síntesis orgánica total y parcial.

Se diferencial por el origen y complejidad de los precursores químicos utilizados (UNAM, 2016). La síntesis realizada en el experimento fue la parcial donde se partió de un producto natural, fue extraído y purificado de Ajo (*Allium cepa*) por métodos de separación de mezclas.

3. LITERATURA CITADA

ADAMA, 2016. Ficha técnica de Oxiteraciclina + estreptomicina: cuprimicin 100 hyper. Disponible en: http://www.adama.com/mexico/es/Images/ficha_tecnica_cuprimicin100_adama_tcm43-9629.pdf. Fecha de consulta 21 de Noviembre de 2016.

Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. 5a Ed. Academic Press.USA. 922 p

BANXICO, 2014. Balanza comercial agropecuaria reportados por el Banco de México. Disponible en: <http://observatoriodeprecios.com.mx/attachments/article/186/tomate%20r ojo%2020-III-%202014.pdf>. Fecha de consulta 21 de Noviembre de 2016

CATIE, 2002. Plantas Insecticidas producidas en casa. Enlaces (Nicaragua) 12: 10-13.

Dudley, N. 1988. Maximun safety: pest control and organic farming. Soil Association. Bristol.

EPPO, 2016. Global Database. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Disponible en: <https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/photos>. Fecha de consulta 23 de Noviembre de 2016.

- FAOSTAT 2016. Altibajos en la producción de tomate en México. disponible en: <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detail/en/c/234151/>. Fecha de consulta 20 de Noviembre de 2016.
- Financiera Rural, 2014. Ficha técnica de jitomate. Disponible en: <http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Ficha%20Jitomate.pdf>. Fecha de consulta 20 de Noviembre de 2016.
- Gelernter, W. D., Evans, H. F. (1999). Overview: Factors in the succes and failure of microbial insecticides. *Integrated Pest Management Reviews*. 4: 279; 313-316.
- Gracia, N. M. 2003. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. 22:34.
- Hausbeck, M.K., Bell, J., Medina - Mora, C., Podolsky, R. and Fulbright, D.W.: Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90: 38-44, 2000.
- Kamel. C., Cardozo P.W, Calsamiglia S, Ferret A. (2004) Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science* 82: 3230-3236.
- Mejía, J. 1995. Manual de Alelopatía básica y productos botánicos. Santafé de Bogotá. Colombia. Kingraf., 83 - 97 pp.
- Miño, V. J., Uricoechea, S. J. 2000. Evaluación de seis métodos farmacológicos de reparación de extractos de repollo (*Brassica oleraceae*), ajo (*Allium sativum*) y eucalipto (*Eucaliptus globulus*) en el control de *Botrytis cinerea* en el cultivo de la mora (*Ruuís graucus*) en condiciones de laboratorio en Tunja, Boyacá. Tesis profesional. Colombia. 44 - 47 pp.

NMX-BB-040-SCFI-1999 Métodos Generales de Análisis. Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas.

Nuez, F. 2001. El cultivo del tomate. Editorial Mundi-Prensa. Barcelona, España. 793 pp.

OECD 208. Adopted. 2006. Guideline for Testing of Chemicals. 21 pp.

OECD 301-A. 1992. Guideline for Testing of Chemicals. 62 pp.

Piñero, J. & H.F. Puertas (1992) Industrialización de la flora medicinal colombiana. Bogotá, Colombia: Fondo Editorial Universitario de la Escuela de Medicina Juan N Corpas, págs. 15-55

Prager, M., Ligia, C. M. 1990. La biodiversidad: una estrategia a favor del control biológico. Colombia Ciencia y tecnología. Vol. 8 No 3. Colciencias.

Ramírez, V. J., Sainz, R. R. A. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1ª Ed. Once Ríos Editores. Culiacán Sinaloa, México 360 p. Revista Horticultura Internacional.60:70-71.

SIAP-SAGARPA, 2016. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. con datos del año 2014. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp. Fecha de consulta 20 de noviembre de 2016

SIAVI 2016. Sistema de Información Arancelaria Vía Internet. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/comercio/Paginas/Comercio-Exterior.aspx>

SNIIM (2016). Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. Precios del Tomate. Disponible en: http://www.economia-sniim.gob.mx/Precios_de_Tomate.htm Fecha de consulta 20 de Noviembre de 2016.

Tavares, de M.P.C; Tavares, de M.A.M. 2007.Hortalizas subutilizadas en Brasil.

UNAM 2016, Manual de prácticas: Extracción y síntesis orgánica 11 pp.

CAPITULO I

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO DE AJO

1. INTRODUCCIÓN

En la implementación de medidas de control de enfermedades vegetales es importante considerar todas las medidas de manejo disponibles dejando el control químico como última herramienta de forma que el ambiente, los productos vegetales y en especial los alimentos sean más saludables. En particular las bacterias fitopatógenas hoy en día ya no se controlan con antibióticos por las implicancias indirectas en la salud humana (Sánchez de Rivas, 2006). La principal herramienta química son los productos a base de cobre para los cuales ya se ha reportado resistencia en bacterias (Zignago, 2011).

El tomate es una de las hortalizas de mayor consumo por parte de la población y es afectado por muchas enfermedades de distintas causas. Las de origen bacteriano en especial tienen una gran importancia para el cultivo (Balestra et al, 2009).

En esta propuesta se plantea el estudio del efecto del extracto vegetales Ajo (*Allium cepa*) para el control de *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis, inoculada artificialmente sobre plántulas de jitomate (2-4 hojas verdaderas.

2. OBJETIVO

Determinar la efectividad biológica de un extracto de ajo, para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) en el cultivo de jitomate.

3. HIPÓTESIS

La aplicación del extracto de ajo de síntesis orgánica en plantas de jitomate, puede presentar una nueva alternativa de control del cáncer bacteriano en jitomate.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del experimento

El experimento se estableció bajo invernadero en el Rancho “El Capricho”, en Zumpahuacán, Estado de México, que se encuentra bajo la dirección de la empresa BYOSS S.A. DE C.V dedicada a investigación y desarrollo de productos fitosanitarios de origen natural. Se ubica geográficamente entre los paralelos 99°27'51" y 99°37'32" de longitud oeste, 18°41'35" y 18°55'22" latitud norte, con altitud de 1678 msnm. El clima de Zumpahuacán, se compone de varios microclimas pero predomina, "el templado semicálido subhúmedo (a) c (w2) w (1) g. La temperatura más elevada se origina antes del solsticio de verano y una temperatura media anual de 14 °C. En cuanto a la precipitación pluvial, se considera que gran parte de las lluvias son de verano con un régimen pluvial promedio de 650 mm; el mes más lluvioso es junio y en febrero se observa la mínima precipitación (INAFED 2016).

4.1.1. Variedad utilizada y establecimiento del almacigo

En las instalaciones de la empresa BYOSS S.A. de C.V. se prepararon semilleros para la obtención de plantas sanas que servirían como testigo negativo, para la aspersión de la bacteria *Clavibacter* sp., en condiciones controladas. Se utilizaron semillas de jitomate saladette híbrido CID F1 de crecimiento indeterminado, previamente termo tratadas (24 h a 80 °C), germinadas en bandejas de unicel desinfectadas con cloro (1mL L⁻¹ de agua), el sustrato utilizado fue una mezcla de turba (peat moss) y vermiculita (en proporción 4:1 v/v), ambos sometidos a esterilización en autoclave durante 1 h a 121 °C.

Durante todo el ensayo las plantas de jitomate se mantuvieron bajo aislamiento fitosanitario en un invernadero exclusivo para el experimento y desinfectado con clorhexidina 2% (Desinfectante grado hospitalario efectivo contra bacterias Gram +, Gram – y diferentes clases de esporas), a su vez las plantas fueron regadas con agua purificada esterilizada.

Los tratamientos evaluados en el experimento fueron 1) Testigo experimental sin inoculación de la bacteria (Cmm); 2) Control inoculado con la bacteria (Cmm) a una concentración de 1.5×10^8 UFC mL⁻¹; 3) Extracto de Ajo (1mL L⁻¹ de Agua); 4) Extracto de Ajo (2mL L⁻¹ de Agua); 5) Extracto de Ajo (4mL L⁻¹ de Agua) y 6) Tratamiento comercial (desinfectante de Yodo 1.5mL L⁻¹ de Agua) (Cuadro 1).

A los 10 días después de la inoculación se registró la incidencia de la enfermedad y los datos se expresaron en porcentaje de plantas con síntomas en cada repetición.

A los 30 días de establecidos los tratamientos, los tallos de todas las plantas fueron cortados en forma longitudinal para confirmar la presencia de síntomas internos propios de la infección causada por *C. michiganensis*, de igual manera se registraron los porcentajes de plantas que presentaban el síntoma en los haces vasculares.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en la prevención de la infección por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Tratamiento	Dosis Producto L ⁻¹ de Agua
1. Sin inoculación	-----
2. Control inoculado	1.5 x 10 ⁸ UFC mL ⁻¹
3. Extracto de Ajo	1mL L ⁻¹
4. Extracto de Ajo	2mL L ⁻¹
5. Extracto de Ajo	4mL L ⁻¹
6. Desinfectante comercial, a base de Yodo	1.5mL L ⁻¹ (dosis del fabricante)

4.1.2. Suspensión bacteriana

La bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* fue proporcionada por la empresa BYOSS S.A. DE C.V. Misma que fue aislada de jitomate en el 2015 y mantenida en una suspensión con glicerol (30 %) a – 20 °C. La patogenicidad de la cepa se revisaba cada tres meses inoculándola en plantas de jitomate, recuperándola y almacenándola nuevamente conforme a los procedimientos normalizados de operación para bacterias “PNO B-02” y “B-04” e instructivos de trabajo para equipo de laboratorio “L-301 Microbiología” de uso confidencial en la empresa.

4.1.3. Inoculación de la suspensión bacteriana

La cepa purificada en solución se encontraba ajustada a una densidad óptica de 1.5×10^8 ufc mL⁻¹ (concentración), determinada mediante el estándar 0.5 de McFarland (Anexo1). Cuando las plántulas de jitomate alcanzaron el tamaño adecuado (1-2 hojas verdaderas) para la inoculación con *C. michiganensis*, se colocaban una por una en contenedores de plásticos (10 cm x 10 cm) desinfectados con cloro (1mL L⁻¹ de agua), los cuales contenían como sustrato estéril Peat-most (Turba negra + vermiculita en una proporción 4:1 v/v).

A las plantas utilizadas como unidad experimental se les provocaron micro heridas (hasta tres) en las axilas de las hojas con ayuda de agujas de disección estériles y usando jeringas BD Ultra-Fine® de plástico estériles de 1.0 cc, se extrajo 1mL de solución bacteriana del tubo de ensayo de poliestireno que la contenía, consecutivamente se procedió a depositar una gota de solución bacteriana en las micro heridas. Con ayuda de atomizadores de 40 mL, los cuales contenían las diluciones de cada tratamiento, se realizaron hasta tres aspersiones y se cubrieron las heridas con algodón estéril y vitafilm para impedir la desecación y permitir el desarrollo de la infección.

Las plántulas inoculadas se mantuvieron en invernadero bajo condiciones de temperatura y humedad propias para el desarrollo de la bacteria (entre 18 - 30 °C). La evolución de síntomas se evaluó 10 días después de la inoculación (DDI). La presencia de la bacteria se confirmó mediante observación visual de síntomas (incidencia). Las plantas utilizadas como testigo negativo (plantas sanas sin inoculación) permanecieron aisladas en un invernadero contiguo con idénticas condiciones (entre 18 - 30 °C) para reducir al máximo la posibilidad de algún contagio no deseado, esto hasta finalizar el experimento.

En los controles inoculados solo con la solución bacteriana se procedió de la misma forma que con las plantas para tratamientos solo que el algodón se humedeció con agua destilada estéril para favorecer la infección.



Figura 1. Inoculación de la suspensión con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a 1.5×10^8 UFC mL⁻¹, De izquierda a derecha de arriba-abajo a) Dosis de extracto de ajo e yodo, b) Instrumentos utilizados para inocular, c) Punción de daño, d) *Clavibacter* sp. en solución, e) Aspersión de tratamiento, f) Sellado.

4.1.4. Diseño experimental y análisis estadístico

El ensayo de manejo alternativo del cáncer bacteriano *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) en jitomate se estableció usando un diseño de bloques al azar con seis repeticiones; el tamaño de la unidad experimental fue de 20 plantas. Dando un total de 120 plantas por tratamiento.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados

Tratamiento	Dosis L ⁻¹ de Agua	Repeticiones
1. Sin inoculación	-----	6
2. Control inoculado	1.5 x 10 ⁸ UFC mL ⁻¹	6
3. Extracto de Ajo	1mL L ⁻¹	6
4. Extracto de Ajo	2mL L ⁻¹	6
5. Extracto de Ajo	4mL L ⁻¹	6
6. Desinfectante comercial, a base de iodo	1.5mL L ⁻¹ (dosis del fabricante)	6

Con los datos obtenidos de promedio (Incidencia) de plantas que presentaban síntomas totales (Internos: haces vasculares necrosados y externos marchites, necrosis en la zona axilar de las hojas) se realizó el análisis de varianza (cuadro 3) y la comparación de medias esta última mediante la prueba de Tukey (cuadro 4) en donde se utilizó el software estadístico Minitab® (R) versión 17, y una confiabilidad del 95% ($\alpha = 0.05$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del ensayo de la inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, mostraron altos porcentajes de incidencia de infección de las plántulas superiores a 87 % con buena expresión de severidad, como se observó en el control inoculado únicamente con la solución bacteriana y con el tratamiento del producto comercial a base de yodo. El tratamiento tres: Extracto de Ajo a una dosis de 1 mL L^{-1} de Agua no difirió estadísticamente del testigo sin inoculación al no presentar síntomas externos y solamente el 2 % de plantas con haces vasculares sintomáticos. El tratamiento cuatro extracto de ajo (2 mL L^{-1} de Agua) y cinco extracto de ajo (4 mL L^{-1} de Agua) exhibieron valores medios en la evaluación de sintomática (60 y 20 % respectivamente) (Cuadro 4).

Cuadro 3. Analisis de varianza de los tratamientos en relacion a la inoculación de *Clavibacter* sp.

Fuente	GL	S. C	C M	Valor $F_{\text{cal.}}$	Valor p
Tratamiento	5	2311	462	137	0.0008920
Bloque	5	26	5	1.60	
Error	25	83	3		
Total	35	2422			

95 % de confiabilidad ($\alpha = 0.05$), $F_{\text{tab}} = 2.603$

En base a los resultados del análisis de varianza anteriores se observa que si existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos dado que el valor de F calculada es mayor que el valor de F tabulada (Fig.2), ($F_{\text{calc.}} 137 > F_{\text{tab.}} 2.603$).

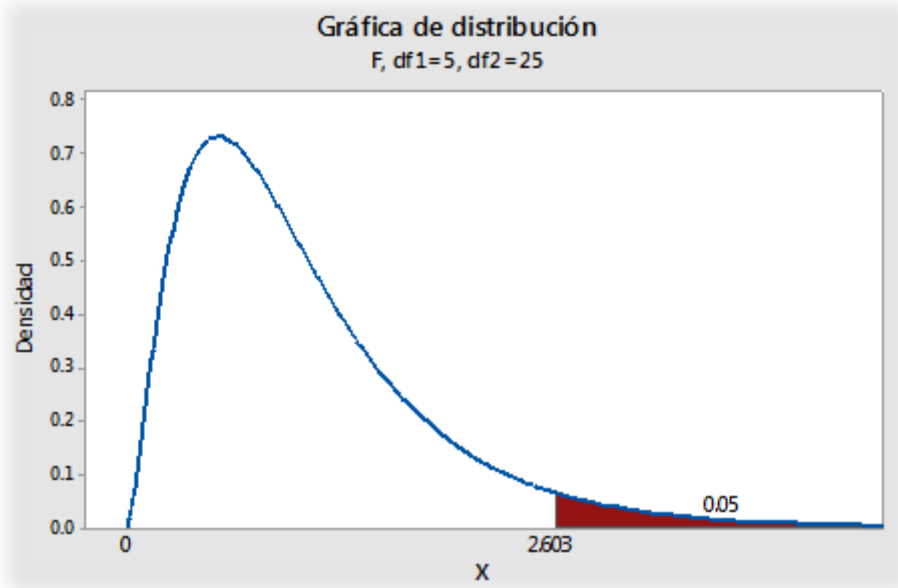


Figura 2. Grafica de distribución (Valor Ftab.).

Cuadro 4. Comparación de medias de infección total de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Media del porcentaje de plantas sintomáticas			
	Haces	Agrupación	Externos	Agrupación
6.Desinfectante comercial a base de yodo 1.5mL L ⁻¹ de Agua	96.67	A	100.00	A
1. Control inoculado Solución bacteriana 1.5 x 10 ⁸ UFC mL ⁻¹	97.00	A	90.83	A
2. Extracto de Ajo 4mL L ⁻¹ de Agua	28.33	B	20.00	C
3. Extracto de Ajo 2mL L ⁻¹ de Agua	18.33	B	60.00	B
4. Extracto de Ajo 1mL L ⁻¹ de Agua	1.67	C	0.00	C
1. Sin inoculación (Agua estéril)	0.00	C	0.00	C

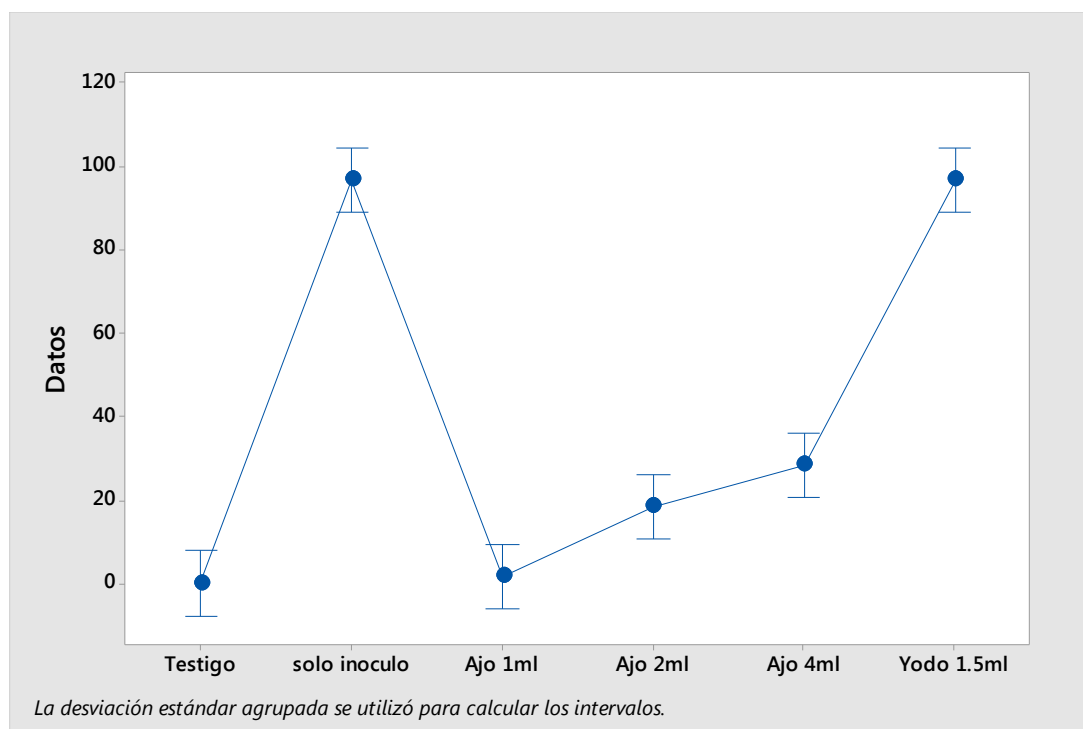


Figura 3. Grafica de la agrupación Tukey para los tratamientos

Los mayores porcentajes totales de infección se observaron en el control inoculado con la solución bacteriana (promedio del 93% plantas con síntomas totales) y el tratamiento a base de Yodo (promedio del 98% plantas con síntomas totales). El porcentaje de plantas con sintomatología propia del cáncer bacteriano (Cmm) fue superior al 90 % por lo que es diferente significativamente del resto de los tratamientos. El extracto de ajo a 2 mL L⁻¹ de agua exhibió valores medios de 18 a 60% para síntomas internos y externos respectivamente, para el extracto a una dosis de 4 mL L⁻¹ de agua fueron de 20 a 29 %, diferenciándose significativamente del control inoculado.

El resultado obtenido en el tratamiento uno: testigo inoculado con la solución bacteriana (1.5×10^8 UFC mL⁻¹) y seis: tratamiento comercial a base de yodo (1.5mL x L⁻¹ de agua) confirma la importancia de la infección por transmisión de esta enfermedad mediante heridas que normalmente se pueden realizar en el

manejo agronómico del cultivo. Al utilizar el extracto de ajo a la dosis de 1 mL L^{-1} se obtuvieron los menores porcentajes de infección de síntomas totales menores del 2 %.

Ninguno de los tratamientos, incluso el desinfectante comercial formulado con Yodo, logró prevenir la infección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Esto concuerda con lo expresado por Kleinhempel *et al.* (1987) quienes sostienen que aún los mejores métodos de desinfección y limpieza son inefectivos para eliminar totalmente bacterias en superficies. Otro aspecto que pudo haber perjudicado el desempeño de los tratamientos en este ensayo fue el tiempo transcurrido entre la inoculación y la aplicación posterior de los desinfectantes, Van Der Wolf *et al.*, 2005; menciona que aplicaciones diez minutos antes de productos desinfectantes ofrece un mejor control de la infección y dispersión de enfermedades bacterianas. Por ello, una desinfección rápida como la que se acostumbra entre las labores de deschuponado, deshoje u alguna otra actividad donde se manipule la planta directamente o indirectamente no sería suficiente para prevenir el contagio. Para incrementar el factor desinfectante del extracto de ajo en sus diferentes dosis se sugiere realizar aspersiones al cultivo de jitomate antes del ingreso del personal que realizara alguna de las labores culturales.

Si bien el control de la infección no fue total y se mantiene el riesgo de propagación de la enfermedad, se debe considerar que se utilizaron soluciones bacterianas en alta concentración (1.5×10^8 UFC mL^{-1}). Gartermann *et al.*, (2003), menciona que la aparición de síntomas depende de la población bacteriana colonizando el huésped, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* puede vivir como endófito en la planta de jitomate pero para ocasionar síntomas debe superar una población de 1×10^8 UFC g^{-1} de tejido, además de poseer algunos plásmidos involucrados en la patogenicidad

(Meletzus *et al.*, 1993). A ese nivel la bacteria es capaz de provocar la alteración física del xilema que junto a la producción de polisacáridos impide la normal circulación de agua y provoca marchitamientos.

Algunos trabajos mencionan buena actividad preventiva de desinfectantes con yodo de la infección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, en esta investigación no tuvo efecto en la prevención de la infección.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir lo siguiente:

- 1.- El tratamiento que mejor evitó la infección del cáncer bacteriano fue el extracto de ajo a una dilución de 1mL L^{-1} de agua. Ya que es estadísticamente igual al testigo sin inoculación de la bacteria.
- 2.- El producto hidrosoluble de extracto de ajo puede ser considerado como una nueva alternativa viable para evitar la infección y dispersión de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Ya que presento solo el 1.67 % de síntomas internos y 0 % de síntomas externos.

7. LITERATURA CITADA

- Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. 5a Ed. Academic Press.USA. 922 p.
- Castellanos, Z. J. 2004. Manual de producción hortícola en invernadero. INTAGRI. 2ª Edición. 429 pp.
- DEAQ. 2015. Diccionario de especialidades agroquímicas. 25ª ed. Thomson. Distrito Federal. México. Versión electrónica.
- Kleinhempel H, Nachtigall M, Ficke W, Ehrig F. 1987. Disinfection of pruning shears for the prevention of the fire blight. *Acta Horticulturae*, 217: 211 - 218.
- Meletzus D, Bermpohl A, Dreier J, Eichenlaub R. 1993. Evidence for plasmidencoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Journal of Bacteriology*, 175(7): 2131 - 2136.
- Nuez, F. 2001. El cultivo del tomate. Editorial Mundi-Prensa. Barcelona, España. 793 pp.
- OEPP/EPPO (2016) EPPO Standards PM 7/42(1): EPPO A1 and A2 lists of quarantine pests. PM 7/42 (1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 271 – 273.
- Ramírez R., S. Osuna C., F. J de. Vázquez A., J.M.P. Bustamante O. J. D. de. Canul K., J. Ocampo O., T. 2009. Plagas y enfermedades del jitomate cultivado en invernaderos y bio-espacios del estado de Morelos. INIFAP. 79 p.
- Sánchez de Rivas, C. 2006. ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...? Revista Química Viva. 5: 63-77.
- SIAP, Datos 2012-2014. Disponible en: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeagr.html Fecha de consulta 20 de Noviembre de 2016.

Van der Wolf J.M, Elphinstone J.G, Stead D.E, Metzler M, Müller P, Hukkanen A, Karjalainen R. 2005. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot [En línea]. Wageningen : Plant Research International. Consultado el 6 junio 2015. Disponible en: <http://edepot.wur.nl/39352>.

Zignago, A. 2011. Estudio in vitro de la actividad antimicrobiana de dos propóleos frente a bacterias fitopatógenas. Tesis Ing. Agr. F. de Agronomía. UDELAR. 62 p.

CAPITULO II

BIODEGRADABILIDAD AEROBIA DEL EXTRACTO DE AJO HIDROSOLUBLE BASADA EN EL PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR INTERNACIONAL OECD 301-A

1. INTRODUCCIÓN

La biodegradabilidad es un parámetro determinante en el comportamiento ambiental de las sustancias químicas y una propiedad deseable de los productos que se liberan en grandes cantidades al medio natural, tales como detergentes, pesticidas, materiales de embalaje, etc. Mediante el proceso conocido como biodegradación, los microorganismos transforman los compuestos orgánicos, la mayoría de las veces en productos menos tóxicos que los compuestos originales. (Ottenbrite y Albertsson, 1992).

La biodegradación puede ser 'primaria' y conducir a simples alteraciones estructurales del compuesto, o bien implicar su conversión a productos inorgánicos de bajo peso molecular y constituyentes celulares, en cuyo caso se denomina 'biodegradación última' o 'mineralización'. La biodegradabilidad ha sido definida como la capacidad intrínseca de una sustancia de ser transformada en una estructura química más simple por vía microbiana (Ottenbrite y Albertsson, 1992). Para su evaluación se han diseñado una serie de pruebas, las cuales buscan cuantificar el grado de persistencia de estructuras químicas en ambientes naturales o industriales.

Algunas de estas pruebas han sido normalizadas para garantizar que sus resultados sean confiables y válidos independientemente del laboratorio en el que sean obtenidos.

Esta prueba se realizó con base en lo establecido en el procedimiento de la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) OECD 301-A “OECD 301-A Ready biodegradation test” (Guidelines OECD 301 A-F, 1992). Esta prueba evaluó la biodegradabilidad de un producto hidrosoluble previamente formulado a base de extracto de ajo. Lo anterior con la finalidad de que se cuente con resultados experimentales que permitan evidenciar si dicho compuesto es biodegradable, para lo cual se realizará de forma integral el procedimiento citado.

La prueba a desarrollar está enfocada al extracto de ajo, que será utilizado como única fuente de carbono en un medio con nutrientes limitados bajo condiciones aerobias, para que dicho compuesto sea o no biodegradable, el cual se va a comparar con materiales de biodegradabilidad conocida.

2. OBJETIVO

Evaluar la biodegradabilidad de un producto hidrosoluble de extracto de ajo (*Allium sativum*) estandarizado por síntesis orgánica, de acuerdo al procedimiento OECD 301-A.

3. HIPÓTESIS

La realización de la prueba OECD 301-A, en el extracto de ajo puede evidenciar si el extracto obtiene niveles de DQO correspondientes a una biodegradación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Con base en la metodología de prueba OECD 301-A (Anexo 2), se evaluó la biodegradabilidad del extracto de ajo preparando 5 litros de medio mineral mantenido en aireación por un periodo de 6 horas con el fin de saturarlo con oxígeno.

El extracto de ajo, los controles de procedimiento, los blancos, controles de degradación: abiótica, adsorción y toxicidad se colocaron en matraces con agitación (50 rpm) asegurando una temperatura ambiental de 22 °C. Para minimizar posibles errores y variaciones debidas a manejo, las soluciones fueron preparadas al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones (Cuadro 1).

4.1. Caracterización del extracto de ajo

Producto hidrosoluble de un extracto natural de ajo (*Allium sativum*), de aspecto translucido, con aroma ligero a etanol con formación de espuma un pH de 7.5 y una DQO inicial evaluada de 548, 888 mL.O₂ L⁻¹ (presenta una gran cantidad de material orgánico disuelto).

Cuadro 1. Compuestos presentes en las soluciones preparadas para el estudio de biodegradabilidad.

Matraz	Solución	Composición
1	Sustancia de prueba o problema: Extracto de ajo Inóculo = Lodo activado Medio mineral (ver Anexo 2)	50 µL de extracto de ajo 100 mL de inóculo 900 mL de medio mineral
2	Sustancia de prueba o problema (Duplicado): Extracto de ajo Inóculo = Lodo activado Medio mineral (ver Anexo 2)	50 µL de extracto de ajo 100 mL de inóculo 900 mL de medio mineral
3	Blanco 1 o Control de Inoculo: Inóculo = Lodo activado Medio mineral (Ver anexo 2)	100 mL inóculo 900 mL medio mineral
4	Blanco 2 o Control de Inoculo: Inóculo (Lodo activado) Medio mineral (Ver anexo 2)	100 mL inóculo 900 mL medio mineral
5	Control de procedimiento o referencia: Compuesto de referencia (acetato de sodio) Inóculo = Lodo activado Medio mineral (ver anexo 2)	10 mL de acetato de sodio 100 mL de inóculo 900 mL de medio mineral
6	Control de degradación abiótica: Extracto de Ajo Medio mineral (ver anexo 2) Inóculo = Lodo activado Agente esterilizante (cloruro de mercurio = HgCl_2)	50 µL extracto de ajo 900 mL de medio mineral 100 mL inóculo Cloruro de mercurio = HgCl_2
7	Control de adsorción: Extracto de ajo (sustancia de prueba) Inóculo = Lodo activado Agente esterilizante (HgCl_2)	50 µL extracto de ajo 1 L medio mineral Cloruro de mercurio
8	Control de toxicidad: Extracto de ajo (sustancia de prueba) compuesto de referencia Medio mineral Inóculo = Lodo activado	50 µL extracto de ajo 10 mL acetato de sodio 990 mL medio mineral Inóculo

La solución de acetato de sodio se utilizó como sustancia de referencia para el control de procedimiento y el cloruro de mercurio se utilizó para inhibir la actividad microbiana en el matraz de degradación abiótica (OECD 301-A, 1992).

El inóculo fue facilitado por la empresa BYOSS S.A. de C.V., el cual consistió de lodos activados de una planta tratadora de agua, obtenido mediante sedimentación, a efecto de eliminar la mayor cantidad de agua, pre-acondicionado por inanición y aireación durante 5 días antes de la prueba a temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La concentración de sólidos totales usados en la prueba fue de 50 g L^{-1} (SST) (Suma de los sólidos suspendidos totales, sales disueltas y materia orgánica) a un pH de 6.7.

Se eliminó del inóculo las partículas en sucesión gruesas y después éste fue colocado en un matraz enjuagado con agua destilada, con el objeto de asegurar que esté libre de sustratos que pudieran elevar la concentración inicial de carbono orgánico disuelto (COD). Una vez preparados los matraces estos se cubrieron con papel aluminio para mantenerlos en oscuridad parcial (Figura 1, cada matraz contenía una barra magnética para mantenerlo con agitación constante hasta su uso, y con una bomba de aireación esto para contar con la mayor concentración de oxígeno disuelto que permita a los microorganismos realizar la biodegradación del sustrato bajo condiciones aerobias ($> 2\text{ mg OD L}^{-1}$). La OECD (1992), recomienda que el inóculo presente una concentración entre los 3 a 5 g L^{-1} de SST. El inóculo fue lavado varias veces con medio mineral (Anexo 2) para evitar que contribuyera el COD de las muestras durante las pruebas.



Figura 1. Matraces conteniendo el extracto de ajo y controles de la prueba OECD 301-A biodegradabilidad aerobia.

Las determinaciones de Carbono orgánico se realizaron por medio un analizador de carbono orgánico marca Shimadzu (figura 2) modelo TOC-VCPN (Calibrado con biftalato de potasio), las muestras se filtraron a través de membranas Syringe de politetrafluoretileno de 0.45 micras para determinar la fracción de carbono disuelta en la muestra.



Figura 2. Analizador de Carbono orgánico Shimadzu.

El principio de funcionamiento del equipo es la oxidación de muestras liquidas a 680 °C en presencia de un catalizador obteniéndose como productos agua y CO₂; esté último es determinado fotométricamente por una lámpara infrarroja.

El equipo compara la muestra contra la curva de calibración y determina la cantidad de COD.

4.2. Análisis de biodegradabilidad

De acuerdo al procedimiento experimental de la prueba de biodegradabilidad aerobia (OECD 301-A), para determinar si esta la prueba en este estudio es válida es necesario considerar los siguientes lineamientos:

Determinar el grado y la velocidad de biodegradación

Utiliza a la sustancia de prueba como la única fuente de carbono para los microorganismos con una cantidad de nutrientes limitados para que la sustancia de prueba pueda ser biodegradada.

Cumplir con el criterio para definir que la sustancia es biodegradable: “La sustancia en cuestión debe exhibir el retiro del 70 % del Carbono Orgánico Disuelto (COD) a los 28 días.

Para poder hacer valido el estudio se obtiene la D_t del producto de referencia (acetato de sodio) misma que tiene que ser superior al D_t de la sustancia problema.

En el cuadro 2 se presentan las concentraciones iniciales de DQO para el extracto de ajo y los controles de procedimiento OCDE 301-A biodegradabilidad.

Cuadro 2. Demanda química de oxígeno (DQO $\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$) inicial para el extracto de ajo y los controles de procedimiento OCDE 301-A biodegradabilidad

Matraz	Solución	DQO inicial
1	Sustancia de prueba o problema: Extracto de ajo Inóculo = Lodo activado Medio mineral (ver Anexo 2)	77.45
2	Sustancia de prueba o problema (Duplicado): Extracto de ajo Inóculo = Lodo activado Medio mineral (ver Anexo 2)	68.33
3	Blanco 1 o Control de Inoculo: Inóculo = Lodo activado Medio mineral (Ver anexo 2)	8.33
4	Blanco 2 o Control de Inoculo: Inóculo = Lodo activado Medio mineral (Ver anexo 2)	13.33
5	Control de procedimiento o referencia: Compuesto de referencia (acetato de sodio) Inóculo = Lodo activado Medio mineral (ver anexo 2)	98.33
6	Control de degradación abiótica: Extracto de Ajo Medio mineral (ver anexo 2) Inóculo = Lodo activado Agente esterilizante (cloruro de mercurio)	65.00
7	Control de adsorción: Extracto de ajo (sustancia de prueba) Inóculo = Lodo activado Agente esterilizante (HgCl_2)	75.77
8	Control de toxicidad: Extracto de ajo (sustancia de prueba) compuesto de referencia Medio mineral Inóculo = Lodo activado	113.67

El curso de la biodegradación se midió y monitoreó por medio del análisis de las concentraciones de Demanda Química de Oxígeno (DQO) durante los 28 días del período de prueba.

El grado y determinación de biodegradación fue calculado a partir de la concentración de carbón orgánico disuelto (COD) removido, medido como el

promedio de la demanda química de oxígeno (DQO) de los matraces que contenían los blancos o controles de Inóculo (Inóculo + medio mineral), se obtuvo así igual la DQO en los matraces de sustancia de prueba o problema (extracto de ajo + Inóculo + medio mineral) como se muestra en la figura 4 y figura 5, respectivamente, donde se puede observar la disminución de la DQO durante los 28 días de estudio. Para dar validez a la prueba como lo sugiere la prueba OCDE 301-a para determinar si el extracto de ajo es corresponde a un porcentaje de biodegradabilidad superior a 70 %.

La determinación de biodegradabilidad (D_t) se obtiene de la diferencia de los valores de la DQO de la sustancia problema y la sustancia de los blancos

Para calcular el porcentaje de degradación (D_t) de la sustancia de prueba o problema (extracto de ajo + Inóculo + medio mineral) se realizó un promedio de los datos diarios de la DQO obtenidos durante los 28 días que duró el estudio.

El porcentaje de degradación que se calcula con la siguiente ecuación 1.

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

Dónde:

D_t = % de degradación al tiempo t

C_0 = el promedio de la concentración inicial de DQO en el medio de mineral inoculado con la sustancia de prueba (mg DQO L⁻¹)

C_t = el promedio de la concentración de DQO en el medio de cultivo inoculado con la sustancia problema o de estudio al tiempo t (mg DQO L⁻¹)

$C_{bl(0)}$ = el promedio de la concentración inicial de DQO en el blanco del medio mineral inoculado (mg DQO L⁻¹)

$C_{bl}(t)$ = el promedio de la concentración del blanco del medio mineral inoculado al tiempo t (mg DQO L^{-1})

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la disminución de la DQO durante los 28 días de estudio se muestran en el cuadro 3 y gráficamente en la figura 3

Cuadro 3. Resultados de la demanda química de oxígeno (DQO) obtenidos durante el estudio de biodegradabilidad.

Demanda química de oxígeno (DQO) $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ por día de duración de la prueba															
Matraz	Inicial	1	2	3	5	7	9	12	14	17	19	20	23	26	28
Blanco 1 o Control de Inoculo: Inóculo (Lodo activado) Medio mineral (Ver anexo 2)	8	9	9	10	13	10	8	9	10	10	10	10	8	8	8
Blanco 2 o Control de Inoculo (Duplicado) Inóculo (Lodo activado) Medio mineral (Ver anexo 2)	13	13	12	12	13	12	12	12	12	12	10	10	12	8	8
Sustancia de prueba o problema: Extracto de ajo Inóculo (Lodo activado) Medio mineral (ver Anexo 2)	77	75	75	73	60	55	52	48	45	43	39	34	22	20	18
Sustancia de prueba o problema (Duplicado): Extracto de ajo Inóculo (Lodo activado) Medio mineral (ver Anexo 2)	68	67	65	63	51	46	43	39	36	34	30	27	18	15	13
Control de procedimiento o referencia: Compuesto de referencia (acetato de sodio) Inóculo Medio mineral (ver anexo 2)	98	94	91	88	74	64	53	45	40	33	27	21	14	8	7
Control de toxicidad: Extracto de ajo (sustancia de prueba) Compuesto de referencia Medio mineral Inóculo	114	111	111	104	99	99	77	76	69	63	57	51	45	39	38
Control de degradación abiótica: Extracto de Ajo Medio mineral (ver anexo 2) Inóculo (Lodo activado) Agente esterilizante (cloruro de mercurio)	65	65	64	64	64	61	61	60	60	60	58	58	57	56	53
Control de adsorción: Extracto de ajo (sustancia de prueba) Inóculo Agente esterilizante (HgCl_2)	76	76	76	75	73	73	73	72	72	70	70	70	67	63	63

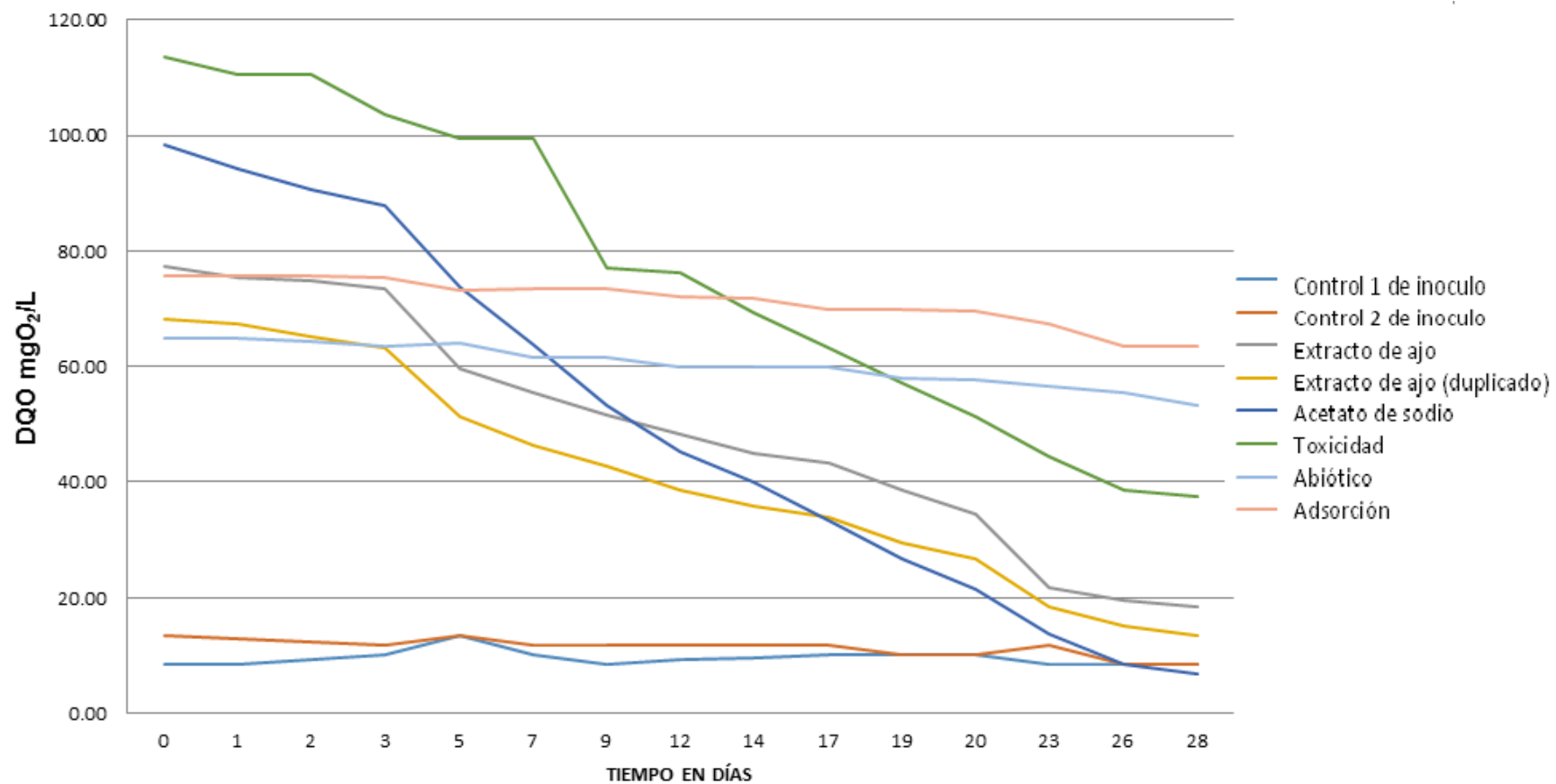


Figura 3. Observación gráfica de los resultados de la demanda química de oxígeno (DQO) obtenidos durante el estudio de biodegradabilidad.

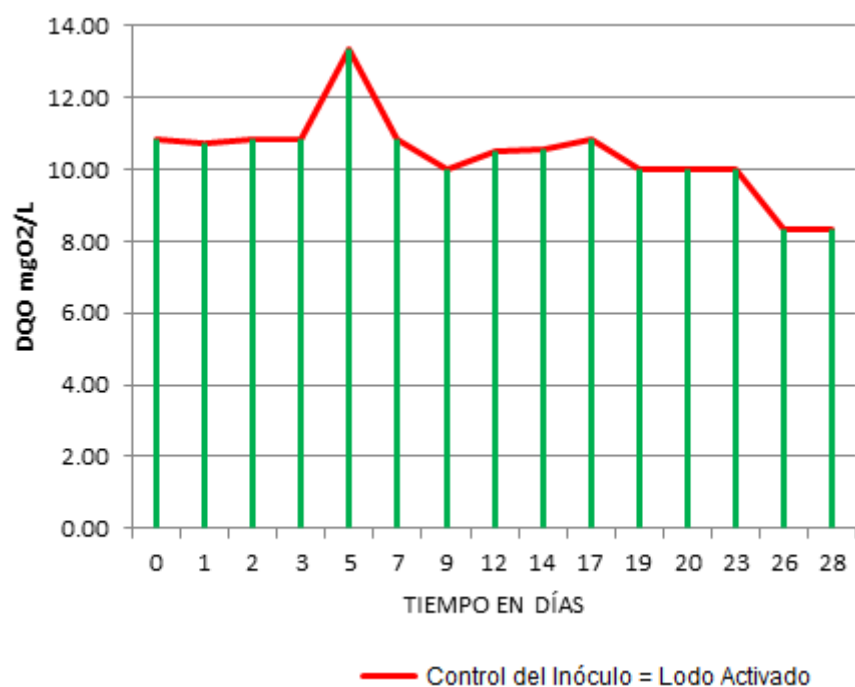


Figura 4. Observación grafica del grado de biodegradabilidad de los blancos o controles del inóculo (promedios) usada para comparación del grado de biodegradabilidad del extracto de ajo (sustancia problema).

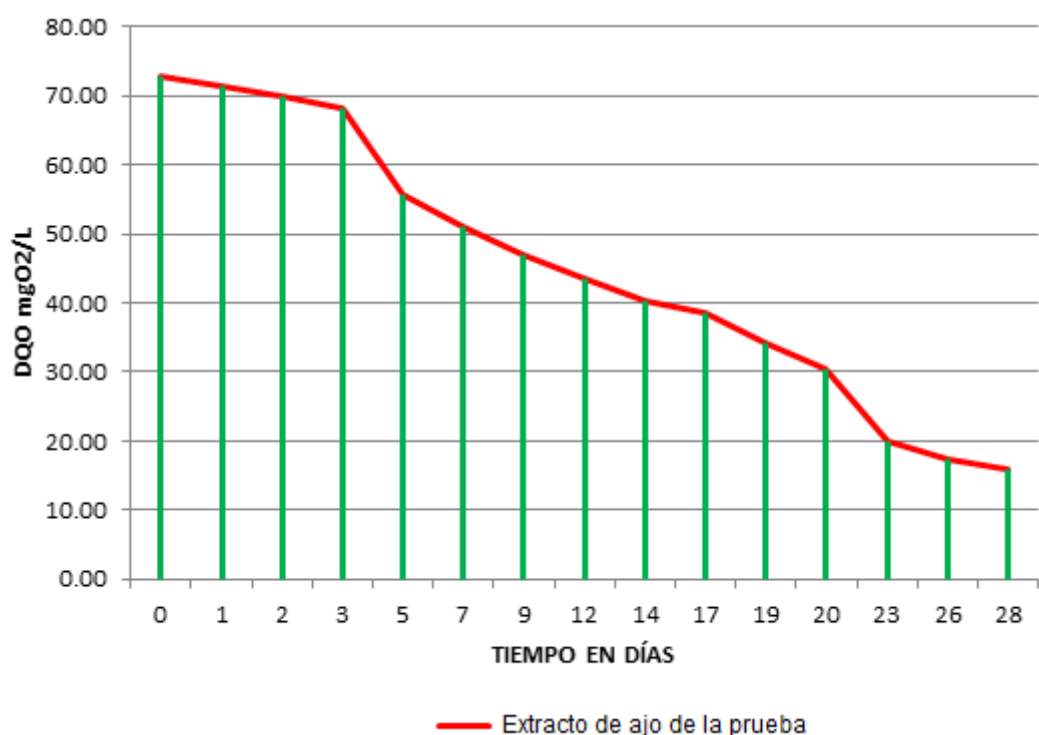


Figura 5. Observación grafica del grado de biodegradabilidad (promedios) del extracto de ajo (sustancia problema).

Se observa en las figuras 4 y 5 que los matraces que contuvieron las sustancias problema 1 y duplicado (extracto de ajo + inóculo + medio mineral) iniciaron la prueba OCDE 301-A con un promedio de $72.5 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ de DQO y finalizaron con un promedio de $15.5 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ de DQO, por otra parte los matraces que contuvieron las sustancias blanco 1 y duplicado iniciaron (día cero con un promedio de $10.5 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ de DQO y finalizaron (día 28) con $8 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ (28 días) de DQO.

Se utilizó la ecuación 1 para determinar el porcentaje de degradación (Dt) de la sustancia problema.

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100 \text{ (Ec. 1)}$$

Se obtuvo el porcentaje de degradación (Dt) de: La sustancia problema y correspondió a 87.9 %, mientras que el Dt de la sustancia de referencia (acetato de sodio) fue de 98.1 % (figura 6).

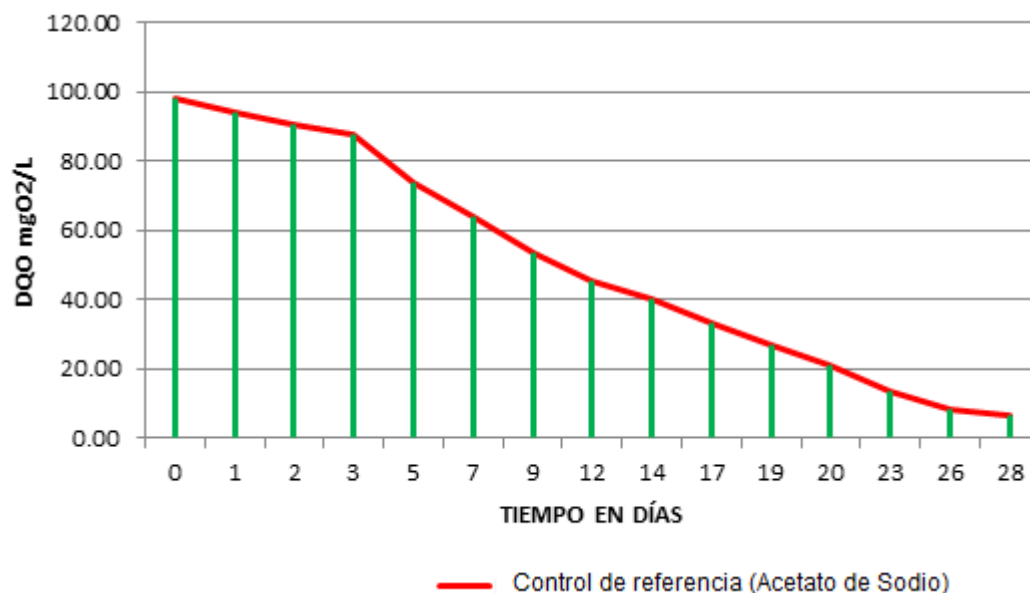


Figura 6. Observación grafica del grado de biodegradabilidad de la sustancia de referencia (acetato de sodio).

Este resultado indica que el proceso de biodegradación se realizó bajo condiciones óptimas ya que se obtuvo una remoción de COD mayor al 70 %, tal como lo establece el requisito en el procedimiento OECD 301-A.

6. CONCLUSIONES

1. La prueba de biodegradabilidad realizada es válida ya que se encontró una **Dt mayor al 70%** en la sustancia de referencia (acetato de sodio) como lo marca el procedimiento OECD 301-A como requisito de validez.
2. El producto hidrosoluble de extracto de ajo (*Alium sativum*) presentó una **Dt del 87.9 %**, de esta forma cumple el requisito en el parámetro de degradación considerado en el protocolo OECD 301-A por lo que puede considerarse como biodegradable.

7. LITERATURA CITADA

OCDE (1992) Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development. Paris, Francia.

OECD 301-A. 1992. GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. 62 pp.

Ottenbrite RM, Albertsson AC (1992) Discussion on degradation terminology. En Vert M, Feijen J, Albertsson A, Scott G, Chiellini E (Eds.) Biodegradable Polymers and Plastics. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, RU. pp. 73-92

CAPITULO III

EVALUACION DE LA ECOTOXICIDAD DEL EXTRACTO DE AJO BASADA EN EL PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR INTERNACIONAL OECD 208

1. INTRODUCCIÓN

La preocupación por preservar el ambiente se ha mantenido a lo largo de la historia a golpes de dramáticos accidentes por el uso y abuso de la utilización de diversas sustancias químicas en la agricultura. De esta manera surgió la Toxicología Ambiental y la Ecotoxicología (Wang y Freemark, 1995).

La Ecotoxicología es la ciencia que estudia los efectos de las sustancias químicas sobre la estructura y función de los ecosistemas, y abarca un amplio rango de temas como: la distribución de los contaminantes, su transporte, bioacumulación, degradación y efectos biológicos y ecológicos asociados a ellos. Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. A pesar de sus obstáculos y sus limitaciones, los bioensayos ecotoxicológicos son métodos que pueden ayudar a determinar si un efluente, o una sustancia vertida a un ecosistema representan un potencial riesgo tóxico para la flora y fauna, e incluso para el hombre (Wang y Freemark, 1995).

Las plantas superiores son ampliamente utilizadas por ser organismos eucarióticos, y por lo tanto más comparables a la mayoría de las especies de la flora y la fauna superiores, y constituyen una eficiente herramienta de trabajo para medir alarma de peligro ambiental por ser más sensibles que otros sistemas de ensayos disponibles, son de fácil manipulación, almacenaje y bajo costo, además de presentar buena correlación con otros sistemas de pruebas (Uribe, 2008)

En América Latina son numerosos los países que utilizan los sistemas de plantas para la evaluación toxicológica de muestras ambientales. Las semillas más comúnmente utilizadas para estos fines son las semillas de lechuga y jitomate (Adam y Duncan, 2002)

Una de las aplicaciones más extendidas del monitoreo de efectos biológicos en los bioensayos con semillas es que permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento y simplificando el procedimiento de prueba. la OCDE emitió el procedimiento estándar internacional denominado OECD 208. "Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test". Como prueba de toxicidad de sustancias que se comercializarán para ser emitidas en grandes cantidades al ambiente (OECD, 1984).

2. OBJETIVO

Evaluar la toxicidad acuática y terrestre de acuerdo al procedimiento OECD 208, del producto hidrosoluble formulado de extracto de ajo (*Allium sativum*), después de ser sometido a la prueba de biodegradabilidad. OECD 301-A.

3. HIPÓTESIS

La realización de la prueba OECD 208 al extracto de ajo puede evidenciar si este extracto obtiene niveles de toxicidad después de ser sometido a una biodegradación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En la realización de este estudio se utilizó el material procedente de la aplicación de la prueba OECD 301-A biodegradabilidad al extracto de ajo con el objeto de contar con resultados experimentales que permitan evidenciar si el extracto de ajo al ser sometido a biodegradación adquirió o no características de toxicidad.

La prueba está enfocada hacia el efecto ocasionado sobre el crecimiento inicial (germinación) de las plantas tras la exposición al formulado de extracto de ajo y al resultante del formulado de extracto de ajo sometido a biodegradación en la prueba OECD 301-A (Sustancia de prueba o problema: Extracto de ajo + Inóculo (Lodo activado) + medio mineral anexo 2) para evaluar si el extracto de ajo estudiado adquirió características tóxicas.

El procedimiento OECD 208 es aplicable a productos químicos en general, biocidas y sustancias para protección de cultivos (también conocidos como productos fitosanitarios o plaguicidas).

El empleo de esta metodología requiere que la sustancia de estudio sea soluble en agua, la cual se mezcla con el suelo de siembra o sustrato, por lo que, la exposición de la sustancia en estudio a la semilla o a la planta es a través del suelo o poro-agua del suelo. Es importante considerar que la capacidad de retención de agua del suelo no debe ser superada mediante la

adición de la sustancia evaluada en el estudio después de que el extracto de ajo fue sometido a la prueba OCDE 301 A de biodegradación.

4.1. Caracterización del extracto de ajo

Producto hidrosoluble de extracto natural de ajo (*Allium sativum*), de aspecto translucido, con aroma ligero a etanol con formación de espuma un pH de 7.5 (Figura 1)

De la prueba OECD 301-A se utilizó el medio resultante del matraz número 8 que contuvo (cuadro 1).

Cuadro 1. Control de toxicidad utilizado para germinación de semillas a diferentes diluciones (prueba OECD 301-A)

Matraz	Solución	Composición
8	Control de toxicidad: Extracto de ajo (sustancia de prueba) compuesto de referencia Medio mineral Inóculo	50 µL extracto de ajo 10 mL acetato de sodio 990 mL medio mineral Inóculo



Figura 1. Aspecto del producto hidrosoluble de extracto de ajo

4.2. Descripción de las variedades de semillas utilizadas

La prueba se desarrolló en variedades mejoradas de especies vegetales cultivadas: lechuga y jitomate.

LECHUGA (Figura 2)

Especie: *Lactuca sativa*, variedad: bola

Familia: *Asteraceae*

Género: *Lactuca*

Nombre común: Lechuga

Proveedor de la semilla: Caloro Seed.

Germinación: 85%

Pureza: 98%

No. Lote: 785EMOR

Año de incremento de la semilla: 10/01/14

Fecha de aplicación de la prueba de germinación: 01/01/15



Figura. 2 Semillas de lechuga bola

JITOMATE (Figura 3)

Especie: *Solanum lycopersicum*, Híbrido CID F1.

Familia: *Solanaceae*

Género: *Solanum*

Nombre común: Tomate rojo o jitomate.

Proveedor: Harris Moran Seed Company.

Germinación: 90%

Pureza: 99%

No. Lote: F13556

Año de incremento de la semilla: 2015



Figura 3. Semillas de jitomate saladette CID F1.

Para evaluar el efecto tóxico del medio resultante de la prueba de biodegradabilidad, se realizó el efecto potencial de este material sobre la germinación de semillas. Para tal efecto, la prueba de germinación se realizó colocando 20 semillas de lechuga y jitomate en dos placas de Petri (10 por placa) sobre un papel filtro, sobre el cual se agregó el medio resultante de la prueba de biodegradabilidad a diluciones del 50, 25, 10, 5, 1 y 0 % (sin dilución) (Figura 4).

Las cajas Petri con las semillas se incubaron a una temperatura ambiental de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en el laboratorio de aseguramiento de calidad de la empresa BYOSS S.A. de C.V., en oscuridad durante cinco días, se observó la germinación de las semillas con las diluciones y los controles (figura 5, 6 y 7), se realizó la cuenta de semillas germinadas y se sacó el promedio (cuadro 2).

Se realizó una gráfica de las semillas germinadas a diferentes concentraciones para evaluar la posible inhibición de la germinación del 50% de las semillas, las cuales se muestran en la figura 8. Donde se observa la germinación las dos especies de semillas a diferentes diluciones del control de toxicidad (cuadro 1) resultante de la prueba OECD 301-A.

Para el análisis de varianza se utilizó el software estadístico minitab® versión 17. Considerándose como tratamientos las diferentes diluciones del control de toxicidad de la prueba OCDE 301-A y unidad experimentan 2 cajas Petri con 10 semillas cada una para las dos especies de semillas (jitomate y lechuga) con tres repeticiones. Usando en total 60 semillas por tratamiento.



Figura 4. Semillas en cajas Petri. De arriba a abajo: a) Lechuga. b) jitomate

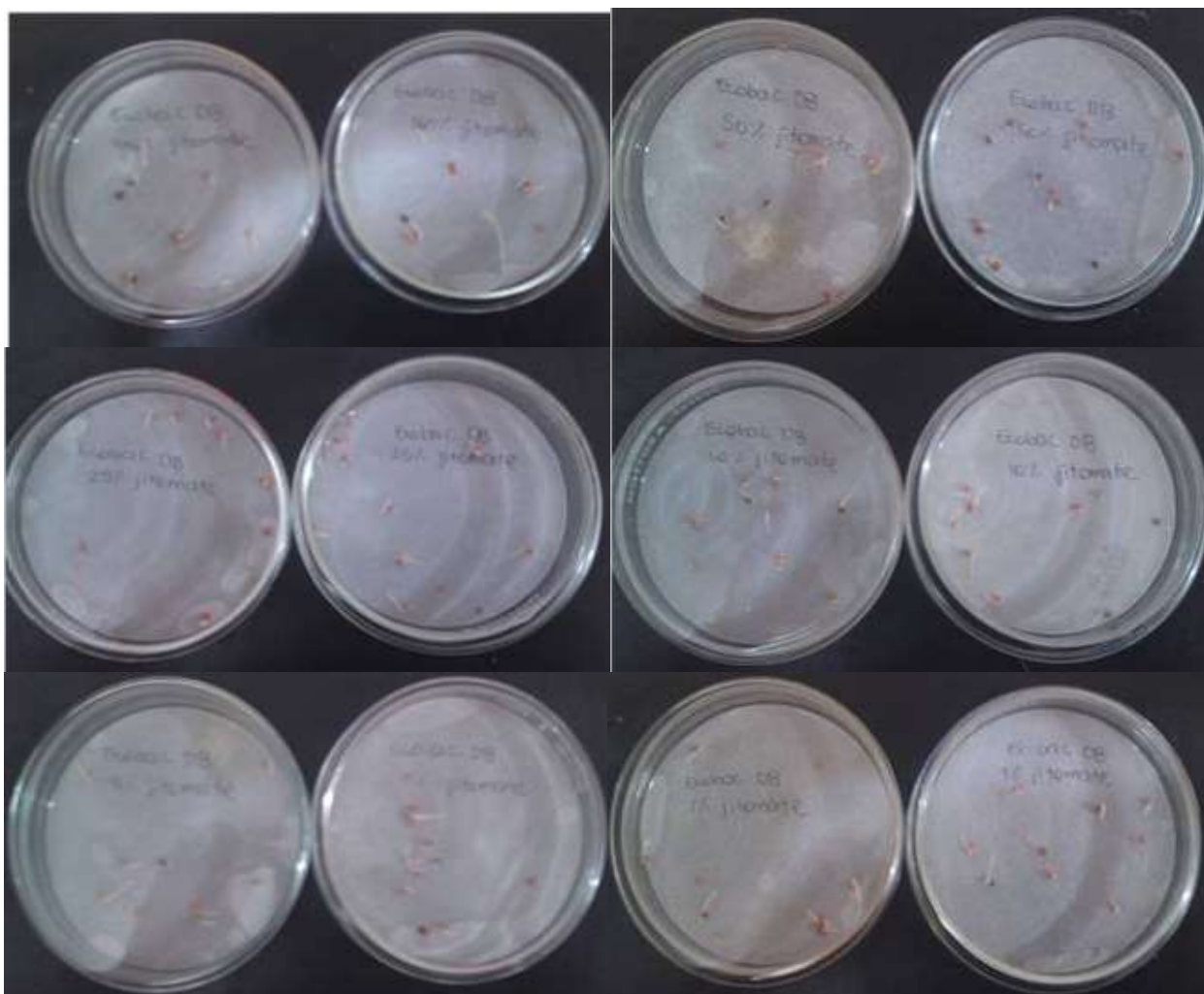


Figura 5. Semillas de jitomate germinadas de arriba – abajo, de izquierda a derecha a) control de toxicidad al sin dilución, b) control de toxicidad a dilución del 50 %, c) control de toxicidad a dilución del 25 %, d) control de toxicidad a dilución del 10 %, e) control de toxicidad a dilución del 5%, f) control de toxicidad a dilución del 1 %.



Figura 6. Semillas de lechuga germinadas. De arriba - abajo, de izquierda a derecha a) control de toxicidad al sin dilución, b) control de toxicidad a dilución del 50 %, c) control de toxicidad a dilución del 25 %, d) control de toxicidad a dilución del 10 %, e) control de toxicidad a dilución del 5%, f) control de toxicidad a dilución del 1 %.



Figura 7. Control de semillas de A) lechuga y B) jitomate germinadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El promedio de las semillas germinadas se muestra en el cuadro 2 y 3 para jitomate y lechuga, respectivamente.

Cuadro 2. Promedio de germinación de las semillas de jitomate a diferentes diluciones del control de toxicidad (cuadro 1) resultante de la prueba OECD 301-A

JITOMATE						
Diluciones del control de toxicidad (%)	Plantas germinadas repetición 1	% de germinación repetición 1	plantas germinadas repetición 2	% de germinación repetición 2	plantas germinadas repetición 3	% de germinación repetición 3
0	16	80	20	100	20	100
1	15	75	20	100	20	100
5	19	95	20	100	19	95
10	16	80	17	85	19	95
25	17	85	19	95	18	90
50	19	95	19	95	20	100

Cuadro 3. Promedio de germinación de las semillas de lechuga a diferentes diluciones del control de toxicidad (cuadro 1) resultante de la prueba OECD 301-A.

LECHUGA						
Diluciones del control de toxicidad (%)	Plantas germinadas repetición 1	% de germinación repetición 1	plantas germinadas repetición 2	% de germinación repetición 2	plantas germinadas repetición 3	% de germinación repetición 3
0	20	100	19	95	20	100
1	20	100	18	90	19	95
5	19	95	19	95	18	90
10	18	90	18	90	18	90
25	19	95	18	90	19	95
50	20	100	18	90	20	100

Se realizó una gráfica de las semillas germinadas a diferentes diluciones para evaluar la posible inhibición de la germinación del 50% de las semillas, las cuales se muestran en la figura 8. Donde se observa que los dos tipos de semillas a diferentes diluciones del control de toxicidad (cuadro 1) resultante de la prueba OECD 301-A germinan por arriba del 50% (10 semillas germinadas).

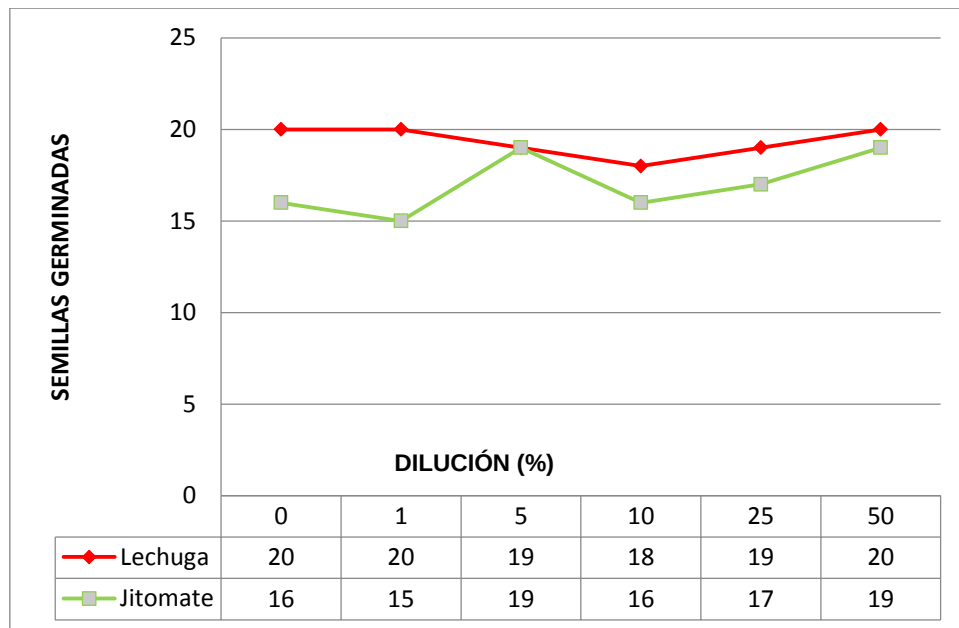


Figura 8. Germinación promedio de semillas de jitomate y lechuga a diferentes diluciones del control de toxicidad (cuadro 1) resultante de la prueba OECD 301-A.

Con el software estadístico Minitab® versión 17, Se evaluó los datos obtenidos de germinación que se muestran en el cuadro 4 (semillas de jitomate) y cuadro 5 (semillas de lechuga). Los resultados del ANOVA se observa en el cuadro 6 y 7 respectivamente.

Cuadro 4. Datos obtenidos de la prueba de germinación de semillas de jitomate a diferentes diluciones del control de toxicidad.

Tratamientos	Repeticiones		
	PLANTAS GERMINADAS REPETICIÓN 1	PLANTAS GERMINADAS REPETICIÓN 2	PLANTAS GERMINADAS REPETICIÓN 3
DILUCIÓN DEL CONTROL DE TOXICIDAD (%)			
0	16	20	20
1	15	20	20
5	19	20	19
10	16	17	19
25	17	19	18
50	19	19	20

Cuadro 5. Datos obtenidos de la prueba de germinación de semillas de lechuga a diferentes diluciones del control de toxicidad.

Tratamientos	Repeticiones		
	PLANTAS GERMINADAS REPETICIÓN 1	PLANTAS GERMINADAS REPETICIÓN 2	PLANTAS GERMINADAS REPETICIÓN 3
DILUCIÓN DEL CONTROL DE TOXICIDAD (%)			
0	20	19	20
1	20	18	19
5	19	19	18
10	18	18	18
25	19	18	19
50	20	18	20

Cuadro 6. Análisis de varianza germinación de semillas de jitomate.

Fuente	GL	S. C	C M	Valor F _{cal.}	Valor p
Tratamiento	5	9.167	1.833	1.21	0.367
Bloque	2	20.33	10.167	6.76	
Error	10	15.00	1.500		
Total	17	44.50			

95 % de confiabilidad ($\alpha = 0.05$), $F_{\text{tab}} = 3.326$

En base a los resultados del análisis de varianza anteriores se observa que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos dado que el valor de F calculada es menor que el valor de F tabulada ((Fig. 9), ($F_{\text{calc.}} 1.21 < F_{\text{tab.}} 3.326$))

Cuadro 7. Análisis de varianza germinación de semillas de lechuga

Fuente	GL	S. C	C M	Valor F _{cal.}	Valor p
Tratamiento	5	5.111	1.02	2.88	0.73
Bloque	2	3.11	1.55	4.37	
Error	10	3.556	0.35		
Total	17	11.778			

95 % de confiabilidad ($\alpha = 0.05$), $F_{\text{tab}} = 3.326$

En base a los resultados del análisis de varianza anteriores se observa que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos dado que el valor de F calculada es menor que el valor de F tabulada ((Fig. 9), ($F_{\text{calc.}} 2.88 < F_{\text{tab.}} 3.326$))

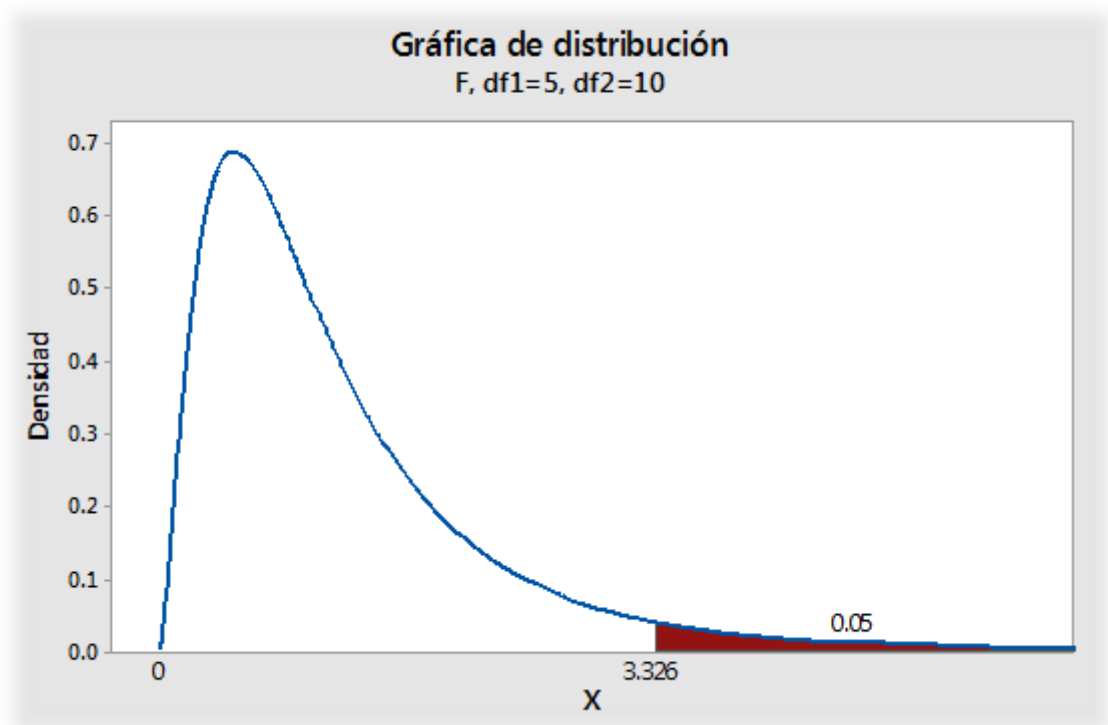


Figura 9. Grafica de distribución, donde se observa el valor de F tabulada igual a 3.326, para germinación de semillas de jitomate

6. CONCLUSIONES

- 1.-La prueba de ecotoxicidad o toxicidad demostró que el líquido resultante del control de toxicidad en la prueba OCDE 301-A. en las diferentes diluciones utilizadas no presento actividad fitotóxica, ya que se encontró un porcentaje de germinación para cada especie de semillas superior al 50%. De esta forma cumple el requisito en el parámetro de germinación considerado en el protocolo OECD 208.
2. El análisis de varianza mostró que no existe diferencia significativa, entre tratamientos (Diluciones del control de toxicidad OCDE 301-A) para las dos variedades de semillas (jitomate y lechuga)

7. LITERATURA CITADA

- Adam, G., Duncan, H. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*. 120, 363-370.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. *Terrestrial Plants, Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals*. No. 208. Paris, Francia.
- Uribe, R. 2008. Ensayo de inhibición de la germinación y del alargamiento radicular en Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con semillas 105 semillas de cebolla *Allium cepa* y soya *Glycine max*. 2008. En: Ramírez-Romero, P., Mendoza-Cantú, A. (compiladoras). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.
- Wang, W., Freemark, K. 1995. Use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 30, 289-301.

A N E X O S

ANEXO 1

MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL 0,5 STANDARD DE MCFARLAND

Reactivos

1% Cloruro de Bario (BaCl_2) anhidrido

1% Ácido sulfúrico (H_2SO_4) puro y frío

Método de Preparación

1. Añadir 0,5 mL de BaCl_2 al 1% a 99,5 mL de H_2SO_4 al 1%.
2. Mezclar completamente antes de proceder al siguiente paso.
3. Distribuya 5 mL de la solución de McFarland en tubos de diámetros similares.

Se sugiere usar los mismos tubos que se utilizan rutinariamente para ajustar la densidad de las suspensiones antes de la inoculación.

4. Cuando estos estándares están en suspensión completa, la turbidez equivale a un cultivo que contiene $1,5 \times 10^8$ células.
5. Los tubos que contienen la solución de 0.5 McFarland se deben guardar en un lugar oscuro, a temperatura ambiente.

ANEXO 2

OECD 301-A “Prueba de biodegradabilidad aerobia, disminución de carbono orgánico disuelto (COD)” 1992

Introducción

El contenido de carbono orgánico disuelto (COD) y la pureza o cantidades relativas de los principales componentes de la muestra deben preferentemente ser conocidos. La prueba radica en el uso de densidades microbianas altas.

Fundamento de la prueba

Un volumen determinado de medio mineral pre-inoculado, conteniendo una concentración conocida de la sustancia de prueba (entre 10 y 60 mg COD L⁻¹) como única fuente de carbono orgánico, es mantenido con aireación constante en la oscuridad o con luz difusa a 22 ± 2 °C. El curso de la degradación es monitoreado por medio de análisis de la concentración de COD a intervalos frecuentes de tiempo durante un periodo de 28 días. El grado de biodegradación es calculado a partir de la cantidad de COD removida (corregida por medio de un blanco de inóculo utilizado como control) con respecto al porcentaje de concentración inicialmente presente en el medio. También puede calcularse la biodegradabilidad primaria del compuesto original por medio de análisis químicos suplementarios realizados al principio y al final del periodo de incubación.

Descripción del método

Equipo:

Matraces Erlenmeyer de 250 mL a 2 L, dependiendo del volumen necesario para realizar el análisis de COD. Los matraces deben ser cuidadosamente

limpiados, por ejemplo con solución de ácido clorhídrico-alcohol, enjuagados y secados antes de cada prueba.

Agitador para contener los matraces cónicos, con control automático de temperatura o a temperatura ambiente constante y con suficiente fuerza como para mantener condiciones aerobias en todos los matraces.

Aparato de filtración con membranas.

Analizador de COD

Medidor de oxígeno disuelto, para comprobar que los matraces se encuentran bajo condiciones aerobias.

Centrifuga

Agua

Debe de utilizarse agua desionizada o destilada, libre de concentraciones inhibitorias de sustancias tóxicas (ejemplo Cu^{2+}) No debe de contener más de un 10% de carbono orgánico disuelto, pues introduciría un error a la sustancia de prueba. Se requiere agua con alta pureza para eliminar valores altos del blanco. La contaminación del agua puede ser causada por impurezas propias, por las resinas de intercambio iónico y material contaminado de bacterias y algas.

Para cada corrida de prueba, usar sólo lote de agua a la que previamente se le habrá determinado la concentración de COD presente.

Soluciones patrón de medio mineral

Solución a:

Fosfato monobásico de potasio, KH_2PO_4	8.50 g
Fosfato dibásico de potasio, K_2HPO_4	21.75 g
Fosfato dibásico de sodio dihidratado, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33.40 g
Cloruro de amonio, NH_4Cl	0.50 g

Disolver en agua y aforar a 1L. El pH de la solución deber ser de 7.4

Solución b:

Cloruro de calcio anhidro, CaCl_227.50 g

o

Cloruro de calcio dihidratado, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$36.40 g

Disolver en agua y aforar a 1 L

Solución c:

Sulfato de magnesio heptahidratado, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$22.50 g

Disolver en agua y aforar a 1 L

Solución d:

Cloruro de hierro (III) hexadhidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$0.25 g

Disolver en agua y aforar a 1 L

Preparación del medio mineral

Mezclar 10 mL de solución (a) con 800 mL de agua, añadir 1 mL de solución (b), (c) y (d). Aforar a 1 L con agua.

Soluciones patrón de sustancia de prueba

Cuando la solubilidad de sustancia de prueba excede 1 g L^{-1} , disolver 1-10 g, de sustancia de prueba o de referencia en agua y aforar a 1 L. Otra opción es preparar soluciones patrón en medio mineral o añadir la sustancia directamente al medio mineral, permitiendo su completa disolución antes de continuar con el procedimiento de montaje. (Acetato de sodio o Biftalato de potasio)

Inóculo

El inóculo puede derivarse de una gran variedad de fuentes: lodos activados, efluentes de aguas residuales, aguas superficiales, suelo o una mezcla de éstos.

Inóculo a partir de lodos activados

Colectar una muestra fresca de lodos activados, a partir de un tanque de aireación de planta de tratamiento de aguas residuales o un reactor a escala de laboratorio que trate principalmente aguas residuales domésticas. Si es necesario, remover las partículas gruesas por filtración a través de un tamiz fino y mantener el lodo bajo condiciones aerobias.

Alternativamente, después de retirar las partículas gruesas, centrifugar (por ejemplo 1100 g durante 10 minutos). Descartar el sobrenadante. El lodo debe ser lavado con medio mineral. Re-suspender el lodo concentrado en medio mineral para obtener una concentración final de 3-5 g de sólidos suspendidos L^{-1} . Mantener en aireación hasta su uso.

Una alternativa es homogenizar el lodo activado para obtener una concentración de 3-5 g de sólidos suspendidos L^{-1} . Tratar el lodo en una mezcladora por a velocidad media durante 2 minutos. Dejar sedimentar el lodo mezclado por 30 minutos o más si se requiere, decantar el líquido que será utilizado como inóculo (10 mL L^{-1} de medio mineral).

Pre-acondicionamiento del inóculo

El inóculo puede ser pre-acondicionado, pero no pre-adaptado a la sustancia de prueba. El pre-acondicionamiento consiste en mantener en aireación el lodo activo (en medio mineral) o en el efluente secundario por 5 – 7 días a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$). El pre-acondicionamiento en ocasiones provee de precisión al método de prueba, disminuyendo el valor del blanco.

Preparación de matraces

A modo de ejemplo: tomar 800 mL de medio mineral y colocarlos en matraces de 2 litros, añadir el volumen suficiente de solución patrón de la sustancia de prueba y de referencia, según corresponda, para obtener una concentración equivalente entre 10 y 60 mg COD L⁻¹. Registrar el pH, ajustar el valor a 7.4. Inocular los matraces con el lodo activado u otra fuente de inóculo para obtener una concentración final no mayor de 30 mg SST L⁻¹. Preparar también controles del inóculo en el medio mineral pero sin la sustancia de referencia.

De ser necesario, utilizar un matraz para verificar el posible efecto inhibitorio de la sustancia de prueba por medio de la inoculación de una solución conteniendo concentraciones comparables de la sustancia de prueba y de referencia en el medio mineral.

De igual manera, si se quiere verificar la degradación abiótica de la sustancia de prueba, utilizar un matraz conteniendo una solución estéril sin inóculo. Dicha solución se esteriliza a través de filtración por membrana (0.2 – 0.45 µm) o mediante la adición de una sustancia tóxica con la concentración apropiada. Si se utiliza la filtración a través de membrana, tomar las muestras asépticamente para mantener condiciones de esterilidad.

Adicionalmente, si se sospecha que la sustancia de prueba puede ser adsorbida en vidrio, lodo, etc., de acuerdo a los resultados obtenidos previamente, se debe incluir un matraz que contenga solución de **sustancia de prueba + inóculo + agente esterilizante**.

Aforar todos los volúmenes a 1 L con medio mineral y mezclar perfectamente. Tomar una muestra de cada matraz para determinar la concentración inicial de COD por duplicado. Tapar los matraces con papel aluminio, de manera que se permita el libre intercambio de aire entre el matraz y la atmósfera circundante. Finalmente, colocar los matraces en la incubadora con agitación e iniciar la prueba.

Distribución de los matraces

En una corrida típica, se utilizan los siguientes matraces:

1. Matraz 1 y 2 que contiene la **sustancia de prueba + el inóculo** (Suspensión de prueba, una sola dilución)
2. Matraz 3 y 4 que solamente contiene **inóculo + medio mineral** (blanco del inóculo).
3. Matraz 5 que contiene el **compuesto de referencia + el inóculo** (control del procedimiento); y cuando sea necesario también incluir:
4. Matraz 6 que contiene la **sustancia de prueba + el agente esterilizante** (control de degradación abiótico estéril).
5. Matraz 7 que contiene la **sustancia de prueba + el inóculo + el agente esterilizante** (control de adsorción).
6. Matraz 8 que contiene la **sustancia de prueba + el compuesto de referencia + el inóculo** (control de toxicidad)

Procedimiento

- **Cuantificación de COD**

A lo largo del período de prueba, determinar las concentraciones de COD de las muestras en cada matraz por duplicado a intervalos de tiempo conocidos. Es obligatorio cuantificar la concentración de COD en la suspensión de prueba y el blanco del inóculo al mismo tiempo. Se recomienda monitorear la concentración de COD en los demás matraces.

- **Muestreo**

Tomar una muestra compuesta por el volumen mínimo de la suspensión de prueba necesaria para cada determinación de COD. Antes de realizar el muestreo eliminar cualquier pérdida por evaporación en los matraces, mediante adición de agua en cantidad necesaria para recuperar el volumen anterior. Mezclar perfectamente el medio de cultivo, para que el material adherido a la pared del matraz sea re-disuelto o re-suspendido. Filtrar a través de membrana

o centrifugar la muestra inmediatamente después de ser tomada. Analizar el filtrado o centrifugado el mismo día, de otra manera almacenar a 2-4 °C por un máximo de 48 h o a -18 ° C para periodos más largos.

- **Frecuencia de muestreo**

Asegurar que un número suficiente de muestras sean tomadas para permitir valorar el porcentaje de remoción del periodo de días a ser valorados. El nivel de aceptación para las pruebas de biodegradabilidad rápida aerobia es de 70 % de remoción de COD, este debe ser alcanzado en un periodo de 10 días dentro de los 28 días que dura la prueba. Se deben analizar primero las últimas muestras (28 días), y por selección de muestras apropiada es posible obtener una buena descripción, de la curva de biodegradación con relativamente pocas determinaciones. Por supuesto, si las últimas muestras (28 días) no muestran degradación, el experimento se da por terminado.

- **Datos y reporte**

Los datos obtenidos deberán ser organizados en una hoja de datos. El porcentaje de degradación (D_t) correspondiente a cada tiempo de muestreo, puede ser obtenido a través de las determinaciones por duplicado de COD en cada matraz con sustancia de prueba y registrando el valor promedio para verificar la validez de la prueba.

El cálculo es realizado aplicando la siguiente ecuación:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

Dónde:

D_t = % de degradación al tiempo t

C_0 = concentración inicial promedio de COD en el medio de cultivo (mineral) inoculado con la sustancia de prueba (mg COD L⁻¹)

C_t = concentración promedio de COD en el medio de cultivo (mineral) inoculado con la sustancia de estudio al tiempo t (mg DQO L^{-1})

$C_{bl(0)}$ = concentración inicial promedio de COD en el blanco del medio mineral inoculado (mg COD L^{-1})

$C_{bl(t)}$ = concentración promedio del blanco del medio mineral inoculado al tiempo t (mg COD L^{-1}).

Todas las concentraciones son determinadas experimentalmente. Si la prueba ha cumplido con los criterios de validez, construir una gráfica para seguir el curso de la biodegradación, utilizando los valores promedio de los matraces con la sustancia de prueba. Calcular y reportar el porcentaje de remoción alcanzado en las muestras, al final de la prueba.

- **Validez de la prueba**

La prueba se considera como válida si la diferencia de los valores por duplicado de remoción de COD de la sustancia química en análisis, al final de la prueba es mayor de 70 %.

Anexo 3

PRUEBAS DE LABORATORIO A CULTIVOS BACTERIANOS PREPARADOS PARA UN EXTRACTO DE AJO (DESINFECTANTE) HIDROSOLUBLE

Una muestra del extracto de ajo fue preservada en un recipiente plástico blanco no estéril con tapón de rosca, de 250 mL, presentó al momento del vaciado un aspecto de líquido, translucido, con aroma ligero a alcohol, solubilidad en agua, con formación de espuma y un pH de 7.5 unidades (Figura 1).



Fig. 1. Muestra del extracto de ajo

Para la evaluación de la eficiencia se incluye el informe relativo a las “Pruebas de laboratorio a cultivos bacterianos preparados para el extracto de ajo hidrosoluble”. En este sentido se describe de manera detallada la evaluación del efecto del producto desinfectante sobre cepas de *Pseudomonas* sp. y del ciliado *Paramecium* sp.

A nivel nacional no existe un procedimiento oficialmente reconocido Sin embargo, en el ámbito internacional se encuentran normas europeas para el control y regulación del uso de desinfectantes donde se establece la actividad bactericida, fungicida, esporicida entre otros.

Se realizó un estudio preliminar de actividad microbicida del producto hidrosoluble extracto de ajo estandarizado, formulado en colaboración con la empresa BYOSS S.A. DE C.V. Donde se utilizó la metodología de actividad bactericida y pruebas de contacto, de tal forma que permitió definir la actividad de la muestra sobre los microorganismos.

Para tal efecto se seleccionaron los siguientes cultivos: 5 especies del género *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *P. sutzerii* y *P. putida*), y el ciliado *Paramecium* sp. Los cultivos bacterianos se sembraron en un medio de cultivo con producto hidrosoluble extracto de ajo estandarizado a dos diferentes concentraciones y se incubaron por 24 horas a 37 °C.

Para contar con resultados experimentales que permitan visualizar y evidenciar la actividad desinfectante del extracto de ajo estandarizado por síntesis orgánica, desarrollado con apoyo de la empresa BYOSS S.A. de C.V., Se procedió a realizar un estudio preliminar de actividad microbicida en una muestra del producto sobre dos tipos de microorganismos (bacterias y protozoos).

Cuadro 1. Relación de cepa bacteriana a diferentes porcentajes del producto hidrosoluble extracto de ajo estandarizado.

Microorganismo	Extracto al 1%	Extracto al 0.3%	Extracto al 0.1%
<i>P. aeruginosa</i>	No desarrolla	No desarrolla	No desarrolla
<i>P. fluorescens</i>	No desarrolla	No desarrolla	No desarrolla
<i>P. alcaligenes</i>	No desarrolla	No desarrolla	No desarrolla
<i>P. sutzerii</i>	No desarrolla	No desarrolla	No desarrolla
<i>P. putida</i>	No desarrolla	No desarrolla	No desarrolla

Con estos resultados, parece evidente ver la eliminación de las bacterias fue similar en todas las diluciones ya que el extracto de ajo no permitió el desarrollo de las cepas de *Pseudomonas*.

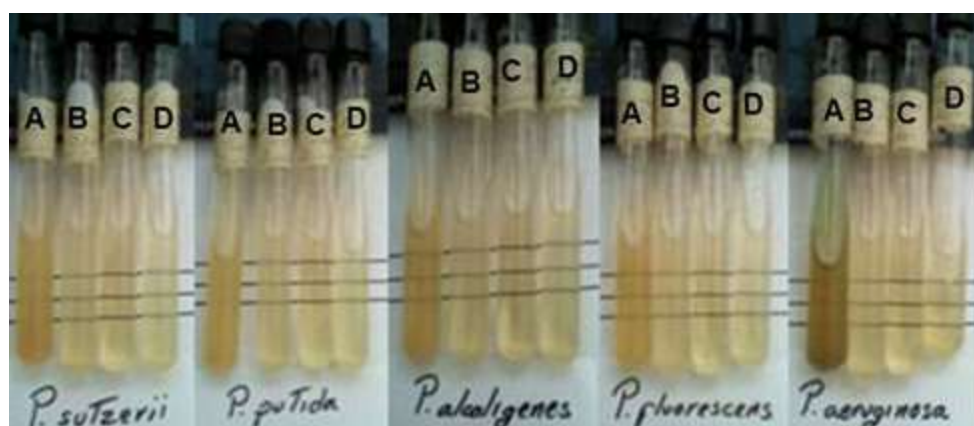


Fig. 1. Tubos con las prueba de desarrollo de las cinco cepas de *Pseudomonas* sp., en medio caldo cerebro corazón, A) Control de desarrollo del microorganismo, B) Control de medio con producto hidrosoluble a una concentración de 1%, C) Cepa más producto hidrosoluble al 0.3%, D) Cepa más producto hidrosoluble al 0.1%.

Es común que la bacteria *Pseudomonas* sp sea la causa principal de las infecciones que se presentan en ambientes hospitalarios, además de afectar a niños y ancianos. Causa infecciones en distintos sitios anatómicos: órganos y sistemas. Puede causar infecciones de vías aéreas superiores, como por ejemplo otitis; infecciones de las válvulas cardiacas (endocarditis bacteriana),

infecciones de vías urinarias, de herida quirúrgica en pacientes postoperados, de pulmonares (neumonía) en pacientes que utilizan ventilación mecánica.

El género *Pseudomonas* sp., es la primer causa de infecciones nosocomiales o intrahospitalarias en forma general, es el contagio hospitalario o la adquisición o propagación de una enfermedad, que contrae por lo menos el 5% de los pacientes que han ingresado a un hospital.

Esto es debido a una insuficiente esterilización de los materiales quirúrgicos o por falta de una buena antisepsia e higiene de las áreas de estancia de los pacientes, así como del personal hospitalario, que entra en contacto de manera involuntaria, microorganismos patógenos con personas, dentro de una instalación hospitalaria, o centro de salud. Muchos son los microorganismos como la *Pseudomonas aeruginosa* que pueden desarrollarse en ambientes con agua, de ahí que este microorganismo es el más frecuente en los casos de contagio intrahospitalario. En los hospitales el uso de desinfectantes que puedan eliminar a estos microorganismos es muy recurrido, por lo que en este estudio se realizaron pruebas de desarrollo bacteriano con diferentes especies de *Pseudomonas*, en medios de cultivo más el producto hidrosoluble en donde fue evidente que el producto desinfectante inhibió el crecimiento de los microorganismos a una concentración hasta del 0.1% del producto.

ANEXO 4

PRUEBAS DE CONTACTO CON EL PROTOZOO DEL GÉNERO *Paramecium* sp.

La muestra del producto fue preservada en un recipiente plástico blanco no estéril con tapón de rosca, de 250 mL., aproximadamente, presentaba al momento del vaciado un aspecto de líquido transparente, con aroma ligero a alcohol, soluble en agua, con formación de espuma y un pH de 7.5 unidades (Figura 1).



Fig. 1. Muestra con producto

Objetivo: Observar el mecanismo de acción del producto hidrosoluble.

Las pruebas de contacto se realizaron con el protozoo del género *Paramecium*, exponiéndolo a diferentes concentraciones del producto hidrosoluble para

determinar el tiempo de supervivencia del microorganismo y mecanismo de acción del producto hidrosoluble sobre el protozoo.

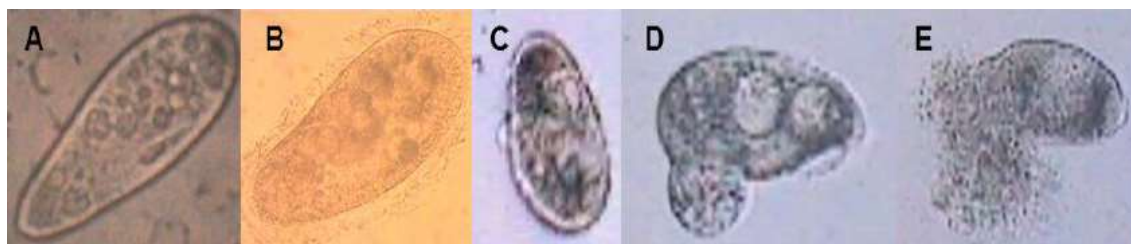


Fig. 3. Secuencia de la muerte del protozoo *Paramecium aurelia* con la concentración del producto desinfectante al 0.19%. A) protozoo antes del desinfectante, B, C, D y E secuencia del daño provocado a la célula por el producto hidrosoluble, en B) se observa daño en la membrana celular y desprendimiento de cilios, C) comienza el rompimiento de la membrana celular, D) membrana rota y líquido fuera de la célula, E) célula totalmente rota. Observaciones en el microscopio de campo claro con el objetivo de 10X.

Con el cultivo de *Paramecium aurelia* se comparó el efecto del producto hidrosoluble extracto de ajo estandarizado donde fue evidente que la actividad microbicida a la concentración recomendada de 1:300, el ciliado murió instantáneamente. Mientras que con la dilución 1:1000 tuvo un tiempo de supervivencia de 5 segundos, aunque con la dilución de 1: 10,000 el protozoo tiene una supervivencia de 5 minutos (cuadro 1).

Cuadro 1. Relación de características del producto evaluado. (Extracto de ajo)

Extracto de ajo estandarizado	Concentración	Apariencia	Tiempo en morir el ciliado
	1:300	Transparente, líquido, forma ligera espuma	Instantánea
	1:500		3 seg. De contacto
	1:1000		5 seg. De contacto
	1:5000		30 seg. De contacto
	1:10,000		Pierde movilidad en 1 min. Y muere a los 5 min. De contacto

NOTA: Lo importante de esta secuencia de fotos es mostrar las fases de muerte, las cuales acontecen en pocos segundos, lo valioso es captar la imagen en el momento preciso.

Estas pruebas constituyen un indicio de la capacidad del producto para afectar a otro tipo de microorganismos de tipo patógeno como las Amebas, Giardias y Cryptosporidium, causantes de enfermedades gastrointestinales

Existen sustancias químicas que influyen negativamente sobre los microorganismos, éstas pueden ejercer dos tipos de efectos diferentes: microbiostáticos y microbicidas.

Las sustancias químicas microbiostáticas impiden el desarrollo de los microorganismos sin dañar estructuras celulares externas o internas, mientras que las sustancias microbicidas destruyen los microorganismos debido a su efecto tóxico sobre la célula. Ahora bien, para una misma sustancia química, la línea que marca entre un efecto microbiostático y microbicida va a depender muchas ocasiones de la concentración de dicha sustancia y del tiempo durante el que actúa.

De ahí, que la única manera de saber que un microorganismo está "muerto", es la observación de la pérdida irreversible de la capacidad de división celular, es decir, de la pérdida de viabilidad, y se suele comprobar para bacterias

empleando técnicas de desarrollo en placas de Petri con los medios adecuados para su crecimiento, mientras que, para protozoarios es la observación en microscopia estereoscópica de la división celular o en su caso del rompimiento de la membrana y por consiguiente de la destrucción del microorganismo. En este proyecto de investigación se usó el protozooario *Paramecium aurelia* al que se realizó un seguimiento de viabilidad en presencia de un producto hidrosoluble a diferentes diluciones.

P. aurelia es un ciliado de vida libre que habita en ambientes acuáticos con presencia de materia orgánica disuelta y de bacterias, además este microorganismo es muy sensible a la presencia de compuestos tóxicos en su medio. En estas pruebas se pudo observar que el producto hidrosoluble a la concentración sugerida en el proyecto de etiqueta por la empresa BYOSS S.A. DE C.V. para registro, ya que mató al ciliado en diluciones posteriores a esa en poco tiempo mataba a los ejemplares de *P. aurelia*, además de afectar su desarrollo aún a diluciones de hasta 1:10000, donde se observó que el protozooario podía sobrevivir hasta poco más de un minuto donde pierde movilidad.