

# Efecto de formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo *in vitro* de *Clavibacter michiganensis*

## Effect of oleic acid and chitosan formulations on *in vitro* development of *Clavibacter michiganensis*

Susana Alexa Castañón-Viveros, Cindy Salas-Marcial, Margarita de Lorena Ramos-García\* Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Nutrición. Calle Iztaccihuatl S/N, Colonia Los Volcanes, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62350. México; Jesús Hernández-Romano Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Boulevard Cuauhnahuac 556, Lomas del Texcal, Jiutepec, Morelos 62550, México; Dagoberto Guillén-Sánchez. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc. Avenida Nicolas Bravo s/n, Parque Industrial Cuautla, Ayala, Morelos, C.P. 62742. México. \* Autor para correspondencia: margarita.ramosg@uaem.edu.mx

Recibido: 27 de Marzo, 2019.

Aceptado: 10 de Mayo, 2019.

Castañón-Viveros SA, Salas-Marcial C, Ramos-García ML, Hernández-Romano J, Guillen Sánchez D. 2019. Efecto de formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo *in vitro* de *Clavibacter michiganensis*. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1): 37-42.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1903-6

**Resumen.** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causa pérdidas económicas significativas en el cultivo de Solanáceas, debido a que al infectarse, el cultivo debe ser desechado. El objetivo de este estudio fue evaluar formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo *in vitro* de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. La bacteria se aisló en medio NYB. Se elaboraron formulaciones acuosas de ácido oleico (1, 2 y 3%) y quitosano al 1%. Las técnicas utilizadas para evaluar el efecto bactericida de las formulaciones, fueron de pozos, antibiograma disco-placa y envenenamiento del medio, en este último caso, previo y posterior a la

incubación de la bacteria. Se evaluó el crecimiento (cm) y peso (g). La temperatura de incubación fue de 28 °C durante 8 días. Los resultados mostraron que en la técnica de envenenamiento del medio, previo a la siembra del microorganismo, la solución de ácido oleico al 3% y quitosano 1%, controló el crecimiento de *C. michiganensis* (0.02g) al compararlo con el control (0.35 g). El ácido oleico y quitosano al aplicarlo de manera preventiva, disminuyeron el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro*.

**Palabras clave:** Fitopatógeno, cáncer bacteriano, NYB, antimicrobiano

**Abstract.** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causes significant economic losses in the cultivation of Solanaceae, because when infected, the crop must be discarded. The objective of this study was to evaluate formulations of oleic acid

and chitosan on the *in vitro* development of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. The bacterium was isolated in NBY medium. Aqueous formulations of oleic acid (1, 2 and 3%) and 1% chitosan were prepared. The techniques used to evaluate the bactericidal effect of the formulations were wells, disk-plate antibiogram and medium poisoning, in the latter case, previous and after incubation of the bacteria. Growth (cm) and weight (g) were evaluated. The incubation temperature was 28 °C for 8 days. The results showed that in the technique of poisoning the medium, prior to seeding the microorganism, the solution of chitosan and 3% oleic acid controlled the development of *C. michiganensis* (0.02g) when compared to the control (0.35 g). Oleic acid and chitosan when applied in a preventive manner, decreased the development of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro*.

**Key words:** Phytopathogen, bacterial canker, NYB, antimicrobial

Los problemas fitosanitarios limitan la producción de diversos cultivos, debido a que causan disminución en el rendimiento de las hortalizas y ocasionan pérdidas económicas importantes. El cáncer bacteriano es causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, la cual causa la muerte prematura de la planta infectada; se ha reportado que este fitopatógeno causa pérdidas hasta del 100% del total de la producción, afectando principalmente al tomate. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es una bacteria Gram positiva cuya característica hace que sea difícil de controlar; es más frecuente en lugares húmedos y puede diseminarse por semilla o tubérculos, ocasionando la pudrición de tallos y hojas de los cultivos. Además inhibe el crecimiento de la planta y con el paso del tiempo provoca que se marchite a consecuencia

del bloqueo de los vasos del xilema. Bajo condiciones adecuadas, la planta infectada puede seguir creciendo hasta producir frutos, los cuales contienen al agente causal de la enfermedad. Los frutos contaminados muestran como signo una mancha de color blanco y en el centro un punto de tono café, razón por la que denomina “ojo de pájaro” (Pizano *et al.*, 2016; Borboa *et al.*, 2009; Rueda, *et al.*, 2009).

Se han utilizado varios métodos para controlar el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Los productos a base de cobre (oxicloruro de cobre, óxido de cobre) han ayudado a reducir la velocidad de diseminación de la enfermedad, sin embargo se ha limitado su uso por el impacto en el ambiente. Los antibióticos han sido efectivos, pero sus elevados costos y baja disponibilidad limitan su utilización. Por tal motivo es necesario explorar nuevas alternativas que no provoquen daños ambientales y sean efectivos para controlar la enfermedad. Se ha observado que algunos lípidos obtenidos de materiales vegetales poseen características antibacterianas, antifúngicas y antivirales. El ácido oleico, por su consistencia aceitosa, puede llegar a afectar el medio de desarrollo de bacterias Gram positivas, haciéndolo hidrofóbico y con esto modificando la humedad externa de la planta o fruto, lo que provoca que las bacterias tengan dificultad para desarrollarse (Borboa-Flores *et al.*, 2010). El quitosano es un producto natural que se obtiene de la desacetilación de la quitina, forma parte del exoesqueleto de los artrópodos, insectos y algunos hongos. Diversas investigaciones han evidenciado su efectividad en el control de bacterias Gram positivas (Kim *et al.*, 2011; Hernández-Ochoa *et al.*, 2011). Además, se ha evidenciado que el quitosano muestra mayor actividad contra microorganismos cuando se aplica de manera preventiva (Oviedo *et al.*, 2011). Se ha reportado que la combinación de quitosano y ácido oleico reducen hasta el 80%

incidencia de microorganismos en productos vegetales (Ramos-García *et al.*, 2010). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo *in vitro* de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Se formuló una solución que contenía 50 mL de ácido acético glacial al 1%, 0.15 mL de glicerol, ácido oleico al 1% y 0.5 g de quitosano de bajo peso molecular. La solución se colocó en una parrilla de agitación (Hotplane Stirrer, LabTech, Corea) a 70 °C durante 10 min, y se homogenizó (13,500 rpm). Se repitió el mismo procedimiento para las concentraciones de ácido oleico al 2% y 3%. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se incubó en cajas de Petri con medio NBY (caldo nutritivo 0.8%, extracto de levadura 0.2% fosfato ácido de potasio 0.2%, fosfato diácido de potasio 0.5%, agar 1.5%) y posteriormente se mantuvieron a 28 °C por 72 h antes de ser sometidas a experimentación. Se utilizó la técnica de pozos, la cual consistió en hacer cuatro perforaciones en la caja Petri en donde se colocaron las tres diferentes soluciones (1%, 2% y 3% de ácido oleico y quitosano 1%) y el control (ácido acético al 1%). La técnica de antibiograma disco-placa, consistió en colocar cuatro discos de papel filtro de celulosa con un diámetro de 0.7 cm a los cuales se les agregó 1 mL de las formulaciones antes mencionadas (Picazo y Prieto, 2016; Guerrero *et al.*, 2017). La técnica de envenenamiento del medio se realizó antes y después de la siembra de la bacteria en la caja Petri. En la aplicación preventiva se colocaron 20 µL de las formulaciones (ácido oleico al 1%, 2% o 3% y quitosano 1%), sobre la caja con medio NBY. Una vez colocada la formulación, se sembró la bacteria por medio de un estriado. Con respecto a la aplicación posterior del inóculo, se agregaron 20 µL de las formulaciones sobre la bacteria previamente inoculada. El control en las dos últimas metodologías fue únicamente la cepa en el medio de cultivo

NBY (Zárate *et al.*, 2018; Guerrero *et al.*, 2017). Las cajas Petri se incubaron (Thermo Scientific Heratherm, Alemania) a 28 °C durante 8 días. En las técnicas de pozos y antibiograma, se evaluó el crecimiento bacteriano (cm) y para las técnicas de envenenamiento del medio, se evaluó el peso seco (g). Esto se realizó pesando en una balanza analítica de precisión (Jinghai, Shanghai) la masa bacteriana sustraída de los medios de cultivo después del periodo de incubación de la bacteria evaluada en las diferentes formulaciones. Se utilizaron nueve repeticiones por tratamiento y se realizó un análisis de varianza con un método de comparación de medias de Fisher. Se utilizó el programa Infostat 2010.

No se observó control de la bacteria en los tratamientos evaluados mediante la técnica de pozos y antibiograma (Figura 1).

En el método envenenamiento del medio previo a la siembra del inóculo, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y el control. Las formulaciones de ácido oleico en las tres concentraciones y quitosano fueron estadísticamente diferentes al control. A pesar que la solución de ácido oleico 3% y quitosano 1%, mostró un mayor efecto de inhibición, estadísticamente fue similar al resto de las formulaciones. El crecimiento de la bacteria fue inverso al aumento en la concentración del ácido oleico. Se observó que el crecimiento de la bacteria disminuyó conforme aumentó la concentración de ácido oleico (Cuadro 1, Figura 2).

En la técnica de envenenamiento del medio posterior a la siembra del inóculo, no se observaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos evaluados; sin embargo, se mostraron los valores de peso más bajos al utilizar la formulación de ácido oleico 3% y quitosano (Cuadro 1, Figura 3).

En la condición posterior a la siembra del inóculo, las técnicas utilizadas para determinar la inhibición

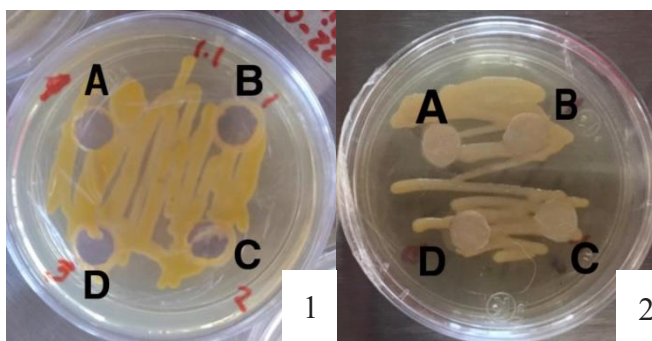


Figura 1. Efecto antimicrobiano de formulaciones de ácido oleico en diferentes concentraciones y quitosano sobre el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* incubado a 28 °C, mediante la técnica de pozos (1) y antibiograma (2): A) ácido acético; B) ácido oleico 1% y quitosano; C) ácido oleico 2% y quitosano; D) ácido oleico 3% y quitosano.

Cuadro 1. Efecto antimicrobiano de formulaciones de quitosano y ácido oleico en diferentes concentraciones sobre el crecimiento *in vitro* de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* incubada a 28 °C, durante 8 días, mediante la técnica de aplicación directa, previa y posterior a la siembra del inóculo.

Formulaciones	Aplicación de la formulación	
	Previa	Posterior
	Peso (g)	
Ac. oleico al 1% y quitosano	0.12y ± 0.04z a*	0.10 <sup>y</sup> ±0.09 <sup>z</sup> a*
Ac. oleico al 2% y quitosano	0.04 ± 0.02 a	0.12 ±0.14 a
Ac. oleico al 3% y quitosano	0.02 ± 0.01 a	0.08 ±0.02 a
Testigo	0.35 ± 0.1 b	0.13 ±0.11 a

<sup>y</sup>Medias / <sup>z</sup>Desviación estándar / \*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (LSD Fisher,  $p < 0.05$ ).

del crecimiento bacteriano con los tratamientos evaluados no ejercieron inhibición. La explicación podría centrarse en que una vez establecido *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* produce exopolisacáridos los cuales favorecen la adhesión a superficies abióticas y biológicas. Además, este tipo de moléculas protegen a la bacteria contra componentes de defensa de la plantas y ayudan a la desintoxicación de fitoalexinas o compuestos tóxicos (Gartemann *et al.*, 2003; Rueda *et al.*, 2010).

En la técnica de envenenamiento del medio previo a la siembra del inóculo, el ácido oleico en sus

tres concentraciones con el quitosano 1%, mostró un efecto inhibitorio en el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Además, se observó que a medida que aumentó la concentración de ácido oleico, disminuyó el desarrollo de la bacteria, esto concuerda con lo reportado por Barboa *et al.* (2010), quienes demostraron que los lípidos, por su consistencia aceitosa, pueden afectar el desarrollo de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, haciéndolo hidrofóbico, y con esto modificando la humedad externa del área donde se desarrolla la bacteria, por lo tanto se dificulta su establecimiento. Se ha

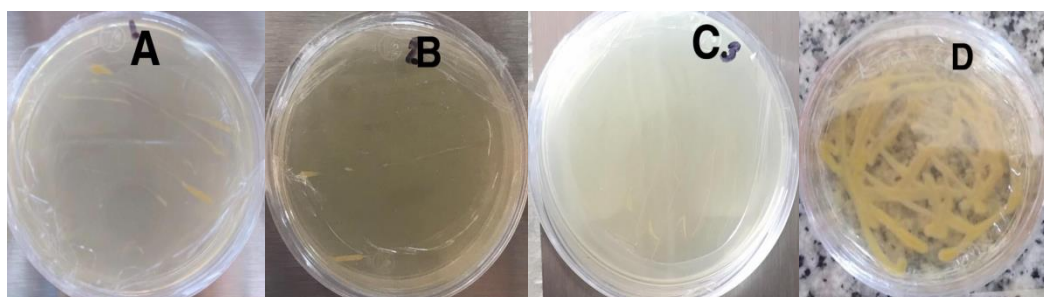


Figura 2. Efecto antimicrobiano de las formulaciones de ácido oleico en diferentes concentraciones y quitosano sobre el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* incubado a 28 °C durante 8 días, mediante la técnica de envenenamiento del medio previo a la siembra del inóculo; A) ácido oleico 1% y quitosano; B) ácido oleico 2% y quitosano; C) ácido oleico 3% y quitosano; D) Testigo.

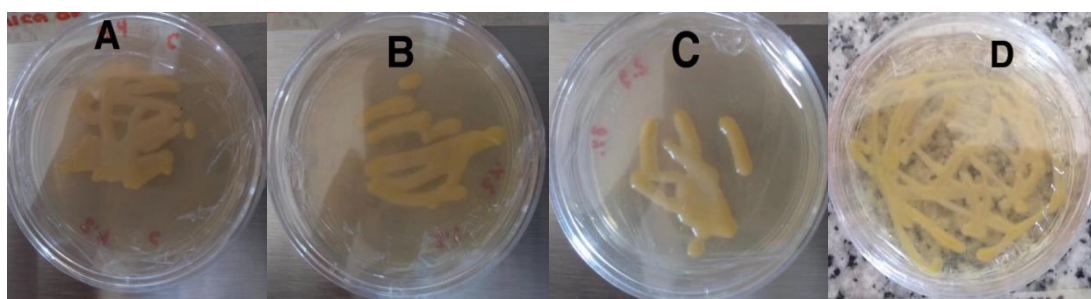


Figura 3. Efecto antimicrobiano de las formulaciones de quitosano y ácido oleico en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* incubado a 28 °C durante 8 días, mediante la técnica de envenenamiento de medio posterior a la siembra del inóculo; A) ácido oleico 1% y quitosano; B) ácido oleico 2% y quitosano; C) ácido oleico 3% y quitosano; D) Testigo.

documentado que los ácidos grasos libres (entre ellos el ácido oleico) presentan efecto bactericida contra bacterias gram positivas. En un estudio realizado por Chao-Tsuan *et al.* (2011) mostraron que concentraciones de ácido oleico por arriba de  $3.125 \mu\text{mL}^{-1}$  evitan el desarrollo de *Staphylococcus aureus* ( $3.5 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$ ); el ácido oleico reduce el desarrollo de la bacteria porque causa daño a la pared celular al separar los compartimentos citoplasmáticos.

En conclusión, se observó en esta investigación que las formulaciones de ácido oleico en las tres concentraciones (1, 2 y 3 %) evaluadas con el quitosano al 1%, disminuyeron el desarrollo de *C.*

*michiganensis* subsp. *michiganensis*, únicamente cuando se aplicó de manera previa a la inoculación de la bacteria.

## LITERATURA CITADA

- Borboa-Flores J, Rueda-Puente O, Acedo-Felix E, Ponce J, M. Cruz-Villegas, García-Hernández J y Ortega-Nieblas M. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis*. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 12: 539–547. <http://www.revista.cbba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/466/427>
- Borboa F, Rueda P, Acedo F, Ponce F, Cruz M, Grimaldo J y García O. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. Revista Fitotecnia Mexicana, 32 (4): 319-

- 326 <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/466/427>
- Chao-Hsuan C, Wang Y, Nakatsuji T, Yu-Tsueng L, Zoiboulis C, Gallo R, Zhang L, Ming-Fa H y Chun-Ming H. 2011. An innate bactericidal oleic acid effective against skin infection of methicillin-resistant staphylococcus aureus: A Therapy Concordant with Evolutionary Medicine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 391-399. <http://nano.ucsd.edu/~17zhang/publications/45-J%20Microbiol%20Biotech.pdf>
- Gartemann KH, Kirchner O, Engemann J, Gräfen I, Eichenlaub R y Burger A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106: 193-191. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.011>
- Guerrero R, Mónaco C, Stocco M, Rolleri J y Guerrero N. 2017. Selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Amazonica Ciencia y Tecnología*, 6: 9-20. <http://revistas.proeditio.com/REVISTAMAZONICA/article/view/1898>
- Hernández-Ochoa L, Gonzalez-Gonzalez A, Gutierrez-Mendez N, Muñoz-Castellanos L, Quintero-Ramos A. 2011. Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especies como agentes antimicrobianos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10: 455-463. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v10n3/v10n3a11.pdf>
- Kim K, Min B, Kim Y, Kimmel R, Cooksey K y Park S. 2011. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 565-569. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810002677>
- Oviedo M, Morales S y Ramírez-Navas J. 2016. Efecto fungicida del quitosano sobre la roya inoculada en café. *UGCiencia*, 22: 45-56. [https://www.researchgate.net/profile/Juan\\_Ramirez-Navas/publication/312054030\\_Efecto\\_fungicida\\_del\\_quitosano\\_sobre\\_la\\_roya\\_inoculada\\_en\\_cafeto\\_Fungicidal\\_effect\\_of\\_chitosan\\_on\\_rust\\_inoculated\\_on\\_coffea/links/5878c44e08ae329d622a8b48/Efecto-fungicida-del-quitosano-sobre-la-roya-inoculada-en-cafeto-Fungicidal-effect-of-chitosan-on-rust-inoculated-on-coffee.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Juan_Ramirez-Navas/publication/312054030_Efecto_fungicida_del_quitosano_sobre_la_roya_inoculada_en_cafeto_Fungicidal_effect_of_chitosan_on_rust_inoculated_on_coffea/links/5878c44e08ae329d622a8b48/Efecto-fungicida-del-quitosano-sobre-la-roya-inoculada-en-cafeto-Fungicidal-effect-of-chitosan-on-rust-inoculated-on-coffee.pdf)
- Picazo J y Prieto P. 2016. Compendio de microbiología. 2ª edición. Elsevier. Barcelona, España 714 p. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=709724>
- Pizano F, Acosta G, Sánchez R, González C, Guevara G, Torres P y Guevara O. 2016. Detección de *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* por PCR en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 7(6): 1347-1357. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i6.182>
- Ramos-García M, Bautista-Baños S, Barrera-Necha L, Bosquez-Molina E, Alia-Tejacal I y Estrada-Carrillo M. 2010. Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 44-57. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v10n3/v10n3a11.pdf>
- Rueda P, Duarte M, Alvarado M, García O, Tarazón H, Holguín P, Amador B, García H, Flores H y Orona C. 2009. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*: una enfermedad bacteriana en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Sonora, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10: 169-175. <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/issue/view/6>
- Rueda P, Duarte M, Alvarado M, Holguín P, Borboa F, Tarazón H, Murillo A, García H y Barrón H. 2010. Agente causal de la necrosis bacteriana en cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Invurnus*, 5(1):34-39 <http://www.invurnus.uson.mx/revistas/articulos/4-art6.pdf>
- Zárate M, González M, Ramírez G, Robledo O y Juárez M. 2018. Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculadas con *Clavibacter michiganensis*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 20: 4367-4379. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.1005>