UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA EL CONTROL DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS HORTOFRUTÍCOLAS

PRESENTA

Q.B.P. DENISSE YATZELY MERCADO MEZA

CHIHUAHUA, CHIH., JUNIO DE 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

Los que suscriben, certifican que han leído y recomiendan a la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas la aceptación de la tesis de Maestría titulada: **"NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA EL CONTROL DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS"**

Realizada por: **DENISSE YATZELY MERCADO MEZA**
Como cumplimiento parcial de los requerimientos para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**

Ratifican que las firmas son verdaderas:

Dr. Damian Aaron Porras Flores
Director
Facultad de Ciencias Agrotecnológicas

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada
Directora de Tesis

M. C. Ramón Saúl Luján Aguirre
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Agrotecnológicas

Dr. Gerardo Pável Espino Solís
Co-Director
Facultad de Ciencias Biomédicas y Medicina, UACH

Dr. Juan Luis Jacobo Cuéllar
Asesor

17-Junio-2021
Fecha

Dr. Rafael Ángel Parra Quezada
Asesor

Cd. Universitaria, s/n Campus 1
Chihuahua, Chih., México C. P. 31310
Tel. y Fax (614) 4391844 y 4391845
www.faciatec.uach.mx

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

The undersigned certify that they have read, and recommend to the Agrotechnological Sciences Department for acceptance, a Master's thesis entitled: **"SILVER NANOPARTICLES AS AN ANTIMICROBIAL AGENT IN PHYTOGENIC BACTERIA"**

Submitted by: **DENISSE YATZELY MERCADO MEZA**
In partial fulfilment of the requirements for the degree of **MASTER OF SCIENCE**

Ratify that signatures are real:

Ph.D. Damian Aaron Porras Flores
Department Chair
Agrotechnological Sciences Department

Ph.D. Graciela Dolores Ávila Quezada
Major-professor

M.C. Ramón Saúl Luján Aguirre
Chairman of Research and Graduate Studies
Agrotechnological Sciences Department

Ph.D. Gerardo Pável Espino Solís
Major-professor

Ph.D. Juan Luis Jacobo Cuéllar
Advisor

17-Junio-2021

Date

Ph.D. Rafael Ángel Parra Quezada
Advisor

Cd. Universitaria, s/n Campus 1
Chihuahua, Chih., México C. P. 31310
Tel. y Fax (614) 4391844 y 4391845
www.faciatec.uach.mx

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

Los que suscriben, miembros del **Cuerpo Académico UACH-CA-17 HORTOFRUTICULTURA, han** fungido como parte integral en la asesoría de **DENISSE YATZELY MERCADO MEZA** durante el desarrollo y conclusión del trabajo de Investigación: **"NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA EL CONTROL DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS"**

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada
Colaboradora

Dr. Juan Luis Jacobo Cuéllar
Colaborador

17- Junio- 2021
Fecha

Dr. Rafael Ángel Parra Quezada
Integrante

Cd. Universitaria
Chihuahua, Chih., México C. P. 31310
Tel. y Fax (614) 4391844 y 4391845
www.faciatec.uach.mx

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

Los que suscriben, miembros del **Cuerpo Académico UACH-CA-133 PATOGENIA Y BIOMEDICINA MOLECULAR"**, han fungido como parte integral en la asesoría de **DENISSE YATZELY MERCADO MEZA** durante el desarrollo y conclusión del trabajo de Investigación: **"NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA EL CONTROL BACTERIAS FITOPATÓGENAS"**

17 - Junio - 2021

Fecha

Dr. Gerardo Pável Espino Solís
Integrante

Cd. Universitaria
Chihuahua, Chih., México C. P. 31310
Tel. y Fax (614) 4391844 y 4391845
www.faciatec.uach.mx

TÍTULO DE LA TESIS:

NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA EL CONTROL DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

BIOTECNOLOGÍA

i AGRADECIMIENTOS

En primera instancia me encuentro agradecida con Dios, quien ha forjado mi camino, y me ha permitido compartir mi vida con personas que con amor, entusiasmo y amabilidad han formado parte de mi formación académica.

Expreso mi agradecimiento a la Directora de tesis, Dra. Graciela Ávila Quezada, por su incondicional apoyo y dedicación bridando en este trabajo, por transmitirme el deseo de seguir aprendiendo y el entusiasmo por la investigación, gracias por su amabilidad y compartirme su tiempo y sus ideas.

Así mismo, gracias al Dr. Gerardo Espino, codirector de tesis, por brindarme con amabilidad herramientas necesarias para el desarrollo de este trabajo. Gracias a todos mis asesores por darme la oportunidad de recurrir a su conocimiento e impulsarme a desempeñar todas las actividades con esfuerzo y dedicación.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas por la oportunidad de ser parte de ella y estudiar el programa de maestría.

Gracias a mi familia, padres y hermanos, que han sido la base de mi formación, han sido el apoyo más grande durante toda mi formación académica y todos mis logros se los debo a ellos.

ii DEDICATORIA

Las aportaciones de todos mis asesores, familia y amigos, han sido fundamentales para el desarrollo de este proyecto. Es por esto que este trabajo está dedicado a todas las personas que formaron parte de ello.

“Haz lo que puedas, pide a Dios lo que no puedas, y él te dará para que puedas”
San Agustín de Hipona

iii ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos……..…..i
Dedicatoria……..ii
Índice General…….....iii
Índice de Cuadros……...iv

Índice de Figuras……...v
Resumen……vi

I INTRODUCCIÓN 10
II REVISIÓN de literatura 11
2.1 *Erwinia amylovora* Morfología y Metabolismo 11
2.2 Identificación Bacteriana 12
2.3 Tizon de Fuego por *Erwinia amylovora* en Manzano 14
2.4 Control de Tizón de Fuego por *Erwinia amylovora* 14
2.5 Nanoparticulas de Plata 15
2.6 Biopelícula Bacteriana 17
2.7 Viabilidad celular por Tinción Azúl Tripano 18
III MATERIALES Y MÉTODOS 20
3.1 Identificación Morfológica de *Erwinia amylovora*..... 20
3.2 Identificación Genético-Molecular *Erwinia amylovora* 20
3.3 Pruebas de Patogenicidad de *E. amylovora* 21
3.3.1 Pruebas de patogenicidad en fruto 21
3.3.2 Pruebas de patogenicidad en ramas de manzano..... 21
3.3.3 Pruebas de patogenicidad en árbol de manzano..... 22
3.4 Determinación de la Cinética de Crecimiento 23
3.4.1 Preparación del preinóculo 23
3.4.2. Preparación del inóculo 24
3.5 Condiciones de los Enfrentamientos in vitro en Medio líquido y Tratamientos Aplicados a *Erwinia amylovora* 25
3.5.1. Condiciones de *Erwinia amylovora*..... 25
3.5.2. Orden de tratamientos 26
3.5.3 Condiciones de los enfrentamientos en medio líquido..... 26
3.5.4. Determinación de la cinética de tratamientos aplicados a *Erwinia amylovora* 28

3.5.5 Cuantificación de la viabilidad celular bacteriana 29
3.6 Medición de la Biopelícula Bacteriana 30
3.7 Enfrentamientos de *E. amylovora* por Difusión de Disco en Placa 32
3.7.1. Características de Discos de papel filtro estériles..... 32
3.7.2. Condiciones de *E. amylovora* para el Enfrentamiento en Difusión de Disco en Placa..... 32
3.7.3. Aplicación de difusión de disco en placa 33
3.8. Enfrentamientos de *E. amylovora* por Difusión de Pozo en Placa 35
3.8.1. Condiciones de *E. amylovora* para el Enfrentamiento en Difusión de Pozo en Placa..... 35
3.8.2. Aplicación de Tratamientos en Pozo..... 35
IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN 37
4. Influencia de medio de cultivo en la morfológica de la cepa 37
4.1. Producción de pigmentos en medio de cultivo..... 38
4.2 Patogenicidad de la cepa..... 39
4.2.1 Patogenicidad de la cepa en Manzana 39
4.2.2 Patogenicidad de la cepa en Varas de Manzan..... 40
4.2.3. Patogenicidad de la cepa en manzano 40
4.4. Influencia del tiempo en la Cinética bacteriana..... 41
4.4.1 Influencia de los tratamientos en la cinética bacteriana..... 42
4.5 Efecto de los tratamientos en la viabilidad celular..... 43
4.6 Inhibición de la Formación de la Biopelícula Bacteriana por Nanopartículas de Plata..... 44
4.7. Efecto de los tratamientos en el Crecimiento de *E. amylovora* en Placa por Difusión de Disco..... 45
4.7. Efecto de los tratamientos en el Crecimiento de *E. amylovora* en Placa por Difusión de Pozo..... 46
IV. CONCLUSIÓN..... 46
V. LITERATURA CITADA 47

iv. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro número | **Titulo** | **Página**

Cuadro 1. Tratamientos aplicados a *E. amylovora* en suspensión líquida. 27
Cuadro 2. Tratamientos aplicados a *E*. *amylovora* en caja 100 y 200 ppm..... 33
Cuadro 3. Tratamientos aplicados a *E. amylovora* en cada pozo. 37

v. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura número **Titulo** **Página**

Figura 1. Inoculación de manzana. 21
Figura 2. Inoculación de varas de manzano..... 22
Figura 3. Inoculación de árbol de manzano de 1 año de edad. 23
Figura 4. Agua peptonada estéril. 24
Figura 5. Preinóculos de *E. amylovora.* 24
Figura 6. Inóculos de *E. amylovora.* 25
Figura 7. Tratamientos en suspensión liquida. 28
Figura 8. AgNps en espectrofotómetro. 29
Figura 9. Tinción azul tripano. 30
Figura 10. AgNp's teñidas con azul tripano. 30
Figura 11. Tratamientos de AgNp's en condiciones de oscuridad. 31
Figura 12. Tinción cristal violeta en AgNp's 31
Figura 13. Discos de papel filtro impregnados con los tratamientos. 32
Figura 14. Sensidiscos en placa. 33
Figura 15. Tratamientos por difusión de pozo en placa. 35
Figura 16. Difusión por pozo en placa. 36
Figura 17. AgNp's en pozo. 36
Figura 18. *Erwinia amylovora* en Agar Nutritivo. 38
Figura 19. *Erwinia amylovora* en medio CCT. 38
Figura 20. Tinción de Gram en *Erwinia amylovora*..... 39
Figura 21. Síntomas en manzana. 39
Figura 22. Necrosis en varas de manzana. 40
Figura 23. Tizón de fuego en manzano. 41
Figura 24. Cinética de crecimiento de *Erwinia amylovora.* 41
Figura 25. Área bajo la curva. 42
Figura 26. Porcentaje de viabilidad celular en cada tratamiento. 43
Figura 27. Formación de la biopelícula bacteriana por *E. amylovora* en contraste con AgNps dónde esté inhibió la formación de biopeliculas 44
Figura 28. Halo de inhibición en difusión por sensidiscos. 45
Figura 29. Halo de inhibición por difusión en pozo. 46

vi RESUMEN

La bacteria *Erwinia amylovora* es el agente causal del tizón de fuego del manzano. Ésta tiene la capacidad de secretar amylovoran, un exopolisacárido, responsable de su patogenicidad que obstruye el sistema vascular del árbol. Por los daños que causa al manzano es una bacteria cuarentenada en muchos países incluyendo México. La bacteria ha creado resistencia por el continuo uso de agroquímicos utilizados para controlarla y así asegurar la producción. La problemática asociada a la resistencia antimicrobiana (AMR) ha generado la búsqueda de nuevos métodos de control de microorganismos patógenos.

Las nanopartículas (NPs) metálicas son una opción para el control de hongos y bacterias fitopatógenas, presentan baja toxicidad para las células que no están en constante división, y tienen un amplio espectro de acción. Comparando éstas con los bactericidas sintéticos, las NPs tienen poca probabilidad de desarrollar resistencia microbiana, porque actúan inhibiendo la división celular del microorganismo, causando daño en la pared celular y estrés oxidativo. La efectividad de las nanopartículas como agentes antimicrobianos depende de diversas cualidades, entre ellas su tamaño. Para ser efectivas, deben medir menos de 100 nanómetros. La forma de acción de las NPs de plata es que ingresan a las células bacterianas, liberan iones de plata y causan el efecto bactericida.

Debido a las bondades que presentan las NPs de plata, en este estudio se utilizaron contra *E. amylovora* con la finalidad de medir se efecto en la viabilidad celular de la bacteria.

En este estudio se evaluó la viabilidad celular de la bacteria causante del tizón de fuego en rosáceas, *E. amylovora* al ser sometida en un ensayo in vitro a tres agentes antimicrobianos, nanopartículas de plata (AgNp's 200 mg/ml), Sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4$ 5 H_2O, COMET® 200 mg/ml) y Sulfato de gentamicina + clorhidrato de oxitetraciclina (Agrygent plus 5000® 200 mg/ml).

La concentración bacteriana experimental fue 5 x 10^7UFC/ml. La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión azul de tripano por espectrofotometría 600 D.O. El experimento consistió en el enfrentamiento en medio líquido (agua peptonada 1.8 %) con los tratamientos mencionados, los cuales se mantuvieron a 100 rpm durante 24 horas a una temperatura de 25°C. La efectividad de AgNp's para inhibir la formación de biopelícula fue evaluada por el método cristal violeta y medida por espectrofotometría a 600 D.O. en los mismos tratamientos.

Los resultados indican que *E. amylovora* crece en agua peptonada dentro de las primeras diez horas de manera exponencial, después de este tiempo, comienza la etapa estacionaria y finalmente su crecimiento máximo se alcanza a las 24 horas a 28 °C.

Las nanopartículas de plata (AgNp's) a 200 ppm presentan un efecto inhibitorio para *Erwinia amylovora* reduciendo la viabilidad celular en un 64.8% en medio líquido a base de agua peptonada.

La mayor Área Bajo la Curva fue producida por el crecimiento bacteriano en medio líquido en 24h. La menor área o menor volumen acumulado de crecimiento bacteriano fue limitado por el tratamiento con nanopartículas de plata.

La formación de biopelícula de *E. amylovora* se inhibió en las muestras tratadas con AgNps en un 96 %. Por lo tanto, las nanopartículas de plata son muy efectivas para inhibir la formación de polisacáridos extracelulares de esta bacteria.
Los ensayos de halo de inhibición y zona de inhibición mostraron que el mejor tratamiento fue el del agroquímico, esto debido a que los agroquímicos contienen tensoactivos y adherentes que les permiten difundirse sobre la superficie en la que son aplicados. Por lo tanto, la forma efectiva de comprarlos con las nanopartículas es aplicar un surfactante a éstas.

Palabras clave: Nanopartículas metálicas, viabilidad celular, biopelicula, bacteria fitopatógena cuarentenada, tizón de fuego del manzano.

vii ABSTRACT

The bacterium *Erwinia amylovora* is the causative agent of apple fire blight. This has the ability to secrete amylovoran, an exopolysaccharide, responsible for its pathogenicity that obstructs the vascular system of the tree. Due to the damage it causes to the apple tree, it is a quarantined bacterium in many countries including Mexico. The bacterium has created resistance by the continuous use of agrochemicals used to control it and thus ensure production. The problem associated to antimicrobial resistance (AMR) has generated the search for new methods to control pathogenic microorganisms.
Metallic nanoparticles (NPs) are an option for the control of phytopathogenic fungi and bacteria, they have low toxicity for cells that are not constantly dividing, and they have a broad spectrum of action. Comparing these with synthetic bactericides, NPs are unlikely to develop microbial resistance, because they act by inhibiting the cell division of the microorganism, causing damage to the cell wall and oxidative stress. The effectiveness of nanoparticles as antimicrobial agents depends on various parameters, including their size. To be effective, they must be less than 100 nanometers in size. The way of action of silver NPs is that they enter the bacterial cells, release silver ions and cause the bactericidal effect.
Due to the benefits of silver NPs, in this study they were used against *E. amylovora* in order to measure the effect on the cell viability of the bacteria.
In this study, the cell viability of the bacterium that causes fire blight in rosaceae, *E. amylovora*, was evaluated by being subjected in an in vitro test to three antimicrobial agents, silver nanoparticles (AgNp's 200 mg / ml), $CuSO_4$ 5 H_2O (COMET ® 200 mg / ml) and Gentamicin + oxytetraciclin (Agrygent plus 5000 ® 200 mg / ml).

The experimental bacterial concentration was (5 x 10^7 CFU / ml). Cell viability was determined by the trypan blue exclusion method by spectrophotometry 600 O.D. The experiment consisted of the confrontation in liquid medium (peptone water 1.8%) with the mentioned treatments, which were maintained at 100 rpm for 24 hours at 25 °C. The effectiveness of AgNp's to inhibit biofilm formation was evaluated by the crystal violet method and measured by spectrophotometry at 600 O.D. in the same treatments.

The results indicate that *E. amylovora* grows exponentially in peptone water within the first ten hours, after this time, the stationary stage begins and finally its maximum growth is reached after 24 hours at 28 °C.

Silver nanoparticles (AgNp's) at 200 ppm show an inhibitory effect for *Erwinia amylovora*, reducing cell viability by 64.8% in a liquid medium based on peptone water.

The largest Area Under the Curve was produced by bacterial growth in liquid medium in 24h. The smallest accumulated area or volume of bacterial growth was limited by the treatment with silver nanoparticles.

Biofilm formation of *E. amylovora* was inhibited in samples treated with AgNp's by 96.06%. Therefore, silver nanoparticles are very effective in inhibiting the formation of extracellular polysaccharides in this bacterium.

The inhibition halo and inhibition zone essays showed that the best treatment was that of the agrochemical, this because the agrochemicals contain surfactants and adherents that allow them to diffuse on the surface where they are applied. Therefore, the effective way to compare them with nanoparticles is to apply a surfactant to nanoparticles.

Keywords: Metallic nanoparticles, cell viability, biofilm, quarantined phytopathogenic bacteria, apple fire blight.

I INTRODUCCIÓN

El manzano (*Malus domestica*) es uno de los principales cultivos de clima templado en México y su producción puede verse afectada por distintos factores bióticos y abióticos. Uno de los principales fitopatógenos de interés reglamentado, es la bacteria Gram-negativa *Erwinia amylovora,* agente causal del tizón de fuego en rosáceas (Santander y Biosca, 2017). Esta bacteria modula la infección y promueve el crecimiento debido a que utiliza un sistema de secreción tipo III, asociado a proteínas, que le confiere la capacidad de secretar amylovoran, un exopolisacárido, responsable de su patogenicidad que obstruye el sistema vascular del árbol (Vrancken *et al*., 2013). Esta enfermedad comienza en la primavera, con la infección de las flores, seguida por la invasión de brotes y frutos en verano y finalizando en el invierno con el desarrollo de cancros (FAO ,2016) es una de las enfermedades más severas de este cultivo, debido a que origina la muerte en yemas florales y en ocasiones del árbol (Romo-Chacón *et al.,* 2011). El catálogo de plaguicidas autorizados por la Sader (2017) permite la utilización de hidróxido cúprico para su control, sin embargo, el manejo del tizón de fuego se complica por las limitaciones en el uso de antibióticos en la agricultura, resistencia y eficacia limitada de agentes biocontroladores (A´cimovi´c *et al*., 2015). Por otro lado, la nanotecnología ofrece una alternativa novedosa en la lucha contra los microorganismos. Las nanopartículas de plata (AgNP) son prometedoras para el control de bacterias (Avila-Quezada y Espino-Solís*, 2019*) debido a la liberacion gradual de iones de plata que induce la inhibicion de adenosin trifostato (ATP), sintesis de ADN, formación de especies reactivas de oxÍgeno y daño a la membrana celular (Betancurt *et al, 2016*), se ha reportado la eficiencia de AgNp como una solucion eficaz y no tóxica para el control de la podredumbre de semillas de pimienta causada por *Proteobacterium caratovorum* (Ayisigi *et al*., 2020), por lo tanto el objetivo del presente trabajo es inhibir a *Erwinia amylovora* “in vitro” con nanopartículas de plata y comparar la efectividad bactericida con clorhidrato de oxitetraciclina, Sulfato de gentamicina y sulfato de cobre pentahidratado.

II REVISION DE LITERATURA

2.1 *Erwinia amylovora* morfología y metabolismo

Erwinia amylovora es una bacteria que se encuentra taxonómicamente dentro del filum: proteobacterias, clase: gammaproteobacterias, orden: enterobacteriales y familia: enterobactericeae (NIMF27, 2018) es el agente causal del tizón de fuego, infección fitopatológica que afecta los arboles de pera (*Pyrus communis)* y manzano (*Malus domestica*) (Biosca, 2017).

La morfología se presenta en forma de bacilo, Gram negativa, con presencia de flagelos perítricos, anaerobia facultativa, su temperatura óptima de crecimiento son 27°C, con capacidad de hidrolizar gelatina, metabolizar sorbitol, de acuerdo al kit enzimático API 20 se presentan como negativas las pruebas de ornitina descarboxilasa, lisina descarboxilasa, citratos, producción de H_2S, ureasa, triptófano desaminasa, producción de indol y oxidación de ramnosa, se presentará positiva la oxidación de sacarosa (FAO, 2016).

Esta bacteria modula la infección y promueve el crecimiento, debido a que utiliza un sistema de secreción tipo III, asociado a la secreción de proteínas, que confiere la capacidad de suprimir la defensa del huésped (Koczan *et al.*, 2009., Malnoy *et al*., 2012) y de secretar amylovoran, un exopolisacárido, responsable de su patogenicidad, principal componente de la biopelícula, su formación también requiere la secreción de levano y celulosa para su formación (Santander y Biosca, 2017) las biopelículas provocan la obstrucción del sistema vascular del árbol (Vrancken *et al.,* 2013), esta bacteria puede salir de xilema y continuar propagándose en todo el hospedero en espacios intercelulares donde nuevamente utilizan el T3SS para infectar nuevas células vegetales (Billing, 2011). Otro mecanismo de patogenicidad de la bacteria es la proteina multidominio DspE, que confiere la inhibición del ácido salicílico, de la inmunidad innata y la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que ocasiona una inhibición de la fotosíntesis, interactuando con la ferrodoxina,

proteína responsable del movimiento de electrones del fotosistema I (Khan *et al.,* 2012).

El tizón de fuego bacteriano, causado por *Erwinia amylovora*, es una de las enfermedades más severas del manzano, debido a que origina la muerte en yemas florales y en ocasiones del manzano (Romo-Chacón *et al.,* 2011). Los síntomas típicos incluyen necrosis de flores y frutos inmaduros, podredumbre, exudación bacteriana, cancros en tejidos leñosos, curvatura en los brotes nuevos, decoloración marrón-rojiza, las hojas enfermas permanecen pegadas a los brotes (Santander, 2016) el agente causal toma por vía de entrada aberturas naturales de las flores (nectarios) o daños mecánicos causados por insectos, las epidemias de tizón de fuego, son más severas en climas cálidos y húmedos, que en regiones frías y húmedas (Le Roux , 2012).

2.2 Identificación Bacteriana

Existen diversos métodos para la identificación bacteriana, desde los métodos convencionales basados en características, como, morfología, requerimientos de crecimiento, temperatura óptima, pruebas bioquímicas, con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa, aminopéptidasas, ureasa e indol, hasta la identificación bacteriana mediante métodos moleculares. Existe una amplia variedad de genes que han sido utilizados como diagnóstico molecular en los estudios taxonómicos en los distintos géneros bacterianos, constituyendo el análisis del ARNr 16s el marcador inicial, es un polirribonucleótido codificado por el gen rrs o ADN ribosomal ARN 16s (ADN 16s) que está incluido en la subunidad 30s del ribosoma bacteriano (Bou *et al*., 2011). La reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) es un proceso enzimático que permite la amplificación de un fragmento de ADN específico, se realiza utilizando ADN de una variedad de tejidos y organismos, para esto es necesario la enzima ADN polimerasa, la muestras son colocadas en una máquina que permite ciclos repetidos en 3 pasos básicos, primeramente se propicia un aumento en la temperatura por encima del punto de fusión de las dos cadenas de ADN complementarias, permitiendo su separación, proceso llamado desnaturalización, luego la temperatura decrece permitiendo que los cebadores

específicos se unan a los segmentos de ADN, proceso denominado hibridación, el tercer paso consiste en elevar la temperatura de nuevo para que la ADN polimerasa sea capaz de adicionar los nucleótidos a la cadena ADN en desarrollo, con cada repetición de estos pasos, el número de moléculas de ADN se duplica (Garibyan y Avashia, 2013). Se han obtenido secuencias de ADNr 16 s del genero *Erwinia* de las especies *amylovora* y *carotova* (McGhee y Sundin, 2012). *E. amylovora* se puede dividir en dos agrupaciones específicas de acuerdo al huesped, cepas que infectan una amplia gama de huespedes dentro de la familia *Rosaceaea* y cepas que infectan a la familia *Rubus ,* el pangenoma contiene 5751 secuencuas codificantes y se encuentra ampliamente conservado en los genes centales (Mann *et al*., 2013). El genoma de *E. amylovora* consiste en un cromosoma circular de 3,805,874 pares de bases y dos plasmidos AMYP1 (28,243 pb) y AMYP2 (71,487 pb) cerca del 85.1 % del genoma total representa las secuencias codificantes, con 3.483 secuencias de codificacion de proteinas (CDS) 7% de las CDS no tienen coincidencia con las bases de datos actuales de NCB, el plasmido AMYP1 fue reportado como pEA29 y el plasmido mas grande AMYP2 ha sidp renombrado como pEA72, el genoma de *E. amylovora* tiene solamente 3.8 Mb de largo, mientras que la mayoría de las enterobacterias presentan genomas mas grandes de 4.5 Mb a 5.5 Mb, presenta un menor numero de genes involucrados en la respiración anaerobia y fermentación en comparación con otras enterobacterias, es probale que por eso presente una capacidad reducida a vivir en ambientes anaerobios (Sebaihia *et al*., 2010). Las pruebas de patogenicidad se realizan para demostrar que los microorganismos aislados son los causantes de los síntomas observados, consiste en inocular en el tejido vegetal sano el microorganismo previmanete aislado (Martin *et al.,* 2017). La Norma Internacional para medidas Fitosanitarias 27 anexo 13 (NIMF 27) indica que las colonias aisladas sospechosas de *E. amylovora* deben inocularse en plantas hospedantes para cumplir con los postulados de Koch y verifiar su patogenicidad, realizando la inoculación en brotes jovenes, tambien se puede inocular frutos inmaduros, el resultado positivo de una prueba se manifiesta porque al cabo de 7 dias se oscuerce el lugar de la inoculación.

2.3 Tizon de fuego por *Erwinia amylovora* en manzano

El tizón de fuego bacteriano, causado por la bacteria Gram negativo *Erwinia amylovora*, es una de las enfermedades más severas del manzano, debido a que origina la muerte en yemas florales y en ocasiones del manzano (*Malus x domestica Borkh*) y peral (*Pyrus communis*) (Khan ,Zhao y Korban, 2012., Romo-Chacó *et al.,* 2011). Es una enfermedad que apareció por primera vez en Norte América, provocando pérdidas económicas en frutales de pepita (Khan, Zhao y Korban, 2012) Los síntomas típicos incluyen necrosis de flores y frutos inmaduros, podredumbre, exudación bacteriana y chancros en tejidos leñosos, el agente causal toma por vía de entrada aberturas naturales de las flores o daños mecánicos causados por insectos, las epidemias de tizón de fuego, son más severas en climas cálidos y húmedos, que en regiones frías y húmedas (Le Roux , 2012). Es una infección compleja, en la cual las partes de la planta pueden aparecer primero empapadas de agua, luego se vuelven color verde oscuro, marchitarse y finalmente tornarse a un color marrón oscuro o negro, en todos los casos, se vuelven pegajosos por la presencia de exudado bacteriano compuesto con polisacáridos, es difícil de controlar, ya que es capaz de diseminarse muy rápidamente en toda la planta (Vrancken *et al.*, 2013). Esta enfermedad es favorecida por las condiciones climáticas como la alta humedad y temperatura, especialmente durante el crecimiento vegetativo, sin embargo, su aparición es generalmente irregular y difiere de una temporada a otra (Van der Zwet *et al.,* 2012). Es una de las enfermedades más complicadas del manzano, debido a que origina la muerte de yemas florales y en ocasiones del árbol completo, un método para su manejo es el uso de antibióticos, sin embargo, la aplicación frecuente de estos puede inducir resistencia en las bacterias (Romo-Chacón *et al*., 2011). El control químico de esta enfermedad de basa en la aplicación de productos a base cobre y antibioticos como oxidotetracilcina y estreptomicina y kasugmicina, (McGhee y Sundin, 2012), la resitencia a la estreptomicina ya ha sido reportada (Romo-Chacón *et al*., 2011). En algunos paises el uso de la oxidotetracilcina esta limitado (Stockwell y Duffy 2012).

2.4 Control de Tizón de Fuego por *Erwinia amylovora*

La SADER (Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural) en su catálogo de plaguicidas 2012, permite la utilización de Hidróxido cúprico, como tratamiento ante el tizón de fuego en manzano.

En Marruecos se llevó a cabo un estudio, donde se evaluó el biocontrol del tizón de fuego provocado por *E. amylovora*, en flores de pera y manzano, con *Bacillus subtilis* y *Pantoea agglomerans*, mostraron una reducción significativa en la incidencia de la enfermedad, *Pantoea agglomerans* P10c mas *B. subtilis* QST713, a razón (1:1); *B. subtilis* GB03 mas *B. subtilis* Y1336, redujeron la incidencia de infección con un 66 %, 63.8%, respectivamente (Bahadou *et al.,* 2017).

El concepto de controlar plagas con bacteriófagos, surgió poco después de su descubrimiento, dentro de sus ventajas, se menciona que pueden ser aplicados contra receptores bacterianos específicos, son autorreplicables, abundantes en la naturaleza y al parecer no tóxicos en la célula eucariota, sin embargo, dentro de las desventajas se señala que:, a) se puede desarrollar resistencia del huésped hacia el fago, b) limitación para ser utilizados bajo diferentes condiciones ambientales, dado que estos se desactivan bajo cierto pH, calor extremo, radiación UV y c) la susceptibilidad con cobre (Kolozsvári-Nagy *et al*., 2012).

Otras opciones de manejo ante el tizón de fuego bacteriano se encuentran los extractos de aceites naturales, se evaluó la eficacia del extracto de orégano, como una alternativa comparativa con los antibióticos, en Chihuahua México, sin embargo, estadísticamente, no se encontraron diferencias significativas entre la utilización del aceite esencial de orégano 39 % de eficacia, sulfato de estreptomicina y oxitetraciclina marca Agry- Mycin 17% eficiencia, sulfato de estreptomicina y oxitetraciclina marca Agry-gent plus 0% y marca cupricum 24 % de eficiencia (Romo-Chacón *et al.*, 2011).

2.5 Nanopartículas de Plata

Por otro lado la nanotecnología ofrece una gama novedosa, en la lucha contra microrganismos, las Nanopartículas de plata, pueden actuar afectando desde la pared celular o incluso el ADN (Ávila-Quezada y Espino-Solís, 2019).

Nanopartículas se considera aquellas con un tamaño entre 1 y 100 nm, cuando son menores de 100 nm y se presentan entre 10,000 – 15,000 átomos, son potenciales para inhibir el crecmiento bacteriano (Rai *et al.*, 2012). La fabricación de las nanopartículas data de cientos años atrás, por ejemplo, los coloides, la plata ha sido utilizada desde la antigüedad, principalmente para la desinfección del agua. A partir del siglo XVII se describió como producto medicinal con múltiples propósitos y a fines del silo XIX se introduce la solución de nitrato de plata para uso en gotas oculares en el recién nacido. En 1920 la FDA aprobó soluciones de plata iónica (electro-coloidales) como agentes antibacterianos. Existen indicadores de que las nanopartículas de plata (Ag-NP) se han encontrado presentes en la naturaleza y que su producción deliberada se practica hace más de 100 años, siendo uno de los nanos materiales más comúnmente utilizados. El primer reporte de obtención de las nanopartículas de plata data desde 1889, se estabilizó con citrato, teniendo como promedio partículas obtenidas de 7 a 9 nm. El producto comercialmente utilizado se llama “Collargol” con un tamaño promedio de 10 nm. En 1902 se reportó la estabilización de las nanopartículas de plata con proteínas. Existen 3 métodos para la síntesis de las Ag-Np, el método físico, químico y biológico, la síntesis física se basa en la molienda, desgaste (top-down) o a partir de una sal precursora, que será reducida en una reacción química (botton-up), para la reducción química se utiliza principalmente sal de plata, el nitrato de plata es frecuentemente utilizado para las Ag-NP, debido a su bajo costo y su estabilidad, para su biosíntesis se puede utilizar el quitosano, como agente quelante, a partir de desechos de la industria del camarón. La actividad bactericida Ag-Np puede ser mejorada con la combinación de polímeros como quitosan y polisacárido catiónico, se sabe que el aumento de la temperatura y el aumento del pH aumenta la actividad de la plata iónica, se requiere la humedad para que aumente la acción antibacteriana de la plata. El potencial de toxicidad de las Ag-NP en humanos u otros seres vivos amerita realizar investigaciones nuevas y más complejas que permitan una evaluación riesgo/beneficio en los productos fabricados con estas partículas (Cardoso, 2016). Recientemente se ha implementado la búsqueda por materiales antibacterianos en diversas áreas, como la industria textil, tratamiento de aguas, industria médica (Betancurt *et al*.,2016). Los materiales antibacterianos

deben generar un efecto bactericida o bacteriostático (Lerma *et al.*, 2015), garantizando la disminución o la eliminación de los mismos, dentro de estos agentes, se pueden mencionar las nanopartículas de plata, nanopartículas de cobre, de titanio y zinc, las más estudiadas han sido las nanopartículas de plata, se han puesto a prueba contra bacterias Gram negativas como *E. coli* y bacterias Gram positivas como *S. aureus*. Se pueden enlistar 3 mecanismos de acción, la liberación gradual de iones plata, inhibe la producción de ATP, por lo tanto, la replicación de ADN, en segundo lugar, se le atribuye el provocar daño directo a la membrana celular y el tercer mecanismo es la generación de Especies Reactivas de Oxigeno, provocando daño oxidativo, lo que da lugar a la muerte celular (Salem *et al*., 2015)

Se ha reportado que las AgNp's presentan una manera eficiente de controlar la formación de las biopelículas bacterianas (Hamed *et al*., 2020). Según Agnihotri y Mukherji, (2014), las bacterias Gram negativas son más susceptibles a el efecto antibacteriano de las AgNp's, dependiendo de la dosis bacteriana.

En su trabajo de investigación, enfrentó AgNP con *E. coli* in vitro, una concentración de 10 y 20 µg / ml (10 nm) provocaron la reducción del 18 % de *E. coli,* mientras que concentraciones entre 30 y 40µg / ml eliminaron el crecimiento bacteriano (Agnihotri y Mukherji, 2014).

2.6 Biopelícula Bacteriana

Las biopelículas son comunidades de microorganismos que crecen agregados y rodeados de una matriz extracelular que ellos mismos producen para protegerse del ambiente entre otras funciones, esta matriz está conformada por proteínas, acido desoxirribonucleico (ADN) extracelular y exopolisacárido (EPS) (Allewell, 2016).~~,~~ Las biopelículas han obtenido gran relevancia principalmente en el área médica ya que restringen el desarrollo de infecciones crónicas, uso de dispositivos médicos como catéteres intravasculares y prótesis (Bjarnsholt, 2013) El control de microorganismos productores de biopelículas representa un gran reto debido a que son más resistentes a la acciones de las moléculas con actividad antimicrobiana a diferencia de los organismos que crecen en forma libre (Davies, 2003) La síntesis de la biopelícula es un proceso complejo, constante y dinámico que conlleva 4 pasos, adhesión, agregación, maduración

y disgregación (Ortega y Franco, 2014). Durante la adhesión ocurren dos fenómenos que favorecen que los microrganismos se depositen sobre la superficie atracción y adhesión, la atracción es reversible y ocurre cuando los microorganismos libres mediante fuerza de Van del Waals, gravitaciones, electrostáticas, hidrofóbicas y movimientos Brownianos son atraídos y depositados en superficies inertes (Grössner *et al*., 2009). En la fase de adhesión es mediada por componentes de la membrana como pili, flagelos, ácidos teicoicos y moléculas que los microorganismos expresan (componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas de matriz adhesiva (Hook *et al*., 2013), luego estos microorganismos se agregan, donde se generan varias concentraciones de metabolitos secundarios que ayudan a la comunicación microbiana quorum sensing, lo que genera la producción de factores de virulencia y los principales componentes de la matriz extracelular como el exopolisacárido (Qin *et al.,* 2017) y por último en la fase de maduración los organismos que ya se han agregado comienzan a multiplicarse (Allewell, 2016).

2.7 Viabilidad celular por tinción Azúl Tripano

El análisis de viabilidad celular es una herramienta útil en los procedimientos experimentales, resistencia microbiólogica, susceptibilidad tumoral y muerte celular espontanea (Chan *et al*., 2012).

Para determinar la cantidad de células vivas o muertas se utilizan las pruebas de exclusión de colorantes, se basan en el principio de que las membranas plasmáticas intactas en las células vivas excluyen los colorantes específicos, mientras que las células muertas no, la técnica de exclusión azul de tripano se utiliza para cuantificar la viabilidad celular ya que es un tinte capaz de penetrar el citoplasma de células muertas, es un ensayo muy común para evaluar la citotoxicidad, consiste en la coloración del citoplasma debido a la pérdida de la selectividad de la membrana, mientras que las células vivas permaneceran sin teñir (Avelar *et al.,* 2014). Existen otras técnicas novedosas para la cuantificación de células en crecimiento, un ejemplo de esto es la citometría de flujo (Kummrow *et al*., 2013).

2.8 Mecanismo de Acción de Sulfato de Gentamicina

Los aminoglucósidos pertenecen a un grupo de antibióticos utilizados como tratamiento de baterías Gram negativas, la gentamicina es un aminoglucósidos producto del metabolismo de *Micromonospora purpurea*. Desde hace tiempo se sabe los aminoglucósidos se unen a los ribosomas bacterianos impidiendo la traducción del ADNm, evitando la síntesis de proteínas (Garneau-Tsodikova y Labby, 2016), específicamente, la unión de la gentamicina ocurre en la hélice 44 de la subunidad menor del ribosoma (Rajasekaran y Crich, 2020) se ha reportado que la gentamicina es el aminoglucósido con mayor actividad nefrotóxica en humanos (Jamshidzadeh *et a*l., 2015).

2.9 Mecanismo de Acción de Clorhidrato de Oxitetraciclina

El clorhidrato de oxitetraciclina pertenece a la familia de las tetraciclinas. Es producido por *Streptomyces* spp*.* se caracteriza por ser un antibiótico bacteriostático de amplio espectro que inhibe la síntesis proteica bacteriana (Han *et al*., 2016; Mannan *et al*., 2020) al unirse irreversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma (Zounková *et al.,* 2011). Este antibiótico ha sido detectado en el ecosistema, lo que puede tener un efecto perjudicial debido al desarrollo de resistencia microbiana (Liu *et al*., 2016).

2.10. Mecanismo de Acción del Sulfato de Cobre Pentahidratado

El cobre forma parte de los micronutrientes esenciales para los seres vivos, actúa como cofactor de varias enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones, además, en altas concentraciones presenta actividad biocida, interactuando con las membranas celulares, el ADN, causando interferencia con el transporte de energía. Formulaciones inorgánicas de sulfato de cobre pentahidratado son utilizadas como tratamiento preventivo de microorganismos fitopatógenos (Capinera y Dickens, 2016; Lamichhane *et al*., 2016).

III MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de *E. amylovora* se obtuvieron de Unifrut Cuauhtémoc y del CIAD Cuauhtémoc. Aun así, se realizaron pruebas para su identificación.

3.1 Identificación Morfológica de *Erwinia amylovora*

Para la identificación macroscópica se observó la morfología en caja Petri con medio CCT (ciclohexamida, cristal violeta y tergitol) en cuanto a la identificación microscópica se realizó la tinción de Gram.

3.2 Identificación Genético-Molecular de *Erwinia amylovora*

La cepa fue previamente resembrada en medio CCT como se indica en el protocolo del Kit de extracción para ADN (invitrogen minikit de ADN genómico pure link) La extracción se llevó a cabo mediante invitrogen minikit de ADN genómico pure link en el laboratorio de micología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH. La amplificación del gen 16S se realizó en un termociclador (Fisher Scientific), mediante una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s, anillamiento a 53°C por 1.5 min y extensión a 72°C por 1.5 min, y una extensión final por 10 min a 72°C en el laboratorio Nacional de Citometría de Flujo de Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la UACH.

Los productos de PCR se colocaron en un gel de agarosa al 1 % y se sometieron a electroforesis horizontal con el búfer TBE 1X pH 8.0 a 110v/50mA. Los productos de PCR se visualizaron en un fotodocumentador (Biorad) y finalmente se secuenciaron mediante Blast comparando la secuencia de interés con la base de datos del NCBI. Se identificó la cepa bacteriana como *Erwinia amylovora*.

3.3 Pruebas de Patogenicidad de *E. amylovora*

Se preparó una suspensión bacteriana en agua destilada a una concentración de $1x10^9$ UFC/ml y se inoculó en cinco manzanas, cinco varas de manzana y en un árbol de manzana de un año (FAO, 2016).

3.3.1 Pruebas de patogenicidad en fruto

Se inoculó 30 µL de suspensión bacteriana con una concentración de $1x10^9$ UFC/ml de *E. amylovora* (*con* ayuda de una jeringa desinfectada con etanol al 70 %) en cuatro sitios distintos en cada uno de dos frutos de manzano, se mantuvieron en cámara húmeda a una temperatura de 35°C durante 15 días (FAO, 2016).

Figura 1. Inoculación de manzana.

3.3.2 Pruebas de patogenicidad en ramas de manzano

Se inoculó 30 µL de suspensión bacteriana a una concentración de $1x10^9$ UFC/ml de *E. amylovora,* desinfectando con etanol al 70% el área y realizando

pequeñas punciones con una navaja en las yema y hojas. Se mantuvieron a 80 % de humedad relativa y 25°C durante 15 días (FAO, 2016).

Figura 2. Inoculación de varas de manzano

3.3.3 Pruebas de patogenicidad en Árbol de manzano

En un árbol de 1 año de edad se realizaron heridas en 10 zonas distintas previamente desinfectadas con etanol al 70 % (yemas y hojas) con ayuda de una navaja desinfectada con etanol al 70 % y se inoculó 30 µL de suspensión bacteriana a una concentración de $1x10^9$ UFC/ml de *E. amylovora.*

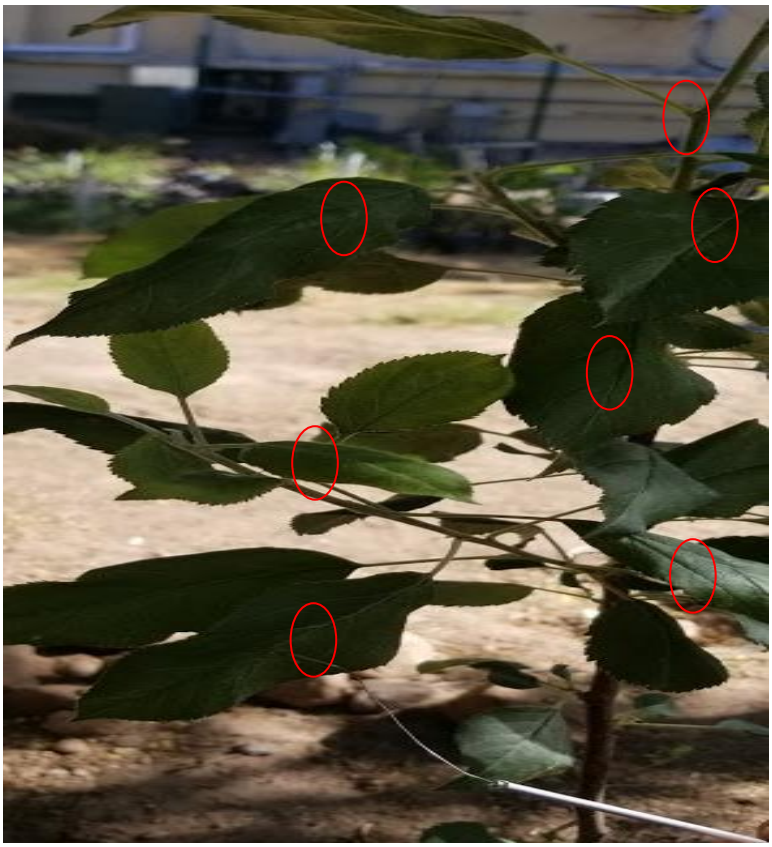

Figura 3. Inoculación de árbol de manzano de 1 año de edad.

3.4 Determinación de la Cinética de Crecimiento

Se cuantificó por espectrofotometría la turbidez de la suspensión bacteriana, se midió la absorbancia de las muestras en distintos tiempos con la finalidad de monitorear el crecimiento bacteriano.

3.4.1 Preparación del preinóculo

En un tubo de ensayo de 10 ml con agua peptonada (1.8 %) se inoculó *Erwinia amylovora* proveniente de medio CCT, manteniendo una temperatura de 28 °C a 100 rpm durante 12 horas, se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

Figura 4. Agua peptonada estéril.

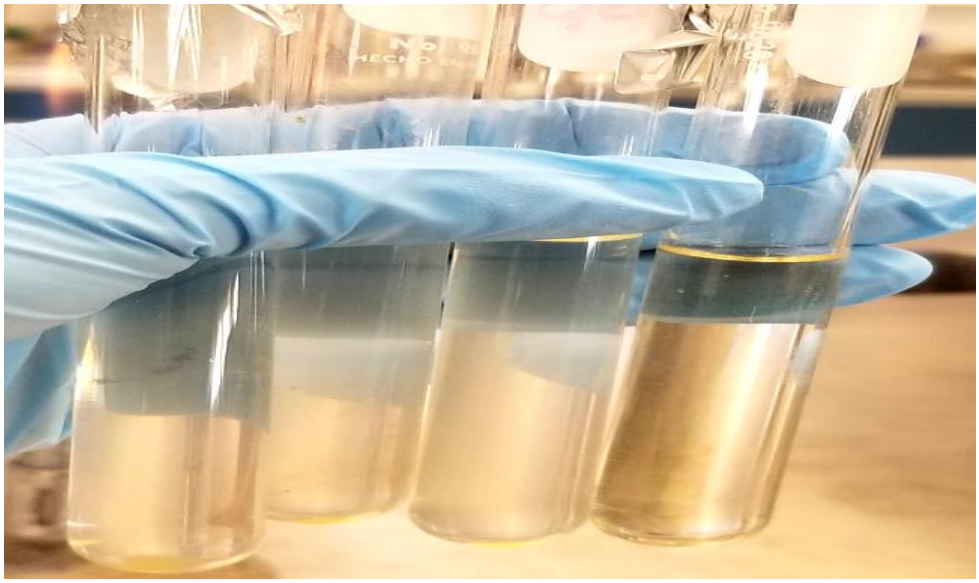

Figura 5. Preinóculos de *E. amylovora.*

3.4.2. Preparación del Inóculo

En un matraz Erlen Meyer de 100 ml se adicionaron 90 ml de agua peptonada y 10 ml de preinóculo de *Erwinia amylovora*, a una temperatura de 28 °C a 100 rpm durante 24 horas, se tomaron medidas por espectrofotometría en un

equipo marca Genesys 20 Thermo Fisher scientific a una densidad óptica de 600 nm a las 4, 8 y 24 horas. Cinco repeticiones por tratamiento.

Figura 6. Inóculos de *E. amylovora.*

3.5 Condiciones de los Enfrentamientos in vitro en Medio líquido y Tratamientos Aplicados a *Erwinia amylovora*

3.5.1. Condiciones de *Erwinia amylovora*

Se utilizó una suspensión liquida de la bacteria en agua peptonada a una concentración de 0.5 a 600 nm D.O. equivalente a $1.5x10^7$ UFC/mL

3.5.2. Orden de tratamientos

Se prepararon 3 tratamientos a 200 ppm

I. Nanopartículas de plata
II. gentamicina + oxitetraciclina
III. Sulfato de cobre

3.5.3 Condiciones de los enfrentamientos en medio líquido

Los enfrentamientos se realizaron en matraces volumétricos de 50 ml. A cada matraz se adicionaron 10 ml de suspensión bacteriana, 10 ml de tratamiento y 10 ml de agua peptonada, se mantuvieron a 25 °C a 100 rpm durante 24 horas.

En total se utilizaron 24 matraces, cinco de ellos con bacteria sin tratamiento, 15 de bacteria con tratamiento y 4 matraces de blanco de cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones, los blancos de los tratamientos consistieron en 10 ml de tratamiento y 10 ml de agua peptonada (sin bacteria)

Para las bacterias sin tratamiento el blanco fue agua peptonada.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados a *E. amylovora* en suspensión líquida.

Nanopartículas de plata 200 ppm (blanco)	Gentamicina + oxitetraciclina 200 ppm (Blanco)	Sulfato de cobre 200 ppm (Blanco)	*E. amylovora* 1 x 10^7 UFC/ml (Blanco)
Nanopartículas de plata + *E. amylovora*	Gentamicina y oxidotetraciclina + *E. amylovora*	Sulfato de cobre + *E. amylovora*	Tx.
R1	R1	R1	R1
R2	R2	R2	R2
R3	R3	R3	R3
R4	R4	R4	R4
R5	R5	R5	R5

Figura 7. Tratamientos en suspensión liquida.

3.5.4. Determinación de la Cinética de Tratamientos aplicados a *Erwinia amylovora*

Todos los tratamientos fueron medidos por espectrofotometría en un equipo Genesys 20 marca Thermo Scientific a las 11, 13, 18, 20, 22 y 24 h a una densidad óptica de 600 nm

A las 24 horas también se cuantificó la viabilidad por el método de azul de tripano a 600 nm.

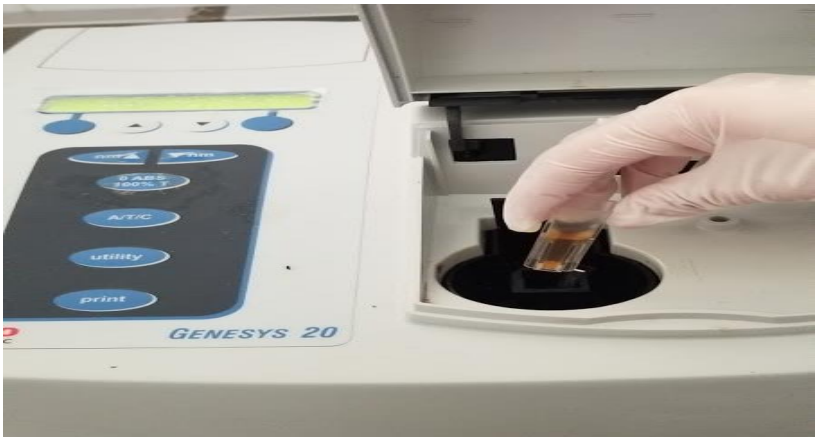

Figura 8. AgNps en espectrofotómetro.

3.5.5 Cuantificación de la Viabilidad celular bacteriana

La técnica de exclusión azul de tripano fue utilizada para cuantificar la viabilidad celular bacteriana, en una celda para espectrofotometría de 1 ml se adicionaron 500 microlitros de todos los tratamientos y blancos, posteriormente se tiñeron con 10 microlitros de azul de tripano al 0.2 % y se leyeron a 600 nm
La viabilidad celular se midió cuando los tratamientos cumplieron las 24 horas a 100 rpm a 25°C.

Figura 9. Tinción azul tripano.

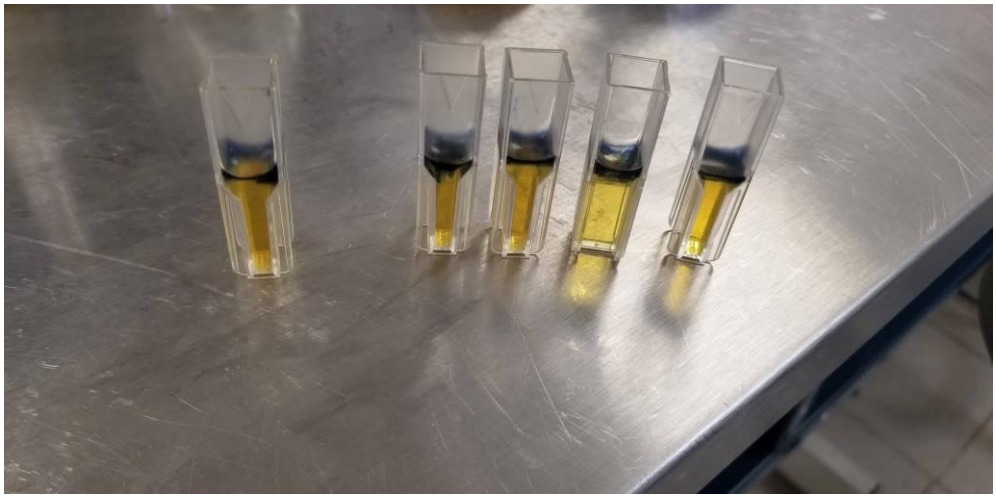

Figura 10. AgNp's teñidas con azul tripano.

3.6 Medición de la Biopelícula Bacteriana

Se incubaron 200 microlitros de *E. amylovora* a una concentración de 1.5 x 10^7 UFC/mL 0.5 D.O 600 nm y 200 microlitros de nanopartículas de plata 200 ppm en celdas de 1 ml a 28 °C en oscuridad para espectrofotometría.

Después de 24 horas se lavó por duplicado la pared de las 15 celdas con 200 microlitros de solución salina fisiológica, se tiñó con 100 microlitros de cristal violeta al 2 %, luego de 30 minutos se decantó el exceso de colorante y se fijó con 100 microlitros de etanol al 70 % y finalmente las celdas se lavaron con

ácido acético. La formación de la biopelícula se cuantificó midiendo la absorbancia a 570nm.

Figura 11. Tratamientos de AgNp's en condiciones de oscuridad.

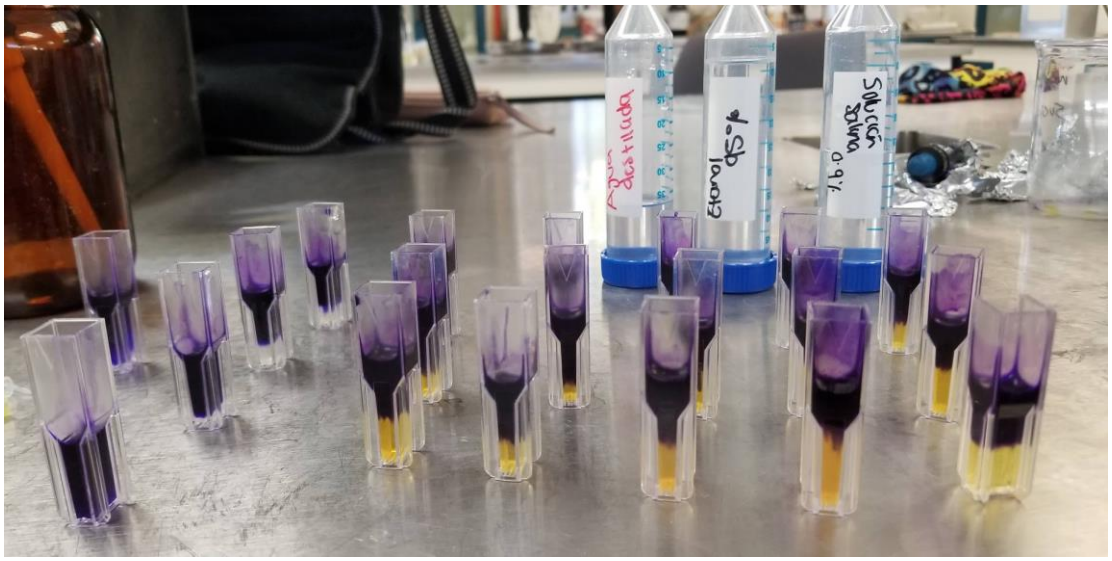

Figura 12. Tinción cristal violeta en AgNp's.

3.7 Enfrentamientos de *E. amylovora* por Difusión de Disco en Placa

3.7.1. Características de Discos de papel filtro estériles

Se utilizó una autoclave para esterilizar 90 discos de papel filtro de 6 mm de diámetro a 120 °C durante 15 minutos, posteriormente, 15 discos fueron impregnados con 30 microlitros de 100 ppm de plata, otros 15 discos con 30 microlitros de 100 ppm de sulfato de cobre, 15 discos con 30 microlitros con oxitetraciclina y 15 discos más con 30 microlitros de agua destilada estéril, se repitió el mismo procedimiento con 200 ppm de cada tratamiento, se dejaron secar a temperatura ambiente durante dos horas.

Figura 13. Discos de papel filtro impregnados con los tratamientos.

3.7.2. Condiciones de *E. amylovora* para el Enfrentamiento en Difusión de Disco en Placa

Cien microlitros de *E. amylovora* a una concentración de 1.5 x 10^7 UFC/ml 0.5 D. O 600 nm, fueron inoculados en caja petri con agar nutritivo. Se inocularon un total de 30 cajas, 15 cajas con los tratamientos a una concentración de 100 ppm y 15 cajas con los tratamientos a una concentración de 200 ppm. Se realizaron tres experimentos con cinco repeticiones cada uno de 100 ppm y el mismo procedimiento para 200 ppm.

3.7.3. Aplicación de difusión de disco en placa

Luego de 1 hora después de inocular las 30 cajas con *E. amylovora* a una concentración de 0.5 D. O. 600 nm (1.5x 10^7 UFC/ml) se colocaron aleatoriamente 4 discos de papel filtro estéril.

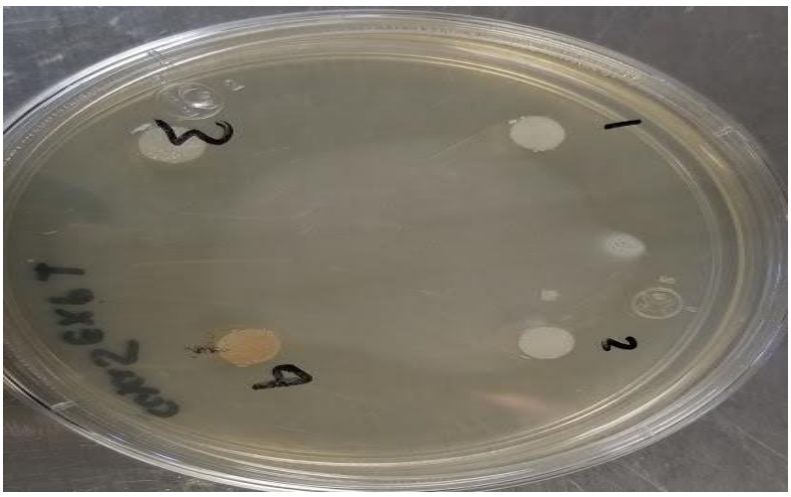

Figura 14. sensidiscos en placa.

Cuadro 2. Tratamientos aplicados a *E. amylovora* en caja 100 y 200 ppm.

Exp1 100 ppm				
Caja/ Rep. 1 ~~1~~	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5

agua destilada Cobre r4 antibióticos r3 plata r2	agua destilada antibióticos r1 antibióticos r5 cobre r1	agua destilada cobre r3 plata r4 plata r5	agua destilada plata r3 cobre r5 antibióticos r2	agua destilada cobre r2 antibióticos r4 plata r1
Ex 2 100 ppm				
Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5
agua destilada antibióticos r4 plata r2 cobre r5	agua destilada plata r3 cobre r4 plata r1	agua destilada antibióticos r2 cobre r3 antibióticos r5	agua destilada plata r5 cobre r2 plata r4	agua destilada antibióticos r1 cobre r1 antibióticos r3
Ex 3 100 ppm				
Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5
agua destilada cobre r4 plata r2 cobre r5	agua destilada cobre r3 antibióticos r4 antibióticos r2	agua destilada plata r1 plata r5 antibióticos r1	agua destilada antibióticos r5 plata r3 plata r4	agua destilada antibióticos r3 cobre r2 cobre r1
Ex 1 200 ppm				
Caja/ Rep. 1 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5
agua destilada Cobre r4 antibióticos r3 plata r2	agua destilada antibióticos r1 antibióticos r5 cobre r1	agua destilada cobre r3 plata r4 plata r5	agua destilada plata r3 cobre r5 antibióticos r2	agua destilada cobre r2 antibióticos r4 plata r1
Ex 2 200 ppm				
Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5
agua destilada antibióticos r4 plata r2 cobre r5	agua destilada plata r3 cobre r4 plata r1	agua destilada antibióticos r2 cobre r3 antibióticos r5	agua destilada plata r5 cobre r2 plata r4	agua destilada antibióticos r1 cobre r1 antibióticos r3
Ex 3 200 ppm				
Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5
agua destilada cobre r4 plata r2 cobre r5	agua destilada cobre r3 antibióticos r4 antibióticos r2	agua destilada plata r1 plata r5 antibióticos r1	agua destilada antibióticos r5 plata r3 plata r4	agua destilada antibióticos r3 cobre r2 cobre r1

3.8. Enfrentamientos de *E. amylovora* por Difusión de Pozo en Placa

3.8.1. Condiciones de *E. amylovora* para el Enfrentamiento en Difusión de Pozo en Placa

Con un hisopo estéril se inoculó *E. amylovora* a una concentración de 1.5x 10^7UFC/Ml 0.5 D. O 600 nm, en caja petri con agar nutritivo. La cepa se inoculó uniformemente en un total de 15 cajas con los tratamientos a una concentración de 200 ppm. Se realizaron tres experimentos con cinco repeticiones por tratamiento.

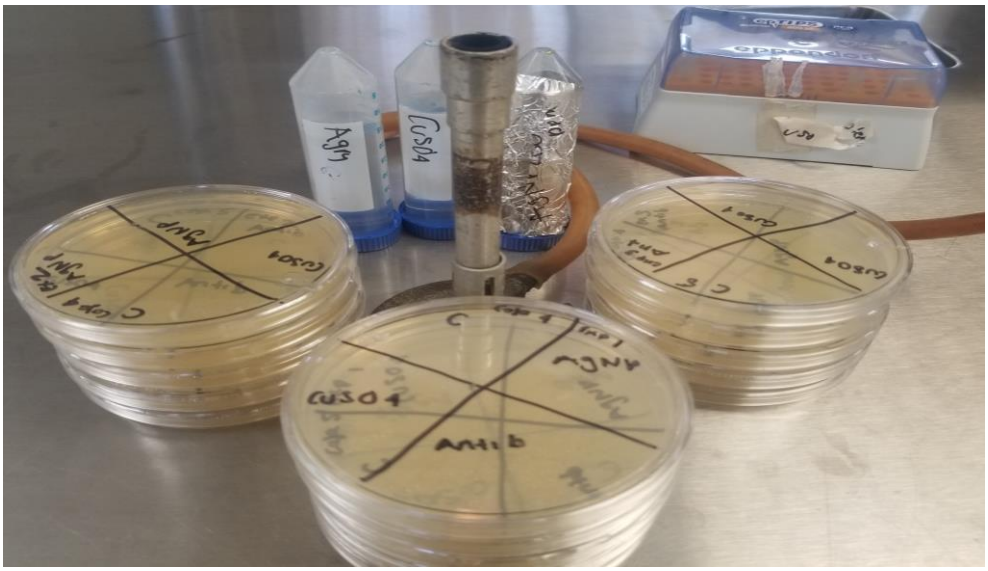

Figura 15. Tratamientos por difusión de pozo en placa.

3.8.2. Aplicación de Tratamientos en Pozo

Una hora después de inocular las 15 cajas con *E. amylovora* a una concentración de 0.5 D. O. 600 nm (1.5x 10^7 UFC/ml), se realizaron cuatro pozos por caja con la punta de una micropipeta. En cada pozo se depositaron 50 microlitros de cada tratamiento, las cajas fueron incubadas a 28°C durante 24 h antes de medir el halo de inhibición.

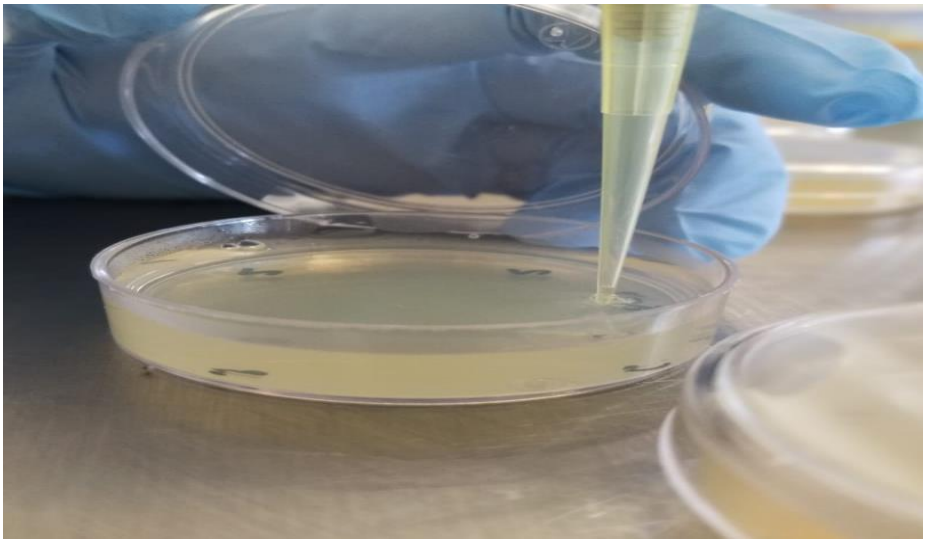

Figura 16. Difusión por pozo en placa.

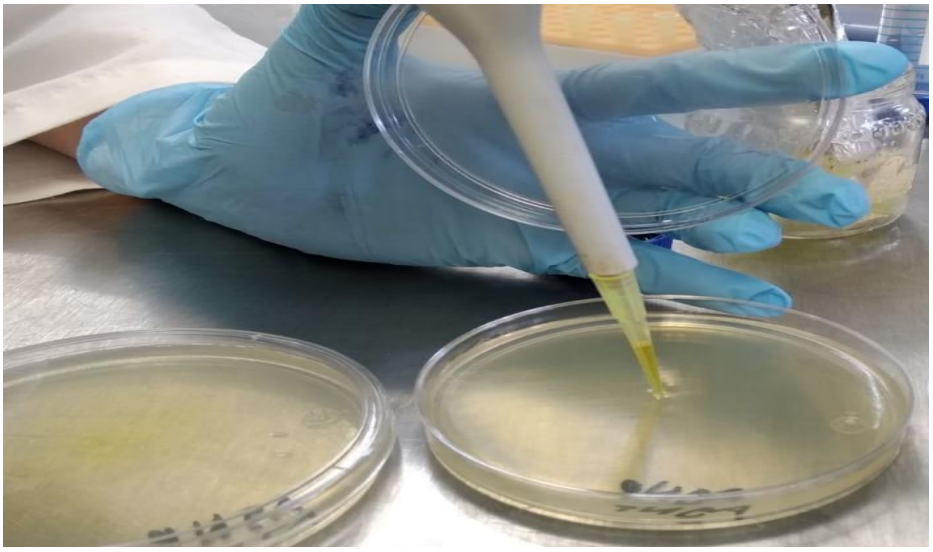

Figura 17. AgNp's en pozo.

Cuadro 3. Tratamientos aplicados a *E. amylovora* en cada pozo.

Ex 1 200 ppm				
Ex 1				
Caja/ Rep. 1 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5
agua destilada Cobre r4 antibióticos r3 plata r2	agua destilada antibióticos r1 antibióticos r5 cobre r1	agua destilada cobre r3 plata r4 plata r5	agua destilada plata r3 cobre r5 antibióticos r2	agua destilada cobre r2 antibióticos r4 plata r1
Ex 2 200 ppm				
Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5
agua destilada antibióticos r4 plata r2 cobre r5	agua destilada plata r3 cobre r4 plata r1	agua destilada antibióticos r2 cobre r3 antibióticos r5	agua destilada plata r5 cobre r2 plata r4	agua destilada antibióticos r1 cobre r1 antibióticos r3
Ex 3 200 ppm				
Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5
agua destilada cobre r4 plata r2 cobre r5	agua destilada cobre r3 antibióticos r4 antibióticos r2	agua destilada plata r1 plata r5 antibióticos r1	agua destilada antibióticos r5 plata r3 plata r4	agua destilada antibióticos r3 cobre r2 cobre r1

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Influencia de medio de cultivo en la morfología de la cepa

Microscópicamente se observaron bacilos Gram negativos, macroscópicamente en agar nutritivo se desarrollaron colonias convexas, cremosas y amarillentas, en agar CCT se presentaron colonias lilas, convexas, cremosas y con tendencia a extenderse.

4.1. Producción de pigmentos en medio de cultivo

Luego de 48 horas a 25 °C comenzaron a aparecer las primeras colonias en ambos medios de cultivo.

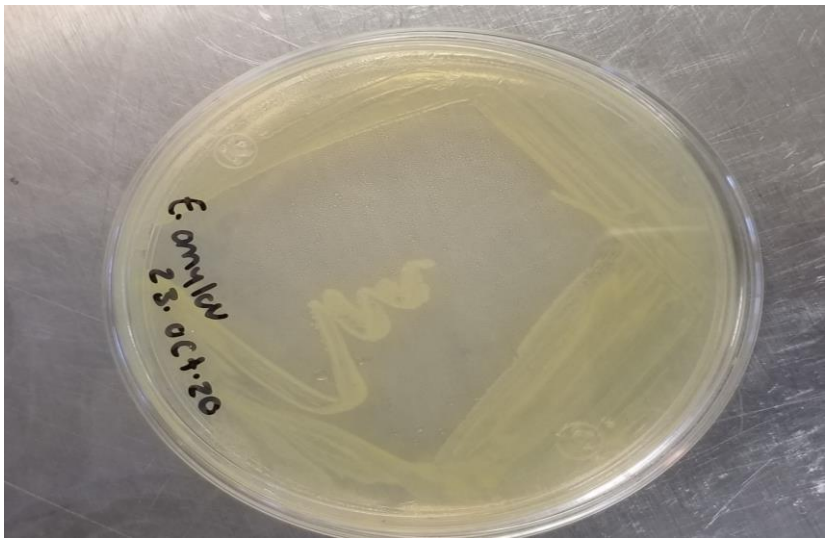

Figura 18. ***Erwinia amylovora*** **en Agar Nutritivo.**

Figura 19. ***Erwinia amylovora*** **en medio CCT.**

E. amylovora produjo un pigmento amarillento, que de acuerdo con Ordax *et al.* (2012) el medio RESC (Recovery *Erwinia amylovora* Stressed Cells) es un medio diferencial que contiene 1.5 Mm de $CuSO_4$ para mejorar la recuperación de la cepa procedente de condiciones desfavorables y debido a una mayor concentración de cobre en el medio, las colonias fueron más amarillentas y mucoides en comparación con otros medios.

Al observar al microscopio la tinción de Gram se apreciaron bacilos Gram negativos.

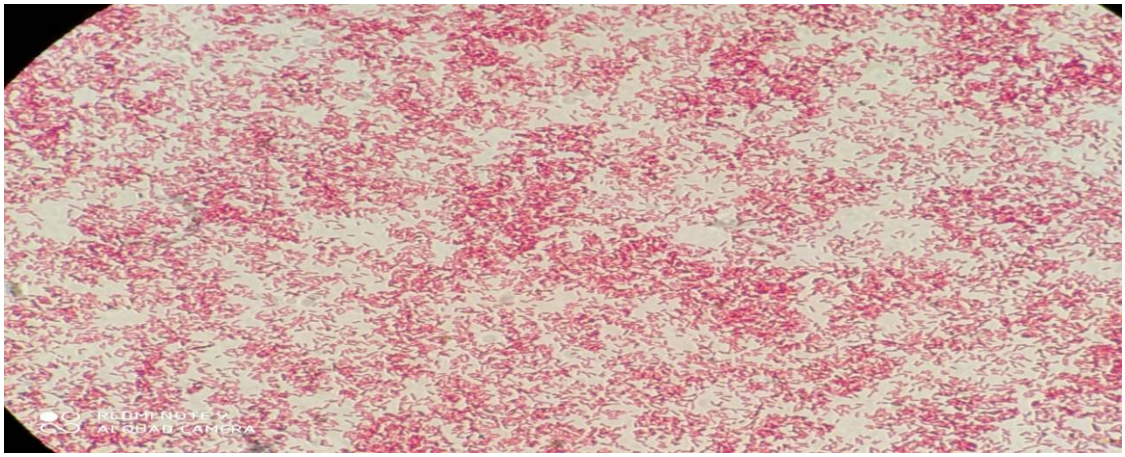

Figura 20. Tinción de Gram en *Erwinia amylovora*.

4.2 Patogenicidad de la cepa

Quince días después de la inoculación de la cepa en varas de manzano y manzana, se empezó a observar necrosis en la zona de inoculación, en el árbol después de un mes se observaron los síntomas de tizón de fuego bacteriano.

4.2.1 Patogenicidad de la cepa en Manzana

Después de permanecer incubados los frutos quince días a una temperatura de 30°C, se oscureció la zona de inoculación en los frutos.

Figura 21. Síntomas en manzana.

4.2.2 Patogenicidad de la cepa en Varas de Manzano

Quince días luego de mantener las varas de manzana en cámara humedad, se presentó la necrosis.

Figura 22. Necrosis en varas de manzana.

4.2.3. Patogenicidad de la cepa en manzano

Un mes después de la inoculación en plántulas del manzano de un año de edad comenzaron a aparecer los síntomas de tizón de fuego en las hojas. Los síntomas iniciales son los que se describen para la enfermedad como un atizonamiento.

Figura 23. Tizón de fuego en manzano.

4.3. Identificación molecular

Se extrajeron 1.5 de ADN bacteriano y luego de su amplificación por PCR se observó en el gel de agarosa un tamaño de 500 pb.

4.4. Influencia del tiempo en la Cinética bacteriana

Los datos obtenidos de las mediciones a diferentes tiempos, indican que *E. amylovora* en agua peptonada (suspensión líquida) crece dentro de las primeras diez horas de manera exponencial, después de este tiempo comienza la etapa estacionaria y finalmente su crecimiento máximo se alcanza a las 24 horas de incubación a 28 °C.

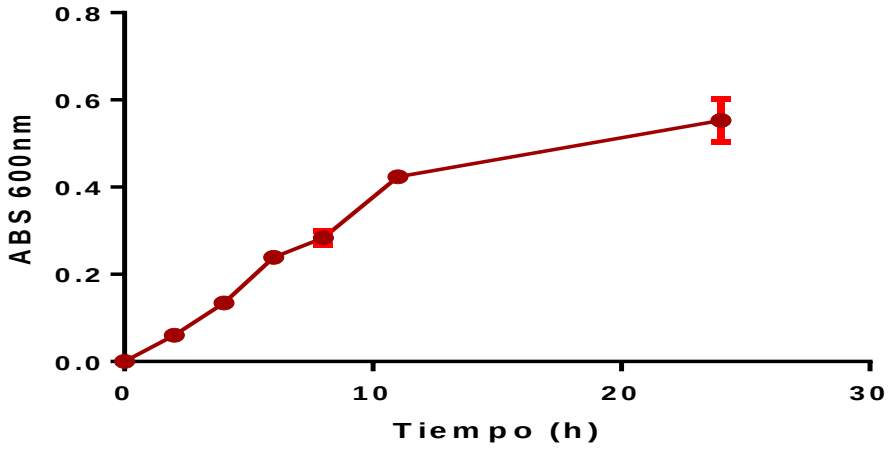

Figura 24. Cinética de crecimiento de *Erwinia amylovora.*

Luego de 24 horas *E. amylovora* llegó a su punto máximo de crecimiento, a una concentración de 5 x 10 ^{7}UFC/mL, comparando con Correa *et al.* 2017, donde se realizó una curva de crecimiento de *Erwinia chrystantemi* en caldo Brucella, se observa que la bacteria creció de manera exponencial dentro de las primeras diez horas y llegó a su crecimiento máximo a las 24 horas a una concentración de 4.5 x 10^{9} UFC/ mL. El comportamiento es similar a lo observado en este trabajo, debido a que en ambos casos después de las diez horas comienza la fase estacionaria.

4.4.1 Influencia de los tratamientos en la cinética bacteriana

Los datos obtenidos de la cinética de crecimiento de *E. amylovora* bajo diferentes tratamientos fueron procesados en el programa Prisma Graphad con el análisis estadístico Área bajo la Curva (ABC) La Figura 25 del Área bajo la Curva indica que hay un efecto significativo entre los tratamientos y entre los tratamientos y el control.

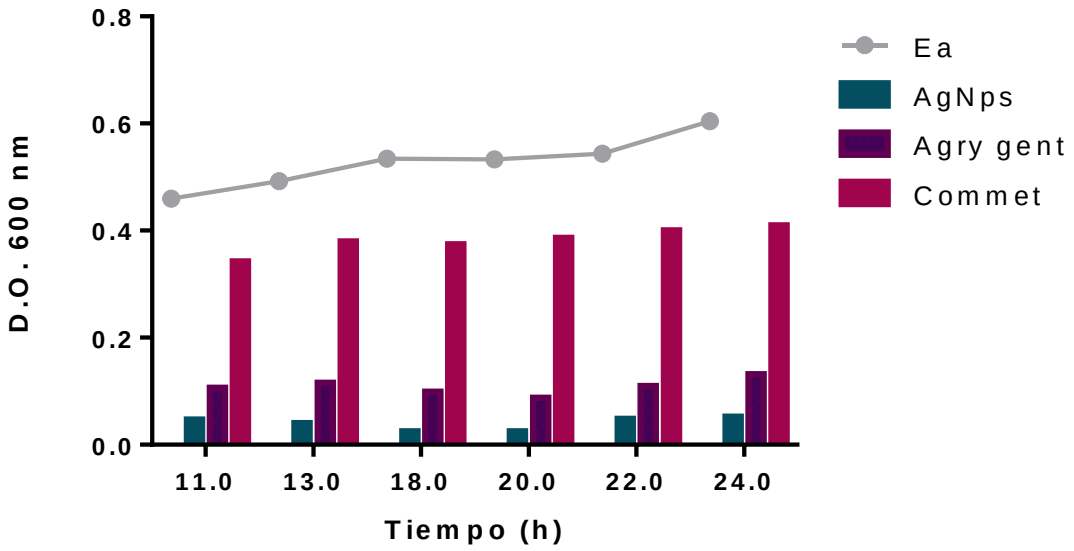

Figura 25. Área bajo la curva.

El área bajo la curva valora globalmente el contenido de todos los puntos en el tiempo. Muchos estudios comparan el progreso de enfermedades con el ABC (Guigón-López y González, 2001).

El área total bajo la curva del control (*E. amylovora* sola) es de 6.811, seguida por 4.966 de COMET, 1.385 de Agry Gent y por último 0.4762 de AgNps. Estos resultados se interpretan como la mayor área producida por el crecimiento bacteriano, y la menor área, como el menor volumen acumulado de crecimiento bacteriano limitado por el tratamiento con nanopartículas de plata AgNp's.

4.5 Efecto de los tratamientos en la viabilidad celular

La viabilidad celular presente en las muestras de los distintos tratamientos, fué analizada tomando como el 100 % de viabilidad celular la absorbancia a las 24 h de crecimiento de *E. amylovora*, estos datos fueron sometidos a la prueba de comparación múltiple de Tukey 95 % I.C en Prisma Graphad.

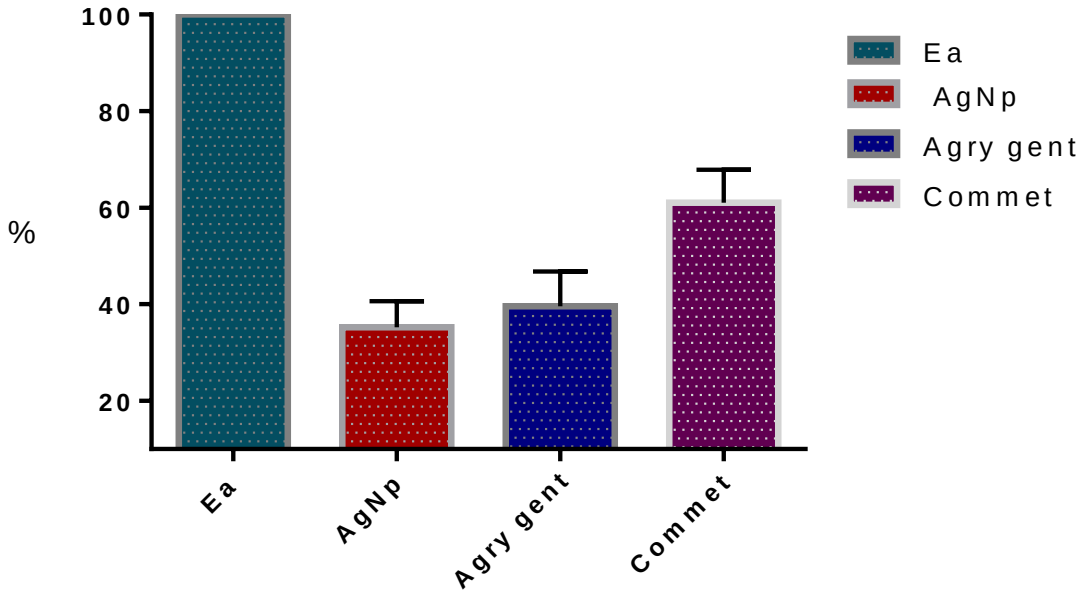

Figura 26. Porcentaje de viabilidad celular en cada tratamiento.

El mejor tratamiento para controlar *E. amylovora* fue el de AgNp's, debido a que presentó el menor porcentaje de viabilidad celular 35.2 %, esto es, la viabilidad se redujo en un 64.8%., seguido por 39.6 % presente en las muestras con Agry gent plus 5000 y finalmente la viabilidad celular presente en COMET

es dé 61.06 %. Los tratamientos más efectivos fueron AgNp's y Agrygent, dejando células viables a porcentajes menores del 40%. Estos resultados son similares a los de Sinha *et al*. (2011), donde las nanopartículas de plata inhibieron bacterias entre el 50 y 80%.

4.6 Inhibición de la Formación de la Biopelícula Bacteriana por Nanopartículas de Plata

La formación de la biopelícula bacteriana en las muestras de *E. amylovora* fue tomada como el 100 % y se comparó con la formación en las muestras tratadas con AgNps.

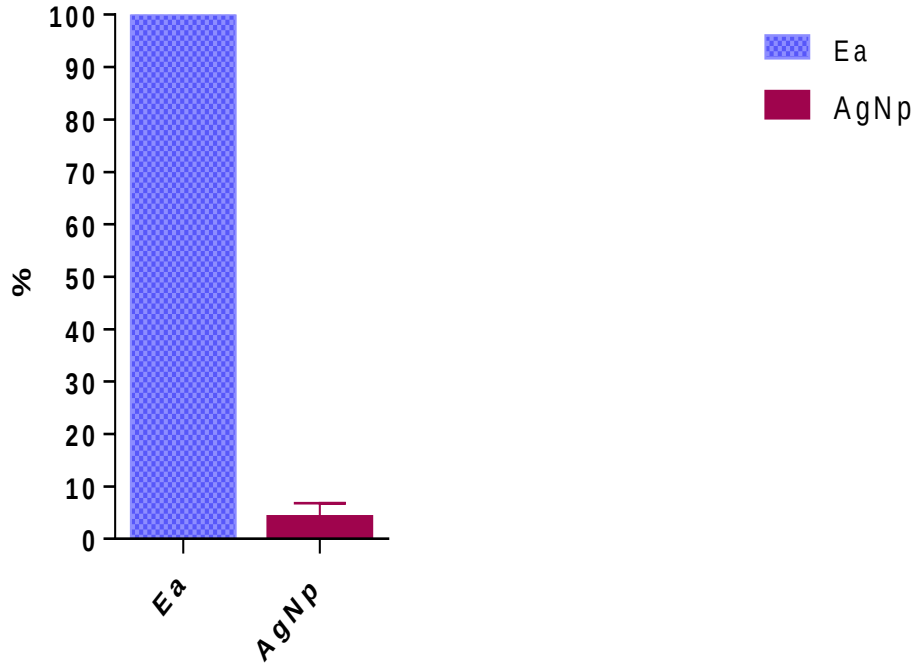

Figura 27. Formación de la biopelícula bacteriana por *E. amylovora* en contraste con AgNps dónde esté inhibió la formación de biopelículas

El porcentaje de inhibición de la biopelícula bacteriana en las muestras tratadas con AgNps fue de 96.06 %. Lo que indica que las nanopartículas de plata son muy efectivas para inhibir la formación de polisacáridos extracelulares bacterianos. Esto concuerda con lo que menciona Ansari *et al*. (2014), quienes encontraron que las nanopartículas de plata inhiben la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* multiresistente.

4.7. Efecto de los tratamientos en el Crecimiento de *E. amylovora* en Placa por Difusión de Disco

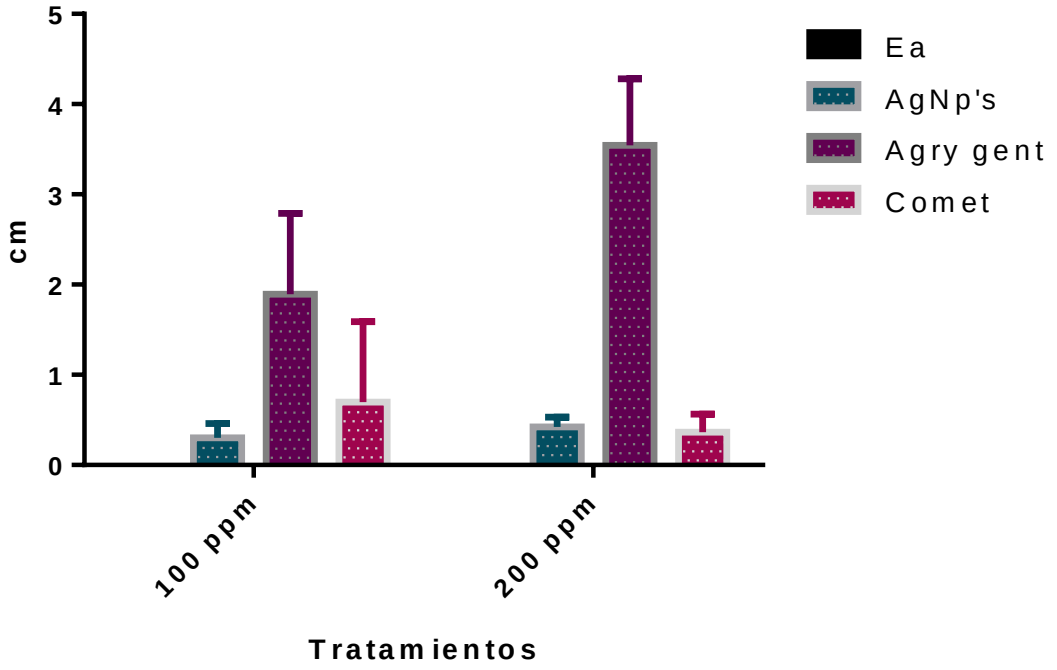

Figura 28. Halo de inhibición en difusión por sensidiscos.

En caja Petri se observa un halo de inhibición de 0.3038 mm para los tratamientos de AgNp's, el halo de inhibición formado por Agry Gent es de 1.8956 cm y 0.7960 para COMET a 100 ppm.

A 200 ppm el halo de inhibición observado en los tratamientos con AgNps fué de 0.4222 mm, 3.5448 cm por Agry gent y 0.3652 mm para COMET.

Para el análisis estadístico se realizaron múltiples comparaciones de Sidak's 95 % I.C. en Prisma Graphad. En este ensayo el mejor tratamiento fué el de Agrygent, esto pudo deberse a la capacidad de difusión del agroquímico, generando un halo más amplio. Los agroquímicos contienen tensoactivos y adherentes que les permiten difundirse sobre el tejido al que son aplicados (Green y Beestman, 2007).

4.7. Efecto de los tratamientos en el Crecimiento de *E. amylovora* en Placa por Difusión de Pozo

Las medidas del halo de inhibición de los tratamientos a 200 ppm, en Caja Petri fueron analizados en Prisma Graphad Tukey 95 % I.C. Se observan diferencias estadísticas entre el tratamiento de Agrygent y los demás tratamientos.

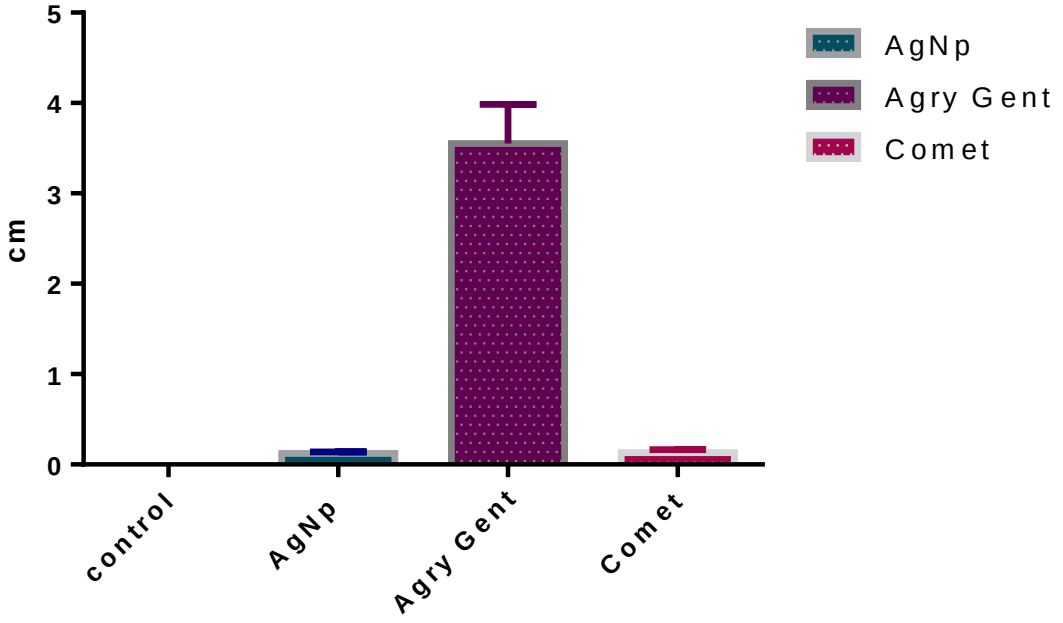

Figura 29. Halo de inhibición por difusión en pozo.

El halo de inhibición provocado por las AgNps fue de 0.1226 mm, 3.55 cm para Agry gent y 0.1314 para COMET. El efecto del agroquímico es el de difusión por lo que se aprecia su eficiencia en placa.

IV. CONCLUSION

La bacteria *E. amylovora* crece en agua peptonada (suspensión líquida) dentro de las primeras diez horas de manera exponencial, después de este tiempo comienza la etapa estacionaria y finalmente su crecimiento máximo 1.6 X10 ^{7} UFC/mL se alcanza a las 24 horas de incubación a 28 °C.

Las nanopartículas de plata (AgNp's) a 200 ppm presentan un efecto inhibitorio para la bacteria *Erwinia amylovora* reduciendo la viabilidad celular en un 64.8% en medio líquido a base de agua peptonada.

El análisis del Área Bajo la Curva muestra que la mayor área fue producida por el crecimiento bacteriano medio liquido en 24h. La menor área o menor volumen acumulado de crecimiento bacteriano fue limitado por el tratamiento con nanopartículas de plata.

El porcentaje de inhibición de la biopelícula bacteriana en las muestras tratadas con AgNps fue de 96%. Lo que indica que las nanopartículas de plata son muy efectivas para inhibir la formación de polisacáridos extracelulares de *E. amylovora.*

Los ensayos de halo de inhibición y zona de inhibición mostraron que el mejor tratamiento fue el del agroquímico. Debido a que los agroquímicos contienen tensoactivos y adherentes que les permiten difundirse sobre el tejido al que son aplicados, la forma de compararlos con las nanopartículas es aplicar un surfactante a éstas para obtener datos comparativos.

V. LITERATURA CITADA

A´cimovi´c, E. A. (2015). Fire blight (*Erwinia amylovora*) of rosaceous plants. Pathogen virulence and selection and characterization of biological control agents. Frontiers in plant science, ÷10.3389/fpls.2015.00016.

Agnihotri, S y Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. RSC Advances 4, 974-3983.

Bahadou, S. A., Ouijja, A., Boukhari, M. A., Tahiri, A. (2017). Development of field strategies for fire of blith control integratin biocontrol agents and plant defense activators in Morocco. Journal of Plant Pathology , 99, 51-58.

Alewell N.M. (2016). Introduction to biofilms thematic minireview series. J Biol Chem, 291:12527-8.

Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Cameotra, S. S., Saquib, Q., Musarrat, J (2014). Gum arabic capped-silver nanoparticles inhibit biofilm formation by multi-drug resistant strains of Pseudomonas aeruginosa. Journal of basic microbiology, 54(7), 688-699.

Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C. X., Mourão, F. A. G., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Brito-Melo, G. E. A.(2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 47(4), 307-315.

Avila-Quezada G.D., y Espino-SolIs G.P. (2019). Silver Nanoparticles Offer Effective Control of Pathogenic Bacteria in a Wide Range of Food Products. In Pathogenic Bacteria. IntechOpen.

Ayisigi, M., Cokislerel, A., Kucukcobanoglu, Y., Yalcin, T., Aktas, L. Y. (2020). Green synthesized silver nanoparticles for an effective control on soft rodisease pathogen *Pectobacterium carotovorum* and growth stimulation in pepper. Bulg. J. Agric Sci, 26, 574-584.

Betancur Henao, C. P., Hernández Montes, V., Buitrago Sierra, R. (2016). Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 35(4), 366 - 381.

Biling E. (2011). Fire blight. Why do views on host invasion by *Erwinia amylovora* differ? Plant Pathol, 60:178 –189.

Bou, G. F., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 29(8), 601-608.

Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS Suppi, (136):1-51.

Capinera, J. L. y Dickens, K. (2016). Some effects of copper-based fungicides on plant-feeding terrestrial molluscs: a role for repellents in mollusc management. Crop Protection, 83, 76-82.

Cardoso, D. P. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el area de salud. Hosp. Niños *(*B. Aires*)*, 58(260):19-28 / 19.

Chan LL., Wilkinson, A. R., Paradis, B. D., Lai, N (2012). Rapid imagebased cytometry for comparison of fluorescent viability staining methods. J Fluoresc , 22: 1301-1311.

Correa, A. M., Vásquez, A. O., Trespalacios, A. A., y Obando, F. S. (2017). Inhibición del crecimiento de *Erwinia chrysanthemi* a diferentes concentraciones de ácido

fólico: posible uso del ácido fólico como agente bacteriostático y fortificante de la papa *Solanum tuberosum*. Universidad y Salud, 19(1), 140-148.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov, 2:114-22.

Delgado-Santander, R. (2016). Biology of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in oligotrophic environments: survival responses and virulence. Universitat de València, València.

FAO. (2016). NIMF 27, *Erwinia amylovora* . Protocolos de diagnostico para las plagas reglamentadas.

Garibyan, L. A. y Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). he Journal of investigative dermatology , 133.3: e6.

Garneau-Tsodikova y Labby, K. J (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. Medchemcomm, 7(1), 11-27.

Grössner-Schreiber B., Teichmann, J., Hannig, M., Dörfer, C., Wenderoth, D. F., Ott, S. J (2009). Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. Clin Oral Implants Res, 2009;20:817-26.

Green, J. M. y Beestman. G. B. (2007). Recently patented and commercialized formulation and adjuvant technology. Crop Protection, 26(3), 320-327.

Guigón- López, C. G. y González P. A. G.(2001). Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum, L.*) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 19(1), 49-56.

Hamed, A. A., Kabary, H., Khedr, M., y Emam, A. N (2020). Antibiofilm, antimicrobial and cytotoxic activity of extracellular green-synthesized silver nanoparticles by two marine-derived actinomycete, RSC Advances, 10(17), 10361-10367.

Han, H., Xiao, H., Lu, Z. (2016). Short-term toxicity assessments of an antibiotic metabolite in Wistar rats and its metabonomics analysis by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Toxicology and applied pharmacology, 293, 1-9.

Hook AL., Chang, C. Y., Yang, J., Atkinson, S., Langer, R., Anderson, D. G., Alexander, M. R. (2013). Discovery of novel materials with broad resistance to bacterial attachment using combinatorial polymer microarrays. Adv Mater, 25:2542-7.

Jamshidzadeh, A., Heidari, R., Mohammadi-Samani, S., Azarpira, N., Najbi, A., Jahani, P., Abdoli, N. (2015). A comparison between the nephrotoxic profile of gentamicin and gentamicin nanoparticles in mice. Journal of biochemical and molecular toxicology, 29(2), 57-62.

Khan, M. A., Zhao, Y. F., Korban, S. S. (2012). Molecular mechanisms of pathogenesis and resistance to the bacterial pathogen *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease in Rosaceae. Plant Molecular Biology Reporter, 30(2), 247-260.

Koczan JM., McGrath, M. J., Zhao, Y., Sundin, G. W (2009). Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. Phytopathology, 99:1237–1244.

Kolozsvári-Nagy., Király, L., Schwarczinger, I (2012). Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. Central European Journal of Biology, *7*(1), 1-12.

Kummrow, A, Frankowski, M., Bock, N., Werner, C., Dziekan, T., y Nuekammer, J. (2013). Quantitative Assessment of Cell Viability Based on Flow Cytometry and Microscopy. Cytometry A., 83(2), 197-204.

Lamichhane, J. R ., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., & Aubertot, J. N. (2016). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. Agronomy for Sustainable Development, 38(3), 1-18.

Lerma, L. L., Benomar, N., Muñoz, M. D. C. C., Gálvez, A., Abriouel, H. (2015). Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas spp*. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. Food Microbiol, 51:33-44.

Liu, Y., He, X., Fu, Y., y Dionysiou, D. D (2016). Inetics and mechanism investigation on the destruction of oxytetracycline by UV-254 nm activation of persulfate. Journal of Hazardous Materials, 305, 229-239.

Malnoy M., Martens, S., Norelli, J. L., Barny, M. A., Sundin, G. W., Smits, T. H., Duffy, B (2010). Fire blight: applied genomic insights of the pathogen and host. Annu Rev Phytopathol , 50:475– 494.

Mann, R. A., Smits, T. H., Bühlmann, A., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J. E., Rodoni, B. (2013). Comparative genomics of 12 strains of *Erwinia amylovora* identifies a pan-genome with a large conserved core. PloS one, 8(2).

Mannan, M. I. (2020). Antibacterial activity of oxytetracycline on microbial ecology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) gastrointestinal tract under laboratory condition. Aquaculture Research, 51(5), 2125-2133.

Martin–Mex., Cauich-Rejón., Montejo-Canúl., Quijano–Ramayo (2017). Hongos fitopatógenos asociados a enfermedades en orquídeas cultivadas en la península de Yucatán. Desde El Herbario CICY, 208(9), 203-208., 208(9), 203-208.

McGhee, G. C., y Sundin, G. W. (2012). *Erwinia amylovora* CRISPR elements provide new tools for evaluatin strain diversity and for microbial source tracking. PLos one 7:e41706.

Medini D., Donati, C., Tettelin, H., Masignani, V y Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. Curr Opin Genet Dev, 15: 589–594.

Ordax, M., Biosca, E. G., López, M. M., Marco-Noales, E. (2012). Improved recovery of Erwinia amylovora-stressed cells from pome fruit on RESC, a simple, rapid and differential medium. *Trees*, 26(1), 83-93.

Ortega-Peña, S y Franco-Cendejas, R (2014). Importancia médica del biofilm de *Staphylococcus epidermidis* en las infecciones de prótesis articular. Invest Discap, 3:106-13.

Le Roux, P. M., Flachowsky, H., Hanke, M. V., Gessler, C., Patocchi, A (2012). Use of a transgenic early flowering approach in apple (Malus 3 domestica Borkh.) to introgress fire blight resistance from cultivar Evereste. Mol Breedin, 30, 857–874.

Qin X., Sun, Q., Yang, B., Pan, X., He, Y., Yang, H. (2017). Quorum sensing influences phage infection efficiency via affecting cell population and physiological state. J Basic Microbio*l*, 57:162-70.

Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., Gade, A. K. (2012). Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. Journal of applied microbiology, 112(5), 841-852.

Rajasekaran, P., y Crich, D. (2020). Synthesis of Gentamicin Minor Components: Gentamicin B1 and Gentamicin X2. Organic letters, 22(10), 3850-3854.

Romo Chacón, A., Berlanga Reyes, D.I.,Guerrero Prieto, V.M., Martinez Campos, R., Romero Gomez, S., y Ramirez Legarreta M.R. (2011). Manejo de con Aceite Esencial de Orégano y Estudio de Resistencia a Estreptomicina en Arboles de Manzano cv. Golden Delicious. Revista Mexicana de Fitopatología, 119-132.

Santander, R. D., y Biosca, E. G (2017). *Erwinia amylovora* psychrotrophic adaptations: evidence of pathogenic potential and survival at temperate and low

environmental temperatures. peerj5:e3931; DOI 10.7717/peerj.3931. Obtenido de https://peerj.com/articles/3931.pdf.

Salem W., Leitner, D. R., Zingl, F. G., Schratter, G., Prassl, R., Goessler, W., Schild, S (2015). Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxic *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol. Elsevier GmbH., 305(1):85-95.

Sebaihia, M., Bocsanczy, A. M., Biehl, B. S., Quail, M. A., Perna, N. T., Glasner, J. D., Beer, S. V. (2010). Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. Journal of bacteriology, 192(7), 2020-2021.

Sinha, R., Karan, R., Sinha, A., Khare, S. K. (2011). Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. Bioresource technology, 102(2), 1516-1520.

Stockwell, V. O., y Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties, 31(1).

Van der Zwet, T., Orolaza-Halbrendt, N., y Zeller, W. (2012). Fire blight, history, biology and management. (421 pp). St. Paul, MN: APS Press.

Vrancken, K., Holtappels, M., Schoofs, H., Deckers, T., Valcke, R. (2013). Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art . Microbiology, 159, 823–832.

Zounková, R., Klimešová, Z., Nepejchalová, L., Hilscherová, K., Bláha, L. (2011). Complex evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of antimicrobials oxytetracycline and flumequine used in aquaculture. Environmental Toxicology and Chemistry, 30(5), 1184-1189.