

## Efecto del agua electrolizada sobre *Pseudomonas syringae* pv. Tomato en condiciones *in vitro*

Lilia Mexicano-Santoyo<sup>1</sup>

Tarsicio Medina-Saavedra<sup>2,5</sup>

Mariano Mendoza-Elos<sup>1</sup>

Alejandra Chacón-López<sup>3</sup>

Adriana Mexicano-Santoyo<sup>4</sup>

Ulises Miguel López-García<sup>3</sup>

1 División de estudios de Posgrado e Investigación-Instituto Tecnológico de Roque. Carretera Celaya-Juven- tino Rosas km 8, Celaya, Guanajuato. AP. 508, CP. 38110. (mendoza66@hotmail.com; Lilia- lasalle@hotmail.com).

2 Departamento de Ingeniería Agroindustrial-Universidad de Guanajuato. Privada Arteaga s/n, Col. Centro, Salvatierra, Guanajuato. CP. 38900.

3 División de Posgrado e investigación-Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico núm. 2595, Col. Lagos del Country, Tepic, Nayarit, México. CP. 63175. (alei.chacon@gmail.com; ulopez@tepic.tecnm.mx).

4 División de estudios de Posgrado-Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria. Boulevard Emilio Portes Gil núm. Ciudad Victoria, Tamaulipas, México 1301 Pte. AP. 175, CP. 87010. (mexicanoa@gmail.com).

Autor para correspondencia: tarsicioms@hotmail.com.

### Resumen

*Pseudomonas syringae* pv. Tomato causa la peca bacteriana en el cultivo de tomate, provocando retraso en el crecimiento, maduración tardía en los frutos y pérdidas en el rendimiento. Para el control de este fitopatógeno se utilizan plaguicidas, los cuales se ha reportado que son una fuente de contaminación del suelo. Debido a que el uso de plaguicidas ha incrementado y con ello el impacto negativo, es necesario buscar alternativas eficientes y amigables con el medio ambiente. El agua electrolizada es una alternativa al uso de plaguicidas ya que ha mostrado tener efecto antimicrobiano. Es producida por electrólisis de soluciones diluidas de NaCl en una celda de electrólisis. En el presente trabajo se evaluó el efecto del agua electrolizada ácida (AEA) y alcalina (AEB) en cultivos de PstDC3000. El experimento se realizó en el laboratorio de Agrobiotecnología y Electroquímica perteneciente al Instituto Tecnológico de Tepic en el año 2020. Se aplicaron tratamientos con AEA y AEB al minuto 1, 3 y 6. Los resultados muestran la inhibición total de PstDC3000 con el tratamiento de AEA al minuto 1. Por otra parte, el tratamiento con AEB, logró disminuir 26.9%, 42.16% y 58.53 % UFC ml<sup>-1</sup> al minuto 1, 3 y 6, respectivamente. Finalmente, se concluye que el agua electrolizada afecta el crecimiento de PstDC3000 y que el pH es un factor que influye en su actividad bactericida.

### Palabras clave:

agua ácida, agua alcalina, antibacteriano.



License (open-access): Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia **Creative Commons**

*Pseudomonas syringae* pv. Tomato (PstDC3000) infecta las plantas de tomate y *Arabidopsis thaliana* (Cunnac *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2003). En el cultivo de tomate, causa la enfermedad de la peca bacteriana. Aunque es un epifito débil, es un patógeno altamente agresivo una vez que se encuentra dentro de los tejidos del huésped (Xin y He, 2013). Esta bacteria sobrevive de manera epífita en las hojas, se puede encontrar en restos vegetales en el suelo y en las semillas secas y se activa durante la germinación (Beuzón y Ruiz, 2014). La bacteria entra en la planta a través de las estomas o por heridas, multiplicándose endofíticamente y asintóticamente antes de desarrollar síntomas (Preston, 2000).

Además, PstDC3000 puede causar retraso en el crecimiento, maduración tardía en los frutos y pérdidas en el rendimiento, principalmente en plantas jóvenes infectadas (Preston, 2000). Debido al daño que causa la bacteria, el control de la enfermedad que provoca es de suma importancia. Para el control de enfermedades por fitopatógenos, en la agricultura se utilizan plaguicidas (SAGARPA, 2011), los cuales se ha reportado que son una fuente de contaminación del suelo y provocan su degradación (Sanaullah *et al.*, 2020).

Debido a que el uso de plaguicidas ha incrementado y con ello el impacto negativo en los ecosistemas (Abhilash y Singh, 2009) y en la salud humana (Gomiero, 2018), es necesario buscar alternativas eficientes y amigables con el medio ambiente. El agua electrolizada es una alternativa al uso de plaguicidas que ha mostrado tener efecto antimicrobiano en bacterias y hongos (Rahman *et al.*, 2016). Es producida por electrólisis de soluciones diluidas de NaCl en una celda de electrólisis, constituida por dos electrodos (ánodo y cátodo) y divididos por una membrana diafragmática (Fujiwara *et al.*, 2009; Ovissipour *et al.*, 2015).

Al final del proceso de electrólisis se obtiene agua electrolizada ácida en la parte anódica (Pangloli y Hung, 2011) con un pH de 2-3 y una concentración de cloro libre de 10-90 ppm (Hao *et al.*, 2011) y agua electrolizada alcalina en la parte catódica (Shiroodi y Ovissipour, 2018) con un pH de 10-13 (Huang *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2011). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del agua electrolizada ácida y alcalina en la reducción de las poblaciones bacterianas de PstDC3000 bajo condiciones *in vitro*.

El experimento se realizó en el laboratorio de Agrobiotecnología y Electroquímica perteneciente al Instituto Tecnológico de Tepic en los meses de agosto a diciembre del año 2020.

## Obtención de agua electrolizada

El agua electrolizada utilizada en este estudio fue el agua electrolizada ácida y agua electrolizada alcalina, las cuales fueron generadas mediante un equipo LeveLuck SD501 modelo TYH-401. El pH de los dos tipos de agua electrolizada obtenida se determinó con un potenciómetro LAQUA-PC 1100 HORIBA Advanced Techno Co., Ltd. y la concentración de cloro libre (CCL) se determinó mediante un colorímetro marca HANNA modelo HI771.

## Cepa bacteriana y obtención de la suspensión bacteriana

La cepa de *Pseudomonas syringae* pv. Tomato PstDC3000 utilizada en este estudio fue obtenida del Instituto Tecnológico de Tepic. La cepa fue reactivada en medio sólido KB e incubada a 28°C durante 24 horas utilizando una incubadora marca Benchmark modelo Incu-Shaker 10LR. Para la obtención de la suspensión bacteriana se inocularon 50 ml de medio de cultivo líquido KB y se incubó a 28°C durante 24 h a 180 rpm para obtener un preinóculo. A partir del preinóculo se inocularon 50 ml de medio KB a una  $DO_{600} = 0.05$ , se incubó a una temperatura de 28°C a 180 rpm por 24 horas.

Terminado el tiempo de incubación se tomaron 10 ml del medio de cultivo y se centrifugaron a 22°C a 7 000 rpm durante 15 min utilizando una centrífuga marca Sigma modelo 2-16KL. Se decantó el sobrenadante y a la pastilla celular fue resuspendida en 10 ml de agua desionizada estéril. Se centrifugó a 22°C a 7 000 rpm durante 15 min. Finalmente, la pastilla celular fue resuspendida el 10 ml de agua desionizada estéril.

## Tratamientos con agua electrolizada ácida y alcalina

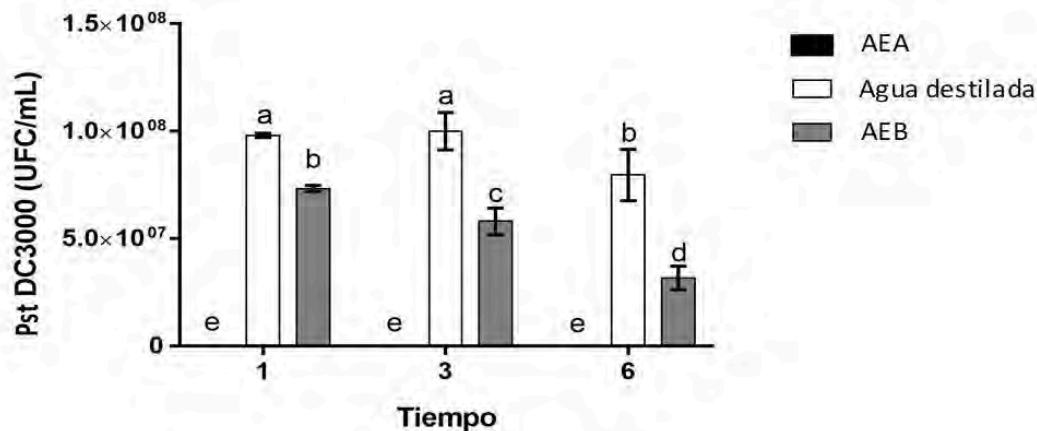
Para la aplicación de los tratamientos se utilizó el protocolo sugerido por Ovissipour *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Los tratamientos aplicados fueron agua electrolizada ácida, agua electrolizada alcalina y como control se utilizó agua destilada estéril. Primeramente, se colocaron 2 ml de la suspensión bacteriana en un tubo Falcón de 50 ml y se adicionaron 38 ml de agua electrolizada durante 1, 3 y 6 min a temperatura ambiente.

Terminado cada uno de los tiempos de tratamientos, se tomó 1 ml de la suspensión tratada y se adicionaron 1 ml de solución de NaCl al 0.85% y 1 ml de una solución de tiosulfato de sodio al 3%. En el caso del control, solo se adicionó 1 ml de NaCl al 0.85% y se homogenizó. Se tomaron 100  $\mu$ l de las suspensiones tratadas y se realizaron diluciones en serie ( $10^0$  -  $10^6$ ). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l de cada dilución y se inocularon cajas Petri que contenían medio sólido KB y se incubaron a 28°C durante 48 h (cada uno de los tiempos de tratamiento se realizó por triplicado).

Terminado el tiempo de incubación se procedió realizar el conteo en placa y se calcularon las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC  $\text{ml}^{-1}$ ). Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA con un  $\alpha = 0.05$ , seguida de una prueba de Tukey para la comparación de medias entre los tratamientos utilizando el software GraphPad Prism 7.

Los tratamientos con agua electrolizada se realizaron utilizando agua electrolizada ácida (AEA) con  $\text{pH} = 2.4$  y una concentración de cloro libre (CCL) de  $18 \pm 0.58$  ppm y agua electrolizada alcalina (AEB) con  $\text{pH} = 10.2$  y  $\text{CCL} = 0 \pm 0$  ppm. Como control se utilizó agua destilada estéril ( $\text{pH} = 8.8$  y  $\text{CCL} = 0 \pm 0$ ). Los resultados de las células sobrevivientes de PstDC3000 después de la aplicación de los tratamientos se muestran en la Figura 1.

Figura 1. Células sobrevivientes de PstDC3000 tratadas con agua electrolizada ácida (AEA) y agua electrolizada alcalina (AEB).



En la Figura 1 se puede observar que hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). Al aplicar el tratamiento con AEA se logró el 100% de la reducción de las poblaciones de PstDC3000 en un tiempo de tratamiento de 1 min, en comparación con el control de agua destilada estéril ( $9.8 \times 10^7$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ), además, como se observa, no hubo diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tiempos de tratamiento con AEA ( $p > 0.05$ ).

En un estudio realizado por Al-Qadiri *et al.* (2016) al aplicar agua electrolizada con una CCL= 60 y 120 ppm reportan que al incrementar el tiempo de tratamiento de 1 a 5 min y la concentración de cloro libre del agua electrolizada, se incrementa la reducción en el número de microorganismos.

En el presente estudio no se observó ese efecto ya que al aplicar AEA con CCL=  $18 \pm 0.58$  ppm se logró la reducción del 100%.

Sin embargo, este efecto se observó al aplicar AEB (CCL= 0 ppm), ya que al minuto 1 se logró una reducción bacteriana del 26.9% en comparación con el control y esta reducción de microorganismos incremento con el tiempo de tratamiento a 58.53% observando diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tiempos de tratamiento con AEB ( $P < 0.05$ ).

Hao *et al.* (2016) reportaron que el AEA (CCL= $60.43 \pm 0.34$  ppm) y el agua electrolizada ligeramente ácida (CCL=  $25.27 \pm 0.38$  ppm) pueden tener una eficiencia antibacteriana equivalente; sin embargo, al diluirlas la eficiencia del AEA es menor en comparación con el agua electrolizada ligeramente ácida, sugiriendo que la concentración de cloro libre no es el principal factor que contribuye a la actividad antibacteriana del agua electrolizada.

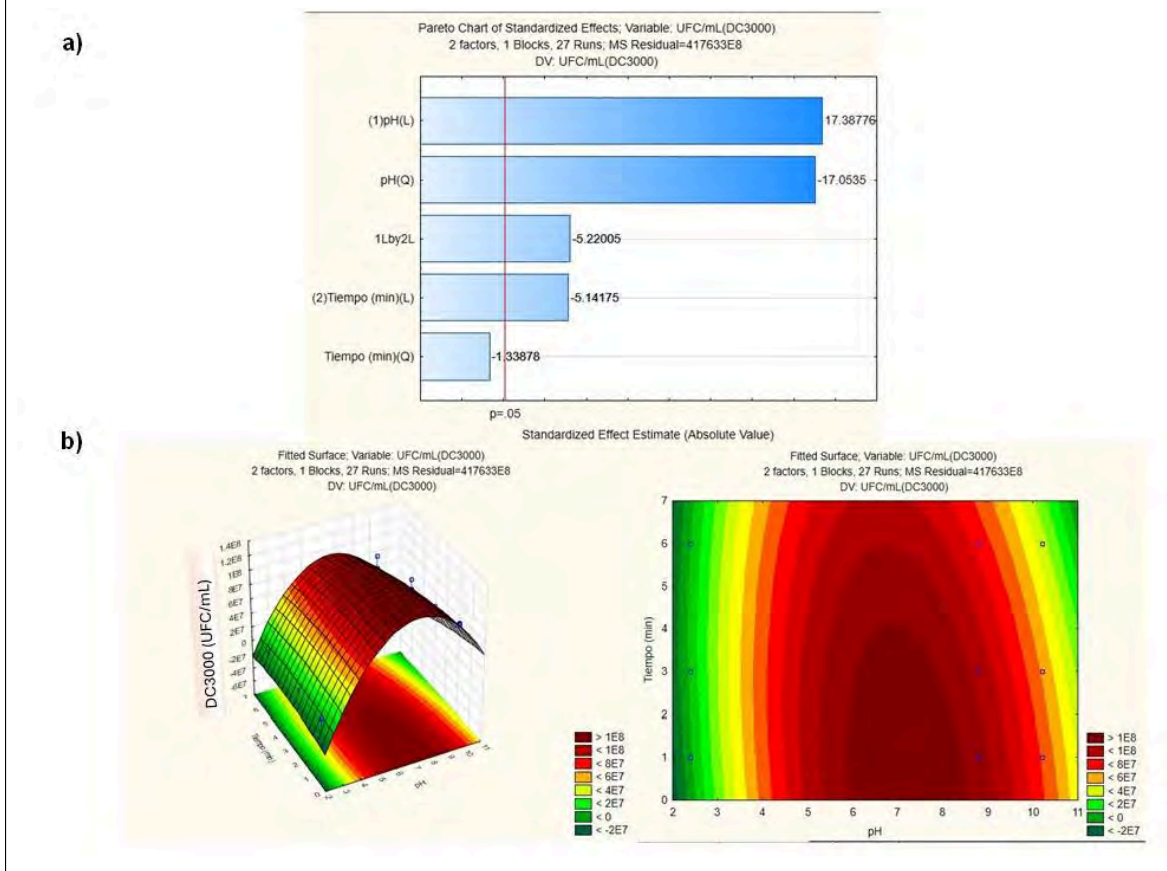
En este sentido y de acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que la concentración de cloro no es el factor principal en la reducción de las poblaciones bacterianas ya que se logró reducir las poblaciones bacterianas con los dos tipos de agua. Por otra parte, se observó que el tiempo de tratamiento al aplicar AEA, no es un factor que influya en la actividad bactericida, pero si tuvo influencia con el tratamiento de AEB, lo que sugiere que el pH es el factor que más influyó ya que al aplicar AEA (pH= 2.4) se logró una inhibición del 100% de las poblaciones bacterianas en comparación de AEB (pH= 10.2) y el tratamiento control (pH = 8.8).

## Efecto del pH en la eficiencia bactericida del agua electrolizada

Para determinar si el pH del agua electrolizada ácida o alcalina ejerce algún efecto sobre la capacidad del agua electrolizada para reducir el número de microorganismos, se generó el diagrama de Pareto y la superficie de respuesta evaluando las variables tiempo y pH del agua electrolizada. En la Figura 2a se presenta el diagrama de Pareto que muestra que tanto el pH del agua electrolizada como el tiempo de tratamiento, influyen sobre el crecimiento de PstDC3000 ( $p < 0.05$ ) y que el factor pH es el factor que más efecto tiene.



Figura 2. a) diagrama de Pareto del efecto de las variables tiempo, pH o tipo de agua y sus interacciones y b) superficie de respuesta del crecimiento de PstDC3000.



En la Figura 2b se presenta la superficie de respuesta, donde se muestra que a un valor de pH de 2.4, correspondiente a AEA, se logra eliminar completamente a las poblaciones PstDC3000 en un minuto tratamiento y a un valor de pH de 10.2 se logra una reducción de 26.9%, 42.16% y 58.53% UFC ml en un tiempo de tratamiento de 1, 3 y 6 min, respectivamente.

Sun *et al.* (2012) reportaron una reducción del 95% de las poblaciones de *S. aureus* en un tiempo de tratamiento de 2 min al aplicar AEA con pH de 2.5. Un efecto similar fue observado en el presente estudio, donde se observó una reducción del 100% al aplicar AEA con pH= 2.4 en un tiempo de tratamiento de 1 min. Sin embargo, los autores reportan que AEB es menos eficiente en la reducción del número de bacterias.

En el presente estudio se observó que el AEB, efectivamente, es menos eficiente que el AEA; sin embargo, con un tiempo de tratamiento de 5 min, se logró reducir hasta un 58.53%. Por otra parte, en un estudio realizado por Issa-Zacharia *et al.* (2010) reportaron una mayor reducción de *E. coli*, *Salmonella spp* y *S. aureus* al aplicar tratamientos con AEA (pH= 2.6) en comparación con agua ligeramente ácida con pH de 5.6 y una solución de NaClO con pH de 9.1.

Rahman *et al.* (2016) comentan que las bacterias crecen en un rango de pH de 4-9. También comentan que la actividad antimicrobiana del agua electrolizada depende de su pH y que este valor determina las especies de cloro disponibles en esta, además de que un pH bajo reduce el crecimiento microbiano debido a que hace a las células bacterianas más sensibles al cloro activo.

En el presente estudio se aplicó un tratamiento de AEA con pH de 2.4 y se obtuvo una mayor reducción en comparación con el tratamiento de AEB (pH= 10.2) y el control (pH= 8.8), sugiriendo que a pH bajo (por debajo de 4) se logra afectar el crecimiento bacteriano. Además de que el pH junto con las concentraciones de cloro libre presentes en AEA pudieron haber ejercido un efecto sinérgico en la reducción de las poblaciones bacterianas.



## Conclusiones

El agua electrolizada ácida y alcalina poseen actividad antibacteriana ya que los dos tipos de agua afectaron el crecimiento de PstDC3000. Sin embargo, aunque AEB mostró tener efecto antimicrobiano, este fue menor en comparación con el observado con AEA por lo que es necesario incrementar el tiempo de tratamiento para reducir el número de microorganismos. Por otra parte, los factores pH y tiempo de tratamiento contribuyeron en la reducción bacteriana, siendo el pH el factor que más influyó en su actividad antimicrobiana.

## Bibliografía

- 1 Abhilash, P. C. y Singh, N. 2009. Pesticide use and application: an Indian scenario. *Journal of Hazardous Materials*. 165(1):1-12. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.10.061.
- 2 Al-Qadiri, H. M.; Al-Holy, M. A.; Shiroodi, S. G.; Ovissipour, M.; Govindan, B. N.; Al-Alami, N. and Rasco, B. 2016. Effect of acidic electrolyzed water-induced bacterial inhibition and injury in live clam (*Venerupis philippinarum*) and mussel (*Mytilus edulis*). *International Journal of Food Microbiology*. 23:48-53. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.012.
- 3 Beuzón, C. R. y Ruiz-Albert, J. 2014. Sistema de secreción tipo III en la interacción de *Pseudomonas syringae* con la planta. *Microbiología Molecular*. 60(58):130-132.
- 4 Cunnac, S.; Lindeberg, M. and Collmer, A. 2009. *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: Repertoires in search of functions. *Current Opinion in Microbiology*. 12(1):53-60. Doi: 10.1016/j.mib.2008.12.003.
- 5 Fujiwara, K.; Fujii, T. and Park, J. S. 2009. Comparison of foliar spray efficacy of electrolytically ozonated water and acidic electrolyzed oxidizing water for controlling powdery mildew infection on cucumber leaves. *Ozone: Science & Engineering*. 31(1):10-14. Doi: 10.1080/01919510802587358.
- 6 Gomiero, T. 2018. Food quality assessment in organic vs. conventional agricultural produce: Findings and issues. *Applied Soil Ecology*. 123(12):714-728. Doi: 10.1016/j.apsoil.2017.10.014.
- 7 Hao, J.; Wuyundalai, L. H.; Chen, T.; Zhou, Y.; Su, Y. and Li, L. 2011. Reduction of pesticide residues on fresh vegetables with electrolyzed water treatment. *Journal of Food Science*. 76(4):C520-C524. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02154.x.
- 8 Huang, Y R.; Hung, Y. C.; Hsu, S. Y.; Huang, Y. W. and Hwang, D. F. 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control*. 19(4):329-345. Doi: 10.1016/j.foodcont.2007.08.012.
- 9 Issa-Zacharia, A.; Kamitani, Y.; Tiisekwa, A.; Morita, K. and Iwasaki, K. 2010. *In vitro* inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. using slightly acidic electrolyzed water. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110(3):308-313. Doi:10.1016/j.jbiosc.2010.03.012.
- 10 Ovissipour, M.; Al-Qadiri, H. M.; Sablani, S. S.; Govindan, B. N.; Al-Alami, N. and Rasco, B. 2015. Efficacy of acidic and alkaline electrolyzed water for inactivating *Escherichia coli* O104:H4, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio parahaemolyticus* in cell suspensions. *Food Control*. 53:117-123. Doi: 10.1016/j.foodcont.2015.01.006.
- 11 Pangloli, P. and Hung, Y. C. 2011. Efficacy of slightly acidic electrolyzed water in killing or reducing *Escherichia coli* O157:H7 on iceberg lettuce and tomatoes under simulated food

- service operation conditions. *Journal of Food Science*. 76(6):M361-M366. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02219.x.
- 12 Preston, G. M. 2000. *Pseudomonas syringae* pv. Tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular Plant Pathology*. 1(5):263-275.
  - 13 Rahman, S. M. E.; Khan, I. and Oh, D. H. 2016. Electrolyzed water as a novel sanitizer in the food industry: current trends and future perspective. *Compr. Reviews in Food Science and Food Safety*. 15(3):471-490.
  - 14 SAGARPA, 2011. Enfermedades fúngicas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. Folleto técnico núm. 19. 12-66 pp. ISBN: 978-607-425-720-5.
  - 15 Sanaulah, M.; Usman, M.; Wakeel, A.; Cheema, S. A.; Ashraf, I. and Farooq, M. 2020. Terrestrial ecosystem functioning affected by agricultural management systems: a review. *Soil and Tillage Research*. 196:1-11. Doi:10.1016/j.still.2019.104464.
  - 16 Shirooti, S. G. and Ovissipour, M. 2018. Electrolyzed water application in fresh produce sanitation. *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*. 67-89 pp. Doi: 10.1016/b978-0-12-812698-1.00003-0.
  - 17 Sun, J. L.; Zhang, S. K.; Chen, J. Y.; and Han, B. Z. 2012. Efficacy of acidic and basic electrolyzed water in eradicating staphylococcus aureus biofilm. *Canadian Journal of Microbiology*. 58(4):448-454. Doi: 10.1139/w2012-005.
  - 18 Xin, X. F. and He, S. Y. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology*. 51:473-498. Doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102321.
  - 19 Zhao, Y.; Thilmony, R.; Bender, C. L.; Schaller, A.; He, S. Y. and Howe, G. A. 2003. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. Tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *The Plant Journal*. 36(4):485-499. Doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01895.x.



## Efecto del agua electrolizada sobre *Pseudomonas syringae* pv. Tomato en condiciones *in vitro*

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 July 2024
Date accepted: 01 August 2024
Publication date: 13 December 2024
Publication date: Oct-Nov 2024
Volume: 15
Issue: 7
Electronic Location Identifier: e3175
DOI: 10.29312/remexca.v15i7.3175

### Categories

Subject: Nota de investigación

### Palabras clave:

**Palabras clave:**

agua ácida  
agua alcalina  
antibacteriano

### Counts

Figures: 2  
Tables: 0  
Equations: 0  
References: 19  
Pages: 0