

## Factores etiológicos y epidemiológicos de la tuberculosis del olivo. (\*)

por

Pedro Romero Raya

El trabajo se encuentra dividido en siete capítulos. El primero de ellos a modo de INTRODUCCION es el que se trata: de las sinomias del agente causal de la tuberculosis del olivo *Pseudomonas savastanoi* SMITH-STEVENSON 1913; de las características descritas para dicho germen en los principales Manuales de Microbiología, tales como el Bergey y el Charlotte, aspecto interesante, pues se ha pretendido conocer mejor este germen con objeto de simplificar su identificación y posible tratamiento de la enfermedad. También se describen las características de la infección, situación de los microorganismos en los tumores, propagación de la enfermedad, distribución geográfica de la misma y medios de lucha empleados hasta el momento.

Objetos del trabajo:

1.º Aislar el germen causal de la tuberculosis del olivo *Pseudomonas savastanoi* de:

- a) Tumores del olivo.
- b) Mosca del olivo (*Dacus oleae* Rossi) y larva de la misma.
- c) Aceitunas infectadas por la mosca.

2.º Estudio de las propiedades bioquímicas y serológicas de las cepas aisladas para comprobar si se trata de un solo tipo bacteriológico o por el contrario existen diferencias entre los distintos orígenes. Asimismo compararemos nuestros resultados con los publicados por diversos autores.

3.º Determinación del poder patógeno experimental sobre diversas plantas.

(\*) Extracto de la tesis doctoral de don Pedro Romero Raya, dirigida por el Prof. Dr. Vicente Callao Fábregat — Granada 1966.

Este trabajo ha sido realizado mediante una beca de INICIACION a la Investigación para Post graduados otorgada por el P. I. O.



4.º) Aspecto epidemiológico de la enfermedad.

### METODICA

En el segundo capítulo se expone el "MATERIAL Y METODOS" que se han empleado en el trabajo experimental. Aquí se indica los medios de cultivo (en número de 28) de distinta naturaleza que hemos utilizado y la técnica seguida para aislar el *Ps. savastanoi* de los tumores producidos por el germen en el olivo, de las aceitunas infectadas, larva y mosca del olivo.

También se indica el lugar de procedencia y la fecha de recogida de las 136 muestras de tumores utilizados en nuestro trabajo, así como el origen de las moscas y aceitunas infectadas (en número de 14 y 25, respectivamente) que hemos ensayado.

A continuación y siguiendo el orden en que se ha escrito la tesis, figuran las "TECNICAS DE IDENTIFICACION" que están divididas en dos capítulos: Pruebas bioquímicas y Pruebas serológicas.

Entre las primeras hemos realizado:

Oxidación y fermentación de los siguientes azúcares:

Glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa, salicina y D-manita.

Hidrólisis de la esculina, hidrólisis del almidón, formación de indol, ácido acético, acetil-metil carbinol; utilización de los citratos como única fuente de carbono.

Utilización de los ácidos orgánicos cítrico al 1 %, malónico al 1 %, benzoico al 0'3 %.

Producción de catalasa, reducción de los nitratos a nitritos, formación de gases a partir de los nitratos.

Licuefacción de la gelatina, actuación sobre el medio de leche simple, sobre leche tornasolada y sobre leche artificial (Medio de Beltrá R.).

Formación de sulfídrico, hidrólisis de la urea, utilización de DL-alanina, DL-serina y DL-metionina.

Prueba de Hugh y Leifson o prueba O-F.

Actuación sobre el lactato cálcico y oxidación del gluconato potásico.

Formación de pigmentos.

Entre las "reacciones serológicas" se han realizado aglutinaciones de orientación con cada una de nuestras cepas frente a dos sueros por nosotros obtenidos; uno con la cepa *Ps. savastanoi* "M" y otro con la cepa *Ps. savastanoi* "69". (1).

También se ha realizado la producción de sueros monoespecíficos mediante la saturación de aglutininas del suero obtenido con el *Ps. savastanoi* "M" frente al *Ps. savastanoi* "F" según la técnica usual.

A continuación de nuestro trabajo, se expone la investigación del "PODER PATOGENO EXPERIMENTAL" de cada cepa para el tallo de *Solanum lycopersicum* y *Phaseolus vulgaris*, resultando en ambos casos una sintomatología característica y evidente.

(1) Hemos recibido dos cepas tipo de *Pseudomonas savastanoi*: N.º=OS-6071, denominada por nosotros *Ps. savastanoi* "F" remitida por el "Centre National de Recherches Agronomiques, Station Centrale de Pathologie Vegetal, París", y otra denominada *Ps. savastanoi* "M" enviada por la Dra. R. Beltrá, del Instituto Jaime Ferrán de Madrid, que a su vez le fue remitida de la "National Collection of plant pathogen. Botany School". University of Cambridge, por el Prof. W. J. Dowson.



Respecto al "ESPECTRO ANTI-BIOTICO" de nuestras cepas se ha realizado frente a los antibióticos que a continuación se enumeran :

Clorotetraciclina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Eritromicina, Dihidroestreptomicina, Oxitetraciclina, Kanamicina, Oleandromicina, Oxacilina, Penicilina, Colimicina y Novobiocina.

Los resultados obtenidos en las distintas experiencias (ver tesis doctoral), serán objeto de sucesivas publicaciones, de ahí que nos limitamos en este trabajo a incluirlas en las conclusiones finales.

En el capítulo tercero se indican los RESULTADOS obtenidos en las pruebas bioquímicas que anteriormente hemos expuesto y que también se resumen en las conclusiones finales.

En el capítulo IV consideramos las características que corresponden al *Ps. savastanoi* que son :

Características morfológicas y fisiológicas :

Bacilos de 0'4-0'8 por 1'2-3'3 micras, de extremos redondeados, aislados, agrupados en parejas o en cadenas cortas. Móvil por 1-4 flagelos polares Gram negativos. Aerobios y formadores de gran cantidad de catalasa.

Colonia en agar extracto de carne : pequeña, lisa, brillante, de borde entero, no confluentes, convexas, ligeramente acuminadas, blancas y de fácil suspensión en los medios líquidos. Análogas características se observan en agar judía-verde.

El crecimiento masivo en tubos de agar judía-verde inclinado presenta un aspecto blanco cremoso muy característico.

En medios líquidos producen la mayoría de las veces enturbiamiento homogéneo.

En leche forma un pigmento amarillo ligeramente verdoso, soluble en grasa que se encuentra en la superficie del medio.

Características bioquímicas :

Actúan sobre la glucosa produciendo ácidos (vía oxidativa). Nunca forman gases sobre la sacarosa y la galactosa, generalmente no actúan, aunque algunas cepas producen solo ácido de los citados azúcares.

Sobre los demás monosacáridos y disacáridos no ejercen una acción marcada.

Hidrólisis del almidón positiva.

Descomposición de la esculina positiva.

Las reacciones del Indol, Rojo de Metilo y Voges Proskauer son negativas.

Crecen en un medio con citrato sódico como única fuente de carbono.

Producen alcalinización de los medios con ácido cítrico, ácido malónico, alanina y serina. Con metionina se comporta irregularmente alcalinizando o no según la estirpe.

Catalasa positivo.

Nitritos negativo.

No forma ácido sulfídrico, ni descompone la urea.

Gelatina no licuada.

Coloración parda en el medio de patata ordinaria.

Crecimiento en el medio de cultivo que posee como fuente de carbono exclusivamente vaselina líquida.

No forman gases de los azúcares ni sobre las proteínas.



Antigéticamente existen por lo menos dos razas completamente distintas.

Patógeno para diversas plantas, siendo recomendable para trabajos de laboratorio la inoculación en tallo de *Phaseolus vulgaris*.

Resistencia a los antibióticos acusada y especialmente sensible a la Kanamicina.

Temperaturas: máxima=35° C.  
 óptima=25-26° C.  
 mínima=12° C.

Punto término mortal: 43-46° C. en treinta minutos.

#### CONSIDERACIONES EPIDEMIOLOGICAS DE LA TUBERCULOSIS DEL OLIVO

Se ha comprobado que cuanto más fresco y jugoso es un tumor mayor es el grado de positividad en el aislamiento de *Pseudomonas savastanoi*. Por ello es aconsejable cuando se quiera aislar este germen dirigirse a aquellos tumores que están en sus primeros estadios de formación y rechazar todos aquellos que presentan un aspecto lignificado (cubierta fragmentada) que son los que se han formado en años anteriores.

Para la transmisión de la enfermedad es necesario "una puerta de entrada" para el germen, que la proporciona las inclemencias atmosféricas (lluvia, granizo, viento, etc.), heridas producidas durante la poda, vereo de la aceituna, etc.

Respecto al papel que la mosca del olivo puede tener en la propagación de la enfermedad tan solo diremos que en nuestras experiencias no hemos aislado cepa alguna cuyas características correspondan con las en-

contradas para el *Pseudomonas savastanoi* y que según diversos autores no juega papel alguno en la extensión de la infección.

En lo que se refiere a la distribución en nuestra Patria de la enfermedad, prácticamente se encuentra extendida por todo el territorio nacional.

En la lucha contra la enfermedad se han empleado diversos productos, tales como sublimado corrosivo al 1/1000, caldo bordelés, ácido fénico al 5-6 % y sulfato ferroso.

#### CONCLUSIONES

1.<sup>a</sup>—El *Pseudomonas savastanoi* se encuentra en los tumores frescos de la tuberculosis del olivo, aislándose en el cien por cien de los casos. En los tumores ya lignificados se aísla en muy pocos casos.

2.<sup>a</sup>—Siguiendo la técnica descrita no se ha logrado aislar *Ps. savastanoi* de la aceituna picada ni de la mosca del olivo (*Dacus oleae* Rossi).

3.<sup>a</sup>—Se considera de elección el agar-judía verde para el aislamiento del *Pseudomonas savastanoi* de los tumores de la tuberculosis del olivo.

4.<sup>a</sup>—El *Pseudomonas savastanoi* se desarrolla bien en un medio que contenga sales minerales y vaselina líquida como única fuente de carbono, por lo que consideramos podría servir para enriquecimiento cultural del germen en productos donde existe.

5.<sup>a</sup>—La esculina es descompuesta por el *Pseudomonas savastanoi* por todas las estirpes que hemos aislado.

6.<sup>a</sup>—Con la técnica utilizada se observa que el *Pseudomonas savastanoi* generalmente no acidifica los medios con sacarosa ni galactosa.



Este resultado contradice la descripción corriente del germen.

7.<sup>a</sup>—El *Pseudomonas savastanoi* es fuertemente catalasa positivo.

8.<sup>a</sup>—El *Pseudomonas savastanoi* en medio de leche no produce ninguna alteración y sí origina un pigmento amarillo verdoso soluble en la grasa.

9.<sup>a</sup>—El *Pseudomonas savastanoi* produce alcalinización en la leche tornasolada en la primera semana de incubación a 25° C., y reducción del mismo a las tres semanas.

10.<sup>a</sup>—Los medios de cultivo enriquecidos con ácido cítrico o ácido malónico son alcalinizados entre los 4 y 10 días de incubación.

11.<sup>a</sup>—Los medios de cultivo adicionados del 0'3 % de ácido benzoico presentan en el 56'66 % de los casos alcalinización tardía (2-3 semanas) y el 43'33 % de los mismos no presentan alteración debido a que dicha concentración de ácido benzoico impide el desarrollo del *Ps. savastanoi*.

12.<sup>a</sup>—Los medios de cultivo enriquecidos con alanina o serina son alcalinizados dentro de las primeras semanas. Cuando contiene metionina su comportamiento es irregular.

13.<sup>a</sup> Se han observado dos estirpes antigenéticas diferentes de *Pseudomonas savastanoi*.

14.<sup>a</sup>—El *Pseudomonas savastanoi* produce un tumor entre los 25-45 días después de su inoculación en el tallo de *Phaseolus vulgaris* por lo que debe emplearse dicha planta como elemento diagnóstico en su identificación y para la determinación del grado de virulencia. Se puede recuperar el germen puro de los tejidos infectados. (Fotografía 1).



FOTOGRAFIA 1

15.<sup>a</sup>—El *Pseudomonas savastanoi* inoculado en el tallo de *Solanum lycopersicum* produce entre los 25-60 días después de su inoculación una sintomatología característica, consistente en la formación desde el punto de inoculación, primero hacia el ápice de la planta y después hacia la raíz, de una serie de pequeños tumores que tienden a invadir todo el tallo. También se puede recuperar a partir de éstos el germen en cultivo.

16.<sup>a</sup>—El *Pseudomonas savastanoi* es muy sensible a la Kanamicina y algo menos a la dihidroestreptomicina. Insensible a la Novobiocilina, Oxacilina y Colimicina.

17.<sup>a</sup>—Hemos comprobado que el sulfato ferroso inhibe el crecimiento del *Pseudomonas savastanoi* "in vi-



tro", aumentando dicho poder antibacteriano con la concentración.

Pos último, los capítulos VI y VII exponen la BIBLIOGRAFIA y el testimonio gráfico de nuestras experiencias.

#### RESUMEN

En este trabajo describimos el aislamiento de 90 razas de *Pseudomonas savastanoi* de tumores de olivos que padecen tuberculosis. Habiendo sido sometidas a 34 pruebas bioquímicas diferentes se han escogido las más adecuadas para una segura y rápida identificación. Se ha realizado el espectro antibiótico, siendo la Kanamicina el que presenta la mayor actividad "in vitro".

El tallo de *Phaseolus vulgaris* es el elemento más adecuado para demostrar la virulencia del *Ps. savastanoi* en el laboratorio.

También se han indicado las características bacteriológicas y serológicas de las razas que han sido aisladas.

#### SUMMARY

In this work we describe the isolating of 90 strains of *Pseudomonas savastanoi* from

tumors of olive trees suffering, from tuberculosis. They have been submitted to 34 different biochemical tests choosing those more suitable for their rapid and sure identification. Their antibiotic sensitivity has been carried out "Kanamicine" being the most active agent against bacteria "in vitro".

The stem of *Phaseolus vulgaris* is a very good place to demonstrate the degree of virulence of *Ps. savastanoi* in the laboratory.

The bacteriological and serological characteristics of the strains isolated are also described.

\* \* \*

Esta tesis fue defendida el 9 de Julio de 1966 mereciendo la calificación de Sobresaliente "cum laude".

El tribunal estuvo constituido por los siguientes catedráticos:

Presidente:	Prof. Dr. Vicente Callao
Secretario:	Prof. Dr. Enrique Hernández
Vocales:	Prof. Dr. Luis Recalde
"	Prof. Dr. Rafael Ibáñez
"	Prof. Dr. Diego Guevara

#### BIBLIOGRAFIA

- SOLARI, A. A. DATO, AA. et Colab. (1962). "Use of selective enrichment medium for the isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from heces". *J. of Bacteriol.* 84, 190.
- BARRIT, M. H. (1963). "Reacción de Voges-Proskauer: Método Barrit". *J. Path and Bact.* 42,44.
- BELTRA, R. (1954). "Método selectivo para la identificación de bacterias fitopatógenas y en especial del *Pseudomonas savastanoi*". Tesis Doctoral. Madrid.
- BONNER, I., Galston, A. W. (1955). "Principios de Fisiología Vegetal". Págs. 346-47.
- BRISOU, J., TYSSET, C. et Colab. (1962). "Etude de cinquentesiy souche de *Pseudomonas Chromogens*". Bucetin de l'Association des Dplomes de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy. N.º 85. Págs. 19-20 et suites.
- D'OLIVEIRA, M.<sup>a</sup> LOURDES (1939). "Inoculacoes experimentais como *Bacterium savastanoi* var. *fraxinii* N. A. Brown". *Agronomia Lusitana*, Vol. I.
- DOWSON, W. J. (1939). "Manual of Bacterial Plant Disease". Págs. 10, 12, 36 y 81.
- ELLIOT, C.: (1951). "Manual of Bacterial Plant Pathogens". 2.<sup>a</sup> edición. Págs. 84 y 85.
- GABY, W. L., LOCAN, C. and WHITHAKER, S. (1962). "Catabolismo de los compuestos nitrogenados por los *Pseudomonas*". *J. Gen. Microbiol.* 28, 279-384.
- GAUMANN, E. (1954). "Toxinas y enfermedades de las plantas". 12, 52, 198.
- KELMAN, A. and SEQUEIRA, L. (1965). "Infección de raíz a raíz del *Pseudomonas solanacearum*". *Phytopathology*, 55, 304.



- KOLMER, A., SPAULDING, E. H. and ROBINSON, H. (1955). "Métodos de Laboratorio". Editorial Interamericana. Spain.
- LYSENKO, O. (1961). "Pseudomonas. An attempt at a general clasification". J. Gen. Microbiol. 25-379-400.
- MELIS, A. (1948). "La lotta razionale contro gli insetti nocivi all'agricoltura". 50, 208. Ramo Editoriale Degli Agricoltori. Roma.
- NYSTRON, G. (1960). "Sensitivity of Salmonella bacteria in vitro to different antibiotics and chemotherapeutics". Acta Pathol. et Microbiol. Scandinave. 50, 303-321.
- ARK, P. A. (1963). "Pathogenidad del Pseudomonas savastanoi para plantas herbáceas". Phytopathology XI.
- PREVOT, A. R. (1961). "Traite de Systematique Bacterienne". Dunod 1961.
- BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. and Colab. (1957). "Bergey's manual of determinative bacteriology". Pág. 139. Seventh Edition. The Williams-Wilkins Company.
- HUGH, R. and LEIFSON, E. (1953). "The taxonomie significance of fermentative versus oxidative metabolism o fearbohydrates by various Gram negatives bacteria". J. of Bacteriol. 66, 24.
- SEDLAK, J., RICHE, H. (1961). "Enterobacteriaceas infektionen". Veb. Georg Thieme. Leipzig.
- SHIMWELL, J. L., CARR, J. G. and RHODES, M. (1960). "Differentiation of Acetomonas and Pseudomonas". J. Gen. Microbiol. 23, 283-286.
- SMITH, E. F. (1905). "Some observations on de biology of the olive tubercle organism." Centrabl Bakt. 15, 189-200.
- SMITH, E. F. (1906). "Recent studies of the olive tubercle organism." U. S. Dep. Agric. Bull. 131, IV, 37.
- SUTIC, D. and DOWSON, W. (1963). "The reation of olive, oleander and ash cross inoculated with some strains and forms of Pseudomonas savastanoi". Phytopathol. Zeitsch. 46, 305-314.
- TOBIE, W. C. (1945). "A proposed biochemical basis for the genus Pseudomonas". J. Bacteriol. Págs. 49-50.
- WILSON, E. E. and ALLAN R. MACIE. (1963). "Physiological, serological and pathological evidence that Ps. tonelliana is identical with Ps. savastanoi". Phytopathol. 53, 653-659.
- WADSWORTH, A. B. (1943). "Métodos standard de laboratorio del Departamento de Sanidad del Estado de Nueva York". Edit. Labor, S. A. Buenos Aires, Argentina.
- ZAPATERO, E., GRACIAN, M. (1941). "Manual de Técnica Bacteriológica". Imprenta Castellana. Valladolid.
- CORNIL et BABES. (1890). "Les Bacteries". Tercera edición. Pág. 155.
- COWAN, S. T. and STEEL, K. S. "Manual for Identification of Medical Bacteries". Editorial Cambridge Universite-Press (1965).
- KAUFMANN, F. (1954). "Enterobacteriaceas". Ejnar Munksgaard. Publisher. Copenhagen.
- OLIVARES, J. (1964). "Tesis Doctoral".
- CALLAO, V. (1959) "Resumen sistemático de Bacterias y Hongos de Aplicación Clínica e Industria". Imprenta Román Camacho. Granada.
- MAWELL BENTLEY. (1956). "Comercial Hidroponics". First South African Edition. Johannesburg.
- SMITH and CONANT. (1960). "Bacteriología de ZINSSER". UTEA. Segunda Edición. Méjico.