

ABSORCION RADICAL DEL SULFATO DE DIHIDROESTREPTOMICINA
POR PHASEOLUS VULGARIS EN CULTIVOS HIDROPONICOS. SU IN-
FLUENCIA EN LA INHIBICION DEL PODER PATOGENO EXPERIMEN-
TAL DEL PSEUDOMONAS SAVASTANOI PARA DICHA PLANTA

por

P. ROMERO, V. CALLAO y M. HENARES

Ars Pharm. XI, 345 (1970).

INTRODUCCION

En trabajos anteriores (1) (2) (3) hemos puesto de manifiesto el poder patógeno del *Ps. savastanoi* para el tallo de *Phaseolus vulgaris* así como la inhibición de dicho poder infeccioso mediante la administración del sulfato de dihidroestreptomicina —técnicas de implantación y goteo (3)— a plantas de *Ph. vulgaris* infectadas con el agente productor de la tuberculosis del olivo *Pseudomonas savastanoi* Smith, (Stevens) 1913.

En el presente trabajo estudiamos:

- a) La absorción radical del sulfato de dihidroestreptomicina —en cultivos hidropónicos— por *Ph. vulgaris*.
- b) Persistencia del antibiótico en la planta, una vez eliminado de la solución hidropónica.
- c) Persistencia del mismo en plantas obtenidas en cultivos ordinarios (en macetas) y que han sido implantadas con un cilindro que contiene 1'25 mg. de sulfato de dihidroestreptomicina.
- d) Inhibición de la infección experimental producida en el tallo de *Ph. vulgaris* por el *Ps. savastanoi*, mediante la adición de sulfato de dihidroestreptomicina a las soluciones hidropónicas.

Este estudio con los ya realizados (3) va encaminado a establecer la forma más idónea de administración del antibiótico para esta planta, la persistencia del mismo en el vegetal y su velocidad de degradación, conocimientos que creemos son necesarios para establecer un tratamiento de la tuberculosis del olivo.

MATERIAL Y METODOS

Material.

Disponemos para la realización de este trabajo de una cepa (núm. 64) de *Ps. savastanoi* (3); de una solución de sulfato de dihidroestreptomicina al 50 por ciento P/v obtenida extemporáneamente, (1 mg. de sulfato de dihidroestreptomicina = 760 UI) y de plantas de *Ph. vulgaris* cultivadas en medios hidropónicos según la siguiente técnica.

Las semillas de *Ph. vulgaris* se inhiben en agua a 30° durante una hora. Después se siembran para su germinación en bateas de plástico que contienen arena de cuarzo humedecida en la proporción de 264 cc. de agua para 4 kg. de arena (7).

Las bateas se cubren con un plástico, para evitar la evaporación, y se trasladan al invernadero. Cuando las semillas germinan se riegan por aspersión, a fin de mantener la humedad suficiente. Pasados quince días (las plantas suelen presentar un tamaño de unos 15 cm.), se encharca la batea con objeto de que la arena se suelte fácilmente de las raíces y se traslada la planta, previo lavado de las raíces, a los medios hidropónicos contenidos en recipientes de plástico de 1.500 cc. de capacidad. Las plantas se sujetan por medio de una esponja de plástico a los recipientes. La aireación del medio se logra mediante barboteamiento de aire a través de la solución hidropónica.

El medio hidropónico empleado contiene los macronutrientes y los oligoelementos en la proporción que se indica:

Macronutrientes	N	P	K	Ca	Mg	S
P.P.M.	200	120	200	285'6	50	86'5

Oligoelementos	Cu	Zn	Mn	B	Fe
P.P.M.	0,05	0'05	0'5	0'5	4

Los cultivos se han realizado en invernadero acondicionado, con un termoperíodo de 18°C. durante la noche y 28°C. durante el día.

Métodos.

La inoculación del germen en el tallo de *Ph. vulgaris* se realiza siguiendo la técnica propuesta por nosotros (3). Veinte y cuatro horas antes de dicha inoculación se añaden 0'3 cc. por bote de la solución antibiótica anteriormente indicada, resultando una concentración final de 100 gammas mililitro. Cada bote contiene 1.500 cc. de solución nutritiva y cuatro plantas. Como cada semana hay que renovar la solución nutritiva debido a su empobrecimiento en sustancias minerales, al mismo tiempo se le adiciona un nuevo volumen de la solución antibiótica, con objeto que la absorción del antibiótico sea continua. Por otra parte y para realizar el apartado b de este trabajo a una serie de botes sólo se le adiciona "una vez" dicho volumen de 0'3 cc. de solución antibiótica.

La implantación de los cilindros que contienen 1'25 mg. de sulfato de dihidroestreptomocina se realiza en el tallo de *Ph. vulgaris* (3).

La investigación del antibiótico tanto en la solución nutritiva hidropónica como en el tallo y hojas de las plantas, se realiza por la técnica de los cilindros y la placa (4), empleando pocillos de acero inoxidable de 8 × 14 mm. y placas Petri de 120 mm. de diámetro con fondo perfectamente plano. Los medios de cultivo empleados han sido agar-extracto de levadura al 3 por ciento como medio nutritivo, y agar común como medio soporte.

El germen de prueba empleado ha sido la estirpe núm. 64 de *Ps. savastanoi* (2). El inóculo se prepara sembrando el germen en un caldo extracto de levadura al 3 por ciento e incubación a 25°C., durante 48 horas.

La obtención de savia de las plantas se realiza por pulpación en mortero estéril. Para ello una vez separadas las plantas de la solución hidropónica se lavan al grifo con objeto de eliminar todo el antibiótico que pueda haber adherido en las raíces de las mismas, pulpándose a continuación en un mortero. Del líquido de pulpación se toman 0'2 cc. que se colocan en un pocillo de la placa.

El peso de las plantas obtenidas en los cultivos hidropónicos, los diámetros de los halos de la inhibición en las placas de Petri y los días transcurridos se indican en el cuadro I. En todos los casos investigados se coloca un pocillo que contiene igual volumen de savia de una planta no tratada con el antibiótico y otro que contiene 0'2 cc. de la solución hidropónica con antibiótico que nos sirve de control. En el primer caso no hay efecto inhibitor alguno; en el segundo, prácticamente se mantiene uniforme la actividad del antibiótico a lo largo de cada semana de experimentación.

CUADRO I.—Poder inhibitor del sulfato de dihidroestreptomocina contenido en medio hidropónico y en la savia de *Ph. vulgaris*

Días transcurridos desde la adición de la sol. antibiótica.	Peso total de la planta en gramos.	Vol. añadido por pocillo Sol. hidrop. con antibiótico.	Zumo de planta con antibiótico.	Diámetro de los halos de inhibición en mm. (1) Sol. hidropónica-Zumo de planta.	
1	8'400	0'2 cc.	0'2 cc.	28	20
2	5'500	0'2 cc.	0'2 cc.	29	23
3	7'400	0'2 cc.	0'2 cc.	28'5	23
4	8'200	0'2 cc.	0'2 cc.	28'5	24
5	7'100	0'2 cc.	0'2 cc.	29	29
6	7'200	0'2 cc.	0'2 cc.	29	29
7 (2)	8'100	0'2 cc.	0'2 cc.	29	29
8	5'600	0'2 cc.	0'2 cc.	28	29
9	6'800	0'2 cc.	0'2 cc.	28	31
10	6'500	0'2 cc.	0'2 cc.	28	30
11	6'900	0'2 cc.	0'2 cc.	28	29
12	8'800	0'2 cc.	0'2 cc.	27	28
13	8'000	0'2 cc.	0'2 cc.	27	28
14 (2)	5'500	0'2 cc.	0'2 cc.	27'5	29
15	4'200	0'2 cc.	0'2 cc.	27'5	28
16	7'400	0'2 cc.	0'2 cc.	27'4	29
17	7'500	0'2 cc.	0'2 cc.	27	29
18	8'400	0'2 cc.	0'2 cc.	28	29
19	8'100	0'2 cc.	0'2 cc.	28	29
20	7'100	0'2 cc.	0'2 cc.	27	30
21 (2)	7'500	0'2 cc.	0'2 cc.	27	30

(1) Tamaño de los pocillos: 8 × 14 mm.; lectura: 72 h.

(2) Renovación de la solución nutritiva. Adición de nuevo volumen de solución antibiótica.

CUADRO II.—Estudio de la persistencia del sulfato de dihidroestreptomina (1 mg = 760 UI) en cultivos hidropónicos de *Ph. vulgaris* (Método del cilindro y la placa).

Días transcurridos desde la adición del antibiótico	Volumen añadido por pocillo	Diámetro de los halos de inhibición (1)
1	0'2 cc.	28
2	0'2 cc.	29
3	0'2 cc.	28'5
4	0'2 cc.	28'5
5	0'2 cc.	29
6	0'2 cc.	29
7	0'2 cc.	29
8	0'2 cc.	28
9	0'2 cc.	28
10	0'2 cc.	28'5
11	0'2 cc.	28'5
12	0'2 cc.	28
13	0'2 cc.	27
14	0'2 cc.	26,5
15	0'2 cc.	27
16	0'2 cc.	26
17	0'2 cc.	26
18	0'2 cc.	26,5
19	0'2 cc.	26
20	0'2 cc.	25'5
21	0'2 cc.	25

(1) Tamaño de los pocillos: 8 × 14 mm.; Lectura: 72 h.

La velocidad de degradación del antibiótico en *Ph. vulgaris* implantado se ha investigado de la siguiente manera:

Plantas cultivadas en suelo en las condiciones de invernadero se han implantado en el tallo con un cilindro de 3'75 mg. de peso que contiene a partes iguales: lactosa, goma arábica desenzimada y sulfato de dihidroestreptomina. Diariamente se ha arrancado una planta y una vez lavada perfectamente, se pulpa según la técnica usual y se adiciona 0'2 cc. de los líquidos de expresión por pocillo. La lectura se realiza a las 72 horas de incubación a 25°C.

Los días transcurridos desde la implantación, el peso total de la planta y el diámetro del área de inhibición se indica en el cuadro III,

CUADRO III.—Estudio de la velocidad de degradación del sulfato de dihidroestreptomocina en plantas de *Ph. vulgaris* implantadas con dicho antibiótico

Días transcurridos desde la implantación	Peso total de la planta en gramos.	Volumen agregado por pocillo	Diámetro de la zona inhibición en mm.
1	—	—	—
2	1'500	0'2 cc.	29
3	1'600	0'2 cc.	28'5
4	1'600	0'2 cc.	28'5
5	2'000	0'2 cc.	28'5
6	3'400	0'2 cc.	28
7	4'900	0'2 cc.	26
8	4'700	0'2 cc.	26
9	4'900	0'2 cc.	26'5
10	4'700	0'2 cc.	27
11	5'000	0'2 cc.	26
12	4'900	0'2 cc.	26
13	5'100	0'2 cc.	26
14	5'300	0'2 cc.	25'5
15	5'500	0'2 cc.	26
16	5'500	0'2 cc.	26
17	5'650	0'2 cc.	26
18	4'950	0'2 cc.	25'5

La inhibición de la infección experimental en el tallo de *Ph. vulgaris* por *Ps. savastanoi* mediante la absorción radical del sulfato de dihidroestreptomocina se ha estudiado en una serie de 100 plantas obtenidas en cultivos hidropónicos disponiendo 4 plantas por maceta siguiendo la técnica indicada anteriormente. El tiempo de observación es de 4 semanas a partir de la inoculación (cuadro IV).

RESULTADOS, DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos se indican en las tablas números I, II, III y IV. Se observa que el sulfato de dihidroestreptomocina es perfectamente absorbido en cultivo hidropónico por *Phaseolus vulgaris* (tabla I); que persiste perfectamente en dicho medio sin sufrir apenas degradación (tabla II); que la dosis suministrada es suficiente para inhibir "in vitro" el crecimiento del germen (tabla I) y que conforme transcurre el tiempo su concentración aumenta en la savia de la planta (tabla I).

También se observa que no sufre una degradación apreciable en la planta ya que el diámetro de los halos de inhibición "in vitro" obtenido con savia de plantas implantadas es prácticamente constante (tabla III).

Por último se pone de manifiesto que en las condiciones de experimentación anteriormente descritas no hay inhibición de la infección experimental (tabla IV).

CUADRO IV

N.º de plantas inoculadas	N.º de plantas sometidas a tratamiento	N.º de plantas en las que se ha desarrollado la infección	N.º de plantas dudosas	N.º de plantas que aparecen infectadas	N.º de plantas testigo
105	100	96	4	96	6

RESUMEN

En el presente trabajo se indican soluciones nutritivas, técnicas de cultivo de *Phaseolus vulgaris* en medios hidropónicos, métodos de valoración de antibióticos (sulfato de dihidroestreptomycinina) contenidos en las mismas; resultados obtenidos en la absorción de dicho antibiótico por la planta y su velocidad de degradación, así como la posible acción inhibitoria del antibiótico en la infección experimental de *Ph. vulgaris* por *Ps. savastanoi* (estirpe 64). Se concluye que en las condiciones de experimentación no se logra la inhibición de dicha infección.

SUMMARY

In this paper the nutritive solution and technique for cultivation of *Phaseolus vulgaris* in hydroponic media are given; the methods for valuation of dihydrostreptomycin sulphate and the results obtained in the absorption of this antibiotic here also indicated. It has been concluded that under the conditions of experimentation carried out, the experimental infection of *Ph. vulgaris* by *Ps. savastanoi* (strain 64) is not inhibited by the action of the antibiotic used.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—P. ROMERO (1967).—“Factores etiológicos y epidemiológicos de la tuberculosis del olivo”. *Ars Pharm.* VIII, 3-4.
- 2.—P. ROMERO, V. CALLAO (1968).—“Efecto “in vitro” de diferentes antibióticos y sustancias químicas sobre noventa cepas de *Pseudomonas savastanoi*”. *Microbiología Española*, 21.
- 3.—P. ROMERO, V. CALLAO (1968).—“Efecto del sulfato de dihidroestreptomycinina sobre *Pseudomonas savastanoi* en la infección experimental de *Phaseolus vulgaris*”. Libro de Actas del VIII Congreso Internacional de la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino (en prensa).
- 4.—PRESCOTT and DUNN (1962).—“Microbiología Industrial”. Aguilar, Madrid.
- 5.—PORTALES, A.; y BELTRÁ, R. (1964).—“Antibioterapia de la tuberculosis del olivo” *Phytón*, 21 (2): 181-189.
- 6.—MAXWELL BENTLEY (1959).—“Commercial hydroponics”.—Bendon Books, Johannesburg.
- 7.—Testing Agricultural and Vegetable Seeds” pág. 89. Agriculture handbook núm. 30, U.S. Dept. of Agriculture. EE. UU.