

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFFECTIVIDAD DE DISTINTOS DESINFECTANTES EN LA  
SOBREVIVENCIA DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* SOBRE  
FRUTOS DE LIMÓN (*Citrus limon*) INOCULADOS ARTIFICIALMENTE**

por

Inés de **AURRECOECHEA ALDABALDE**

María José **MONTELONGO GARCÍA**

Luciana **RAUDUVINICHE VIA**

TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniera Agrónoma.

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2006

Tesis aprobada por:

Director: -----

Nombre completo y firma

-----

Nombre completo y firma

-----

Nombre completo y firma

Fecha: -----

Autor: -----

Nombre completo y firma

-----

Nombre completo y firma

-----

Nombre completo y firma

## AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. Federico Montes de Hortifrutícola Kiyú y al Sr. Homero Rodríguez de El Resorte por habernos donado la fruta para este trabajo.

A los Quím. Miguel Castiglioni de Enzur S.A. y Antonio Sanchez de Tenifor S.A. por permitirnos probar sus productos.

A la Ing. Agr. Elena Pérez por haber confiado en nosotras para la realización de este trabajo.

A los integrantes del tribunal, Ing. Agrs. Vivienne Gepp, Elena Pérez y Enrique Verdier por el tiempo, apoyo y dedicación brindada de forma permanente en la elaboración de esta tesis.

A los Ing. Agrs. María Inés Ares, Carlos Perea y Hebert Sendra del MGAP, a la Ing. Agr. Patricia Coscia y a la Bach. Quím. Shirley Furtado de Facultad de Agronomía por su colaboración con nosotras.

A todos nuestros amigos por acompañarnos.

*Queremos dedicar este trabajo especialmente  
a nuestras familias, por habernos apoyado  
durante toda la carrera.  
Sin ustedes no lo hubieramos logrado.*

# TABLA DE CONTENIDO

|                                                                                  | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------|
| PAGINA DE APROBACIÓN.....                                                        | II     |
| AGRADECIMIENTOS.....                                                             | III    |
| LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES .....                                           | VII    |
| <br>                                                                             |        |
| 1 <u>INTRODUCCIÓN</u> .....                                                      | 1      |
| 2 <u>REVISION BIBLIOGRÁFICA</u> .....                                            | 3      |
| 2.1 LA CITRICULTURA .....                                                        | 3      |
| 2.1.1 <u>Situación mundial</u> .....                                             | 3      |
| 2.1.1.1 Distribución geográfica.....                                             | 3      |
| 2.1.1.2 Producción .....                                                         | 3      |
| 2.1.1.3 Comercialización .....                                                   | 5      |
| 2.1.1.4 Efecto de la sanidad sobre la comercialización.....                      | 7      |
| 2.1.2 <u>Situación nacional</u> .....                                            | 7      |
| 2.2 CANCRO CÍTRICO .....                                                         | 11     |
| 2.2.1 <u>¿Qué es el Cancro Cítrico?</u> .....                                    | 11     |
| 2.2.2 <u>Origen, diseminación y distribución actual del Cancro Cítrico</u> ..... | 13     |
| 2.2.3 <u>El cancro cítrico en el Uruguay</u> .....                               | 16     |
| 2.2.4 <u>Ciclo de la enfermedad</u> .....                                        | 18     |
| 2.2.5 <u>Características generales del agente causal</u> .....                   | 21     |
| 2.3 MEDIDAS DE CONTROL CONTRA EL CANCRO CÍTRICO .....                            | 22     |
| 2.3.1 <u>En el campo</u> .....                                                   | 22     |
| 2.3.1.1 Erradicación .....                                                       | 23     |
| 2.3.1.2 Protección .....                                                         | 23     |
| 2.3.1.3 Inmunización.....                                                        | 23     |
| 2.3.1.4 Terapia .....                                                            | 23     |
| 2.3.1.5 Regulación .....                                                         | 24     |
| 2.3.2 <u>Medidas poscosecha para manejo de riesgo de cancro cítrico.</u> .....   | 24     |
| 2.4 DESINFECTANTES .....                                                         | 25     |
| 2.4.1 <u>Condiciones del agua de los baños</u> .....                             | 25     |
| 2.4.2 <u>Mecanismos de acción</u> .....                                          | 26     |
| 2.4.3 <u>Uso de desinfectantes en poscosecha</u> .....                           | 26     |
| 2.4.4 <u>Cloro como hipoclorito</u> .....                                        | 28     |
| 2.4.4.1 Mecanismo de acción.....                                                 | 29     |
| 2.4.4.2 Condiciones de uso.....                                                  | 30     |
| 2.4.4.3 Ventajas para su utilización.....                                        | 31     |

|         |                                                             |    |
|---------|-------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.4.4 | Inconvenientes para su utilización.....                     | 31 |
| 2.4.5   | <u>Dióxido de cloro</u> .....                               | 31 |
| 2.4.5.1 | Mecanismo de acción.....                                    | 32 |
| 2.4.5.2 | Condiciones de uso.....                                     | 32 |
| 2.4.5.3 | Ventajas para su utilización.....                           | 33 |
| 2.4.5.4 | Inconvenientes para su utilización.....                     | 33 |
| 2.4.6   | <u>Amonio cuaternario</u> .....                             | 34 |
| 2.4.6.1 | Mecanismo de acción.....                                    | 34 |
| 2.4.6.2 | Condiciones de uso.....                                     | 34 |
| 2.4.6.3 | Ventajas para su utilización.....                           | 35 |
| 2.4.6.4 | Inconvenientes para su utilización.....                     | 35 |
| 3       | <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....                           | 36 |
| 3.1     | UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO .....                             | 36 |
| 3.2     | FRUTA .....                                                 | 36 |
| 3.3     | ENSAYOS PREVIOS .....                                       | 37 |
| 3.4     | TRATAMIENTOS .....                                          | 38 |
| 3.4.1   | <u>Preparación de las soluciones desinfectantes</u> .....   | 39 |
| 3.4.1.1 | Hipoclorito de sodio .....                                  | 39 |
| 3.4.1.2 | Dióxido de cloro.....                                       | 39 |
| 3.4.1.3 | Amonio cuaternario .....                                    | 39 |
| 3.5     | SOLUCIÓN TAMPÓN PEPTONADA CON BLOQUEADORES. 40              |    |
| 3.5.1   | <u>Para fruta</u> .....                                     | 40 |
| 3.5.2   | <u>Para agua de lavado</u> .....                            | 40 |
| 3.6     | MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS .....                          | 41 |
| 3.7     | PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....                                | 41 |
| 3.8     | EXPERIMENTO.....                                            | 42 |
| 3.9     | ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....                                   | 46 |
| 4       | <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....                         | 47 |
| 4.1     | RECUPERACIÓN DE XAC DE LA SUPERFICIE DE LA FRUTA.....       | 47 |
| 4.2     | RECUPERACIÓN DE XAC DEL AGUA DE LOS BAÑOS DE LA FRUTA ..... | 54 |
| 5       | <u>CONCLUSIONES</u> .....                                   | 56 |
| 6       | <u>RESUMEN</u> .....                                        | 57 |
| 7       | <u>SUMMARY</u> .....                                        | 58 |

|   |                                  |    |
|---|----------------------------------|----|
| 8 | <b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> ..... | 59 |
| 9 | <b><u>APÉNDICES</u></b> .....    | 67 |

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

| Cuadro N°.                                                                                                                                                                                                       | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1- Distribución de la superficie citrícola en hectáreas y porcentaje, según continente.....                                                                                                                      | 3      |
| 2- Producción mundial de cítricos en miles de toneladas métricas y porcentaje según origen.....                                                                                                                  | 4      |
| 3- Producción mundial en miles de toneladas métricas y porcentaje según especie.....                                                                                                                             | 5      |
| 4- Exportaciones en miles de toneladas métricas, porcentaje y miles de dólares de las distintas especies según origen. ....                                                                                      | 6      |
| 5- Importaciones de fruta en miles de toneladas métricas según especie y destino.....                                                                                                                            | 7      |
| 6- Producción (%) y n° de explotaciones citrícolas por departamento, según zona de pertenencia.....                                                                                                              | 8      |
| 7- Estimación de la producción por especie citrícola, según zona para los años 2003 y 2004 (miles de toneladas). ....                                                                                            | 9      |
| 8- Cantidades exportadas de fruta fresca cítrica por tipo, en la zafra 2004 (al 31 de diciembre) según destino en toneladas.....                                                                                 | 10     |
| 9- Grado de patogenicidad (*) de las distintas razas de <i>Xanthomonas axonopodis</i> (Xa) según especie cítrica y distribución geográfica.....                                                                  | 12     |
| 10- Antecedentes de ensayos en los que se evaluó la acción de desinfectantes en poscosecha sobre distintos frutos.....                                                                                           | 27     |
| 11- Antecedentes de ensayos con desinfectantes en poscosecha en los que se evaluó el efecto en el agua.....                                                                                                      | 28     |
| 12- Promedio, desvío estándar, mínimo y máximo de peso, diámetro menor y diámetro mayor de los limones utilizados en cada bloque. ....                                                                           | 37     |
| 13- Características de cada tratamiento según el día de aplicación....                                                                                                                                           | 40     |
| 14- Recuentos de colonias/100 µL de las diluciones 10 <sup>-5</sup> y 10 <sup>-6</sup> de la suspensión bacteriana utilizada como inóculo y cálculo de la concentración de esta suspensión, en cada bloque. .... | 42     |
| 15- Número de colonias promedio/mL de solución tampón recuperadas de la superficie de la fruta, en cada bloque, para cada tratamiento .....                                                                      | 48     |
| 16- Número promedio de colonias/mL de solución tampón, recuperadas de la superficie de cada fruto del tratamiento testigo en cada bloque.....                                                                    | 49     |
| 17- Número promedio de colonias/mL de solución tampón, recuperadas de la superficie de cada fruto desinfectado con 200 ppm de hipoclorito de sodio en cada bloque.....                                           | 49     |

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 18- Número promedio de colonias/mL de solución tampón, recuperadas de la superficie de cada fruto desinfectado con 3 y 5 ppm de dióxido de cloro en cada bloque..... | 49 |
| 19- Número promedio de colonias/mL de solución tampón, recuperadas de la superficie de cada fruto desinfectado con amonio al 0.1% y 0.2%, en cada bloque.....        | 50 |
| 20- Número promedio de colonias/mL de solución tampón, observadas en cada tratamiento y estimadas con 95% de confianza por mínimos cuadrados. ....                   | 51 |
| 21- Número promedio de colonias recuperadas/mL del agua de lavado de la fruta .....                                                                                  | 55 |

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Ilustración N°. | Página |
|-----------------|--------|

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1- Lesiones típicas en frutos de <i>Citrus limon</i> provocadas por Xac.....                                                                                  | 11 |
| 2- Lesiones típicas en hojas de <i>Citrus limon</i> provocadas por Xac, en el haz (izquierda) y en el envés (derecha).....                                    | 12 |
| 3- Distribución mundial del Cancro Cítrico (adaptado de EPPO 2003).....                                                                                       | 15 |
| 4- Ciclo de la enfermedad Cancro Cítrico provocada por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (adaptado de Gottwald et al. 2002).....                 | 20 |
| 5- Porcentaje de cloro disponible como HOCl según el valor de pH a 20°C (adaptado de Palin, 1983). ....                                                       | 30 |
| 6- Esquema del trabajo experimental realizado en cada bloque con la fruta .....                                                                               | 44 |
| 7- Esquema del trabajo experimental realizado en los bloques III y IV con el agua de los baños de la fruta .....                                              | 45 |
| 8- Medias por mínimos cuadrados y límites de confianza de colonias/mL de solución tampón, recuperadas de la superficie de los frutos de cada tratamiento..... | 51 |

# **1 INTRODUCCIÓN**

La citricultura en el Uruguay es un rubro que ocupa más de 20 mil hectáreas. Se ha desarrollado para la exportación de fruta fresca en contraestación. Actualmente se exporta algo más del 50% de la producción, siendo el destino principal la Unión Europea.

El cancro cítrico provocado por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, es la enfermedad cuarentenaria más importante de los cítricos (FAO, 2003).

Los mercados ubicados en zonas libres de cancro cítrico -como la Unión Europea- exigen que la fruta proveniente de áreas con cancro cítrico sea tratada durante por lo menos 2 minutos con 200 ppm de hipoclorito de sodio a un pH entre 6 y 7.5 y con una solución al 2% de ortofenilfenato de sodio (SOPP) durante 1 minuto, bajo el supuesto de que este tratamiento evita el ingreso de la bacteria por fruta contaminada (Schubert et al., 1999). El manejo del hipoclorito de sodio en las plantas de empaque presenta varios inconvenientes que podrían ser levantados usando otros desinfectantes.

En el Uruguay se realizó un estudio para evaluar el efecto del tratamiento poscosecha rutinario en plantas de empaque en la sobrevivencia de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* natural y artificialmente inoculada<sup>1</sup>. Este tratamiento incluye, además de hipoclorito de sodio y SOPP, aplicaciones de fungicidas (Imazalil y Tiabendazol), encerado y secado. La evaluación de este estudio mostró que el tratamiento poscosecha empleado rutinariamente en las plantas de empaque del Uruguay eliminó más del 99% de la población de la bacteria tanto en fruta natural como artificialmente inoculada.

Durante los años 2004 y 2005, se presentaron a la Facultad de Agronomía las empresas Enzur S.A. y Tenifor S.A. solicitando se evaluaran sus productos: dióxido de cloro y Tefor 80 respectivamente, como desinfectantes alternativos al hipoclorito de sodio, para el control del cancro cítrico en poscosecha. La evaluación de estos productos se realizó en el marco del convenio de cooperación técnica en sanidad citrícola (DGSA/MGAP-INIA-Facultad de Agronomía).

---

<sup>1</sup> VERDIER, E; ZEFFERINO, E.; MENDEZ, S. 2006. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* survival in citrus fruit submitted to post harvest treatment using detecting by semi selective culture media and bioassay. (Fitopatología, en prensa).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad de los desinfectantes hipoclorito de sodio, dióxido de cloro y el amonio cuaternario Tefor 80, en la sobrevivencia de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* sobre fruta cítrica asintomática previamente inoculada con la bacteria.

## **2 REVISION BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 LA CITRICULTURA**

#### **2.1.1 Situación mundial**

Los cítricos son frutales de origen tropical. Su producción se ha extendido a zonas subtropicales, llevándose a cabo plantaciones comerciales hasta los paralelos 40 Latitud Norte y 35 Latitud Sur (URUGUAY.MGAP.DIEA, 2003).

Las regiones tropicales presentan condiciones climáticas para la producción de fruta cítrica con destino a la industria para la elaboración de jugos. En las zonas subtropicales las bajas temperaturas consiguen mejorar la calidad de la fruta, tanto externa (coloración) como interna (sabor) lográndose producir naranjas y mandarinas con características adecuadas para el consumo en fresco (URUGUAY.MGAP.DIEA, 2003).

##### **2.1.1.1 Distribución geográfica**

En el año 2004, la superficie mundial citrícola fue de algo más de 7 millones de hectáreas, siendo Asia el continente donde se concentró la mayor superficie plantada (Ver Cuadro 1)

**Cuadro 1** - Distribución de la superficie citrícola en hectáreas y porcentaje, según continente.

| <b>Continente</b>           | <b>Superficie</b> | <b>%</b>   |
|-----------------------------|-------------------|------------|
| <b>TOTAL</b>                | <b>7.373.555</b>  | <b>100</b> |
| ASIA                        | 2.880.805         | 39.0       |
| ÁFRICA                      | 1.369.799         | 18.6       |
| AMÉRICA DEL SUR             | 1.345.325         | 18.2       |
| AMÉRICA DEL NORTE Y CENTRAL | 1.183.756         | 16.0       |
| EUROPA                      | 561.849           | 7.6        |
| OCEANÍA                     | 32.021            | 0.4        |

Fuente: elaborado en base a información de FAO (2004).

##### **2.1.1.2 Producción**

Los cítricos lideran la producción mundial de frutas y su crecimiento fue constante durante los últimos 30 años, pasando de 46 millones de toneladas

métricas de promedio anual en la década del 70 a 95 millones en el año 2000 (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2003).

La producción mundial de cítricos en el año 2004 fue de casi 110 millones de toneladas métricas, siendo América el continente de mayor producción (Ver Cuadro 2) (FAO, 2004).

**Cuadro 2** - Producción mundial de cítricos en miles de toneladas métricas y porcentaje según origen.

|                                    | <b>Producción.<br/>(miles TM)</b> | <b>Aporte de los<br/>países al<br/>continente. (%)</b> | <b>Aporte de los<br/>continentes al<br/>TOTAL. (%)</b> |
|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>TOTAL</b>                       | <b>108.535,5</b>                  | -                                                      | <b>100</b>                                             |
| <b>AMÉRICA</b>                     | <b>50.268</b>                     | -                                                      | <b>46,3</b>                                            |
| <b>América del Sur</b>             | <b>26.297,1</b>                   | <b>100</b>                                             | -                                                      |
| Brasil                             | 19.986                            | 78                                                     | -                                                      |
| Uruguay                            | 2,3                               | 1                                                      | -                                                      |
| <b>América del Norte y Central</b> | <b>23.971</b>                     | <b>100</b>                                             | -                                                      |
| Estados Unidos                     | 14.862                            | 62                                                     | -                                                      |
| <b>ASIA</b>                        | <b>35.320</b>                     | <b>100</b>                                             | <b>32,5</b>                                            |
| China                              | 14481,2                           | 41                                                     | -                                                      |
| <b>ÁFRICA</b>                      | <b>11.398</b>                     | <b>100</b>                                             | <b>10,5</b>                                            |
| Egipto y Nigeria                   | 5.813                             | 51                                                     | -                                                      |
| <b>EUROPA</b>                      | <b>10.967</b>                     | <b>100</b>                                             | <b>10,1</b>                                            |
| España                             | 6.251,2                           | 57                                                     | -                                                      |
| <b>OCEANÍA</b>                     | <b>583</b>                        | <b>100</b>                                             | <b>0,5</b>                                             |
| Australia                          | 542,2                             | 93                                                     | -                                                      |

Fuente: elaborado en base a información de FAO (2004).

La especie citrícola de mayor producción a nivel mundial es la naranja, seguida por las mandarinas Satsuma y Clementinas (Ver Cuadro 3).

**Cuadro 3** - Producción mundial en miles de toneladas métricas y porcentaje según especie.

|                | <b>Producción<br/>(miles TM)</b> | <b>%</b>   |
|----------------|----------------------------------|------------|
| <b>TOTAL</b>   | <b>108.535,5</b>                 | <b>100</b> |
| Naranjas       | 62.814,4                         | 58         |
| Mandarinas     | 22.942,3                         | 21         |
| Limonos        | 12.339                           | 11,4       |
| Pomelos        | 4.639,5                          | 4,3        |
| Otros cítricos | 5.800,5                          | 5,3        |

Fuente: elaborado en base a información de FAO (2004).

### **2.1.1.3 Comercialización**

El 10% de la producción mundial es destinada a la comercialización en el mercado internacional, siendo el Hemisferio Norte la región donde se concentra el comercio.

Alrededor del 60% de la fruta se comercializa en los propios países productores para su consumo en fresco y el 30% restante se destina a la industria (URUGUAY.MGAP.DIEA 2003, FAO 2004).

Las exportaciones mundiales de cítricos del año 2003 fueron 10,8 millones de toneladas métricas, movilizand o 6.000 millones de dólares (FAO, 2004).

Ese año, las especies de fruta fresca más exportadas fueron naranjas, mandarinas y tangerinas. Europa fue el mayor exportador, seguido por África y Asia. Dentro de Europa, el mayor exportador fue España. Considerando naranjas, mandarinas y tangerinas, Sudáfrica es el mayor exportador de África y Turquía lo es de Asia. América es el mayor exportador de limones, limas y otros cítricos, Argentina, México y Estados Unidos son los principales países exportadores dentro del continente (Ver Cuadro 4).

**Cuadro 4** - Exportaciones en miles de toneladas métricas, porcentaje y miles de dólares de las distintas especies según origen.

|                                         | <b>Exportaciones</b> |             |                  |
|-----------------------------------------|----------------------|-------------|------------------|
|                                         | <b>miles TM</b>      | <b>%</b>    | <b>miles UDS</b> |
| <b>TOTAL</b>                            | <b>10.874</b>        | <b>100</b>  | <b>5.994.138</b> |
| <b>NARANJAS, MANDARINAS, TANGERINAS</b> | <b>7.876,1</b>       | <b>72,1</b> | <b>4.448.353</b> |
| EUROPA                                  | <b>3.859</b>         |             |                  |
| España                                  | 2.881                |             |                  |
| ÁFRICA                                  | <b>1.511</b>         |             |                  |
| Sudáfrica                               | 798                  |             |                  |
| ASIA                                    | <b>1.210</b>         |             |                  |
| Turquía                                 | 375                  |             |                  |
| <b>LIMONES, LIMAS</b>                   | <b>1.886,1</b>       | <b>17,3</b> | <b>967.780</b>   |
| AMÉRICA                                 | <b>862</b>           |             |                  |
| Argentina                               | 337                  |             |                  |
| México                                  | 333                  |             |                  |
| EUROPA                                  | <b>675</b>           |             |                  |
| España                                  | 499                  |             |                  |
| <b>OTROS CÍTRICOS</b>                   | <b>1.142</b>         | <b>10,5</b> | <b>578.005</b>   |
| AMÉRICA DEL NORTE Y CENTRAL             | <b>441</b>           |             |                  |
| Estados Unidos                          | 389                  |             |                  |
| ASIA                                    | <b>271</b>           |             |                  |
| Israel                                  | 96                   |             |                  |

Fuente: elaborado en base a información de FAO (2004).

Las importaciones mundiales de frutas cítricas en el año 2004 fueron 10.5 millones de toneladas métricas (Ver Cuadro 5) y significaron 6.700 millones de dólares. (FAO, 2004).

**Cuadro 5** - Importaciones de fruta en miles de toneladas métricas según especie y destino.

|                                         | <b>Importación<br/>(miles TM)</b> |
|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>TOTAL</b>                            | <b>10.530</b>                     |
| <b>NARANJAS, MANDARINAS, TANGERINAS</b> | <b>7.707</b>                      |
| EUROPA                                  | <b>5.565</b>                      |
| Alemania                                | 918                               |
| ASIA                                    | <b>1.416</b>                      |
| China                                   | 233                               |
| <b>LIMONES, LIMAS</b>                   | <b>1.757</b>                      |
| EUROPA                                  | <b>1.142</b>                      |
| Rusia                                   | 151                               |
| Alemania                                | 131                               |
| AMÉRICA DEL NORTE                       | <b>330</b>                        |
| Estados unidos                          | 275                               |
| <b>OTROS CÍTRICOS</b>                   | <b>1.066</b>                      |
| EUROPA                                  | <b>624</b>                        |
| Francia                                 | 102                               |
| ASIA                                    | <b>341</b>                        |
| Japón                                   | 274                               |

Fuente: elaborado en base a información de FAO (2004).

El aumento del consumo de fruta contra estación en el hemisferio norte en los últimos 30 años, fue abastecido por Sudáfrica, Argentina y Uruguay que aumentaron sus exportaciones (URUGUAY.MGAP.DIEA, 2003).

#### **2.1.1.4 Efecto de la sanidad sobre la comercialización**

Los países importadores de fruta cítrica, prefieren la proveniente de lugares libres de plagas o enfermedades que son cuarentenarias (URUGUAY.MGAP.DIEA, 2003). Una plaga o enfermedad cuarentenaria según FAO es aquella “de importancia económica potencial para el área en peligro aun cuando la plaga no esté presente” (A1) “o, si está presente, no está extendida y se encuentra bajo control oficial” (A2). La enfermedad cuarentenaria más importante en los cítricos es la conocida como cancro cítrico (FAO, 2003).

#### **2.1.2 Situación nacional**

La citricultura en el Uruguay desde la década de 1970 se ha desarrollado y transformado tecnológicamente para lograr una producción

nacional de fruta fresca de calidad. El propósito fue conquistar y permanecer en los mercados internacionales, principalmente por la posibilidad de ofrecer fruta fresca en contra estación en los países consumidores del hemisferio norte, como la Unión Europea. Esto llevó a que en los últimos 30 años el sector citrícola realizara inversiones en 300 millones de dólares en plantaciones, maquinaria, equipos de riego, cámaras frigoríficas, plantas de empaque e industrias (URUGUAY.MGAP.DIEA, 2003).

Según el Censo Agropecuario del año 2000 el rubro ocupa una superficie de 21.614 hectáreas, correspondiendo al 0.1% de la superficie agropecuaria total. Esta superficie corresponde a 714 explotaciones, distribuidas en dos regiones productoras, al norte y al sur del Río Negro.

La producción citrícola en la zona norte ocupa 19.029 hectáreas, repartidas en 366 explotaciones, las que contribuyen con el 85% de la producción nacional. Dentro de esta zona, la mayor producción se concentra en los departamentos de Paysandú y Salto (Ver Cuadro 6).

La zona sur: Canelones, San José, Montevideo y en menor medida Soriano y Colonia, ocupa 2.308 hectáreas, 14,5% del total, distribuidas en 314 explotaciones (Ver Cuadro 6).

**Cuadro 6** - Producción (%) y nº de explotaciones citrícolas por departamento, según zona de pertenencia.

|                                  | DEPARTAMENTO | PRODUCCIÓN(%) | Nº EXPLOTACIONES |
|----------------------------------|--------------|---------------|------------------|
|                                  | <b>TOTAL</b> | <b>100</b>    | <b>714</b>       |
| <b>N<br/>O<br/>R<br/>T<br/>E</b> | Paysandú     | 52.4          | 63               |
|                                  | Salto        | 31.0          | 267              |
|                                  | Río Negro    | 1.7           | 8                |
|                                  | Tacuarembó   | 0.2           | 3                |
|                                  | Rivera       | 0.1           | 25               |
| <b>S<br/>U<br/>R</b>             | San José     | 6.4           | 23               |
|                                  | Canelones    | 3.6           | 150              |
|                                  | Montevideo   | 1.8           | 108              |
|                                  | Soriano      | 0.9           | 3                |
|                                  | Maldonado    | 0.7           | 12               |
|                                  | Colonia      | 0.6           | 30               |

Fuente: Censo Gral. Agropecuario (2000).

La producción de fruta cítrica del año 2004 fue superior a las 242 mil toneladas, existiendo un predominio en la producción de naranjas y mandarinas en la región norte del país. De la zona sur se obtiene el 59% de la producción de limones, pero se está tendiendo a la diversificación de especies (URUGUAY.MGAP, 2004) (Ver Cuadro 7).

La naranja es la principal especie producida en el país (55%) seguida por la mandarina (33%) y el resto (12%) está constituido por limones, pomelos y otras especies minoritarias (Ver Cuadro 7).

**Cuadro 7** - Estimación de la producción por especie citrícola, según zona para los años 2003 y 2004 (miles de toneladas).

|                 | <b>ZONA NORTE</b> |              | <b>ZONA SUR</b> |             | <b>TOTAL</b> |              | <b>Variación. %</b> |
|-----------------|-------------------|--------------|-----------------|-------------|--------------|--------------|---------------------|
| Año             | 2003              | 2004         | 2003            | 2004        | 2003         | 2004         | <b>(03/04)</b>      |
| <b>TOTAL</b>    | <b>215,4</b>      | <b>205,3</b> | <b>33,3</b>     | <b>36,9</b> | <b>248,7</b> | <b>242,2</b> | <b>-2,6</b>         |
| <b>Naranjas</b> | <b>124,4</b>      | <b>117,2</b> | 7,2             | 6,8         | 131,2        | 124,1        | -5,7                |
| Mandarinas      | 70,9              | 71,9         | 3,8             | 5,3         | 74,7         | 77,3         | 3,5                 |
| <b>Limones</b>  | 16,4              | 10,7         | <b>20,3</b>     | <b>22,8</b> | 36,7         | 33,5         | -8,8                |
| Pomelos         | 3,7               | 5,4          | 2,0             | 1,9         | 5,7          | 7,3          | 28,3                |

Fuente: Bruno et al. (2004).

En la campaña 2004 se exportaron 129.4 mil toneladas de fruta cítrica fresca (51% de la producción estimada) generando un monto aproximado de 55 millones de dólares (Bruno et al., 2004).

Las especies exportadas fueron naranjas (54%) de las variedades Valencia, Navel y Salustiana, mandarinas (34%) de las variedades Satsuma, Clementinas y Ellendale, limones (11%) y pomelos (1%) de las variedades Star Ruby y Marsh. Los cítricos representan el 95% de las frutas que se exportan del país (URUGUAY.MGAP.DIEA, 2003).

Del total de la producción exportada, el 88% se comercializó en la Unión Europea, destacándose como principales países: Reino Unido (25,5%), Holanda (25%) y España (20%) (Ver Cuadro 8). Fuera de la Unión Europea el segundo lugar lo ocupa Rusia con el 8% del volumen. Un mercado que se ha consolidado a través de los años es Canadá aunque con un bajo nivel de participación (2,34%) (Bruno et al., 2004).

**Cuadro 8** - Cantidades exportadas de fruta fresca cítrica por tipo, en la zafra 2004 (al 31 de diciembre) según destino en toneladas.

|                       | LIMONES       | MANDARINAS      | NARANJAS        | TOTAL            | %            |
|-----------------------|---------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------|
| <b>TOTAL</b>          | <b>13.350</b> | <b>37.222,2</b> | <b>76.960,2</b> | <b>129.439</b>   | <b>100</b>   |
| <b>TOTAL EUROPA</b>   | <b>12.392</b> | <b>33.417</b>   | <b>73.952</b>   | <b>120.998,8</b> | <b>93,48</b> |
| Holanda               | 2.799,3       | 12.235,5        | 16.408          | 32.347,5         | 24,99        |
| Reino Unido           | 2.224,2       | 15.911          | 14.808,3        | 32.982,4         | 25,48        |
| España                | 2.022         | 1.056           | 23.049          | 26.126,4         | 20,18        |
| Italia                | 3.106,3       | 1.539,4         | 3.936           | 8.582            | 6,63         |
| Bélgica               | 1.091,1       | 509,3           | 2.636           | 4.506            | 3,48         |
| Rusia                 | 436           | 1.094,2         | 8.735           | 10.268,1         | 7,93         |
| <b>TOTAL AMÉRICA</b>  | <b>934</b>    | <b>1.675,8</b>  | <b>2.480</b>    | <b>5.758</b>     | <b>4,45</b>  |
| Canadá                | 598,5         | 1.170,2         | 1.244           | 3.030            | 2,34         |
| <b>TOTAL MERCOSUR</b> | <b>335,5</b>  | <b>506</b>      | <b>1.236</b>    | <b>2.728</b>     | <b>2,11</b>  |
| Brasil                | 328           | 334             | 620,2           | 1.502            | 1,16         |
| Argentina             | -             | 155,2           | 578,3           | 1.145,4          | 0,88         |
| Paraguay              | 8             | 17              | 37,5            | 80,5             | 0,06         |
| <b>TOTAL ASIA</b>     | <b>24,3</b>   | <b>2.130</b>    | <b>528,3</b>    | <b>2.682,4</b>   | <b>2,07</b>  |
| Indonesia             | -             | 817,2           | 108             | 925              | 0,71         |
| Filipinas             | -             | 819,4           | 25              | 844,3            | 0,65         |
| China                 | 24,3          | 53,2            | 322,5           | 400              | 0,31         |

Fuente: Bruno et al. (2004).

Tradicionalmente la fruta uruguaya se comercializa en el mercado internacional para ser consumida como fruta fresca. En la actualidad la demanda exige que la fruta cumpla estrictamente con normas de calidad e inocuidad que son cada vez más exigentes. Entre los requerimientos de calidad se destacan la apariencia externa y la necesidad de garantizar la inocuidad como alimentos para la salud humana. La decisión de parte del sector de trabajar con las normas EUREPGAP, apunta a ese objetivo (URUGUAY.MGAP.DIEA 2003, Bruno et al. 2004).

## 2.2 CANCRO CÍTRICO

### 2.2.1 ¿Qué es el Cancro Cítrico?

El cancro cítrico es una enfermedad causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse 1915, Vauterin et al. 1995). Sinónimos: *Pseudomonas citri* (Hasse, 1915); *Bacterium citri* (Hasse) (Doidge, 1916); *Bacillus citri* (Hasse) (Holland, 1920); *Phytomonas citri* (Hasse) (Bergey et al., 1923); *Xanthomonas citri* (Hasse) (Dowson, 1939); *Xanthomonas citri* f. sp. *aurantifoliae* (Namekata et al., 1972); *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse, 1915) (Dye, 1978); *Xanthomonas citri* (ex Hasse) nom. rev. (Gabriel et al., 1989); *Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii* (Gabriel et al., 1989); *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Vauterin et al., 1995). (EPPO 2003, CAB International 2005).

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) pertenece al Dominio Bacteria, Phylum Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Xanthomonadales, Familia Xanthomonadaceae (CAB International, 2005).

Esta enfermedad produce lesiones necróticas en frutos (ver Ilustración 1), hojas (ver Ilustración 2) y ramas jóvenes de sus hospederos. Causa pérdidas económicas directas por disminución en la cantidad y calidad de frutos. También es responsable de pérdidas económicas indirectas por limitar los mercados para la exportación (EPPO 2003, CAB International 2005).



**Ilustración 1** – Lesiones típicas en frutos de *Citrus limón* provocadas por Xac



**Ilustración 2** - Lesiones típicas en hojas de *Citrus limon* provocadas por *Xac*, en el haz (izquierda) y en el envés (derecha)

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* afecta a la familia de las Rutáceas. Las infecciones naturales tienen mayor importancia económica en las especies del género *Citrus*. La especie *Poncirus trifoliata*, portainjerto de mayor uso en Uruguay, también puede sufrir infecciones naturales.

Se han reconocido por lo menos tres razas de *Xanthomonas axonopodis* que afectan citrus (A, B y C) según rango de hospederos y agresividad. La que produce mayores pérdidas, está más ampliamente distribuida y es más difícil de controlar es la raza A o también llamada asiática, haciendo referencia al lugar desde el cual se diseminó. Cuando se habla del cancro cítrico, sin especificar la raza, se está haciendo referencia a la raza A (Stall et al. 1983, Schubert et al. 2001, EPPO 2003, CAB International 2005).

**Cuadro 9** - Grado de patogenicidad (\*) de las distintas razas de *Xanthomonas axonopodis* (*Xa*) según especie cítrica y distribución geográfica.

| Especie cítrica<br>( <i>Citrus</i> ) | Nombre común  | RAZA                                  |                                        |                                        |
|--------------------------------------|---------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
|                                      |               | A<br><i>Xa</i> pv. <i>citri</i>       | B<br><i>Xa</i> pv. <i>aurantifolii</i> | C<br><i>Xa</i> pv. <i>aurantifolii</i> |
| <i>C. sinensis</i>                   | Naranja dulce | +++                                   | +                                      | -                                      |
| <i>C. paradisi</i>                   | Pomelo        | ++++                                  | +                                      | -                                      |
| <i>C. limon</i>                      | Limón         | +++                                   | +++                                    | -                                      |
| <i>C. reticulata</i>                 | Mandarina     | +                                     | +                                      | -                                      |
| <i>C. aurantifolia</i>               | Lima maxicana | ++++                                  | ++++                                   | ++++                                   |
| <b>Distribución geográfica</b>       |               | África,<br>América, Asia<br>y Oceanía | Argentina,<br>Paraguay                 | Brasil                                 |

(\*) Grado de patogenicidad: - =no susceptible, ++++ =muy susceptible  
Fuente: adaptado de Stall et al. (1983), EPPO (2003).

La susceptibilidad al patógeno varía según la especie y cultivar hospedante y órgano afectado. Adquiere mayor relevancia en plantas de vivero y en plantaciones nuevas pues las infecciones usualmente se dan en tejidos inmaduros que son los más susceptibles (Stall et al. 1983, CAB International 2005).

Las lesiones de Xac se producen por hipertrofia principalmente y también por hiperplasia de las células del hospedero (CAB International, 2005). Al inicio estas lesiones son pequeñas manchas redondas, elevadas, translúcidas, con aspecto húmedo, de color verde amarillento que pueden confundirse con glándulas de aceite, pero a diferencia de éstas se encuentran formando agregados. A medida que la lesión va evolucionando aumenta de tamaño, se rompe la epidermis tomando el tejido un aspecto corchoso, de color amarronado, con los bordes levantados con aspecto aceitoso, el centro hundido y el tejido circundante forma un halo clorótico. A esta altura las lesiones hacen recordar un cráter y pueden ser detectadas pasando los dedos por la superficie del órgano afectado. Aproximadamente a los 7 días de iniciada la infección en tejido joven y cuando las condiciones ambientales son ideales para la multiplicación del patógeno, las lesiones se pueden observar con una lupa de mano y una semana después ya pueden ser detectadas a simple vista. Cada lesión puede llegar a medir de 5 a 10 mm de diámetro según la susceptibilidad del hospedero (Stall et al. 1983, Agrios 1995, Duran-Vila et al. 2000, EPPO 2003, CAB International 2005).

Las lesiones en las hojas suelen iniciarse en el envés y a medida que avanza la enfermedad se pueden observar en forma coincidente, en ambas caras. Cuando la lesión es vieja, el halo clorótico puede no aparecer y el centro puede caer (Stall et al. 1983, EPPO 2003).

En los frutos las lesiones no penetran más de 3 mm, sin alcanzar el albedo y por lo tanto no afectan la calidad interior del fruto. Si la infección se da al inicio del desarrollo del fruto, puede llegar a deformarlo (Stall et al. 1983, Duran-Vila et al. 2000, CAB International 2005).

Las lesiones en las ramas son menos frecuentes y aparecen en los hospederos de mayor susceptibilidad; pueden tener forma irregular, sin halo clorótico y presentarse menos elevadas que en frutos y hojas (Duran-Vila et al. 2000, EPPO 2003).

### **2.2.2 Origen, diseminación y distribución actual del Cancro Cítrico**

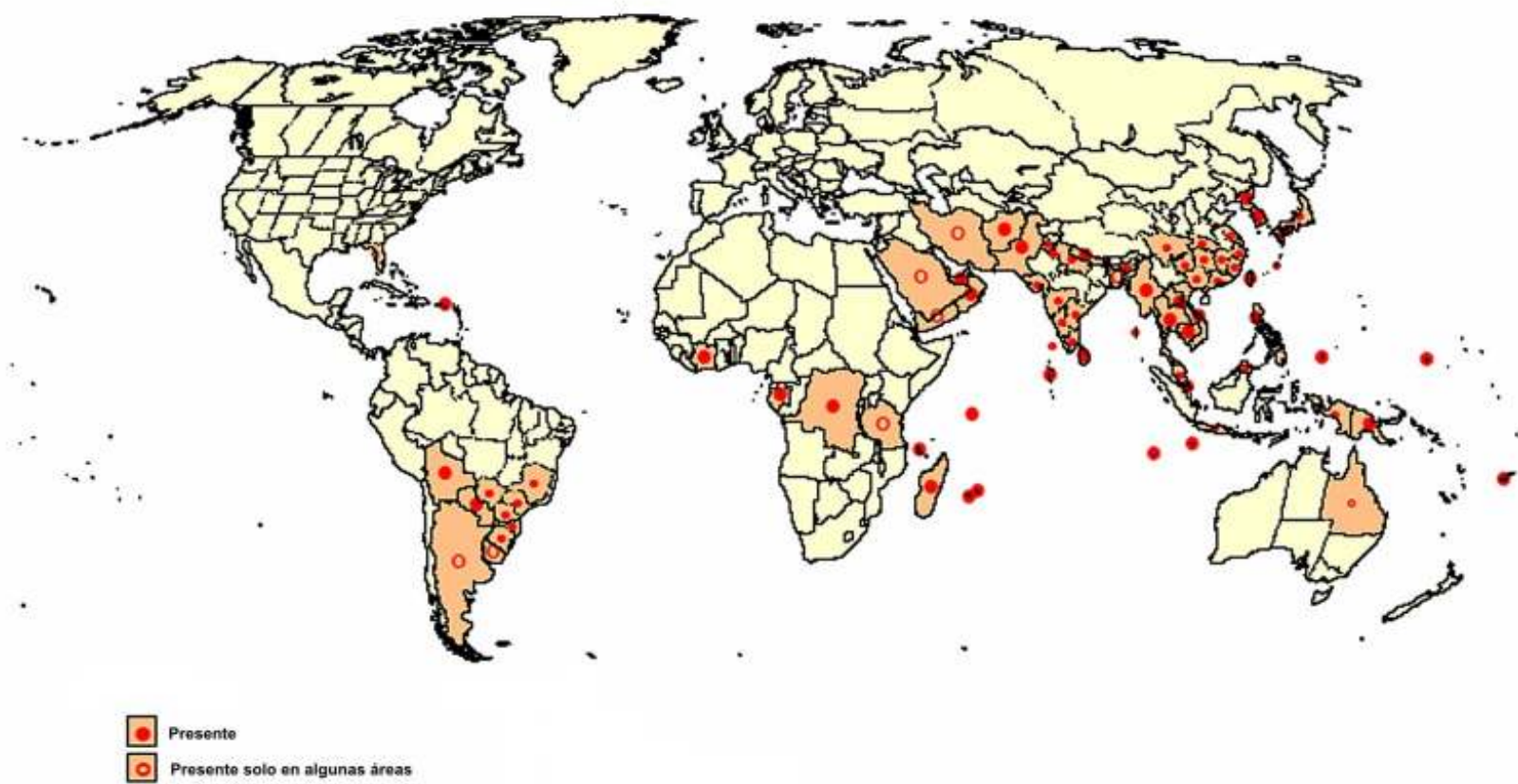
Existe un acuerdo entre los investigadores de cancro cítrico, sobre que esta enfermedad se diseminó desde el sudeste asiático. Esta hipótesis se

sostiene en especímenes cítricos con cancro colectados en India y Java a mediados del siglo XIX. Es probable que desde estas islas del Pacífico haya sido introducido a Japón y desde allí a otros países del mundo, como Estados Unidos y Sudáfrica (Stall et al. 1983, Duran-Vila et al. 2000, Shubert et al. 2001, Gottwald et al. 2002, EPPO 2003).

Berger et al, citados por Stall et al. (1983) y Gottwald et al. (2002) sostienen que el cancro fue introducido a los Estados Unidos a principios del siglo XX desde Japón. Según Stall et al. (1983) en 1915 Hasse describió una bacteria como el agente causal de la enfermedad.

Actualmente el cancro cítrico se encuentra distribuido en muchos países, aunque la situación no es en todos igual. Existen países en los que se está erradicando y otros en los que la enfermedad es endémica. En la Ilustración 3 se puede observar la distribución actual y la situación en cada país (EPPO 2003, CAB International 2005).

La diseminación transcontinental se sabe que se ha realizado a través de material de propagación. Hasta el momento no se conoce que se pueda diseminar por lesiones en fruta (Stall et al. 1983, Shubert et al. 2001, Gottwald et al. 2002, CAB International 2005).



**Ilustración 3** – Distribución mundial del Cancro Cítrico (adaptado de EPPO 2003)

### **2.2.3 El cancro cítrico en el Uruguay**

En 1949, se reportó por primera vez la presencia de *Xanthomonas citri* (tipo B) en un monte de limoneros, ubicado en el departamento de Salto. Los síntomas se encontraron en ramas, hojas y frutos. Casi 20 años después se concluyó que la enfermedad se había diseminado de forma incipiente, tan sólo a unos montes cercanos (Francis et al. 1981, Arocena 1987)<sup>2</sup>.

En el año 1975 se reportan focos de cancrrosis A en la vecina provincia de Entre Ríos (R. Argentina) y se observa una incipiente diseminación de la cancrrosis B en el norte del país. En 1976 el Poder Ejecutivo en el Decreto 600/976 declara a *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) en todas sus razas como plaga nacional y se establece el marco reglamentario para que la Dirección de Sanidad Vegetal del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DSV/MGAP) defina estrategias para el control y la erradicación del cancro cítrico basadas en la inspección de montes y viveros, eliminando tanto las plantas afectadas como sus vecinas dentro de un radio que fue variando (Arocena 1987, Francis et al. 1981). En 1977 se inicia la Campaña de Prevención y Erradicación de Cancro Cítrico (CPECC) y en 1979 se detecta el primer foco de cancrrosis A lo desencadenó que se estableciera la campaña de erradicación con carácter nacional (Francis et al. 1981, Arocena 1987)<sup>2</sup>.

El objetivo de la CPECC fue evitar la introducción y diseminación de la bacteria, procurando su erradicación definitiva o su contención en determinadas áreas (Arocena, 1987).

La estrategia aplicada se fundamentó en las siguientes consideraciones técnicas:

- a. La metodología de eliminación de plantas para lograr la erradicación de focos de la enfermedad, es factible de aplicarse con éxito cuando se constatan bajos niveles de incidencia de la misma, debido a razones de eficiencia biológica (eliminación efectiva del inóculo inicial) y de viabilidad económica (plantas erradicadas/plantas totales).

---

<sup>2</sup> FROMMEL, M. 1994. La cancrrosis de los cítricos. Sin publicar. Material disponible en Unidad de Fitopatología, Facultad de Agronomía.

- b. La diseminación de la Cancrosis ocurre de forma diferente en las largas distancias (entre zonas) o cortas distancias (entre plantas)<sup>3</sup>.

Desde el año 1980, la DSV/MGAP y las empresas citrícolas realizaron convenios para capacitar y disponer de técnicos e inspectores para llevar a cabo la CPECC. Se planificó la ejecución de la campaña y se definieron cuatro regiones del territorio nacional con distintos riesgos epidemiológicos, siendo al norte del río Negro: Salto, Paysandú y Río Negro los departamentos con mayor riesgo. En estos años el diagnóstico e identificación de la bacteria era problemático, ya que se realizaba a través de pruebas de patogenicidad, demorando los resultados entre 20 y 40 días (Arocena, 1987).

En 1983 se realiza por parte de la DSV/MGAP, con apoyo de técnicos de los Estados Unidos el ajuste, la detección e identificación de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) (tipo A) a través de la técnica de ELISA, logrando resultados en 12 horas (Canale et al. 1983)<sup>3</sup>.

Desde el año 1985 y hasta 1991 no se detectaron focos de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) (tipo B), considerándose erradicada a partir de ese año (Arocena 1987)<sup>2</sup>.

Las modificaciones en el marco reglamentario, se basaron fundamentalmente en relación al ajuste y modificación de los radios de eliminación de plantas y de acuerdo a la situación de la enfermedad. En relación a los radios se pasa de un radio inicial de 500 mts (Decreto 600/976) a 30 mts (Decreto 121/979), luego se deja liberado al criterio técnico (Decreto 416/988), posteriormente se establecen las pautas técnicas para la toma de la decisión de cuántas plantas eliminar (Decreto 133/992) y por último el Decreto 535/003 determina otras medidas de control incluida la eliminación de plantas. A partir de 1992 se establece la indemnización a los productores afectados por las acciones de la CPECC en plantaciones y viveros.

A partir de 1997, con la aparición del minador de la hoja de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*) en Uruguay y las particulares condiciones climáticas predisponentes (influencia del fenómeno de “El Niño”), se constata un drástico aumento en el nivel de incidencia de la enfermedad<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> Ing. Agr. M<sup>a</sup> Inés Ares. 2006. Com. Personal. MGAP/DGSSAA.

La influencia del minador de la hoja determinó un cambio en la distribución espacial del cancro cítrico que hasta 1997 fue altamente agregada, concordantemente con los mecanismos de diseminación de la enfermedad (focos de baja incidencia, con plantas afectadas en grupo). A partir del establecimiento del minador, el número y la dispersión de focos aumentó. La distribución agregada, típica desde 1979, cambia como consecuencia del daño del minador, a patrones de agregación intermedia y de distribución al azar<sup>3</sup>.

La evaluación de la incidencia de la enfermedad (plantas afectadas/ plantas existentes) en el norte del país, muestra que desde el año 1970 hasta 1996, se mantiene con incidencias menores al 0,1%, desde el año 1997 al 2001 pasa de 0,17 a 4,12%. El total de plantas afectadas desde el 1979 al 2001 fue de 409.098 de las cuales 364.009 se detectan desde 1997 al 2001, en ese mismo período (1979-2001) se eliminaron 546.475 plantas<sup>3</sup>.

Desde el año 2000, la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA) y el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), acuerdan un Convenio en Sanidad Cítrica (Convenio INIA/DGSA) en el marco del cual coordinan acciones para generar información científica y tecnológica acerca de esta enfermedad. A partir del año 2003 y formalmente en setiembre del año 2004 se incorpora al referido convenio la Universidad de la República a través de la Facultad de Agronomía<sup>4</sup>.

#### **2.2.4 Ciclo de la enfermedad**

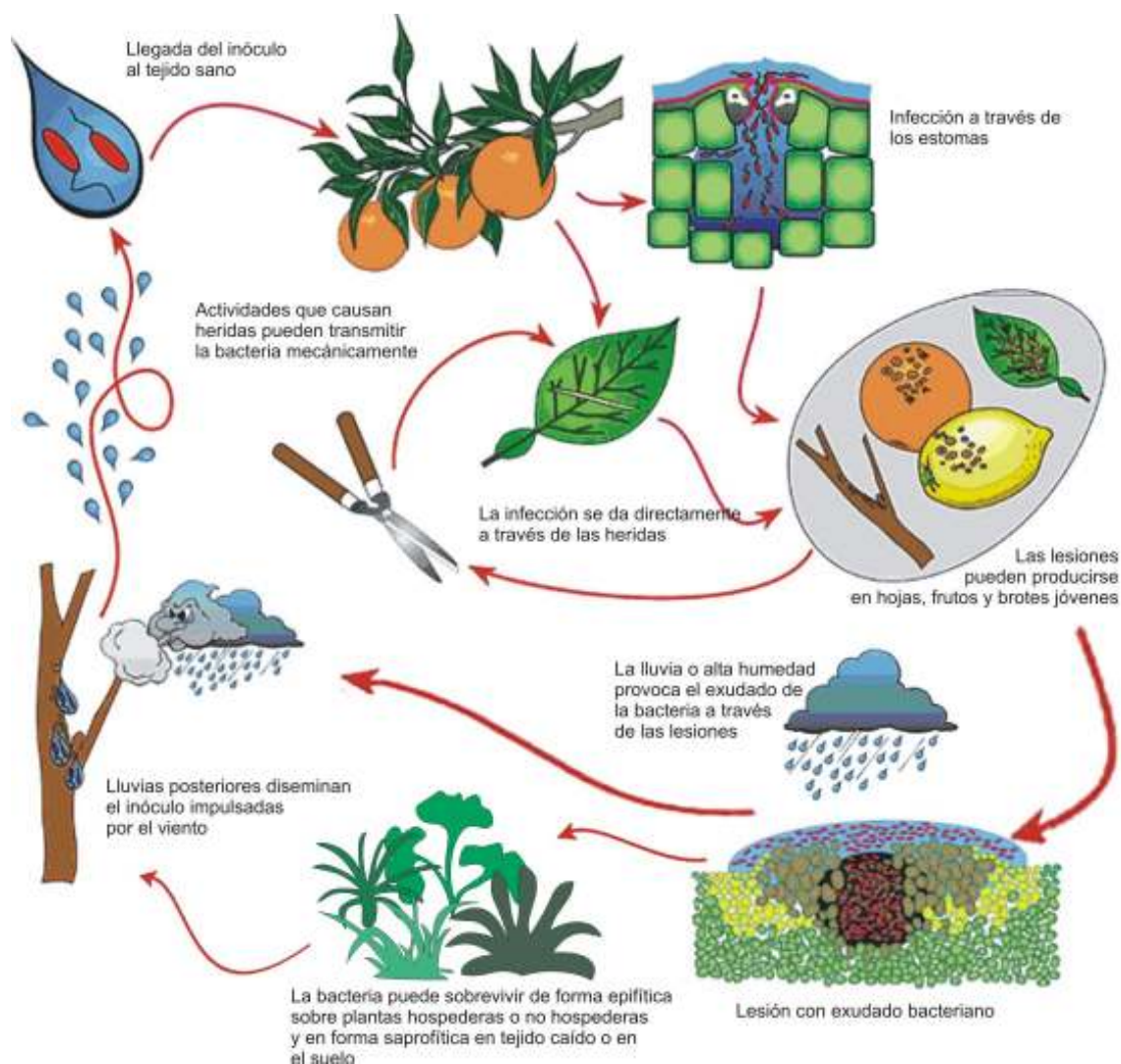
La fuente de inóculo primario son las lesiones resultantes de las infecciones del otoño anterior. En la primavera, al aumentar la temperatura a partir de 14°C y con condiciones de alta humedad, la bacteria se multiplica exudando de las lesiones (Stall et al. 1983, EPPO 2003, CAB International 2005) (Ver Ilustración 4).

La dispersión natural se da principalmente por medio del agua de lluvia impulsada por el viento. Por este mecanismo llega a un nuevo órgano y a otras plantas. Los vientos fuertes, además de ayudar a la diseminación, también pueden ayudar a la infección al causar heridas en hojas y brotes. El agua de lluvia colectada de follaje con lesiones, puede contener hasta 10<sup>9</sup> ufc viables por mL (Stall et al. 1983, Agrios 1995, Duran-Vila et al. 2000, Gottwald et al. 2002, CAB International 2005).

---

<sup>4</sup> Anexo al Convenio de cooperación técnica INIA/MGAP-DGSSAA. Sanidad Cítrica. Exp. N° 020070-000326-04.

La penetración de la bacteria se da a través de estomas o heridas producidas por espinas, insectos como el minador de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*) y arena voladora entre otros. Según Gottwald et al. (1992) y Graham et al. (1992), la entrada de la bacteria se ve favorecida por velocidades de viento mayores o iguales a 8 m/s. Gottwald et al. (1992) encontraron que concentraciones de inóculo de  $10^6$  ufc/mL son suficientes para producir lesiones y que con tan sólo 2 ufc en el estoma se puede ocasionar una lesión. Para que se de la infección, debe haber agua libre en la superficie de los órganos. Cuando la penetración es a través de los estomas, es necesaria una continuidad de agua hasta la cavidad subestomática (congestión estomática). Los órganos susceptibles son brotes, hojas y frutos jóvenes, en activo crecimiento (Duran-Vila et al. 2000, EPPO 2003, CAB International 2005).



**Ilustración 4** – Ciclo de la enfermedad Cancro Cítrico provocada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (adaptado de Gottwald et al., 2002)

Los brotes son susceptibles a infecciones, a través de aberturas naturales, dentro de los 10 a 21 días de iniciado su desarrollo. Las infecciones en las hojas raramente ocurren antes de que se alcance el 85% de la completa expansión y la mayoría se dan en las 2 semanas siguientes. Tanto las hojas muy jóvenes como las maduras son resistentes a las infecciones a través de los estomas, pero no a las que se dan a través de heridas (Stall et al. 1983, Shubert et al. 2001, EPPO 2003).

Frecuentemente los ataques en frutos son más severos que en el resto de la planta ya que su período de susceptibilidad es más largo. Las

infecciones se pueden dar desde que el fruto tiene tan sólo 5 mm de diámetro hasta prácticamente alcanzar su tamaño definitivo, por lo que en un mismo fruto pueden aparecer lesiones de distinto tamaño provocadas por diferentes ciclos de infección (Stall et al. 1983, Duran-Vila et al. 2000).

Las infecciones que producen mayores pérdidas económicas son las que ocurren durante los primeros 90 días de crecimiento del fruto, ya que suelen provocar su caída. Como las lesiones en el fruto no penetran el albedo, la calidad del jugo no se ve afectada (Stall et al., 1983).

Las especies cítricas se caracterizan por presentar varias brotaciones a lo largo del año. Si al momento de la brotación, las condiciones climáticas son favorables, pueden ocurrir nuevas infecciones. Debido a esta características, en un mismo año se dan varios ciclos de la enfermedad (Stall et al. 1983).

La bacteria se multiplica en las lesiones en hojas, tallos y frutos, en los espacios intercelulares provocando que el huésped divida sus células, produciendo lesiones de aspecto típico. Si las condiciones ambientales son favorables, se produce un exudado desde estas lesiones, siendo éstas fuente de inóculo secundario (Stall et al. 1983, Gottwald et al. 2002, EPPO 2003).

Durante el invierno, cuando las condiciones climáticas (sobre todo de temperatura) no son favorables para la multiplicación y dispersión de la bacteria, la misma puede sobrevivir de diversas formas. La más importante desde el punto de vista epidemiológico es en tejidos enfermos. También puede sobrevivir, aunque por corto tiempo y dependiendo de factores climáticos y edáficos, de forma epifítica tanto en plantas hospederas como no hospederas y de forma saprofítica tanto en tejido caído como en el suelo (EPPO 2003, CAB International 2005).

Los brotes infectados al final del otoño, suelen no manifestar síntomas en esa estación, quedando como infecciones latentes, formándose la lesión en la primavera siguiente cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables (CAB International, 2005).

Tanto las infecciones latentes como las lesiones en brotes del año que sobreviven el invierno, son la principal fuente de inóculo primario para la estación siguiente (CAB International, 2005).

### **2.2.5 Características generales del agente causal**

*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* es una bacteria gram-negativa, es un bacilo corto, recto, mide 1.5-2.0 x 0.5-0.75 µm, tiene flagelación

monótrica y no es esporogénica. Es quimioorganotrófica y aerobia obligada, con metabolismo oxidativo de la glucosa. Es catalasa positiva, oxidasa negativa o débil, la reducción de nitrato es negativa y no produce H<sub>2</sub>S. La hidrólisis de almidón, caseína, Tween 80 y esculin es positiva. La asparagina no es utilizada como única fuente de carbono y nitrógeno simultáneamente. Produce la licuefacción de gelatina y pectatos. Para su crecimiento requiere metionina o cisteína y éste es inhibido por 0.02% de cloro de Tetrazolio. Es pobre productora de ácido a partir de carbohidratos (Lelliott et al. 1987, Schaad et al. 1989, CAB International 2005).

Las colonias que se forman en placas con agar y glucosa son de color amarillo cremoso y mucosas. El pigmento amarillo, no difusible en el medio, es xantomonadina (xantano) que es un heteropolisacárido (Lelliott et al. 1987, Schaad et al. 1989, CAB International 2005).

Las colonias que se desarrollan en 48 horas de incubación a 28°C, en medio YDC y NAD son de 1-2 mm de diámetro, redondas, de borde definido, mucoides, convexas, de color amarillo y brillantes. La identificación puede ser confirmada mediante la inoculación de plantas susceptibles. El medio de cultivo XOS con inhibidores, es un medio semiselectivo que permite el desarrollo de las colonias de Xac y de pocos contaminantes que no interfieren con la identificación de la bacteria. Los inhibidores pueden ser colorantes, antibióticos y/o antifúngicos (Monier 1992, Verdier et al. 1994).

## **2.3 MEDIDAS DE CONTROL CONTRA EL CANCRO CÍTRICO**

### **2.3.1 En el campo**

Para que una enfermedad se desarrolle, tienen que encontrarse simultáneamente todos sus componentes, estos son: patógeno virulento, huésped susceptible y ambiente favorable. Cuando se quiere controlar el desarrollo de una enfermedad hay que modificar por lo menos uno de sus componentes. Whetzel, en la década de 1920, enunció cinco principios como una forma de sistematizar las medidas de control de las enfermedades, teniendo en cuenta la relación huésped-patógeno que se dan en un espacio determinado. Los principios de exclusión y erradicación intentan evitar el contacto con el patógeno virulento, mientras que los de protección, inmunización y terapia intentan disminuir la susceptibilidad del huésped. Posteriormente, a estos principios se le agregaron el de evasión que controla el patógeno y/o el ambiente y el de regulación que hace referencia a modificaciones del ambiente (Agrios 1995, Kimati et al. 1995).

Las medidas utilizadas para el control del cancro cítrico abarcan distintos principios dependiendo de la presencia o nivel de desarrollo de la

enfermedad en la zona. En los lugares donde la enfermedad no se ha reportado, el principio más utilizado es la exclusión como forma de prevenir la entrada del patógeno al área y las medidas que pueden utilizarse son la certificación (uso de plantas de vivero libres del patógeno) y medidas cuarentenarias como por ejemplo la prohibición del movimiento de material vegetal desde zonas afectadas, desinfección de vehículos, calzados y ropas de todo aquel que ingrese o salga de las plantaciones en tratamiento (Goto 1992, Kimati et al. 1995, EPPO 2003, CAB International 2005).

Una vez que el cancro cítrico ya se ha establecido en una zona se pueden tomar distintas medidas. A continuación se mencionan las más difundidas.

### **2.3.1.1 Erradicación**

Son medidas tendientes a eliminar el patógeno ya introducido, para lo cual se cortan y queman los árboles infectados y los más próximos aunque no presenten síntomas de la enfermedad. La ausencia de la misma en el campo durante 10 años no es suficiente para declararla erradicada (Stall et al. 1991, Goto 1992, Kimati et al. 1995, CAB International 2005).

### **2.3.1.2 Protección**

Son medidas tendientes a interponer una barrera protectora entre las partes susceptibles de la planta y el inóculo del patógeno antes de que ocurra la inoculación. Con la aplicación de productos cúpricos antes de la primera brotación, debido a su acción bacteriostática, se pueden prevenir las infecciones primarias en los brotes de primavera (Goto 1992, Kimati et al. 1995, CAB International 2005).

### **2.3.1.3 Inmunización**

Es la utilización de plantas con menor grado de susceptibilidad (inmunes, resistentes o tolerantes), por ejemplo las naranjas y las mandarinas son especies menos susceptibles al cancro cítrico que los pomelos y los limones. Otra medida es utilizar portainjertos menos vigorosos como *Poncirus trifoliata*, porque al tener menores brotaciones hay menor cantidad de tejido susceptible (Goto 1992, Kimati et al. 1995, Duran-Vila et al. 2000, EPPO 2003, CAB International 2005).

### **2.3.1.4 Terapia**

Es el restablecimiento de la sanidad de una planta con la cual el patógeno ya estableció una íntima relación parasítica. Se basa en la

eliminación de órganos y/o tejidos afectados mediante la poda y la defoliación (Kimati et al. 1995, EPPO 2003).

### **2.3.1.5 Regulación**

Son medidas de control basadas en modificaciones del ambiente: humedad, temperatura, luminosidad, composición del aire y reacciones y propiedades del suelo como forma de prevenir la enfermedad. Este principio abarca la utilización de cortinas rompeviento, el control del minador de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*) y evitar trabajar en el monte cuando la superficie de los árboles esté húmeda (Stall et al. 1983, Stall et al. 1991, Goto 1992, Kimati et al. 1995, Duran-Vila et al. 2000, CAB International 2005).

### **2.3.2 Medidas poscosecha para manejo de riesgo de cancro cítrico.**

El manejo de riesgos de plagas es definido como la "Evaluación y selección de opciones para reducir el riesgo de introducción y diseminación de una plaga" (FAO, 2001). Una de las medidas que podría ser implementada por el país exportador desde la cosecha hasta el embarque (poscosecha) es la desinfección de los frutos. Luego de la cosecha, la fruta cítrica se procesa en plantas de empaque antes de su comercialización. Tanto Estados Unidos de América como México, para el ingreso de fruta cítrica exigen que la fruta cosechada en zonas donde hay cancro cítrico, sea superficialmente desinfectada en las plantas de empaque como forma de prevenir una posible dispersión de células viables de Xac. La desinfección propuesta luego del trabajo de Obata et al. (1969) es tratar la fruta durante 2 minutos con una solución de hipoclorito de sodio conteniendo 200 ppm de cloro a pH entre 6.0 y 7.5 (Obata et al. 1969, Stapleton 1986, Brown et al. 1987).

Brown et al. (1987) trabajaron con distintos desinfectantes sobre fruta cítrica inoculada con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Esta bacteria responde de forma similar en los test *in vitro* que la bacteria causal del cancro cítrico y no es cuarentenaria en la región de los Estados Unidos de América dónde los investigadores desarrollaron el trabajo. Se consiguieron reducciones significativas en la población de bacterias sobre la fruta, tanto cuando la trataron con hipoclorito de sodio, como con dióxido de cloro y amonio cuaternario.

En Uruguay se evaluó durante tres años, el tratamiento químico de poscosecha utilizado rutinariamente en plantas de empaque para la exportación de fruta cítrica. Dicho trabajo incluyó hipoclorito de sodio

(NaClO) y ortofenilfenato de sodio (SOPP). Trabajando con fruta infestada naturalmente e inoculada artificialmente con *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, se consiguieron reducciones significativas en el número de frutas positivas, así como también en la población bacteriana remanente en la superficie de la misma<sup>1</sup>.

## **2.4 DESINFECTANTES**

Brock et al. (1993) plantean que los desinfectantes son sustancias que matan a los microorganismos y se usan sobre objetos inanimados.

La FAO (2004) propone que la desinfección es la reducción del número de microorganismos presentes en el medio ambiente, por medio de agentes químicos y/o métodos físicos, a un nivel que no comprometa la inocuidad o la aptitud del alimento.

A diferencia de los fungicidas, los desinfectantes no tienen acción residual ni eliminan patógenos del interior del producto, no son sistémicos y por lo tanto no evitan la reinfeción del producto tratado durante su almacenamiento (Taverner et al. 1997, Mari et al. 1999, Taverner 1999, Prusky et al. 2001, Hernandez-Brenes 2002).

Hernandez-Brenes (2002) establece que el objetivo de los desinfectantes en el agua es reducir la contaminación cruzada, si bien también pueden reducir la presencia de patógenos sobre la superficie del producto. En general los desinfectantes de frutas en poscosecha se aplican en el agua de baños. Por esto es importante determinar cuáles son las mejores condiciones en que debe estar el agua para su utilización.

### **2.4.1 Condiciones del agua de los baños**

La eficiencia en el agua de muchos desinfectantes está estrechamente ligada a la cantidad de materia orgánica y a la suciedad presente, debido a que la primera reacciona con los desinfectantes y la segunda dificulta el contacto con los microorganismos de la superficie a desinfectar. Por esto es muy importante que se utilice agua potable y limpia, libre de organismos patógenos (Beuchat 1998, Hernandez-Brenes 2002).

La relación entre la temperatura del agua de lavado y la del producto a lavar es importante. Tanto Bartz et al. (1981) como Zhuang et al. (1995) probaron que cuando la temperatura del agua es menor que la del fruto, el agua y los contaminantes que esta tenga, penetran en la pulpa del fruto. Esto se da porque la diferencia de temperatura genera un diferencial de presión que tiene un efecto de succión. También se genera un diferencial de presión con el mismo efecto si la fruta se fuerza a estar sumergida.

Manteniendo la temperatura del agua a la misma temperatura que la fruta o unos grados por encima y dejando que la misma flote, se evita la posible contaminación interna por parte de los patógenos del agua, así como el posible daño por el aumento del volumen debido al ingreso del agua.

#### **2.4.2 Mecanismos de acción**

Según Tortora et al. (1993) los agentes químicos actúan mediante dos mecanismos. Uno es alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática que es quien controla activamente el pasaje de nutrientes y la eliminación de desechos. La alteración de esta membrana provoca la salida del contenido celular al medio y por lo tanto interfiere en el crecimiento de la célula. El segundo mecanismo es alterando la morfología de las proteínas y los ácidos nucleicos ya que los agentes químicos pueden romper ciertos enlaces (puentes de hidrógeno, puentes disulfuro y enlaces covalentes), consiguiendo de esta forma desnaturalizar las proteínas. Al modificarse los ácidos nucleicos de una célula (ADN y ARN) se impide su correcta duplicación, teniendo un efecto letal sobre la misma.

Un mismo agente químico puede ser inhibitorio del crecimiento (-estático) o letal (-cida) según: la concentración a la que se encuentre, la resistencia del organismo, la acidez del medio, la presencia de materia orgánica, la facilidad con la que se produzca el contacto con el organismo a controlar, el tiempo que dure este contacto y la temperatura a la que se produzca (Brock et al. 1993, Tortora et al. 1993).

#### **2.4.3 Uso de desinfectantes en poscosecha**

Se revisaron algunos trabajos en los cuales se evaluó la actividad desinfectante de distintos agentes químicos, en distintas dosis y tiempos de exposición sobre distintos patógenos. En el Cuadro 10 se presentan los trabajos sobre distintos frutos inoculados (natural o artificialmente) y en el Cuadro 11 los trabajos en agua.

**Cuadro 10** – Antecedentes de ensayos en los que se evaluó la acción de desinfectantes en poscosecha sobre distintos frutos.

| Trabajo                 | Fruto   | Desinfección                                                                                                                                        | Patógeno                                                                           | Inoculación <sup>(1)</sup> |
|-------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Spotts et al. (1980)    | Pera    | <ul style="list-style-type: none"> <li>130 ppm NaOCl 2 min</li> <li>0.35/0.5 ppm de ClO<sub>2</sub> 2 min</li> </ul>                                | <i>Penicillium expansum</i> ,<br><i>Botrytis cinerea</i> , <i>Mucor piriformis</i> | +<br>heridas               |
| Costilow et al. (1984)  | Pepino  | <ul style="list-style-type: none"> <li>105 ppm ClO<sub>2</sub> 15 min</li> </ul>                                                                    | Levaduras, hongos y bacterias ácido lácticas                                       | -                          |
| Stapleton (1986)        | Lima    | <ul style="list-style-type: none"> <li>50-900 ppm NaOCl 2 min</li> </ul>                                                                            | Bacterias y hongos                                                                 | -                          |
|                         |         | <ul style="list-style-type: none"> <li>200/400 ppm NaOCl 2 min</li> </ul>                                                                           | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. citri                                            | +<br>superficial           |
| Brown et al. (1987)     | Cítrica | <ul style="list-style-type: none"> <li>200 ppm NaOCl 2 min</li> <li>200 ppm ClO<sub>2</sub> 2 min</li> <li>0.1% amonio cuaternario 1 min</li> </ul> | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria                                      | +<br>superficial           |
| Lee et al. (2004)       | Manzana | <ul style="list-style-type: none"> <li>40-120 ppm ClO<sub>2</sub> 0.5-4 min</li> </ul>                                                              | <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>                                            | +                          |
| Garmendia et al. (2005) | Cítrica | <ul style="list-style-type: none"> <li>10 ppm ClO<sub>2</sub> 30 seg.</li> <li>100 ppm NaOCl 30 seg.</li> </ul>                                     | <i>Penicillium italicum</i>                                                        | +<br>superficial           |
|                         |         | <ul style="list-style-type: none"> <li>10 ppm ClO<sub>2</sub> 1 min.</li> </ul>                                                                     | <i>Penicillium digitatum</i><br><i>Penicillium italicum</i>                        | +<br>heridas               |

<sup>(1)</sup> + = artificialmente inoculadas; - = con inóculo natural

En los trabajos de Spotts et al. (1980), Costilow et al. (1984), Stapleton et al. (1986), Brown et al. (1987) y Garmendia et al. (2005), se recuperaron microorganismos desde los frutos, luego de aplicar los tratamientos desinfectantes en todos los casos, sin embargo en el de Lee et al. (2004) con algunos tratamientos, la reducción fue tal que no se consiguieron recuperar bacterias.

**Cuadro 11** - Antecedentes de ensayos con desinfectantes en poscosecha en los que se evaluó el efecto en el agua.

| Trabajo                 | Desinfección                                                                                                                                    | Patógeno                                                                                                                  |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Spotss et al. (1980)    | <ul style="list-style-type: none"> <li>0.5-50 ppm NaOCl 0.5-10 min</li> <li>0.1-10 ppm ClO<sub>2</sub> 0.5-10 min</li> </ul>                    | <i>Penicillium expansum</i> ,<br><i>Botrytis cinerea</i> , <i>Mucor piriformis</i>                                        |
| Costilow et al. (1984)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>2.5-250 ppm ClO<sub>2</sub> 15 min</li> </ul>                                                            | Levaduras, hongos y bacterias ácido lácticas                                                                              |
| Brown et al. (1987)     | <ul style="list-style-type: none"> <li>150/200 ppm NaOCl 2 min</li> <li>200 ppm ClO<sub>2</sub> 2 min</li> <li>1000 ppm amonio 1 min</li> </ul> | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria                                                                             |
| Roberts et al. (1994)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>1-5 ppm ClO<sub>2</sub> 0.5-4 min</li> </ul>                                                             | <i>Penicillium expansum</i> ,<br><i>Botrytis cinerea</i> , <i>Mucor piriformis</i> ,<br><i>Cryptosporiopsis perennans</i> |
| Mari et al. (1999)      | <ul style="list-style-type: none"> <li>12.5-200 ppm ClO<sub>2</sub> 20 s-10 min</li> </ul>                                                      | <i>Monilinia laxa</i>                                                                                                     |
| Lee et al. (2004)       | <ul style="list-style-type: none"> <li>20-120 ppm ClO<sub>2</sub> 0-5 min</li> </ul>                                                            | <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>                                                                                   |
| Garmendia et al. (2005) | <ul style="list-style-type: none"> <li>10 ppm ClO<sub>2</sub> 30 seg.</li> <li>100 ppm NaOCl 30 seg.</li> </ul>                                 | <i>Penicillium italicum</i>                                                                                               |

Excepto en el trabajo de Lee et al. (2004), en el resto se encontró que los tratamientos desinfectantes fueron efectivos en el agua.

#### **2.4.4 Cloro como hipoclorito**

El cloro se usa como desinfectante desde la segunda mitad del siglo XIX, aunque se hizo popular a partir de su utilización como desinfectante en heridas en la Primera Guerra Mundial (Dychdala, 1983).

Según Hernandez-Brenes (2002) el desinfectante que más se utiliza en la industria alimenticia es el cloro ya sea para el tratamiento del agua de procesamiento y lavado, como para la limpieza de equipos y otras superficies.

El cloro, para la desinfección superficial de frutas y hortalizas frescas, se utiliza normalmente a concentraciones de 50-200 ppm con un tiempo de contacto de 1-2 minutos (Beuchat, 1998).

Obata et al. (1969) trabajaron con naranjas inoculadas con una suspensión de Xac de hasta 10<sup>7</sup> ufc/mL. Consiguieron una desinfección

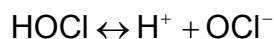
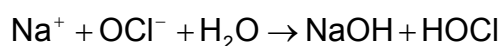
satisfactoria de la superficie luego de sumergirlas en una solución de 100 ppm de cloro libre proveniente de hipoclorito de sodio, durante 2 minutos.

#### 2.4.4.1 Mecanismo de acción

La capacidad del cloro para destruir microorganismos depende de la cantidad de cloro residual libre. El cloro residual libre es el cloro restante después de que reacciona con las impurezas del agua. La cantidad de cloro que reacciona se denomina “demanda de cloro” del agua; las posteriores adiciones de cloro existirán en forma de cloro residual libre. En el agua se puede encontrar bajo tres formas: cloro elemental ( $\text{Cl}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) e ion hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) (Dychdala 1983, Gavin et al. 1995).

El cloro es un fuerte agente oxidante debido a su afinidad por electrones, por lo tanto en el agua reacciona rápidamente tanto con sustancias inorgánicas reducidas como con materia orgánica perdiendo su propiedad oxidativa (Dychdala, 1983).

Cuando el cloro se incorpora al agua bajo la forma de hipoclorito, se forma ácido hipocloroso que al ser un ácido débil se mantiene en equilibrio en la solución con sus iones hipoclorito e hidrógeno (Dychdala 1983)<sup>5</sup>.

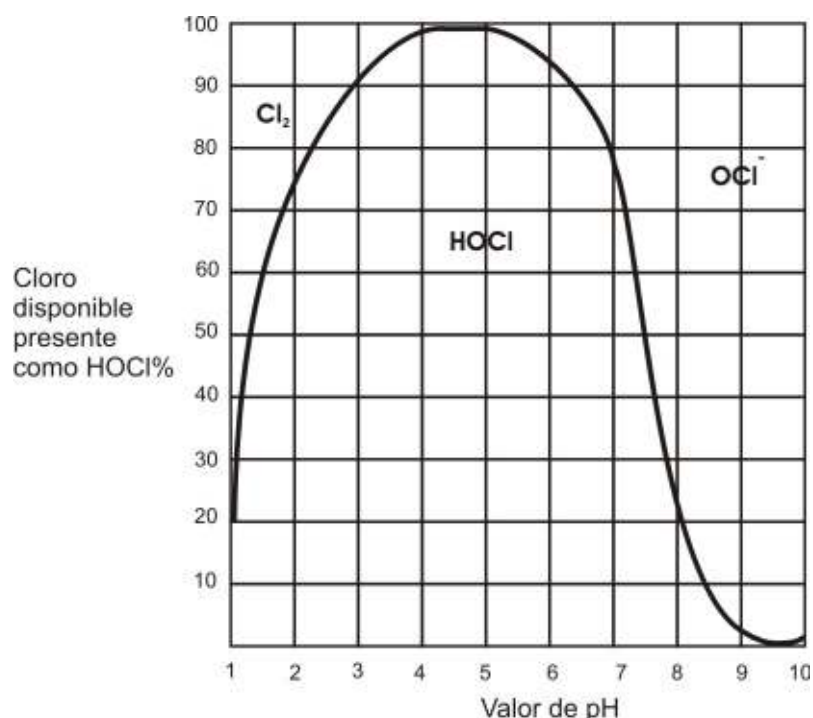


La disociación del ácido hipocloroso varía según las condiciones en las que se encuentra la solución. Dos factores muy importantes son el pH y la temperatura.

A medida que el pH de la solución disminuye el equilibrio favorece la formación de ácido hipocloroso. El porcentaje de cloro como ácido hipocloroso a pH 6.0 y 8.0 es del 97% y 23%, respectivamente, a 20°C. El gas cloro ( $\text{Cl}_2$ ), es un compuesto tóxico y se forma a pH menores de 4 (Beuchat, 1998) (Ver Ilustración 5).

---

<sup>5</sup> Ing. Agr. Patricia Coscia. 2006. Com. Personal. Asistente G.D. Fertilidad de Suelos, Dpto. Suelos y Aguas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República.



**Ilustración 5** – Porcentaje de cloro disponible como HOCl según el valor de pH a 20°C (adaptado de Palin, 1983).

A un pH dado, el equilibrio favorece al ácido hipocloroso a medida que la temperatura disminuye, ya que el cloro se evapora cuando se eleva la temperatura del agua (Beuchat, 1998).

El ácido hipocloroso es la forma que ejerce el efecto letal en los microorganismos. Por su carga neutra, difunde junto con el agua a través de la pared celular lo que le da un amplio rango de acción (Tortora et al. 1993, Beuchat 1998).

#### 2.4.4.2 Condiciones de uso

El pH de la solución de lavado debe mantenerse entre 6.0 y 7.5 a una temperatura de 20°C, para que la mayor cantidad de cloro se encuentre bajo la forma de ácido hipocloroso. De esta forma se minimiza la corrosión que podrían sufrir los contenedores de metal y equipos de procesamiento y los riesgos de exposición a los vapores de cloro que pueden provocar irritación cutánea y del tracto respiratorio si el pH de la solución es demasiado bajo (Palin 1983, Brown 1987, Beuchat 1998, Hernandez-Brenes 2002).

El agua a utilizar no debe ser dura y debe tener la menor cantidad posible de materia orgánica para mejorar la eficacia del cloro. También es

importante evitar la exposición al aire, luz o metales (Dychdala 1983, Hernandez-Brenes 2002).

La inmersión de fruta en la solución de hipoclorito de sodio produce una pérdida de cloro por descomposición del mismo. Dado que la concentración de hipoclorito de sodio disminuye con el lavado de las frutas, Obata et al. (1969) recomiendan, para la desinfección de fruta cítrica, usar 200 ppm de cloro, adicionando periódicamente para asegurarse una concentración mínima por encima de 100 ppm, que es la mínima efectiva.

#### **2.4.4.3 Ventajas para su utilización**

El cloro, bajo la forma de hipoclorito de sodio, presenta rápida acción desinfectante, actuando contra muchos microorganismos con la ventaja de ser un producto relativamente barato, incoloro e inodoro, fácil de preparar y usar. Por otro lado, no resulta difícil determinar su concentración (Cunningham et al. 2002, Taverner 2004).

#### **2.4.4.4 Inconvenientes para su utilización**

El cloro, bajo la forma de hipoclorito de sodio, es un producto inestable durante su almacenamiento, con efecto corrosivo sobre los metales. Al usarlo como desinfectante tiene el problema de que su eficacia se ve afectada por el contenido de materia orgánica (a mayor materia orgánica, mayor pérdida del efecto germicida) y por el valor de pH de la solución (a mayor pH, menor eficacia). Esto último hace que se requiera una permanente medición y corrección del valor de pH de la solución (Roberts et al. 1994, Cunningham et al. 2002).

Otros inconvenientes del cloro son que los virus tienden a ser resistentes, es un producto tóxico a altos niveles y reacciona con algunos compuestos orgánicos formando compuestos nocivos para la salud humana como por ejemplo cloraminas y trihalometanos (uno de los más conocidos es el cloroformo) (Apel 1993, Roberts et al. 1994, Junli et al. 1997).

#### **2.4.5 Dióxido de cloro**

A nivel comercial, existe un gran número de compuestos antimicrobianos en base a cloro. Uno de ellos es el dióxido de cloro, el que se ha difundido como alternativa al hipoclorito de sodio por presentar algunas ventajas comparativas (Junli et al., 1997).

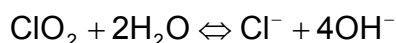
En condiciones normales de temperatura y presión, el dióxido de cloro es un gas de color verde amarillento fácilmente soluble en agua, razón por la

cual se lo usa en solución acuosa. Tiene acción fungicida y bactericida a bajas concentraciones con un gran potencial oxidativo (Dychdala 1983, Junli et al. 1997). En 1948 Ingols et al. citados por Dychdala (1983), mostraron que su capacidad oxidativa es 2.5 veces mayor que la del cloro.

En Estados Unidos de América, el dióxido de cloro se usa para potabilizar agua y para la desinfección de equipamiento en plantas de empaque de frutas y hortalizas. En estas condiciones se permite hasta una máximo de 200 ppm en la solución. Para el tratamiento de frutas y hortalizas enteras y sin heridas superficiales la dosis máxima permitida en el agua de lavado es 5 ppm, mientras que si están cortados no está permitido su uso (Beuchat 1998).

#### **2.4.5.1 Mecanismo de acción**

El dióxido de cloro penetra a través de la membrana celular de las bacterias fácilmente ya que en el agua el 100 % se mantiene en su estado molecular. Actúa destruyendo la permeabilidad de la membrana, inhibiendo la respiración y afectando la síntesis de proteínas y actividad enzimática, lo que provoca la muerte celular (Junli et al. 1997, Beuchat 1998).



Por su poder oxidativo, 2.5 veces mayor que el del cloro, para conseguir el mismo efecto que el cloro líquido, alcanza una menor concentración en un menor tiempo de exposición (Junli et al., 1997).

#### **2.4.5.2 Condiciones de uso**

Por ser un compuesto que no se puede almacenar, debe producirse en el sitio a utilizar, para lo cual existen distintos tipos de generadores. En estos casos el dióxido de cloro generado es vertido directamente en el agua de lavado. Existen mecanismos automáticos que miden el potencial de óxido-reducción, a través del cual se puede estimar la concentración de dióxido de cloro en el agua y lo mantienen constante regulando la generación en función de la necesidad (Roberts et al., 1994).

La dosis máxima permitida para el lavado de frutas enteras es de 5 ppm pero existen distintas recomendaciones que van desde 1 a 5 ppm (Apel 1993, Cunningham et al. 2002).

Durante el proceso de desinfección de la fruta, por la agitación del agua, el dióxido de cloro pasa de la solución al aire. El nivel máximo permitido de dióxido de cloro en el aire es de 0.1 ppm, aunque a menores

niveles ya puede ser percibido su olor. Por este motivo es necesario disponer de un buen sistema de ventilación y extracción del aire en las plantas de empaque que utilicen este sistema de desinfección (Apel 1993, Beuchat 1998).

#### **2.4.5.3 Ventajas para su utilización**

Bajo las mismas condiciones de uso que el cloro en forma de hipoclorito, la acción bactericida y esporicida del dióxido de cloro es más rápida por su mayor capacidad oxidativa y por ser menos reactivo con la materia orgánica, siendo efectivo a menor concentración (Dychdala 1983, Junli et al. 1997, Beuchat 1998, Cunningham et al. 2002).

El rango de pH en el cual el dióxido de cloro mantiene su eficiencia es bastante amplio (entre 6 y 10), siendo esto una ventaja comparativa frente al cloro en forma de hipoclorito, ya que no es necesario corregir el pH del agua (Dychdala 1983, Beuchat 1998).

El dióxido de cloro no forma trihalometanos ni reacciona con compuestos amoniacales y por lo tanto no forma cloraminas (Dychdala 1983, Apel 1993, Junli et al. 1997, Beuchat 1998, Cunningham et al. 2002).

#### **2.4.5.4 Inconvenientes para su utilización**

Debido a que el dióxido de cloro es un compuesto muy reactivo lo que lo hace poco estable, es explosivo a altas concentraciones por lo cual no se puede almacenar debiendo ser generado *in situ* lo que implica un mayor costo (Beuchat, 1998).

La emanación del gas dióxido de cloro al ambiente, aumentando su concentración en el aire, puede resultar tóxica (Cunningham et al., 2002). Roberts et al. (1994), cuando trabajaron con 3ppm de dióxido de cloro en una planta de empaque en la que se usaba un buen sistema de ventilación, se vieron enfrentados a disconformidades por parte de los trabajadores debido a las emanaciones gaseosas del compuesto.

En solución acuosa, se descompone a temperaturas superiores a 30°C y si se expone a la luz. Su actividad bactericida disminuye al bajar la temperatura (Dychdala 1983, Junli et al. 1997, Beuchat 1998, Cunningham et al. 2002).

## **2.4.6 Amonio cuaternario**

Los amonios cuaternarios, también conocidos como “quats”, son surfactantes catiónicos, por lo cual disminuyen la tensión superficial entre las moléculas de un líquido. Su capacidad limpiadora se debe a la parte de la molécula cargada positivamente. Son derivados del ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), de donde proviene su nombre (Tortora et al. 1993, Beuchat 1998).

Los quats tiene una fuerte acción antimicrobiana dependiendo del tipo que se use, siendo más eficaces contra bacterias gram-positivas que frente a las gram-negativas; por esto son comúnmente usados para desinfectar superficies y equipamientos en las plantas de empaque de frutas y hortalizas luego de haber sido lavadas (Tortora et al. 1993, Beuchat 1998, Cunningham et al. 2002).

Estos compuestos pueden ser usados en un amplio rango de pH, son relativamente estables en presencia de materia orgánica y las soluciones adecuadamente diluidas son inodoras e incoloras (Beuchat 1998, Cunningham et al. 2002).

### **2.4.6.1 Mecanismo de acción**

Hasta el momento, el mecanismo de acción de los quats no ha sido fehacientemente aclarado, aunque la hipótesis más aceptada es que afectan la membrana citoplasmática, alterando su permeabilidad, debido a lo cual se provoca la pérdida de algunos constituyentes citoplasmáticos esenciales (Tortora et al., 1993).

Debido a su actividad surfactante, los quats tienen una buena habilidad penetradora y parece que forman una película residual antimicrobiana cuando son aplicados a la mayoría de las superficies duras (Beuchat, 1998).

### **2.4.6.2 Condiciones de uso**

La efectividad como desinfectante de los quats es máxima a pH entre 6 y 10, limitándose su potencial a pH más ácido. Estos compuestos no son compatibles con jabones y detergentes aniónicos, por lo cual las superficies deben ser adecuadamente enjuagada entre la limpieza y la desinfección, si se utilizaron este tipo de detergentes. Este grupo de desinfectantes es potencialmente aplicable en superficies de frutas y vegetales sin cortar y que deban pelarse antes de ser consumidos (Beuchat, 1998).

#### **2.4.6.3 Ventajas para su utilización**

Los quats no son corrosivos de metales, son estables a altas temperaturas, su efectividad no se ve afectada por la presencia de materia orgánica y se mantiene en un amplio rango de pH (Beuchat 1998, Cunningham et al. 2002).

Presentan mayor efectividad que el cloro sobre levaduras, hongos y microorganismos gram positivos (Beuchat 1998, Cunningham et al. 2002).

#### **2.4.6.4 Inconvenientes para su utilización**

No se obtiene el mismo nivel de efectividad sobre las bacterias gram-negativas que sobre las gram-positivas, siendo menor en las primeras. Su actividad se puede ver disminuida si son utilizados con aguas pesadas (Beuchat 1998, Cunningham et al. 2002).

Los quats aún no están registrados para el uso directo sobre las frutas, por lo tanto su uso está limitado a la limpieza del equipamiento (Ritenour 2000, Cunningham et al. 2002).

Los compuestos de amonios cuaternarios, al ser utilizados en la limpieza de equipamientos, pueden manchar la superficie de la fruta. Esto puede ocurrir cuando el equipamiento no ha sido enjuagado, no se ha secado por completo o se vuelve a mojar al momento en que la fruta se pone en contacto con el mismo. El grado de daño es mayor cuanto mayor sea la concentración del quat (Ritenour 2000, Taverner 2001, Cunningham 2003).

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO**

El trabajo experimental se realizó entre el 17 de mayo y el 13 de junio de 2005, en el laboratorio de la Unidad de Fitopatología en la Facultad de Agronomía - Universidad de la República.

#### **3.2 FRUTA**

La fruta utilizada fue limón (*Citrus limon*) del tipo Lisbón y Fino, de calidad exportable, color de cáscara verde amarillento, con un tamaño similar entre los que se usaron el mismo día (ver Cuadro 12) y que no presentaran síntoma de ninguna enfermedad. Los frutos fueron cosechados de cuadros libres de cancro cítrico y mantenidos en heladera hasta el momento de su utilización.

El 19 de mayo se cosecharon 50 limones tipo Lisbón del cuadro 4 del establecimiento “El Resorte”, Punta Espinillo, Montevideo. El último tratamiento fitosanitario que había recibido el cuadro al momento de la cosecha, fue una aplicación de 4 kg/ha de oxiclورو de cobre realizada el 28 de marzo. Con los frutos cosechados, se formaron dos grupos homogéneos de 18 unidades, utilizándose uno el 20 de mayo y el otro el 27 de mayo.

El 4 de junio se cosecharon 30 limones tipo Fino del cuadro F1 del establecimiento “Hortifrutícola Kiyú”, Kiyú, San José. El último tratamiento fitosanitario que había recibido el cuadro al momento de la cosecha, fue una aplicación de 1.5 kg/ha de Nordox (fungicida cúprico), realizada el 4 de abril. De los frutos cosechados, se seleccionaron 18 unidades homogéneas para utilizar el 6 de junio.

El 6 de junio se cosecharon otros 30 limones del establecimiento “El Resorte” del mismo cuadro que se habían cosechado el 19 de mayo, el cual no había recibido ninguna nueva aplicación de productos fitosanitarios. De los frutos cosechados, se seleccionaron 18 unidades homogéneas para utilizar el 7 de junio.

**Cuadro 12** - Promedio, desvío estándar, mínimo y máximo de peso, diámetro menor y diámetro mayor de los limones utilizados en cada bloque.

|                            |          | <b>BLOQUE</b> |               |               |               |
|----------------------------|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                            |          | <b>20-May</b> | <b>27-May</b> | <b>06-Jun</b> | <b>07-Jun</b> |
| <b>Peso (g)</b>            | Promedio | 166.57        | 147.88        | 142.32        | 141.72        |
|                            | Desvío   | 13.17         | 11.61         | 17.61         | 16.88         |
|                            | Min      | 146.62        | 128.17        | 115.17        | 116.24        |
|                            | Máx.     | 188           | 165.5         | 171.21        | 183.09        |
| <b>Diámetro Menor (mm)</b> | Promedio | 65.94         | 63.39         | 60.56         | 62.68         |
|                            | Desvío   | 1.92          | 1.82          | 3.47          | 2.39          |
|                            | Min      | 63            | 61            | 54            | 59.04         |
|                            | Máx.     | 69            | 67            | 66            | 66.45         |
| <b>Diámetro Mayor (mm)</b> | Promedio | 72.22         | 68.00         | 69.50         | 79.49         |
|                            | Desvío   | 2.62          | 1.85          | 4.06          | 3.71          |
|                            | Min      | 68            | 64            | 60            | 73.99         |
|                            | Máx.     | 77            | 73            | 75            | 86.08         |

### 3.3 ENSAYOS PREVIOS

Antes de proponer el experimento a realizar para cumplir con los objetivos del trabajo, se realizaron algunos ensayos para poder ajustar la metodología a emplear.

Se realizaron ensayos *in vitro* con Xac para ajustar la concentración de dióxido de cloro. En los mismos se obtuvieron una alta efectividad con concentraciones del desinfectante mayores o iguales a 3 ppm. Con dosis menores se obtuvieron resultados erráticos. También se realizaron ensayos con 5 ppm de dióxido de cloro con fruta asintomática artificialmente inoculada con Xac, dando diferencias significativas con los testigos (Verdier et al., 2005).

Se realizó un ensayo para cuantificar el posible daño sobre la superficie de la fruta ocasionado por el amonio cuaternario Tefor 80, a las dosis recomendadas por la empresa que lo suministró (0.1 y 0.2%). Los frutos tratados fueron mandarinas y limones, no observándose daños, a ninguna de las dosis, en ningún fruto.

Para poder limitar el tiempo de acción de los desinfectantes, era necesario inactivar la acción de los mismo (bloquear). Se buscaron y seleccionaron productos y dosis que bloquearan la acción de los desinfectantes, sin afectar el crecimiento de la bacteria. En el trabajo de Brown et al., en 1987 utilizaron tiosulfato de sodio como bloqueador de los compuestos clorados y en el libro de Russell et al. (1979) se proponen distintos bloqueadores para los compuestos de amonio cuaternario, siendo uno de ellos el Tween 80.

Se probaron si las dosis de 0.04% p/v de tiosulfato de sodio y de 1% v/v de Tween 80 eran efectivas para bloquear los desinfectantes sin afectar el normal crecimiento de la bacteria. Este ensayo se realizó tanto con los bloqueadores por separado como juntos, siendo efectivos en todas las situaciones.

Para comprobar si la concentración del inóculo variaba durante la inoculación de los frutos, se realizaron recuentos antes y después de inocular 20 frutos. En estos recuentos no se encontraron diferencias.

Para determinar el número de frutos a utilizar en cada tratamiento para cumplir el objetivo del presente trabajo, se realizó un ensayo a partir del cual se determinó que eran necesarios 10 frutos por tratamiento para detectar diferencias de un orden en la sobrevivencia de Xac. Debido a lo inconveniente de realizar el mismo día un ensayo con 60 frutos que luego implicaba manipular 180 placas, se decidió realizar 4 bloques diferidos en el tiempo y por lo tanto en cada bloque trabajar con tres frutos por tratamiento.

### **3.4 TRATAMIENTOS**

Se evaluaron tres productos desinfectantes en el agua del lavado de fruta cítrica a distintas concentraciones: hipoclorito de sodio con un mínimo de 200 ppm de Cl, dióxido de cloro a 3 y 5 ppm +/- 0.5 de Cl y un amonio cuaternario al 0.1 y 0.2% de producto comercial. Como testigo se utilizó agua de grifo esterilizada en autoclave a 120 °C por 20 minutos.

Los tratamientos se aplicaron en un baño durante 2 minutos, manteniendo la fruta sumergida y con un leve movimiento; tratando de simular el pasaje por una balsa de lavado en una planta de empaque. Pasados los 2 minutos se retiraron los frutos de a uno por vez. El tiempo

transcurrido entre la primera extracción y la tercera nunca superó los 5 segundos, pero de todas formas se dejó registrado el orden para poder considerarlo a la hora de analizar los resultados.

### **3.4.1 Preparación de las soluciones desinfectantes.**

#### **3.4.1.1 Hipoclorito de sodio**

Se utilizó una solución comercial de Hipoclorito de sodio al 10%, cuya concentración se verificó por el método DPD (ver 9.1) (Palin 1983, APHA 1992). Luego se preparó el volumen necesario de la solución conteniendo un mínimo de 200 ppm de cloro libre (Obata et al. 1969, Beuchat 1998), utilizando agua de grifo esterilizada en autoclave a 120 °C por 20 minutos. El pH se midió con medidor digital JENWAY 370 pH/mV Meter y se corrigió con ácido fosfórico 1M, hasta obtener un pH entre 6 y 7 (Palin 1983, Brown 1987, Beuchat 1998, Hernandez-Brenes 2002). Con el mismo instrumento, también se midió la temperatura al momento del baño (ver Cuadro 13).

#### **3.4.1.2 Dióxido de cloro**

Se utilizó una solución de dióxido de cloro concentrado proporcionado por la empresa ENZUR S.A. Se midió la concentración inicial por absorbancia a 350 nm en espectrofotómetro JENWAY 6305 UV/Vis. con celda de cuarzo (Valladares 1994, de Andrade et al. 1999) (Ver 9.5). Se preparó el volumen necesario para realizar los baños, de dos soluciones a 3 y 5 ppm, utilizando agua de grifo esterilizada en autoclave a 120 °C por 20 minutos y nuevamente se verificó la concentración por espectrofotometría. Se midió el pH y la temperatura al momento del baño (ver Cuadro 13).

#### **3.4.1.3 Amonio cuaternario**

Se utilizó Tefor 80, un detergente catiónico que es una mezcla sinérgica de dos amonios cuaternarios: cloruro de didecil amonio y cloruro de alquil amido propil dimetil benzil amonio, proporcionado por la empresa TENIFOR S.A.. Se preparó el volumen necesario de las soluciones al 0.1% y 0.2% utilizando agua de grifo esterilizada en autoclave a 120 °C por 20 minutos. Se midió el pH y la temperatura al momento del baño (ver Cuadro 13).

**Cuadro 13** - Características de cada tratamiento según el día de aplicación

| TRATAMIENTO               | DIA DE APLICACIÓN |          |          |          |
|---------------------------|-------------------|----------|----------|----------|
|                           | 20/5              | 27/5     | 6/6      | 7/6      |
| [HOCl] (ppm)              | 207 ppm           | 244 ppm  | 213 ppm  | 254 ppm  |
| *Temp.                    | 20.4°C            | 20.1°C   | 21.3 °C  | 22.3 °C  |
| *pH                       | 6.78              | 6.29     | 6.6      | 6.8      |
| [ClO <sub>2</sub> ] (ppm) | 3.0 ppm           | 3.01 ppm | 3.0 ppm  | 2.95 ppm |
| *Temp.                    | 21.4°C            | 20.4°C   | 21.2 °C  | 22.1 °C  |
| *pH                       | 8.02              | 6.78     | 6.2      | 7.46     |
| [ClO <sub>2</sub> ] (ppm) | 5.0 ppm           | 5.3 ppm  | 5.0 ppm  | 4.98 ppm |
| *Temp.                    | 20.2°C            | 20.3°C   | 21.3 °C  | 22 °C    |
| *pH                       | 7.92              | 6.64     | 5.9      | 7.38     |
| [Amonio]                  | 0.1%              | 0.1%     | 0.1%     | 0.1%     |
| *Temp.                    | 21.8°C            | 20.8°C   | 21.5 °C  | 22.3 °C  |
| *pH                       | 7.58              | 7.6      | 7.25     | 7.74     |
| [Amonio]                  | 0.2 %             | 0.2 %    | 0.2 %    | 0.2 %    |
| *Temp.                    | 20.4°C            | 20.5°C   | 21.6 °C  | 21.8 °C  |
| *pH                       | 7.61              | 8.02     | 7.6      | 7.58     |
| Testigo                   |                   |          |          |          |
| *Temp.                    | 20.4°C            | 20.3°C   | 21.2 °C  | 21.7 °C  |
| *pH                       | 8.38              | 8.32     | 7.93     | 8.56     |
| VOLUMEN BAÑO              | 3 litros          | 3 litros | 2 litros | 2 litros |

### 3.5 SOLUCIÓN TAMPÓN PEPTONADA CON BLOQUEADORES.

#### 3.5.1 Para fruta

A la solución tampón peptonada<sup>1</sup> estéril utilizada para poder recuperar bacterias de las frutas se le agregó tiosulfato de sodio como bloqueador de hipoclorito de sodio y dióxido de cloro y Tween 80 como bloqueador del amonio, de forma tal de conseguir una concentración en la solución de 0.04% para el primero y 1% para el segundo (ver 9.4.1) (Brown et al., 1987).

#### 3.5.2 Para agua de lavado

A la solución tampón peptonada estéril utilizada para poder recuperar bacterias del agua de lavado se le agregó tiosulfato de sodio como bloqueador de hipoclorito de sodio y dióxido de cloro y Tween 80 como bloqueador del amonio, de forma tal de conseguir una concentración en la solución de 0.12% para el primero y 3% para el segundo, para que al

agregarle el agua de lavado las concentraciones finales fuesen de 0.04% y 1% respectivamente (ver 9.4.2) (Brown et al., 1987).

### **3.6 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS**

Para preparar el inóculo, la bacteria fue multiplicada en el medio de cultivo Wakimoto (Verdier et al., 1994) modificado (ver 9.2). Este medio también fue utilizado para realizar la siembra de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  para verificar la concentración original del inóculo.

Para la recuperación de Xac a partir de la superficie de la fruta y del agua de los baños de la fruta, se utilizó el medio de cultivo XOS con inhibidores, semiselectivo para Xac (ver 9.3) (Verdier et al. 1994, Monier 1992).

### **3.7 PREPARACIÓN DEL INÓCULO.**

Para la realización de este experimento se utilizó la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* tipo A, cepa N° 504, cedida por MGAP/DGSSAA.

Se preparó una suspensión bacteriana en solución salina estéril al 0.85% p/v de cloruro de sodio en agua destilada. La bacteria fue sembrada 48 hs antes en medio Wakimoto (Verdier et al., 1994) modificado (ver 9.2) e incubada a una temperatura de 28-30°C<sup>1</sup>. La suspensión se homogeneizó con imán, en agitador Thermolyne Cimarec 2 modelo SP46920-26.

Para estimar la concentración de la suspensión, se midió la absorbancia a 550nm en espectrofotómetro con celda de plástico, buscando una lectura de 0.100 que equivale a  $1 \times 10^8$  ufc/mL (Romeiro, 2001). Se verificó la concentración de la suspensión mediante diluciones y plaqueo de 100 µL de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . Si la concentración de la suspensión se encontraba en el orden de  $10^8$ , estas diluciones deberían estar en los órdenes  $10^3$  y  $10^2$  respectivamente. La siembra se hizo en dos placas con medio de cultivo Wakimoto modificado, homogeneizando la dilución (cargando y descargando la micropipeta 6 veces con el tip a utilizar) antes de sembrar y se incubaron en estufa a 28-30 °C. Al cabo de 2 días se contaron las colonias de estas placas. Los resultados se presentan en el Cuadro 14.

**Cuadro 14** – Recuentos de colonias/100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de la suspensión bacteriana utilizada como inóculo y cálculo de la concentración de esta suspensión, en cada bloque.

|            | $10^{-5}$  |            | $10^{-6}$ |           | Ufc/mL en la suspensión |
|------------|------------|------------|-----------|-----------|-------------------------|
|            | Rep 1      | Rep 2      | Rep 1     | Rep 2     |                         |
| 20 de mayo | <b>218</b> | <b>206</b> | <30       | <30       | $2.12 \times 10^8$      |
| 27 de mayo | <b>149</b> | <b>107</b> | <30       | <30       | $1.28 \times 10^8$      |
| 6 de junio | >300       | >300       | <b>49</b> | <b>53</b> | $5.10 \times 10^8$      |
| 7 de junio | >300       | >300       | <b>54</b> | <b>47</b> | $5.05 \times 10^8$      |

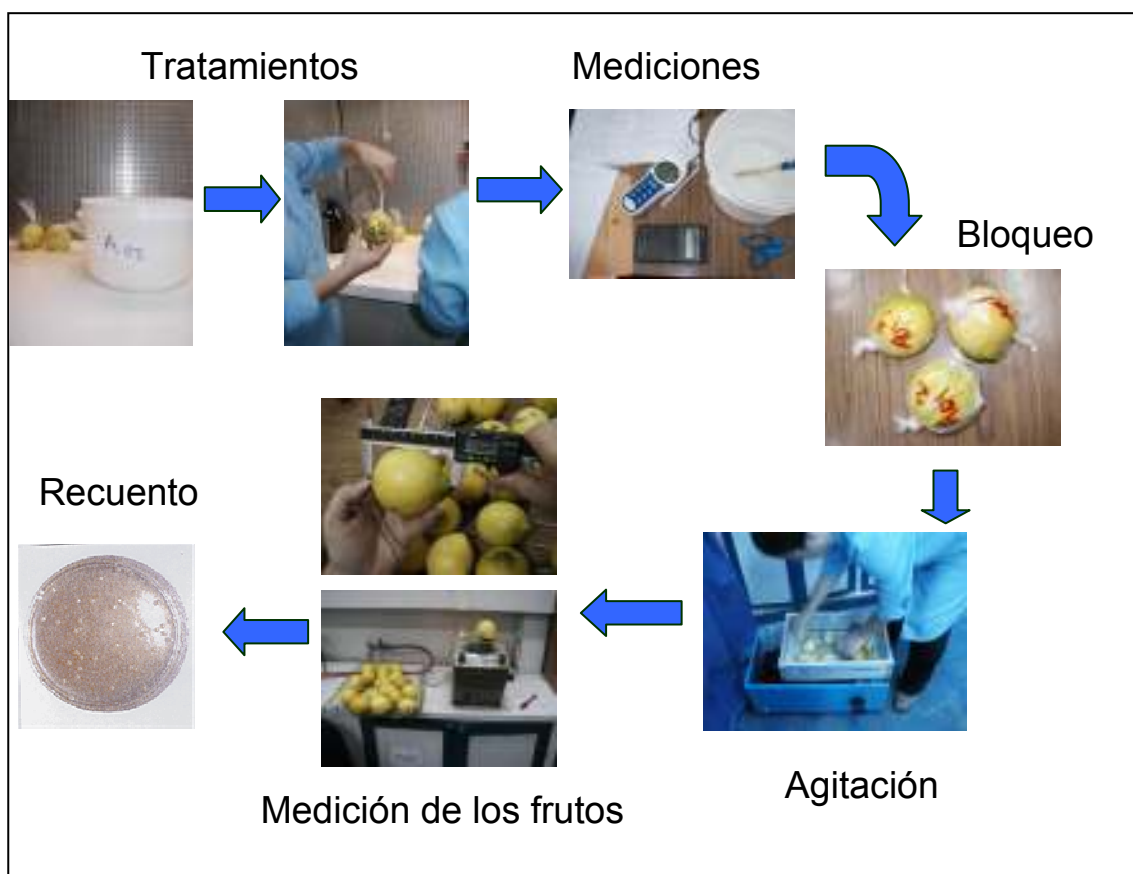
### 3.8 EXPERIMENTO

El experimento consistió en la aplicación de seis tratamientos (ver 3.3) en un diseño de bloques completos al azar con submuestreo, con 3 frutos (ver 3.2) por tratamiento en cada bloque. Se realizaron cuatro bloques (días distintos) el 20 y 27 de mayo y 6 y 7 de junio de 2005.

Cada uno de los días en que se trabajó, se procedió de la siguiente forma:

- Los frutos a tratar fueron lavados con detergente líquido de cocina, frotándolos levemente con esponja para eliminar la mayor cantidad posible de materia orgánica que pudiera haber sobre la superficie. Se enjuagaron y se dejaron secar. Posteriormente se desinfectaron sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril dentro de cámara de flujo laminar NUAIRE NO. NU-201-430E<sup>1</sup>. A partir de ese momento, todo el manipuleo de los frutos se hizo dentro de la cámara para evitar contaminaciones. Se dejaron secar sobre papel absorbente.
- Los frutos fueron inoculados con una suspensión de bacterias preparada según descripción en el punto 3.7, sumergiéndolos en la suspensión durante 2 minutos, dejándolos en la cámara de flujo laminar de 30 minutos a una hora, momento en el cual fueron tratados.
- A cada fruto se le asignó un número y se sorteó qué baño se le iba a aplicar.

- Se prepararon las soluciones desinfectantes (ver 3.4.1) y se trataron los frutos sumergiéndolos en el baño correspondiente durante 2 minutos. Pasado este tiempo se retiró del baño 1 fruto por vez introduciéndolo cada uno en una bolsa de nylon de 18 x 25 cm conteniendo 50 mL de solución tampón peptonada estéril con los bloqueadores de los desinfectantes (ver 3.5.1) como forma de detener la acción de los mismos. Se registró el orden en que fue retirado cada fruto del baño.
- Luego de retirar los frutos, se midió pH y temperatura de cada baño.
- Las bolsas conteniendo un limón cada una fueron puestas en un agitador de vaivén AC Tech., a 130 ciclos por minuto, durante 20 minutos, dividiendo este tiempo en dos turnos consecutivos de 10 minutos para girar los frutos, con el propósito de desprender todas las bacterias que hubiesen permanecido sobre la fruta luego del tratamiento<sup>1</sup>.
- Inmediatamente después, de la solución tampón de cada bolsa se retiraron 3 muestras, de 200  $\mu$ L para los frutos tratados con desinfectante y de 100  $\mu$ L para los frutos del tratamiento testigo. Estas muestras se sembraron en superficie, en placas de Petri de plástico de 9 cm de diámetro con medio de cultivo semiselectivo XOS (ver 9.3) (Verdier et al., 1994). A su vez de los testigo se hizo una dilución 1/10 de los cuales también se sembraron 3 placas con 200  $\mu$ L. Previo a todas las siembras las soluciones se homogeneizaron cargando y descargando la micropipeta 6 veces con el tip a utilizar. Antes de desechar los frutos, se los pesó y midió diámetro mayor y menor (ver Cuadro 12).
- Las placas de Petri se incubaron en estufa Pablo Ferrando ES 64 ST a 28-30°C durante el tiempo suficiente para poder realizar el conteo de colonias (dos o tres días).
- Pasado el tiempo de incubación, se procedió a tomar la medida del número de colonias por placa, según morfología de la colonia<sup>1</sup>. En los casos en que hubo menos de 300 colonias, se contaron todas. Cuando el número de colonias fue superior a 300, pero con menos de 10/cm<sup>2</sup>, se contaron 13 cuadrados de 1 cm<sup>2</sup> cada uno y con este dato se calculó el número de colonias en la placa; en los casos en que se encontraron más de 10 colonias/cm<sup>2</sup>, se contaron 4 cuadrados de 1 cm<sup>2</sup> cada uno, con los cuales se calculó el número de colonias en la placa luego de promediarlos (APHA, 1992). Luego de contar las colonias se mantuvieron las placas en observación durante por lo menos 48 hs más, para permitir un mejor desarrollo de las colonias y descartar posibles contaminantes de color o morfología similar (ver Ilustración 6).



**Ilustración 6** - Esquema del trabajo experimental realizado en cada bloque con la fruta

Para verificar que los desinfectantes estaban actuando sobre las bacterias que se desprendían de las frutas durante la aplicación de los tratamientos, se decidió, a partir del segundo bloque, tomar muestras del agua de lavado.

En el bloque II, inmediatamente después de retirar los frutos del agua de lavado, se sembraron de cada tratamiento 100  $\mu$ L homogeneizados en 3 placas con medio de cultivo semiselectivo XOS conteniendo el bloqueador adecuado para cada desinfectante (tiosulfato de sodio al 0.04% p/v para hipoclorito de sodio y dióxido de cloro y Tween 80 al 1% v/v para amonio cuaternario). En el caso del testigo el medio de cultivo utilizado fue XOS. Se colocaron en estufa a 28-30°C durante el tiempo suficiente para que se pudieran desarrollar las colonias para su posterior recuento.

En los bloques III y IV, se pusieron 30 mL del agua de lavado en un tubo Falcon graduado de 50 mL esterilizado, que contenía 15 mL de solución tampón peptonada estéril con los bloqueadores de los desinfectantes (ver

3.5.2). Se prepararon 3 tubos de cada tratamiento. Estos tubos se centrifugaron en centrífuga Hermle Z383K durante 15 minutos a 3500 rpm (Tineo et al., 1988) a una temperatura entre 1 y 6°C. Luego de centrifugados, se extrajeron con pipeta (para evitar agitación) y descartaron los 40 mL superiores. Los 5 mL restantes se homogeneizaron utilizando un vortex Maxi-Mix 1 Type 16700 Mixer y se sembraron de cada tubo 200  $\mu$ L homogeneizados con la micropipeta, en 2 placas de Petri con medio de cultivo semiselectivo XOS. Se colocaron en estufa a 28-30°C durante el tiempo suficiente para que se pudieran desarrollar las colonias para su posterior recuento (ver Ilustración 7).



**Ilustración 7** - Esquema del trabajo experimental realizado en los bloques III y IV con el agua de los baños de la fruta

### **3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos del número de colonias en las placas de Petri obtenidas del agua de la fruta, se analizaron utilizando el macro glimmix del paquete estadístico SAS V8 (SAS, 1997), según un modelo de bloques completos al azar con repeticiones dentro de bloque, considerando el efecto del bloque y el de la interacción bloque\*tratamiento como aleatorios, asumiendo que la variable tiene distribución Poisson. Las medias ajustadas de los tratamientos se compararon contra el testigo utilizando el test de Dunnett.

Se correlacionó el número de colonias promedio recuperadas de la superficie de cada fruto con el peso y la superficie del fruto. La superficie de cada fruto se calculó como si fuera una esfera a partir del promedio entre el diámetro mayor y menor. El análisis de la correlación se hizo con el procedimiento PROC CORR del paquete estadístico SAS V8 (SAS, 1997).

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 RECUPERACIÓN DE XAC DE LA SUPERFICIE DE LA FRUTA**

En el Cuadro 15 se presentan los promedios de colonias morfológicamente similares a Xac recuperadas de la superficie de los frutos de cada bloque en cada tratamiento. Se puede observar que tanto del tratamiento testigo (sin desinfectante) como de los tratamientos con desinfectante se recuperaron bacterias. En los bloques I y II (20 y 27 de mayo), el número promedio de colonias recuperadas de los tratamientos fue menor que en los bloques III y IV (6 y 7 de junio).

La fruta utilizada el 20, 27 de mayo y 7 de junio provino del mismo lugar. La última aplicación de fitosanitarios en ese cuadro, se realizó con una antelación a la fecha de cosecha tal que no era posible que los residuos de la misma estuvieran afectando la sobrevivencia de la bacteria. Por lo tanto las diferencias encontradas entre los bloques I y II y los bloques III y IV no se pueden explicar por el origen de la fruta.

En todos los bloques, la madurez de la fruta y el tiempo de permanencia de los frutos dentro de la suspensión de inóculo fue el mismo. Al no haber variación en estos factores, no pueden estar explicando ninguna diferencia encontrada.

El tiempo transcurrido entre la inoculación y la aplicación de los tratamientos, en todos los bloques estuvo entre 30 y 60 minutos. Al momento de aplicar los tratamientos, los frutos no se encontraban completamente secos, lo que no permite relacionar las variaciones encontradas entre los bloques con la muerte de la bacteria por el secado de la fruta que plantea Stapleton (1986).

La concentración del inóculo en la suspensión utilizada siempre fue del mismo orden en todos los bloques, aunque en las dos últimas fechas fue más del doble que en las dos primeras (ver Cuadro 14). Estas diferencias en la concentración del inóculo podrían estar explicando las diferencias en el número de colonias recuperadas de los tratamientos entre los bloques I y II y los bloques III y IV.

**Cuadro 15** – Número de colonias promedio/mL de solución tampón recuperadas de la superficie de la fruta, en cada bloque, para cada tratamiento

| Bloque | Tratamiento |                  |                          |                          |                |                |
|--------|-------------|------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|----------------|
|        | Testigo     | NaOCl<br>200 ppm | ClO <sub>2</sub><br>3ppm | ClO <sub>2</sub><br>5ppm | Amonio<br>0.1% | Amonio<br>0.2% |
| 20-May | 1300        | 510              | 1480                     | 960                      | 0              | 0              |
| 27-May | 150         | 480              | 830                      | 1270                     | 540            | 0              |
| 06-Jun | 17300       | 690              | 5810                     | 4700                     | 3190           | 810            |
| 07-Jun | 8470        | 1280             | 4060                     | 1800                     | 380            | 770            |

En los cuadros 16, 17, 18 y 19 se presentan los resultados del número promedio de colonias morfológicamente similares a Xac recuperadas de la superficie de cada fruto en cada tratamiento. En los mismos se puede observar que la cantidad de colonias/mL de solución tampón recuperadas del mismo tratamiento en la misma fecha fue variable entre un fruto y otro, sin evidenciarse un comportamiento que pueda ser explicado por un tiempo diferencial dentro del tratamiento. Las tres medidas que se tomaron del mismo fruto tuvieron una variabilidad insignificante en todos los casos (ver 9.6).

En los trabajos de Spotss et al. (1980), Costilow et al. (1984), Stapleton et al. (1986), Brown et al. (1987), Roberts et al. (1994) y Mari et al. (1999) no se presentan ni se comentan medidas de la variabilidad entre el número de colonias recuperadas de los frutos. En el trabajo de Lee et al. (2003) se presentan los desvíos estándar de los promedios del número de colonias recuperadas de los frutos. De estos datos se desprende que, al igual que en el presente trabajo, la variabilidad fue muy alta, aunque los autores no hacen ningún comentario sobre la misma.

Para realizar el análisis estadístico, en primer lugar, se consideró un modelo que contemplara el orden en que fueron retirados los frutos de cada tratamiento (ver 9.8.1). En este análisis no se encontraron diferencias significativas (ver 9.8.2) en ninguno de los factores analizados (tratamiento, orden, interacción tratamiento\*orden). Por lo tanto, se puede concluir que el tiempo extra que estuvieron los frutos 2 y 3 dentro del tratamiento no afectó el número de colonias/mL de solución tampón recuperadas de la superficie de la fruta.

**Cuadro 16** - Número promedio de colonias/mL de solución tampón, recuperadas de la superficie de cada fruto del tratamiento testigo en cada bloque.

| Bloque | Fruto |       |       |
|--------|-------|-------|-------|
|        | 1     | 2     | 3     |
| 20-May | 1060  | 1150  | 1690  |
| 27-May | 50    | 370   | 40    |
| 6-Jun  | 16250 | 19990 | 15650 |
| 7-Jun  | 9430  | 8320  | 7660  |

**Cuadro 17** – Número promedio de colonias/mL de solución tampón, recuperadas de la superficie de cada fruto desinfectado con 200 ppm de hipoclorito de sodio en cada bloque.

| Bloque | Fruto |      |      |
|--------|-------|------|------|
|        | 1     | 2    | 3    |
| 20-May | 530   | 190  | 810  |
| 27-May | 90    | 0    | 1340 |
| 6-Jun  | 340   | 590  | 1130 |
| 7-Jun  | 770   | 1810 | 1250 |

**Cuadro 18** – Número promedio de colonias/mL de solución tampón, recuperadas de la superficie de cada fruto desinfectado con 3 y 5 ppm de dióxido de cloro en cada bloque.

| Bloque | 3ppm Fruto |      |       | 5ppm Fruto |      |      |
|--------|------------|------|-------|------------|------|------|
|        | 1          | 2    | 3     | 1          | 2    | 3    |
| 20-May | 3720       | 450  | 270   | 1660       | 460  | 750  |
| 27-May | 420        | 660  | 1420  | 960        | 1550 | 1300 |
| 6-Jun  | 2020       | 1690 | 13730 | 8940       | 2430 | 2730 |
| 7-Jun  | 2570       | 3430 | 6180  | 1160       | 1230 | 3010 |

**Cuadro 19** – Número promedio de colonias/mL de solución tampón, recuperadas de la superficie de cada fruto desinfectado con amonio al 0.1% y 0.2%, en cada bloque.

| Bloque | 0.1 %<br>Fruto |      |      | 0.2%<br>Fruto |     |      |
|--------|----------------|------|------|---------------|-----|------|
|        | 1              | 2    | 3    | 1             | 2   | 3    |
| 20-May | 0              | 0    | 0    | 0             | 0   | 0    |
| 27-May | 920            | 520  | 180  | .             | 0   | 0    |
| 6-Jun  | 1660           | 5300 | 2600 | 500           | 900 | 1020 |
| 7-Jun  | 460            | 430  | 260  | 430           | 650 | 1240 |

Debido a que el orden en que fueron sacados los frutos de los tratamientos no afectó significativamente al número de colonias/mL de solución tampón recuperadas de la superficie de la fruta, se realizó un segundo análisis.

En el segundo análisis se trabajó con un modelo que no consideró el orden de extracción de los frutos (ver 9.8.1), sino solamente el efecto del tratamiento.

En el Cuadro 20 se presenta el número promedio de colonias recuperadas de todos los frutos y todos los bloques, en cada tratamiento, junto con sus valores estimados asumiendo una distribución de Poisson. Se puede observar que de los frutos del tratamiento testigo se recuperaron en promedio más bacterias que de los frutos de los demás tratamientos, aunque sólo se encontraron diferencias significativas con el tratamiento de amonio al 0.2%. La reducción que produjo el tratamiento con amonio al 0.2% fue de un orden.

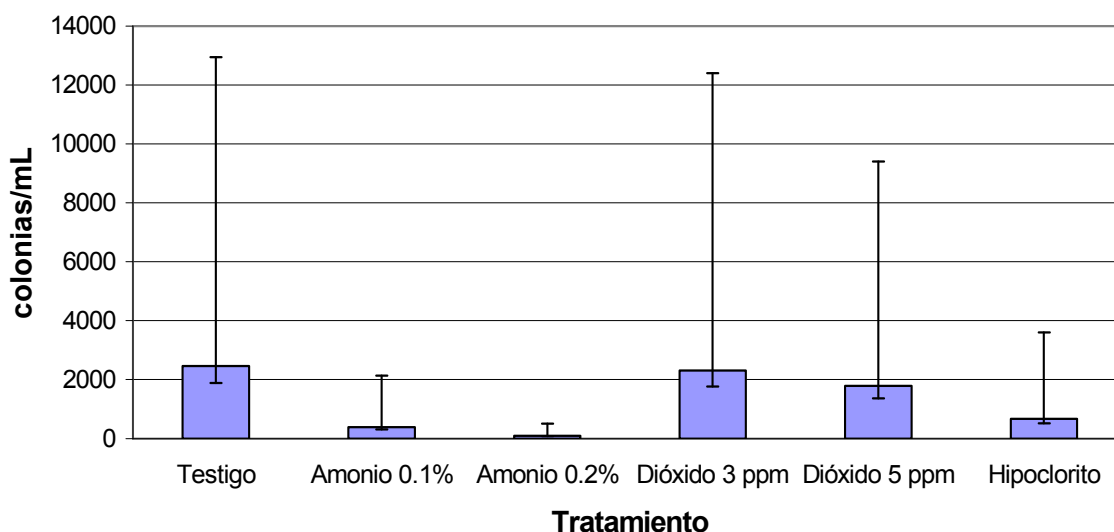
El experimento fue diseñado para que se pudieran detectar diferencias entre las medias poblacionales del tratamiento testigo y los tratamientos con desinfectante, de por lo menos un orden. Los resultados que se obtuvieron en la mayoría de los tratamientos fueron muy heterogéneos por lo que sus intervalos de confianza estimados fueron poco precisos, solapándose con el intervalo del tratamiento testigo. (Ver Cuadro 20 e Ilustración 8).

**Cuadro 20** – Número promedio de colonias/mL de solución tampón, observadas en cada tratamiento y estimadas con 95% de confianza por mínimos cuadrados.

| TRATAMIENTO            | Colonias/mL    |                   |                |                |
|------------------------|----------------|-------------------|----------------|----------------|
|                        | Observadas (*) | Valores estimados |                |                |
|                        | Media          | Media             | Lím. Inf. (**) | Lím. Sup. (**) |
| Testigo                | 6800 a         | 2459              | 1883           | 12952          |
| 200 ppm NaOCl          | 740 a          | 679               | 521            | 3589           |
| 3 ppm ClO <sub>2</sub> | 3050 a         | 2304              | 1778           | 12400          |
| 5 ppm ClO <sub>2</sub> | 2180 a         | 1780              | 1364           | 9398           |
| 0.1 % amonio           | 1030 a         | 393               | 305            | 2144           |
| 0.2 % amonio           | 430 b          | 88                | 69             | 497            |

(\*) Distinta letra indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al testigo según test de Dunnett.

(\*\*) Límites del intervalo de 95% de confianza



**Ilustración 8** – Medias por mínimos cuadrados y límites de confianza de colonias/mL de solución tampón, recuperadas de la superficie de los frutos de cada tratamiento.

Brown et al. (1987) evaluando la acción de distintos desinfectantes sobre la superficie de fruta cítrica inoculada con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo, ya que se recuperaron bacterias en todos los tratamientos. Sin embargo encontraron diferencias significativas entre todos los desinfectantes y el testigo. Estas diferencias se pueden deber a la

metodología con que registraron la recuperación de bacterias, ya que utilizaron una clasificación ordinal en vez de contar las colonias.

Otros autores trabajando con desinfección superficial en otras frutas y con otros patógenos, también recuperaron cantidades importantes de los patógenos. Spotts et al. (1980) realizaron heridas en peras en las cuales inocularon conidios de hongos causantes de pudriciones. Posteriormente sumergieron la fruta en baños con desinfectante de una planta de empaque comercial, sin obtener disminución en las pudriciones. Costilow et al. (1984) no encontraron reducciones en el desarrollo de podredumbres provocadas por microorganismos en pepinos cuando fueron lavados con 105 ppm de dióxido de cloro durante 15 minutos.

Lee et al. (2004) trabajando con manzanas inoculadas con esporas de la bacteria *Alicyclobacillus acidoterrestris*, no encontraron reducciones cuando las trataron con 40 ppm de dióxido de cloro durante 1 minuto, si bien cuando aumentaron la concentración y/o el tiempo de exposición, las reducciones fueron cada vez mayores, alcanzando valores indetectables con 40 ppm durante 4 minutos o a partir de 1 minuto con 120 ppm.

Los resultados del presente trabajo, también coinciden con los obtenidos por Stapleton en 1986 quien recuperó Xac de fruta cítrica previamente inoculada, a pesar de haberla tratado con 400 ppm de cloro. Él considera que en la superficie de la fruta puede haber sitios donde la bacteria quede protegida de la acción del desinfectante.

Los frutos cítricos tienen una superficie particularmente rugosa en comparación con frutos como peras o manzanas. Esta característica podría provocar una mejor protección de los microorganismos en la superficie contra la acción de los desinfectantes, así como una mayor dificultad para desprenderse por el movimiento dentro del baño. Esto queda de manifiesto en los resultados de Lee et al. (2004) y Brown et al. (1987) ya que en el primero consiguieron reducir las esporas de la bacteria de la superficie de manzanas a valores indetectables al bañarlas con una dosis alta de dióxido de cloro, mientras que en el segundo recuperaron cantidades importantes de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de fruta cítrica cuando fue puesta a dosis aún mayores del mismo desinfectante.

Los desinfectantes para ser eficaces en el control de los microorganismos deben ponerse en contacto con los mismos (Brock et al. 1993, Tortora et al. 1993, Beuchat 1998, Hernandez-Brenes 2002). La superficie de los frutos no es lisa, lo que permite que los microorganismos se alojen en sus imperfecciones y por la tensión superficial que se genera puedan no ser alcanzados por los desinfectantes, quedando su eficacia dependiendo de su capacidad surfactante. Spottss et al. (1982) trabajaron

con distintos surfactantes para mejorar la acción del hipoclorito contra pudriciones causadas por hongos en peras. Encontraron diferencias significativas entre la acción del hipoclorito de sodio sólo y cuando fue utilizado con algunos surfactantes. Al utilizar los surfactantes se mejoró la acción del cloro en el control de las podredumbres en fruta previamente herida e inoculada. El mismo efecto se obtuvo cuando se trabajó con fruta herida sumergida en una solución con los tratamientos desinfectantes a la cual se le había agregado el inóculo. En el presente trabajo, la mayor eficacia demostrada por el amonio al 0.2% en la desinfección superficial de los frutos, podría justificarse por su capacidad surfactante.

La concentración del inóculo utilizado en el presente trabajo fue muy alta en comparación con la que puede ocurrir en las peores condiciones de infestación natural sobre fruta asintomática. En el trabajo de Verdier et al. (2006)<sup>1</sup>, realizado con fruta naturalmente infestada proveniente de árboles infectados, cosechada en momentos en que las condiciones climáticas eran favorables para la diseminación del patógeno, se recuperaron mucho menos bacterias que en la artificialmente inoculada con una población de  $10^8$  ufc/mL, en los tratamientos testigos. En la primera situación se recuperaron en promedio 39.4 ufc/mL, mientras que en la segunda fueron  $1.7 \times 10^3$  ufc/mL. Esto está indicando que la fruta que podría ingresar a la planta de empaque en la peor situación de infestación natural, nunca va a tener una población de Xac tan elevada como cuando es artificialmente inoculada con una población de  $10^8$  ufc/mL, por lo tanto se podría esperar una mayor efectividad de los desinfectantes sobre fruta naturalmente infestada.

Verdier et al. (2006)<sup>1</sup> trabajaron con fruta artificialmente inoculada, con concentraciones de inóculo del mismo orden de la utilizada en el presente trabajo. Ellos luego de la inoculación sometieron a la fruta al tratamiento rutinario poscosecha de las plantas de empaque de Uruguay. El tratamiento consistió en drencher con procloraz (900 ppm), inmersión en cloro libre (200-250 ppm) por 1 minuto, SOPP (2%) por 30 segundos, enjuague, Imazalil sulfato (1000 ppm), Tiabendazol (2500 ppm), presecado (38-43°C), encerado con Imazalil (1500 ppm) y secado (38-43°C). Con este tratamiento se eliminó el 99.5% de la población de Xac de la superficie de la fruta. Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo, queda en evidencia que lo que hace eficiente la reducción de Xac sobre la fruta no es sólo la utilización del desinfectante, sino todo el tratamiento que se aplica en una planta de empaque.

## **4.2 RECUPERACIÓN DE XAC DEL AGUA DE LOS BAÑOS DE LA FRUTA**

Durante la realización del experimento, luego de obtener los resultados del bloque I, se observó que en los tratamientos con dióxido de cloro e hipoclorito de sodio se recuperaron más bacterias de la superficie de la fruta de lo que se esperaba de acuerdo a la hipótesis de trabajo. Con el objetivo de comprobar la acción de los desinfectantes en el agua de los baños de la fruta, se tomaron muestras de la misma a partir del bloque II.

En el bloque II (27 de mayo) se sembraron directamente alicuotas de 100µL del agua de los baños de los tratamientos y no se recuperaron colonias de bacterias morfológicamente similares a Xac en ninguno de ellos. Este resultado era esperable para los tratamientos con desinfectante pero no así para el tratamiento testigo, al no haber en el agua ninguna sustancia con acción bactericida. La explicación que se encontró para los resultados obtenidos fue que la cantidad de ufc presente en el agua se encontraba a muy baja concentración y por lo tanto al sembrar tan sólo 100µL era poco probable recuperar alguna bacteria. Para verificar esta hipótesis se buscó una forma de concentrar la bacteria antes de sembrarla.

En los bloques III y IV (6 y 7 de junio) se redujo la cantidad de agua utilizada en los baños a 2 L. Luego de tratar la fruta, se extrajo una muestra de 30 mL y se centrifugó. Posteriormente se sembraron alicuotas de 200µL del concentrado. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 21.

Estos resultados muestran que sólo se recuperaron bacterias morfológicamente similares a Xac del agua del baño de lavado de los frutos cuando no se utilizó desinfectante (tratamiento testigo). Esto evidencia que el leve movimiento al que fueron sometidos los frutos fue suficiente para desprender bacterias de su superficie y que con la metodología utilizada se logró concentrar la bacteria para su recuento. Los desinfectantes en las condiciones utilizadas pudieron actuar, bajando la concentración de la bacteria en el agua a un nivel que no permitió que se recuperaran colonias incluso luego de la centrifugación.

**Cuadro 21** - Número promedio de colonias recuperadas/mL del agua de lavado de la fruta

| TRATAMIENTO   | Colonias/placa |         |
|---------------|----------------|---------|
|               | 6 junio        | 7 junio |
| Testigo       | 25650          | 22220   |
| Hipoclorito   | 0              | 0       |
| Dióxido 3 ppm | 0              | 0       |
| Dióxido 5 ppm | 0              | 0       |
| Amonio 0.1 %  | 0              | 0       |
| Amonio 0.2 %  | 0              | 0       |

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Spotss et al. (1980), Costilow et al. (1984), Brown et al. (1987), Roberts et al. (1994), Mari et al. (1999) y Garmendia et al. (2005). En todos estos trabajos se consiguió reducir la población de microorganismos en el agua de forma significativa con el uso de desinfectantes. Sin embargo, el efecto de los desinfectantes no fue siempre el mismo. En los trabajos de Spotss et al. (1980) y Roberts et al. (1994) el grado de efectividad de la misma dosis de desinfectante durante el mismo tiempo de exposición sobre las esporas fue diferencial según el hongo con el que se trabajó. Esto demuestra que los resultados obtenidos sobre un microorganismo no son extrapolables hacia otros, debiéndose evaluar la acción de los desinfectantes sobre los microorganismos de interés.

La fruta que llega a una planta de empaque tiene una población de microorganismos variable. Los microorganismos que se desprenden de frutos contaminados, pueden permanecer viables en el agua y contaminar otros frutos, lo que se conoce como contaminación cruzada (Hernandez-Brenes, 2002). La reducción de los microorganismos en el agua de los baños es importante para minimizar el riesgo de infestaciones cruzadas. Según los resultados de éste y otros trabajos esta reducción se puede conseguir con el uso de desinfectantes.

## **5 CONCLUSIONES**

El uso de los desinfectantes evaluados en el agua del baño de los frutos no eliminó por completo la población de *X. axonopodis* pv. *citri* de la superficie de los mismos.

De los desinfectantes ensayados, a las dosis probadas, el único que mostró reducir la población de *X. axonopodis* pv. *citri* remanente sobre la fruta fue el amonio cuaternario Tefor 80 al 0.2%.

Todos los desinfectantes ensayados, a las dosis probadas, fueron eficientes en la desinfección del agua de los baños, evitando las infestaciones cruzadas.

Es posible sustituir para *X. axonopodis* pv. *citri*, el tratamiento convencional con hipoclorito de sodio a 200 ppm durante 2 minutos, por cualquiera de los otros tratamientos desinfectantes probados en este trabajo. La limitante a esta sustitución es que tiene que estar aprobada en los países a los que se quiera exportar.

Para incrementar el efecto de los desinfectantes sobre *X. axonopodis* pv. *citri*, en la superficie del fruto se recomienda probar el uso de cepillos y el agregado de surfactantes al desinfectante. El uso de cepillos podría remover la bacteria de la superficie de la fruta, quedando en contacto con el desinfectante, permitiéndole a éste actuar. El agregado de surfactantes al desinfectante permitiría reducir la tensión superficial de la solución en las imperfecciones de la superficie de la fruta donde podría estar alojada la bacteria y de esta forma mejorar el contacto entre el desinfectante y la bacteria.

Sería interesante conocer la cantidad de inóculo que trae la fruta del campo en las peores condiciones de infestación natural y evaluar nuevamente los desinfectantes con suspensiones de inóculo de concentración similar a la natural.

## 6 RESUMEN

La citricultura en el Uruguay ha tenido un gran desarrollo orientado a la exportación de fruta fresca en contraestación fundamentalmente hacia la Unión Europea. El cancro cítrico provocado por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac), es la enfermedad cuarentenaria más importante de los cítricos, no estando presente en la Unión Europea. Los mercados libres de cancro cítrico exigen que la fruta proveniente de áreas donde esta enfermedad está presente sea tratada con hipoclorito de sodio y ortofenilfenato de sodio (SOPP) (Schubert et al., 1999). El manejo del hipoclorito de sodio en las plantas de empaque presenta varios inconvenientes que podrían ser levantados usando otros desinfectantes. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad de los desinfectantes hipoclorito de sodio, dióxido de cloro y un amonio cuaternario, en la sobrevivencia de Xac sobre fruta cítrica asintomática previamente inoculada con la bacteria. Se realizó un experimento en bloques completos al azar con 4 repeticiones sobre *Citrus limon*, de calidad exportable, en el laboratorio de la Unidad de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, donde se aplicaron los tratamientos: testigo (agua estéril), 200 ppm de hipoclorito de sodio, 3 y 5 ppm de dióxido de cloro y 0.1 y 0.2% de un amonio cuaternario (Tefor 80), en baños durante 2 minutos sobre la fruta previamente inoculada con una suspensión de  $10^8$  ufc/mL de Xac. Se midió la sobrevivencia de la bacteria sobre la fruta y en el agua del baño, luego de bloquear la acción del desinfectante. Los resultados de los tratamientos con desinfectantes se compararon con los del testigo mediante la prueba de Dunnett, según una distribución Poisson. El único tratamiento desinfectante que presentó diferencias significativas con el testigo en la sobrevivencia sobre la fruta, fue el amonio cuaternario al 0.2%, sin embargo todos los tratamientos desinfectantes fueron efectivos en el agua del baño.

Palabras clave: *Xanthomonas axonopodis* pv. citri; limón; hipoclorito de sodio; dióxido de cloro; amonio cuaternario; poscosecha

## 7 SUMMARY

Citrus production in Uruguay has developed with the objective of exporting fresh fruit in the Northern Hemisphere off-season, mainly to the European Union. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), the causal agent of Citrus canker, is the most important quarantine pest of citrus, and is not present in the European Union. Markets free of citrus canker require the fruit originated of areas where the disease is present to be treated with sodium hypochlorite and sodium orthophenylphenate (SOPP) to (Schubert et al. 1999). Handling sodium hypochlorite in packing plants presents several disadvantages which could be raised using other disinfectants. The objective of the research was to evaluate the effectiveness of three disinfectants: sodium hypochlorite, chlorine dioxide and a quaternary ammonium, on the survival of Xac on asymptomatic citric fruit previously inoculated with the bacterium. An experiment carried out in randomly complete blocks with 4 repetitions on export quality *Citrus limon*, in the laboratory of the Phytopathology Unit of the Agronomy Faculty. The fruit was inoculated with a  $10^8$  cfu/ml suspension of Xac. and immersed for 2 minutes in one of the following: 200 ppm of sodium hypochlorite, 3 and 5 ppm of chlorine dioxide 0.1 and 0.2% of a quaternary ammonium (Tefor 80) or sterile water (control). Survival of the bacterium was evaluated on the fruit and in the water of the bath, after blocking the action of the disinfectant. Results of disinfectant treatments were compared with those of the control by Dunnett test, according to Poisson distribution. The only disinfectant treatment that presented significant differences with the control in the survival of the bacterium on the fruit was 0.2% quaternary ammonium. Nevertheless all the disinfectant treatments were effective in the water of the bath.

Key words: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; limon; sodium hypochlorite; chloride dioxide; quaternary ammonium; post harvest

## 8 **BIBLIOGRAFÍA**

1. AGRIOS, G. N. 1995. Fitopatología. 2ª ed. México, Limusa. 838 p.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18<sup>th</sup> ed. Washington, DC. M. A. H. Franson. s.p.
3. APEL, G. 1993. Chlorine Dioxide. Postharvest Information Network. (en línea). s.l., Washington State University. Tree Fruit Research and Extension Center. Consultado 9 ago. 2004. Disponible en <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/pgDisplay.php?article=J4I1B>
4. AROCENA, G; FAVARO, F. 1981. The program for control and prevention of citrus bacterial canker disease (*Xanthomonas campestris* pv. citri) in Uruguay. Proc. Int. Soc. Ciriculture. 1:409-414.
5. \_\_\_\_\_. 1987. Control del cancro cítrico en el Uruguay; informe. Trabajo presentado al Simposio Internacional sobre Cancro Cítrico (16-19 jun., 1987, San Pablo, Brasil). Montevideo, MGAP. 18 p.
6. BARTZ, J. A.; SHOWALTER, R. K. 1981. Infiltration of tomatoes by aqueous bacterial suspensions. Phytopathology 71(5):515-518.
7. BEUCHAT, L. R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: A review. (en línea). s.l., World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2. Consultado 23 set. 2004. Disponible en [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/surface\\_decon.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface_decon.pdf)
8. BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. 1993. Microbiología. 6ª ed. México, Prentice Hispanoamericana. 956 p.
9. BROWN, G. E.; SCHUBERT, T. S. 1987. Use of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria to evaluate surface disinfectants for canker quarantine treatment of citrus fruits. Plant Disease 71(4):319-323.
10. BRUNO, Y; ERREA, E. 2004. Cítricos; campaña 2004 y perspectivas para el 2005 (en línea). Anuario OPYPA 2004. Consultado abr. 2005. Disponible en

[http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario04/ARCHIVO S%20PDF/MA-15-CITRICOS%20CAMPA%D1A%202004.pdf](http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario04/ARCHIVO%20PDF/MA-15-CITRICOS%20CAMPA%D1A%202004.pdf)

11. CAB INTERNATIONAL. 2005. Crop protection compendium; 2005 edition. Wallingford, UK. 1 disco compacto, 8mm.
12. CANALE, F.; CASSANELLO, M. E. 1983. Detección de *Xanthomonas campestris* pv citri, Biotipo A, mediante la técnica ELISA (DAS) In: Reunión Técnica de la Facultad de Agronomía (6º., 1983, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, Facultad de Agronomía. p.59.
13. CFSAN/FDA. 2001. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. (en línea). s.l., U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Consultado 30 set. 2001. Disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift3exec.html>
14. COSTILOW, R. N.; UEBERSAX, M. A.; WARD, P. J. 1984. Use of chlorine dioxide for controlling microorganisms during the handling and storage of fresh cucumbers. *Journal of Food Science* 49(2):396-401.
15. CUNNINGHAM, N.; TAVERNER, P. 2002. Types of sanitisers and the factors affecting their activity. *Packer Newsletter* 68: 3-4.
16. \_\_\_\_\_. 2003. The phytotoxic effects of quaternary ammonium compounds. *Packer Newsletter* 72:2-4.
17. de ANDREADE, J. C.; CUSTODIO, R.; KUBOTA, L. T. 1999. Elementos de espectroscopia. Leyes de los procesos de absorción de radiación. (en línea). San Pablo, Universidad Estadual de Campinas. Consultado 15 dic. 2004. Disponible en [http://www.chemkeys.com/esp/md/ede\\_4/ldlpda\\_4/ldlpda\\_4.htm](http://www.chemkeys.com/esp/md/ede_4/ldlpda_4/ldlpda_4.htm)
18. DURAN-VILA, N.; MORENO, P. 2000. Enfermedades de los cítricos. Madrid, Mundi-Prensa. 165 p.
19. DYCHDALA, G. R. 1983. Chlorine and chlorine compounds. In: Disinfection, sterilisation and preservation. 3ª ed. Philadelphia, Lea and Febigar. pp 157-182.
20. EPPO. 2005. Data sheets on quarantine pests. *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. (en línea). Paris. Consultado 9 set. 2005. Disponible en

[http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas\\_citri/XANTCI\\_ds.pdf](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas_citri/XANTCI_ds.pdf)

21. FAO. 2001. Análisis de riesgo de plagas para plagas cuarentenarias. NIMF N° 11 (en línea). Roma. Consultado 20 dic. 2005. Disponible en <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y3240S/y3240s05.htm#bm05.4>
22. \_\_\_\_\_. 2003. Normas internacionales para medidas fitosanitarias; Plagas no cuarentenarias reglamentadas; concepto y aplicación. NIMF N° 16 (en línea). Roma. Consultado 20 dic. 2005. Disponible en [http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=//docrep/007/y4223s/y4223s05.htm](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=//docrep/007/y4223s/y4223s05.htm)
23. \_\_\_\_\_. 2004. Codex alimentarius – Higiene de los alimentos – Textos básicos. (en línea). Roma. Consultado 17 mar. 2005. Disponible en [http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=//DOCREP/005/Y1579S/Y1579S00.HTM](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=//DOCREP/005/Y1579S/Y1579S00.HTM)
24. FRANCIS, M.; CASSANELLO, M. E.; MANOVSKY, C. 1981. Identificación del agente causal de la canchrosis del pomelo. In: Reunión Técnica de la Facultad de Agronomía (4ª., 1981, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, Facultad de Agronomía. p. 57.
25. GARMENDIA, G.; GARAT, F.; ALANIZ, S.; SILVERA, E.; de AURRECOECHEA, I.; VERO, S. 2005. Un tratamiento alternativo para asegurar la calidad de frutas cítricas. Carnes y alimentos 6(16):34-41.
26. GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; 1992. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. Phytopathology 82(9):930-935.
27. \_\_\_\_\_.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. (en línea). s.l., Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. Consultado 19 dic. 2002. Disponible en <http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/>
28. GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, R. T.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. 1992. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in

susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology* 82(11):1319-1325.

29. HERNANDEZ-BRENES, C. 2002. Good manufacturing practices (GMPS) – Buenas prácticas para la manipulación, embalaje, almacenamiento y transporte de productos frescos. (en línea). *In*: Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas; manual de formación para instructores. Maryland, University of Maryland. Consultado 13 set. 2005. Disponible en [http://www.jifsan.umd.edu/PDFs/GAPS\\_Espanol/SECCI\\_N\\_III.pdf](http://www.jifsan.umd.edu/PDFs/GAPS_Espanol/SECCI_N_III.pdf)
30. JUNLI, H.; LI, W.; NANQI, R.; FANG, M.; LI, J. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water research* 31(3): 607-613.
31. KIMATI, H; BERGAMIN FILHO, A. 1995. Princípios gerais de controle. *In*: Manual de fitopatologia; princípios e conceitos. A. Bergamin Filho; H. Kimati; L. Amorim eds. 3ª. ed. Sao Paulo, CERES. v. 1, pp 692-709.
32. LEE, S.-Y.; GRAY, P. M.; DOUGHERTY, R. H.; KANG, D.-H. 2004. The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. *International Journal of Food Microbiology* 92(2):121-127.
33. LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants; methods in plant pathology. Oxford, Blackwell. v. 2, 216 p.
34. LOPEZ-CORONADO, J. M. 2000. Medios de Cultivo. Wakimoto MEDIUM (Modified). (en línea). Valencia, Universidad de Valencia. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Consultado 1º mar. 2004. Disponible en <http://www.cect.org/cectp/pagmed.cgi?med=133>
35. MARI, M.; CEMBALI, T.; BARALDI, E.; CASALINI, L. 1999. Peracetic acid and chlorine dioxide for postharvest control of *Monilinia laxa* in stone fruits. *Plant disease*. 83(8):773-776.
36. MONIER, L. 1992. Contribution à la mise au point d'un milieu de culture semi-sélectif pour la détection de *Xanthomonas campestris* pv. citri, agent du chancre bactérien des agrumes. Tesis de Maestría. Angres, France. Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux de l'Horticulture et de Paysage d'Angres. 68 p.

37. OBATA, T. TSUBOI, F.; WAKIMOTO, S. 1969. Studies on the detection of *Xanthomonas citri* by phage technique and the surface sterilization of Unshu orange for export to the United States. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. (7):26-37.
38. PALIN, A. T. 1983. Chemistry and control of modern chlorination. 2n. ed. Chestertown, MD, LaMotte. 69 p.
39. PRUSKY, D.; ESHEL, D.; KOBILER, I.; YAKOBY, N.; BENO-MOUALEM, D.; ACKERMAN, M.; ZUTHJI, Y.; BEN ARIE, R. 2001. Postharvest chlorine treatments for the control of the persimmon black spot disease caused by *Alternaria alternata*. Postharvest Biology and Technology. 22(3):271-277.
40. RITENOUR, M; NG-SANCHEZ, T; KELSEY, D. F. Quaternary ammonia injury on grapefruit peel. Packinghouse Newsletter. 192:1-4.
41. ROBERTS, R. G.; REYMOND, S. T. 1994. Chlorine dioxide for reduction of post-harvest pathogen inoculum during handling of tree fruits. Applied and Environmental Microbiology. 60(8):2864-2868.
42. ROMEIRO, R. S. 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, UFV. 279 p.
43. RUSSELL, A. D.; AHONKHAI I.; ROGERS, D. T. 1979. Microbiological applications of the inactivation of antibiotics and other antimicrobial agents. Journal of Applied Bacteriology. 46(2):207-45.
44. SAS/STAT. SOFTWARE. 1997. Changes and enhancements through release 6.12. Cary, NC, SAS Institute. 1167p.
45. SCHAAD, N. W.; STALL, R. E. 1989. D. *Xanthomonas*. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2ª ed. St. Paul, MN, APS. pp 81-94.
46. SCHUBERT, T. S.; MILLER, J. W.; DIXON, W. N.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. HEBB, L. H.; POE, S. R. 1999. Bacterial citrus canker and the commercial movement of fresh citrus fruit. (en línea). s.l., Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Consultado 3 set. 2005. Disponible en <http://www.doacs.state.fl.us/pi/canker/pubs/bccffmove.pdf>

47. \_\_\_\_\_.; RIZVI, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; DIXON, W. N. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – again. *Plant Disease* 85 (4):337-448.
48. \_\_\_\_\_.; SUN, X. 2003. Bacterial Citrus Canker. (en línea). s.l., Florida Department of Agriculture & Consumer Services. Division of Plant Industry. Plant Pathology Circular N° 377. 5ª revisión. Consultado 3 set. 2005. Disponible en <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/pathology/pathcirc/ppcirc377-rev5.pdf>
49. SPOTTS, R. A.; PETERS, B. B. 1980. Chlorine and chlorine dioxide for control of d'Anjou pear decay. *Plant Disease* 64(12):1095-1097.
50. \_\_\_\_\_.; PETERS, B. B. 1982. Use of surfactants with chlorine to improve pear decay control. *Plant Disease* 66(8):725-727.
51. STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. 1983. Canker, a Threat to Citrus in the Gulf-Coast States. *Plant Disease* 67(5):581-585.
52. \_\_\_\_\_.; CIVEROLO, E. L. 1991. Research relating to the recent outbreak of Citrus Cancer in Florida. *Annual Review of Phytopathology* 29:399-420.
53. STAPLETON, J. J. 1986. Effects of Postharvest Chlorine and Wax Treatments on Surface Microflora of Lime Fruit in Relation to Citrus Bacteriosis Disease. *Plant Disease* 70(12): 1046-1048.
54. TAVERNER, P.; Cunningham, N. 1997. What is meant by sanitation in citrus packingsheds? (en línea). Sardi Research and Development Institute. South Australia, Packingshed Newsletter N° 52. Consultado 20 may. 2005. Disponible en <http://www.sardi.sa.gov.au/pdfserve/horticulture/citruspacker/pdf/packnews52.pdf>
55. \_\_\_\_\_. 1999. Fungicides and sanitisers. What's the difference. *Citrus packer Newsletter* 55:5-6.
56. \_\_\_\_\_. 2001. Sanitiser use in South África, Spain and Florida (USA) *Citrus packer Newsletter* 64:2-3.
57. \_\_\_\_\_. 2004. Citrus Canker and postharvest treatments. *Packer Newsletter* 76:1-3.

58. TINEO, G. H.; LOSANO, L.; TRUJILLO PINTO, G. 1988. Géneros de bacterias fitopatógenas presentes en semillas de leguminosas comestibles. *Agronomía Tropical* 38(4-6):85-94.
59. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. 1993. Introducción a la Microbiología. Zaragoza, Acribia. 792 p.
60. URUGUAY. REGISTRO NACIONAL DE LEYES. 1992. Decreto N° 133/992; cancro cítrico. Montevideo. pp. 247-256.
61. \_\_\_\_\_. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2000. SICA. Sistema de información censo agropecuario. 1 disco compacto, 8mm.
62. \_\_\_\_\_. LEYES Y DECRETOS. 2003. MGAP estructurará y ejecutará un programa de control de la plaga cancro cítrico. (en línea) Montevideo. Consultado ene. 2006. Disponible en <http://www.presidencia.gub.uy/decretos/2003122306.htm>
63. \_\_\_\_\_. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2003. La citricultura en Uruguay; contribución a su conocimiento. (en línea). Montevideo. Consultado 22 ago. 2005. Disponible en [http://www.mgap.gub.uy/diea/Rubros/Citricultura/Citricultura\\_Junio2003.pdf](http://www.mgap.gub.uy/diea/Rubros/Citricultura/Citricultura_Junio2003.pdf)
64. VALLADARES, S. 1994. 3. Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta visible. (en línea). In: Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. Roma, FAO. Consultado 11 dic. 2004. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S03.htm>
65. VERDIER, E.; MARQUEZ, F.; PERALTA, A. 1994. Comparación de medios selectivos para el diagnóstico asintomático de *Xanthomonas campestris* pv. citri en Uruguay. In: Congreso Brasileño de Fitopatología (27º., 1994, Itajai, Brasil). Resúmenes. Itajai, Sociedade Brasileira de Fitopatologia. s.p. (Resumen N° 166).
66. \_\_\_\_\_.; PEREZ, E. 2005. Evaluación de la capacidad de sobrevivencia de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac) en fruta asintomática y sintomática luego de ser sometida a tratamientos químicos de poscosecha. In: Jornada de Difusión

de Progreso de Actividades (2<sup>a</sup>., 2005, Salto, Uruguay). Sanidad  
citricola. Salto, INIA/DGSA/FA. pp. 8-15.

67. ZHUANG, R. Y.; BEUCHAT, L. R.; ANGULO, F. J. 1995. Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. Applied and Environmental Microbiology 61(6):2127-2131.

## 9 APÉNDICES

### 9.1 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL HIPOCLORITO DE SODIO

Se utilizó el método DPD Ferrous Titrimetric Meted (APHA 1992)

Reactivos:

a) Solución de Buffer fosfato: disolver 24g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro y 46 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhidro en agua destilada. Disolver 800 mg de EDTA (disodium ethylenediamine tetraacetate dihydrate) en 100 mL de agua destilada y agregárselo. Diluir con agua destilada hasta completar 1L.

b) Solución indicadora de DPD (N,N-Diethyl-p-phenylenediamine): disolver 1.1 g de DPD sulfato anhidro en agua destilada libre de cloro conteniendo 8 mL de  $1+3\text{H}_2\text{SO}_4$  y 200mg de EDTA disódico. Completar 1 L y almacenar en recipiente oscuro.

c) Solución valorada de FAS (Sulfato Amoniso Ferroso): Disolver 1.106 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada conteniendo 1 mL de  $1+3\text{H}_2\text{SO}_4$  y completar 1 L con agua destilada. Se valora con dicromato de potasio para lo cual hay que agregar 10 mL de  $1+5\text{H}_2\text{OSO}_4$ , 5 mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  concentrado y 2 mL de indicador barium diphenylamine sulfonate al 0.1% a 100mL de solución de FAS y titular con dicromato de potasio hasta un color violeta que persista por 30 segundos y se calcula el factor de corrección.

$$\text{Factor de corrección: } 1 \times \frac{0.0146}{0.014} \times \frac{\text{gasto}}{20}$$

#### Procedimiento

Las cantidades que se indican aquí son para concentraciones de cloro hasta 5 ppm, si se trabaja con soluciones más concentradas deben hacerse diluciones. La titulación se realiza sobre un muestra de 100 mL.

Colocar 5 mL de Buffer fosfato y 5 mL de solución indicadora de DPD en un erlenmayer, agregar 100 mL de la muestra a analizar, mezclar y titular rápidamente con la solución valorada de FAS hasta que el color rojo desaparezca.

mL de FAS equivale a 1.0 ppm  $\text{ClO}_2$  por mL, corregido por el factor de titulación del FAS previamente calculado.

Cloro libre (ppm) = gasto FAS (mL) x factor de corrección

## 9.2 MEDIO DE CULTIVO WAKIMOTO MODIFICADO (tomado de: <http://www.atcc.org/mediapdfs/666.pdf>)

|                                                                                                       |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Nitrato de calcio tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (APPLICHEM) | 0.5 g |
| Fosfato de sodio dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) (FISHER)    | 2 g   |
| Peptona (DIFCO)                                                                                       | 5 g   |
| Sacarosa (PROSALES usp)                                                                               | 15 g  |
| Sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )                          | 0.5 g |
| Agar (SIGMA)                                                                                          | 15 g  |
| Agua destilada                                                                                        | 1 L   |

El pH, antes de agregar el agar, debe estar entre 6.8 y 7.1. Los ingredientes se disuelven en agua destilada, se calienta en agitación hasta la ebullición, se coloca en los recipientes apropiados y se esteriliza en autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , a 1 atm de presión, durante 15 minutos.

## 9.3 MEDIO DE CULTIVO SEMISELECTIVO XOS

Consiste en un medio nutritivo con el agregado de inhibidores luego de esterilizado.

Mezclar los siguientes compuestos, teniendo en cuenta que el pH antes de agregar el agar debe estar entre 6.8 y 7.1. Esterilizar en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

|                                                                                           |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Peptona (DIFCO)                                                                           | 2 g   |
| Sacarosa (PROSALES usp)                                                                   | 20 g  |
| Nitrato de calcio tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) | 0.3 g |

(APPLICHEM)

|                              |      |
|------------------------------|------|
| Agar (SIGMA)                 | 17 g |
| Glutamato monosódico (FLUKA) | 5 g  |
| Fosfato de potasio anhidro   | 2 g  |
| Fe-EDTA (ESPECTRUM)          | 1 mg |
| Agua destilada               | 1 L  |

Los inhibidores se agregan al medio estéril que debe estar líquido pero a una temperatura menor a 40°C para que no se desnaturalicen.

Inhibidores.

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Cicloheximida (FLUKA)            | 100 mg |
| Cephalexina (SIGMA)              | 20 mg  |
| Kasugamicina (SIGMA)             | 20 mg  |
| Violeta de metilo 2B (APPLICHEM) | 0.3 mg |

Preparación de las soluciones stock de inhibidores.

Cicloheximide (antifúngico): Disolver 1.0 g en 4 mL de alcohol 96° y luego completar 10 mL con agua destilada.

Kasugamicina (antibiótico): Disolver 0.20 g en 10 mL de agua destilada.

Cephalexina (antibiótico): Disolver 0.2 g en 50 mL de agua destilada.

Violeta de metilo 2B (colorante): Disolver 0.3 g en 100 mL de agua destilada

Estas soluciones se filtran con filtro descartable estéril de 0.2  $\mu$  en recipientes esterilizado; la filtración es una manera de esterilizar soluciones que poseen sustancias termolábiles.

Agregar al medio líquido:

Cicloheximide: 1 mL de solución stock /L de medio

Kasugamicina: 1 mL de solución stock /L de medio

Cephalexina: 5 mL de solución stock /L de medio

Violeta de metilo 2B: 100 µL de solución stock /L de medio

#### **9.4 SOLUCIÓN TAMPÓN PEPTONADA CON BLOQUEADORES.**

##### **9.4.1 Para fruta**

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| Cloruro de sodio (NaCl) (BAKER) | 8.5 g |
| Peptona (DIFCO)                 | 10 g  |
| Agua destilada                  | 1L    |
| Tween 80 (AROMACOS)             | 10 mL |
| Tiosulfato de sodio             | 0.4 g |

Los ingredientes se disuelven en agua destilada, en agitación, se coloca en recipientes apropiados y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 1 atm de presión, durante 15 minutos. El pH debe estar entre 6.8 y 7.1.

##### **9.4.2 Para agua de lavado**

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| Cloruro de sodio (NaCl) (BAKER) | 8.5 g |
| Peptona (DIFCO)                 | 10 g  |
| Agua destilada                  | 1L    |
| Tween 80 (AROMACO)              | 30 mL |
| Tiosulfato de sodio             | 1.2 g |

Los ingredientes se disuelven en agua destilada, en agitación, se coloca en recipientes apropiados y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 1 atm de presión, durante 15 minutos. El pH debe estar entre 6.8 y 7.1.

#### **9.5 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL DIÓXIDO DE CLORO**

Según la ley de Beer la absorción de un haz de radiación monocromático por una solución es directamente proporcional a la longitud de la trayectoria del haz a través de la solución o sea el espesor de la

solución (b) y a la concentración de la especie absorbente expresada en moles por litro (c), corregida por el coeficiente de absorptividad molar de la solución (a).

$$\text{Absorbancia} = a \cdot b \cdot c$$

La longitud de onda utilizada para realizar la medición del dióxido de cloro es de 360 nm ya que es la longitud de máxima sensibilidad para esta sustancia.

El dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) tiene un peso molecular de 67,5 g/mol y su absorptividad molar es de  $1166 \text{ l} \cdot \text{moles}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a 360 nm.

Si la celda utilizada tiene 1 cm de ancho esto equivale al espesor de la solución de  $\text{ClO}_2$ .

De una solución de ( $\text{ClO}_2$ ) se mide la absorbancia y se calcula la concentración de la solución.

$$\text{Concentración (ppm)} = \frac{\text{Absorbancia} \cdot \text{peso molecular} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 1000}{\text{Absortividad molar}}$$

## 9.6 COLONIAS/100 $\mu\text{L}$ DE SOLUCIÓN TAMPON, RECUPERADAS DE LA SUPERFICIE DE LA FRUTA

| Fecha  | Trat | Rep | Placa N° | Observaciones |
|--------|------|-----|----------|---------------|
| 20-May | D3   | 1   | a        | + de 300      |
| 20-May | D3   | 1   | b        | + de 300      |
| 20-May | D3   | 1   | c        | + de 300      |
| 20-May | D3   | 2   | a        | 91            |
| 20-May | D3   | 2   | b        | 89            |
| 20-May | D3   | 2   | c        | 89            |
| 20-May | D3   | 3   | a        | 61            |
| 20-May | D3   | 3   | b        | 48            |
| 20-May | D3   | 3   | c        | 55            |
| 20-May | D5   | 1   | a        | 324           |
| 20-May | D5   | 1   | b        | 331           |
| 20-May | D5   | 1   | c        | 342           |
| 20-May | D5   | 2   | a        | 58            |
| 20-May | D5   | 2   | b        | 61            |
| 20-May | D5   | 2   | c        | 159           |
| 20-May | D5   | 3   | a        | 145           |
| 20-May | D5   | 3   | b        | 154           |
| 20-May | D5   | 3   | c        | 150           |
| 20-May | H    | 1   | a        | 97            |
| 20-May | H    | 1   | b        | 107           |
| 20-May | H    | 1   | c        | 112           |
| 20-May | H    | 2   | a        | 32            |
| 20-May | H    | 2   | b        | 37            |
| 20-May | H    | 2   | c        | 47            |

|        |       |   |   |     |          |
|--------|-------|---|---|-----|----------|
| 20-May | H     | 3 | a | 153 |          |
| 20-May | H     | 3 | b | 165 |          |
| 20-May | H     | 3 | c | 169 |          |
| 20-May | T1/10 | 1 | a | 23  |          |
| 20-May | T1/10 | 1 | b | 28  |          |
| 20-May | T1/10 | 1 | c | 30  |          |
| 20-May | T1/10 | 2 | a | 41  |          |
| 20-May | T1/10 | 2 | b | 41  |          |
| 20-May | T1/10 | 2 | c | 36  |          |
| 20-May | T1/10 | 3 | a | 43  |          |
| 20-May | T1/10 | 3 | b | 38  |          |
| 20-May | T1/10 | 3 | c | 42  |          |
| 20-May | TS    | 1 | a | 110 |          |
| 20-May | TS    | 1 | b | 100 |          |
| 20-May | TS    | 1 | c | 107 |          |
| 20-May | TS    | 2 | a | 120 |          |
| 20-May | TS    | 2 | b | 114 |          |
| 20-May | TS    | 2 | c | 110 |          |
| 20-May | TS    | 3 | a | 179 |          |
| 20-May | TS    | 3 | b | 87  |          |
| 20-May | TS    | 3 | c | 240 |          |
| 20-May | A0.1  | 1 | a | 0   |          |
| 20-May | A0.1  | 1 | b | 0   |          |
| 20-May | A0.1  | 1 | c | 0   |          |
| 20-May | A0.1  | 2 | a | 0   |          |
| 20-May | A0.1  | 2 | b | 0   |          |
| 20-May | A0.1  | 2 | c | 0   |          |
| 20-May | A0.1  | 3 | a | 0   |          |
| 20-May | A0.1  | 3 | b | 0   |          |
| 20-May | A0.1  | 3 | c | 0   |          |
| 20-May | A0.2  | 1 | a | 0   |          |
| 20-May | A0.2  | 1 | b | 0   |          |
| 20-May | A0.2  | 1 | c | 0   |          |
| 20-May | A0.2  | 2 | a | 0   |          |
| 20-May | A0.2  | 2 | b | 0   |          |
| 20-May | A0.2  | 2 | c | 0   |          |
| 20-May | A0.2  | 3 | a | 0   |          |
| 20-May | A0.2  | 3 | b | 0   |          |
| 20-May | A0.2  | 3 | c | 0   |          |
| 27-May | D3    | 1 | a | 96  |          |
| 27-May | D3    | 1 | b | 41  |          |
| 27-May | D3    | 1 | c | 112 |          |
| 27-May | D3    | 2 | a | 123 |          |
| 27-May | D3    | 2 | b | 140 |          |
| 27-May | D3    | 2 | c | 130 |          |
| 27-May | D3    | 3 | a |     | + de 300 |
| 27-May | D3    | 3 | b |     | + de 300 |
| 27-May | D3    | 3 | c |     | + de 300 |
| 27-May | D5    | 1 | a | 212 |          |
| 27-May | D5    | 1 | b | 187 |          |
| 27-May | D5    | 1 | c | 175 |          |
| 27-May | D5    | 2 | a |     | + de 300 |
| 27-May | D5    | 2 | b |     | + de 300 |
| 27-May | D5    | 2 | c |     | + de 300 |

|        |       |   |   |     |             |
|--------|-------|---|---|-----|-------------|
| 27-May | D5    | 3 | a | 235 |             |
| 27-May | D5    | 3 | b | 246 |             |
| 27-May | D5    | 3 | c | 297 |             |
| 27-May | H     | 1 | a | 21  |             |
| 27-May | H     | 1 | b | 18  |             |
| 27-May | H     | 1 | c | 12  |             |
| 27-May | H     | 2 | a | 0   |             |
| 27-May | H     | 2 | b | 0   |             |
| 27-May | H     | 2 | c | 0   |             |
| 27-May | H     | 3 | a |     | + de 300    |
| 27-May | H     | 3 | b |     | + de 300    |
| 27-May | H     | 3 | c |     | + de 300    |
| 27-May | T1/10 | 1 | a | 1   |             |
| 27-May | T1/10 | 1 | b | 0   |             |
| 27-May | T1/10 | 1 | c | 0   |             |
| 27-May | T1/10 | 2 | a | 19  |             |
| 27-May | T1/10 | 2 | b | 11  |             |
| 27-May | T1/10 | 2 | c | 14  |             |
| 27-May | T1/10 | 3 | a | 4   |             |
| 27-May | T1/10 | 3 | b | 4   |             |
| 27-May | T1/10 | 3 | c | 1   |             |
| 27-May | TS    | 1 | a | 5   |             |
| 27-May | TS    | 1 | b | 6   |             |
| 27-May | TS    | 1 | c | 4   |             |
| 27-May | TS    | 2 | a | 42  |             |
| 27-May | TS    | 2 | b | 37  |             |
| 27-May | TS    | 2 | c | 32  |             |
| 27-May | TS    | 3 | a | 2   |             |
| 27-May | TS    | 3 | b | 10  |             |
| 27-May | TS    | 3 | c | 0   |             |
| 27-May | A0.1  | 1 | a | 181 |             |
| 27-May | A0.1  | 1 | b | 183 |             |
| 27-May | A0.1  | 1 | c | 189 |             |
| 27-May | A0.1  | 2 | a | 111 |             |
| 27-May | A0.1  | 2 | b | 88  |             |
| 27-May | A0.1  | 2 | c | 114 |             |
| 27-May | A0.1  | 3 | a | 36  |             |
| 27-May | A0.1  | 3 | b | 33  |             |
| 27-May | A0.1  | 3 | c | 39  |             |
| 27-May | A0.2  | 1 | a |     | Contaminado |
| 27-May | A0.2  | 1 | b |     | Contaminado |
| 27-May | A0.2  | 1 | c |     | Contaminado |
| 27-May | A0.2  | 2 | a | 0   |             |
| 27-May | A0.2  | 2 | b | 0   |             |
| 27-May | A0.2  | 2 | c | 0   |             |
| 27-May | A0.2  | 3 | a | 0   |             |
| 27-May | A0.2  | 3 | b | 0   |             |
| 27-May | A0.2  | 3 | c | 0   |             |
| 06-Jun | D3    | 1 | a | 404 |             |
| 06-Jun | D3    | 1 | b | 436 |             |
| 06-Jun | D3    | 1 | c | 372 |             |
| 06-Jun | D3    | 2 | a | 344 |             |
| 06-Jun | D3    | 2 | b | 337 |             |
| 06-Jun | D3    | 2 | c | 330 |             |

|        |      |   |   |     |          |
|--------|------|---|---|-----|----------|
| 06-Jun | D3   | 3 | a |     | + de 300 |
| 06-Jun | D3   | 3 | b |     | + de 300 |
| 06-Jun | D3   | 3 | c |     | + de 300 |
| 06-Jun | D5   | 1 | a |     | + de 300 |
| 06-Jun | D5   | 1 | b |     | + de 300 |
| 06-Jun | D5   | 1 | c |     | + de 300 |
| 06-Jun | D5   | 2 | a |     | + de 300 |
| 06-Jun | D5   | 2 | b |     | + de 300 |
| 06-Jun | D5   | 2 | c |     | + de 300 |
| 06-Jun | D5   | 3 | a |     | + de 300 |
| 06-Jun | D5   | 3 | b |     | + de 300 |
| 06-Jun | D5   | 3 | c |     | + de 300 |
| 06-Jun | H    | 1 | a | 63  |          |
| 06-Jun | H    | 1 | b | 67  |          |
| 06-Jun | H    | 1 | c | 74  |          |
| 06-Jun | H    | 2 | a | 116 |          |
| 06-Jun | H    | 2 | b | 121 |          |
| 06-Jun | H    | 2 | c | 119 |          |
| 06-Jun | H    | 3 | a | 209 |          |
| 06-Jun | H    | 3 | b | 221 |          |
| 06-Jun | H    | 3 | c | 249 |          |
| 06-Jun | TS   | 1 | a |     | + de 300 |
| 06-Jun | TS   | 1 | b |     | + de 300 |
| 06-Jun | TS   | 1 | c |     | + de 300 |
| 06-Jun | TS   | 2 | a |     | + de 300 |
| 06-Jun | TS   | 2 | b |     | + de 300 |
| 06-Jun | TS   | 2 | c |     | + de 300 |
| 06-Jun | TS   | 3 | a |     | + de 300 |
| 06-Jun | TS   | 3 | b |     | + de 300 |
| 06-Jun | TS   | 3 | c |     | + de 300 |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | a | 371 |          |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | b | 306 |          |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c |     | + de 300 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a |     | + de 300 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b |     | + de 300 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c |     | + de 300 |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a |     | + de 300 |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b |     | + de 300 |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c |     | + de 300 |
| 06-Jun | A0.2 | 1 | a | 90  |          |
| 06-Jun | A0.2 | 1 | b | 109 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 1 | c | 100 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 2 | a | 164 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 2 | b | 176 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 2 | c | 197 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 3 | a | 212 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 3 | b | 203 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 3 | c | 199 |          |
| 07-Jun | D3   | 1 | a |     | + de 300 |
| 07-Jun | D3   | 1 | b |     | + de 300 |
| 07-Jun | D3   | 1 | c |     | + de 300 |
| 07-Jun | D3   | 2 | a |     | + de 300 |
| 07-Jun | D3   | 2 | b |     | + de 300 |
| 07-Jun | D3   | 2 | c |     | + de 300 |

|        |      |   |   |     |          |
|--------|------|---|---|-----|----------|
| 07-Jun | D3   | 3 | a |     | + de 300 |
| 07-Jun | D3   | 3 | b |     | + de 300 |
| 07-Jun | D3   | 3 | c |     | + de 300 |
| 07-Jun | D5   | 1 | a | 241 |          |
| 07-Jun | D5   | 1 | b | 233 |          |
| 07-Jun | D5   | 1 | c | 222 |          |
| 07-Jun | D5   | 2 | a | 229 |          |
| 07-Jun | D5   | 2 | b | 233 |          |
| 07-Jun | D5   | 2 | c | 277 |          |
| 07-Jun | D5   | 3 | a |     | + de 300 |
| 07-Jun | D5   | 3 | b |     | + de 300 |
| 07-Jun | D5   | 3 | c |     | + de 300 |
| 07-Jun | H    | 1 | a | 164 |          |
| 07-Jun | H    | 1 | b | 138 |          |
| 07-Jun | H    | 1 | c | 158 |          |
| 07-Jun | H    | 2 | a | 367 |          |
| 07-Jun | H    | 2 | b | 358 |          |
| 07-Jun | H    | 2 | c | 363 |          |
| 07-Jun | H    | 3 | a | 246 |          |
| 07-Jun | H    | 3 | b | 260 |          |
| 07-Jun | H    | 3 | c | 246 |          |
| 07-Jun | TS   | 1 | a |     | + de 300 |
| 07-Jun | TS   | 1 | b |     | + de 300 |
| 07-Jun | TS   | 1 | c |     | + de 300 |
| 07-Jun | TS   | 2 | a |     | + de 300 |
| 07-Jun | TS   | 2 | b |     | + de 300 |
| 07-Jun | TS   | 2 | c |     | + de 300 |
| 07-Jun | TS   | 3 | a |     | + de 300 |
| 07-Jun | TS   | 3 | b |     | + de 300 |
| 07-Jun | TS   | 3 | c |     | + de 300 |
| 07-Jun | A0.1 | 1 | a | 96  |          |
| 07-Jun | A0.1 | 1 | b | 88  |          |
| 07-Jun | A0.1 | 1 | c | 93  |          |
| 07-Jun | A0.1 | 2 | a | 87  |          |
| 07-Jun | A0.1 | 2 | b | 90  |          |
| 07-Jun | A0.1 | 2 | c | 81  |          |
| 07-Jun | A0.1 | 3 | a | 46  |          |
| 07-Jun | A0.1 | 3 | b | 60  |          |
| 07-Jun | A0.1 | 3 | c | 48  |          |
| 07-Jun | A0.2 | 1 | a | 95  |          |
| 07-Jun | A0.2 | 1 | b | 76  |          |
| 07-Jun | A0.2 | 1 | c | 85  |          |
| 07-Jun | A0.2 | 2 | a | 136 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 2 | b | 143 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 2 | c | 112 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 3 | a | 260 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 3 | b | 272 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 3 | c | 211 |          |

Resultados de placas con más de 300 colonias

| Fecha  | Trat | Rep | Placa | N° |
|--------|------|-----|-------|----|
| 20-May | D3   | 1   | a     | 1  |
| 20-May | D3   | 1   | a     | 20 |

|        |    |   |   |    |
|--------|----|---|---|----|
| 20-May | D3 | 1 | a | 6  |
| 20-May | D3 | 1 | a | 18 |
| 20-May | D3 | 1 | a | 8  |
| 20-May | D3 | 1 | a | 15 |
| 20-May | D3 | 1 | a | 55 |
| 20-May | D3 | 1 | a | 7  |
| 20-May | D3 | 1 | a | 15 |
| 20-May | D3 | 1 | a | 42 |
| 20-May | D3 | 1 | a | 10 |
| 20-May | D3 | 1 | a | 8  |
| 20-May | D3 | 1 | a | 3  |
| 20-May | D3 | 1 | b | 11 |
| 20-May | D3 | 1 | b | 3  |
| 20-May | D3 | 1 | b | 8  |
| 20-May | D3 | 1 | b | 4  |
| 20-May | D3 | 1 | b | 8  |
| 20-May | D3 | 1 | b | 0  |
| 20-May | D3 | 1 | b | 4  |
| 20-May | D3 | 1 | b | 11 |
| 20-May | D3 | 1 | b | 26 |
| 20-May | D3 | 1 | b | 9  |
| 20-May | D3 | 1 | b | 10 |
| 20-May | D3 | 1 | b | 1  |
| 20-May | D3 | 1 | b | 13 |
| 20-May | D3 | 1 | c | 22 |
| 20-May | D3 | 1 | c | 13 |
| 20-May | D3 | 1 | c | 19 |
| 20-May | D3 | 1 | c | 41 |
| 20-May | D3 | 1 | c | 10 |
| 20-May | D3 | 1 | c | 6  |
| 20-May | D3 | 1 | c | 3  |
| 20-May | D3 | 1 | c | 8  |
| 20-May | D3 | 1 | c | 6  |
| 20-May | D3 | 1 | c | 10 |
| 20-May | D3 | 1 | c | 11 |
| 20-May | D3 | 1 | c | 21 |
| 20-May | D3 | 1 | c | 23 |
| 27-May | D3 | 3 | a | 4  |
| 27-May | D3 | 3 | a | 2  |
| 27-May | D3 | 3 | a | 2  |
| 27-May | D3 | 3 | a | 3  |
| 27-May | D3 | 3 | a | 2  |
| 27-May | D3 | 3 | a | 14 |
| 27-May | D3 | 3 | a | 9  |
| 27-May | D3 | 3 | a | 1  |
| 27-May | D3 | 3 | a | 5  |
| 27-May | D3 | 3 | a | 15 |
| 27-May | D3 | 3 | a | 3  |
| 27-May | D3 | 3 | a | 5  |
| 27-May | D3 | 3 | a | 5  |
| 27-May | D3 | 3 | b | 3  |
| 27-May | D3 | 3 | b | 3  |
| 27-May | D3 | 3 | b | 4  |
| 27-May | D3 | 3 | b | 4  |

|        |    |   |   |    |
|--------|----|---|---|----|
| 27-May | D3 | 3 | b | 12 |
| 27-May | D3 | 3 | b | 4  |
| 27-May | D3 | 3 | b | 8  |
| 27-May | D3 | 3 | b | 21 |
| 27-May | D3 | 3 | b | 4  |
| 27-May | D3 | 3 | b | 2  |
| 27-May | D3 | 3 | b | 3  |
| 27-May | D3 | 3 | b | 6  |
| 27-May | D3 | 3 | b | 0  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 2  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 2  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 1  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 4  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 3  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 3  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 3  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 7  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 9  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 6  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 1  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 4  |
| 27-May | D3 | 3 | c | 5  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 9  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 3  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 7  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 1  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 1  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 2  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 5  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 6  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 12 |
| 27-May | D5 | 2 | a | 4  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 8  |
| 27-May | D5 | 2 | a | 10 |
| 27-May | D5 | 2 | a | 6  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 9  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 0  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 0  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 0  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 0  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 7  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 7  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 1  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 4  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 9  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 10 |
| 27-May | D5 | 2 | b | 6  |
| 27-May | D5 | 2 | b | 10 |
| 27-May | D5 | 2 | c | 3  |
| 27-May | D5 | 2 | c | 7  |
| 27-May | D5 | 2 | c | 0  |
| 27-May | D5 | 2 | c | 8  |
| 27-May | D5 | 2 | c | 6  |
| 27-May | D5 | 2 | c | 4  |

|        |      |   |   |    |
|--------|------|---|---|----|
| 27-May | D5   | 2 | c | 4  |
| 27-May | D5   | 2 | c | 0  |
| 27-May | D5   | 2 | c | 0  |
| 27-May | D5   | 2 | c | 4  |
| 27-May | D5   | 2 | c | 14 |
| 27-May | D5   | 2 | c | 5  |
| 27-May | D5   | 2 | c | 20 |
| 27-May | H    | 3 | a | 7  |
| 27-May | H    | 3 | a | 3  |
| 27-May | H    | 3 | a | 0  |
| 27-May | H    | 3 | a | 3  |
| 27-May | H    | 3 | a | 4  |
| 27-May | H    | 3 | a | 0  |
| 27-May | H    | 3 | a | 6  |
| 27-May | H    | 3 | a | 4  |
| 27-May | H    | 3 | a | 9  |
| 27-May | H    | 3 | a | 7  |
| 27-May | H    | 3 | a | 3  |
| 27-May | H    | 3 | a | 4  |
| 27-May | H    | 3 | a | 11 |
| 27-May | H    | 3 | b | 1  |
| 27-May | H    | 3 | b | 4  |
| 27-May | H    | 3 | b | 4  |
| 27-May | H    | 3 | b | 9  |
| 27-May | H    | 3 | b | 5  |
| 27-May | H    | 3 | b | 9  |
| 27-May | H    | 3 | b | 0  |
| 27-May | H    | 3 | b | 4  |
| 27-May | H    | 3 | b | 3  |
| 27-May | H    | 3 | b | 9  |
| 27-May | H    | 3 | b | 3  |
| 27-May | H    | 3 | b | 3  |
| 27-May | H    | 3 | b | 14 |
| 27-May | H    | 3 | c | 9  |
| 27-May | H    | 3 | c | 4  |
| 27-May | H    | 3 | c | 3  |
| 27-May | H    | 3 | c | 5  |
| 27-May | H    | 3 | c | 3  |
| 27-May | H    | 3 | c | 4  |
| 27-May | H    | 3 | c | 0  |
| 27-May | H    | 3 | c | 0  |
| 27-May | H    | 3 | c | 4  |
| 27-May | H    | 3 | c | 1  |
| 27-May | H    | 3 | c | 3  |
| 27-May | H    | 3 | c | 7  |
| 27-May | H    | 3 | c | 12 |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 1  |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 0  |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 3  |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 4  |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 15 |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 19 |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 2  |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 5  |

|        |      |   |   |    |
|--------|------|---|---|----|
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 8  |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 2  |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 1  |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 6  |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | c | 7  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 16 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 11 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 1  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 12 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 20 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 8  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 26 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 47 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 62 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 11 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 29 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 9  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 18 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 11 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 7  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 10 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 21 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 51 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 13 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 36 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 3  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 3  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 15 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 5  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 2  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 6  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 22 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 9  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 3  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 12 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 6  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 44 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 19 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 42 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 61 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 7  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 4  |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 18 |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | c | 25 |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 5  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 11 |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 12 |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 1  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 7  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 8  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 13 |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 0  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 21 |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 4  |

|        |      |   |   |     |
|--------|------|---|---|-----|
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 0   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 5   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 4   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 8   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 6   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 13  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 7   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 25  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 6   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 3   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 18  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 1   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 20  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 17  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 10  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 6   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 12  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 4   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 8   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 14  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 12  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 2   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 16  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 4   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 5   |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 11  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 16  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 11  |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | c | 10  |
| 06-Jun | A0.2 | 2 | b | 176 |
| 06-Jun | A0.2 | 3 | b | 203 |
| 06-Jun | A0.2 | 3 | c | 199 |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 76  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 46  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 52  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 109 |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 66  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 65  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 44  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 33  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 73  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 65  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 26  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 82  |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 29  |
| 06-Jun | D3   | 3 | b | 55  |
| 06-Jun | D3   | 3 | b | 10  |
| 06-Jun | D3   | 3 | b | 16  |
| 06-Jun | D3   | 3 | b | 32  |
| 06-Jun | D3   | 3 | b | 108 |
| 06-Jun | D3   | 3 | b | 115 |
| 06-Jun | D3   | 3 | b | 64  |
| 06-Jun | D3   | 3 | b | 20  |
| 06-Jun | D3   | 3 | b | 37  |

|        |    |   |   |    |
|--------|----|---|---|----|
| 06-Jun | D3 | 3 | b | 6  |
| 06-Jun | D3 | 3 | b | 41 |
| 06-Jun | D3 | 3 | b | 13 |
| 06-Jun | D3 | 3 | b | 35 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 23 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 9  |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 14 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 55 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 39 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 55 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 49 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 41 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 67 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 73 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 43 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 56 |
| 06-Jun | D3 | 3 | c | 37 |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 44 |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 5  |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 4  |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 15 |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 8  |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 4  |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 14 |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 4  |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 26 |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 5  |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 9  |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 4  |
| 06-Jun | D5 | 1 | a | 0  |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 9  |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 2  |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 11 |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 16 |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 0  |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 26 |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 10 |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 16 |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 32 |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 10 |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 5  |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 8  |
| 06-Jun | D5 | 1 | b | 7  |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 17 |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 10 |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 3  |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 7  |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 4  |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 5  |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 11 |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 8  |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 8  |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 5  |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 3  |

|        |    |   |   |    |
|--------|----|---|---|----|
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 0  |
| 06-Jun | D5 | 1 | c | 0  |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 1  |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 42 |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 31 |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 38 |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 42 |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 10 |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 79 |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 4  |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 55 |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 7  |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 49 |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 31 |
| 06-Jun | D5 | 2 | a | 16 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 36 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 31 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 53 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 30 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 21 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 29 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 30 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 45 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 32 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 28 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 22 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 17 |
| 06-Jun | D5 | 2 | b | 17 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 55 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 41 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 35 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 24 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 31 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 13 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 12 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 47 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 17 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 21 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 16 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 51 |
| 06-Jun | D5 | 2 | c | 22 |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 11 |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 26 |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 8  |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 3  |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 6  |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 10 |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 9  |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 2  |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 17 |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 9  |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 9  |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 2  |
| 06-Jun | D5 | 3 | a | 7  |

|        |    |   |   |    |
|--------|----|---|---|----|
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 3  |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 16 |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 5  |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 11 |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 15 |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 17 |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 20 |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 29 |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 11 |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 4  |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 14 |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 6  |
| 06-Jun | D5 | 3 | b | 8  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 3  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 7  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 14 |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 9  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 9  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 4  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 5  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 6  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 1  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 9  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 6  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 5  |
| 06-Jun | D5 | 3 | c | 18 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 23 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 20 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 30 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 16 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 38 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 24 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 24 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 28 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 67 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 43 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 24 |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 8  |
| 06-Jun | T  | 1 | a | 7  |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 10 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 72 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 27 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 33 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 44 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 37 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 53 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 73 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 40 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 9  |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 15 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 25 |
| 06-Jun | T  | 1 | b | 11 |
| 06-Jun | T  | 1 | c | 8  |
| 06-Jun | T  | 1 | c | 2  |

|        |   |   |   |    |
|--------|---|---|---|----|
| 06-Jun | T | 1 | c | 9  |
| 06-Jun | T | 1 | c | 22 |
| 06-Jun | T | 1 | c | 65 |
| 06-Jun | T | 1 | c | 53 |
| 06-Jun | T | 1 | c | 7  |
| 06-Jun | T | 1 | c | 9  |
| 06-Jun | T | 1 | c | 8  |
| 06-Jun | T | 1 | c | 25 |
| 06-Jun | T | 1 | c | 41 |
| 06-Jun | T | 1 | c | 17 |
| 06-Jun | T | 1 | c | 45 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 32 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 39 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 20 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 37 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 32 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 59 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 41 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 95 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 56 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 29 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 16 |
| 06-Jun | T | 2 | a | 2  |
| 06-Jun | T | 2 | a | 14 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 30 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 32 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 38 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 40 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 64 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 39 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 22 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 35 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 57 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 14 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 68 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 28 |
| 06-Jun | T | 2 | b | 27 |
| 06-Jun | T | 2 | c | 0  |
| 06-Jun | T | 2 | c | 5  |
| 06-Jun | T | 2 | c | 47 |
| 06-Jun | T | 2 | c | 9  |
| 06-Jun | T | 2 | c | 65 |
| 06-Jun | T | 2 | c | 42 |
| 06-Jun | T | 2 | c | 24 |
| 06-Jun | T | 2 | c | 46 |
| 06-Jun | T | 2 | c | 35 |
| 06-Jun | T | 2 | c | 36 |
| 06-Jun | T | 2 | c | 9  |
| 06-Jun | T | 2 | c | 50 |
| 06-Jun | T | 2 | c | 34 |
| 06-Jun | T | 3 | a | 1  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 14 |
| 06-Jun | T | 3 | a | 9  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 31 |

|        |    |   |   |    |
|--------|----|---|---|----|
| 06-Jun | T  | 3 | a | 28 |
| 06-Jun | T  | 3 | a | 24 |
| 06-Jun | T  | 3 | a | 46 |
| 06-Jun | T  | 3 | a | 22 |
| 06-Jun | T  | 3 | a | 48 |
| 06-Jun | T  | 3 | a | 60 |
| 06-Jun | T  | 3 | a | 33 |
| 06-Jun | T  | 3 | a | 28 |
| 06-Jun | T  | 3 | a | 27 |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 24 |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 2  |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 12 |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 80 |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 51 |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 9  |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 7  |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 2  |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 41 |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 75 |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 51 |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 15 |
| 06-Jun | T  | 3 | b | 37 |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 16 |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 6  |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 10 |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 19 |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 36 |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 16 |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 41 |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 66 |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 6  |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 19 |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 53 |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 1  |
| 06-Jun | T  | 3 | c | 5  |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 1  |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 11 |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 6  |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 0  |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 13 |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 6  |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 7  |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 9  |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 8  |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 0  |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 0  |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 11 |
| 07-Jun | D3 | 1 | a | 5  |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 6  |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 10 |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 16 |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 8  |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 30 |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 31 |

|        |    |   |   |    |
|--------|----|---|---|----|
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 11 |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 5  |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 17 |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 15 |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 1  |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 4  |
| 07-Jun | D3 | 1 | b | 3  |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 16 |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 8  |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 7  |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 8  |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 12 |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 2  |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 23 |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 11 |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 13 |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 4  |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 3  |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 4  |
| 07-Jun | D3 | 1 | c | 6  |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 2  |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 10 |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 10 |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 6  |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 7  |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 17 |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 23 |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 16 |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 14 |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 5  |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 1  |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 19 |
| 07-Jun | D3 | 2 | a | 11 |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 4  |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 9  |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 11 |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 33 |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 2  |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 27 |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 12 |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 8  |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 7  |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 22 |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 4  |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 15 |
| 07-Jun | D3 | 2 | b | 17 |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 11 |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 12 |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 15 |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 15 |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 9  |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 4  |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 5  |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 14 |

|        |    |   |   |    |
|--------|----|---|---|----|
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 6  |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 25 |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 21 |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 16 |
| 07-Jun | D3 | 2 | c | 5  |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 1  |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 16 |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 45 |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 14 |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 33 |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 23 |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 21 |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 10 |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 39 |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 24 |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 3  |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 22 |
| 07-Jun | D3 | 3 | a | 20 |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 29 |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 23 |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 5  |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 54 |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 27 |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 7  |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 16 |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 45 |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 28 |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 9  |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 14 |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 50 |
| 07-Jun | D3 | 3 | b | 16 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 26 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 28 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 32 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 11 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 13 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 11 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 26 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 6  |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 21 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 36 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 27 |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 8  |
| 07-Jun | D3 | 3 | c | 6  |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 3  |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 12 |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 10 |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 8  |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 14 |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 16 |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 23 |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 11 |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 3  |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 2  |

|        |    |   |   |    |
|--------|----|---|---|----|
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 4  |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 38 |
| 07-Jun | D5 | 3 | a | 2  |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 9  |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 3  |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 5  |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 17 |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 12 |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 27 |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 4  |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 2  |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 4  |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 18 |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 5  |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 12 |
| 07-Jun | D5 | 3 | b | 4  |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 12 |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 4  |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 2  |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 11 |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 6  |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 3  |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 34 |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 14 |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 17 |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 18 |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 13 |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 5  |
| 07-Jun | D5 | 3 | c | 5  |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 8  |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 15 |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 39 |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 10 |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 18 |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 10 |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 12 |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 44 |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 16 |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 1  |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 37 |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 17 |
| 07-Jun | T  | 1 | a | 5  |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 6  |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 4  |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 50 |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 11 |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 1  |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 0  |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 15 |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 53 |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 29 |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 9  |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 31 |
| 07-Jun | T  | 1 | b | 15 |

|        |   |   |   |    |
|--------|---|---|---|----|
| 07-Jun | T | 1 | b | 4  |
| 07-Jun | T | 1 | c | 16 |
| 07-Jun | T | 1 | c | 1  |
| 07-Jun | T | 1 | c | 11 |
| 07-Jun | T | 1 | c | 1  |
| 07-Jun | T | 1 | c | 1  |
| 07-Jun | T | 1 | c | 17 |
| 07-Jun | T | 1 | c | 47 |
| 07-Jun | T | 1 | c | 5  |
| 07-Jun | T | 1 | c | 2  |
| 07-Jun | T | 1 | c | 26 |
| 07-Jun | T | 1 | c | 3  |
| 07-Jun | T | 1 | c | 24 |
| 07-Jun | T | 1 | c | 31 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 14 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 6  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 12 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 14 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 13 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 30 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 1  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 23 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 7  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 17 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 10 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 24 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 5  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 4  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 15 |
| 07-Jun | T | 2 | b | 32 |
| 07-Jun | T | 2 | b | 29 |
| 07-Jun | T | 2 | b | 11 |
| 07-Jun | T | 2 | b | 6  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 28 |
| 07-Jun | T | 2 | b | 12 |
| 07-Jun | T | 2 | b | 17 |
| 07-Jun | T | 2 | b | 14 |
| 07-Jun | T | 2 | b | 23 |
| 07-Jun | T | 2 | b | 5  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 9  |
| 07-Jun | T | 2 | c | 2  |
| 07-Jun | T | 2 | c | 5  |
| 07-Jun | T | 2 | c | 7  |
| 07-Jun | T | 2 | c | 25 |
| 07-Jun | T | 2 | c | 8  |
| 07-Jun | T | 2 | c | 62 |
| 07-Jun | T | 2 | c | 23 |
| 07-Jun | T | 2 | c | 14 |
| 07-Jun | T | 2 | c | 2  |
| 07-Jun | T | 2 | c | 26 |
| 07-Jun | T | 2 | c | 1  |
| 07-Jun | T | 2 | c | 8  |
| 07-Jun | T | 2 | c | 5  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 2  |

|        |   |   |   |    |
|--------|---|---|---|----|
| 07-Jun | T | 3 | a | 3  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 6  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 22 |
| 07-Jun | T | 3 | a | 11 |
| 07-Jun | T | 3 | a | 11 |
| 07-Jun | T | 3 | a | 13 |
| 07-Jun | T | 3 | a | 37 |
| 07-Jun | T | 3 | a | 12 |
| 07-Jun | T | 3 | a | 3  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 9  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 12 |
| 07-Jun | T | 3 | a | 1  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 2  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 18 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 22 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 15 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 10 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 7  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 5  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 1  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 9  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 13 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 31 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 0  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 14 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 6  |
| 07-Jun | T | 3 | c | 6  |
| 07-Jun | T | 3 | c | 26 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 16 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 20 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 11 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 31 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 27 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 15 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 24 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 21 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 17 |
| 07-Jun | T | 3 | c | 15 |

## 9.7 COLONIAS/100µL RECUPERADAS DE SOLUCIÓN CENTRIFUGADA Y RESUSPENDIDA DEL AGUA DE LOS BAÑOS

| Fecha  | Trat | Tubo | Rep | Nº | Observaciones |
|--------|------|------|-----|----|---------------|
| 06-Jun | D5   | 1    | a   | 3  |               |
| 06-Jun | D5   | 1    | b   | 0  |               |
| 06-Jun | D5   | 2    | a   | 0  |               |
| 06-Jun | D5   | 2    | b   | 0  |               |
| 06-Jun | D5   | 3    | a   | 0  |               |
| 06-Jun | D5   | 3    | b   | 0  |               |
| 06-Jun | D3   | 1    | a   | 0  |               |
| 06-Jun | D3   | 1    | b   | 0  |               |

|        |      |   |   |   |          |
|--------|------|---|---|---|----------|
| 06-Jun | D3   | 2 | a | 0 |          |
| 06-Jun | D3   | 2 | b | 0 |          |
| 06-Jun | D3   | 3 | a | 0 |          |
| 06-Jun | D3   | 3 | b | 0 |          |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | a | 0 |          |
| 06-Jun | A0.1 | 1 | b | 0 |          |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | a | 0 |          |
| 06-Jun | A0.1 | 2 | b | 0 |          |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | a | 0 |          |
| 06-Jun | A0.1 | 3 | b | 0 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 1 | a | 0 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 1 | b | 0 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 2 | a | 0 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 2 | b | 0 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 3 | a | 0 |          |
| 06-Jun | A0.2 | 3 | b | 0 |          |
| 06-Jun | H    | 1 | a | 0 |          |
| 06-Jun | H    | 1 | b | 0 |          |
| 06-Jun | H    | 2 | a | 0 |          |
| 06-Jun | H    | 2 | b | 0 |          |
| 06-Jun | H    | 3 | a | 0 |          |
| 06-Jun | H    | 3 | b | 0 |          |
| 06-Jun | T    | 1 | a |   | + de 300 |
| 06-Jun | T    | 1 | b |   | + de 300 |
| 06-Jun | T    | 2 | a |   | + de 300 |
| 06-Jun | T    | 2 | b |   | + de 300 |
| 06-Jun | T    | 3 | a |   | + de 300 |
| 06-Jun | T    | 3 | b |   | + de 300 |
| 07-Jun | D5   | 1 | a | 0 |          |
| 07-Jun | D5   | 1 | b | 0 |          |
| 07-Jun | D5   | 2 | a | 0 |          |
| 07-Jun | D5   | 2 | b | 0 |          |
| 07-Jun | D5   | 3 | a | 0 |          |
| 07-Jun | D5   | 3 | b | 0 |          |
| 07-Jun | D3   | 1 | a | 0 |          |
| 07-Jun | D3   | 1 | b | 0 |          |
| 07-Jun | D3   | 2 | a | 0 |          |
| 07-Jun | D3   | 2 | b | 0 |          |
| 07-Jun | D3   | 3 | a | 0 |          |
| 07-Jun | D3   | 3 | b | 0 |          |
| 07-Jun | A0.1 | 1 | a | 0 |          |
| 07-Jun | A0.1 | 1 | b | 0 |          |
| 07-Jun | A0.1 | 2 | a | 0 |          |
| 07-Jun | A0.1 | 2 | b | 0 |          |
| 07-Jun | A0.1 | 3 | a | 0 |          |
| 07-Jun | A0.1 | 3 | b | 0 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 1 | a | 0 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 1 | b | 0 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 2 | a | 0 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 2 | b | 0 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 3 | a | 0 |          |
| 07-Jun | A0.2 | 3 | b | 0 |          |
| 07-Jun | H    | 1 | a | 0 |          |
| 07-Jun | H    | 1 | b | 0 |          |

|        |   |   |   |   |          |
|--------|---|---|---|---|----------|
| 07-Jun | H | 2 | a | 0 |          |
| 07-Jun | H | 2 | b | 0 |          |
| 07-Jun | H | 3 | a | 0 |          |
| 07-Jun | H | 3 | b | 0 |          |
| 07-Jun | T | 1 | a |   | + de 300 |
| 07-Jun | T | 1 | b |   | + de 300 |
| 07-Jun | T | 2 | a |   | + de 300 |
| 07-Jun | T | 2 | b |   | + de 300 |
| 07-Jun | T | 3 | a |   | + de 300 |
| 07-Jun | T | 3 | b |   | + de 300 |

| Fecha  | Trat | Tubo | Rep | N° |
|--------|------|------|-----|----|
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 35 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 66 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 25 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 38 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 17 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 57 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 49 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 19 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 67 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 36 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 54 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 20 |
| 06-Jun | T    | 1    | a   | 32 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 60 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 39 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 66 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 90 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 91 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 20 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 58 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 20 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 59 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 49 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 44 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 33 |
| 06-Jun | T    | 1    | b   | 54 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 83 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 81 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 90 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 65 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 16 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 64 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 37 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 55 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 40 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 58 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 25 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 29 |
| 06-Jun | T    | 2    | a   | 11 |
| 06-Jun | T    | 2    | b   | 65 |
| 06-Jun | T    | 2    | b   | 32 |

|        |   |   |   |     |
|--------|---|---|---|-----|
| 06-Jun | T | 2 | b | 51  |
| 06-Jun | T | 2 | b | 35  |
| 06-Jun | T | 2 | b | 46  |
| 06-Jun | T | 2 | b | 33  |
| 06-Jun | T | 2 | b | 38  |
| 06-Jun | T | 2 | b | 38  |
| 06-Jun | T | 2 | b | 26  |
| 06-Jun | T | 2 | b | 72  |
| 06-Jun | T | 2 | b | 51  |
| 06-Jun | T | 2 | b | 36  |
| 06-Jun | T | 2 | b | 80  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 25  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 62  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 57  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 71  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 58  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 6   |
| 06-Jun | T | 3 | a | 55  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 8   |
| 06-Jun | T | 3 | a | 40  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 55  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 7   |
| 06-Jun | T | 3 | a | 35  |
| 06-Jun | T | 3 | a | 18  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 82  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 15  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 31  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 11  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 103 |
| 06-Jun | T | 3 | b | 44  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 34  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 62  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 49  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 22  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 47  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 19  |
| 06-Jun | T | 3 | b | 39  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 80  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 32  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 77  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 48  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 124 |
| 07-Jun | T | 1 | a | 20  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 150 |
| 07-Jun | T | 1 | a | 66  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 44  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 37  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 65  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 70  |
| 07-Jun | T | 1 | a | 17  |
| 07-Jun | T | 1 | b | 1   |
| 07-Jun | T | 1 | b | 16  |
| 07-Jun | T | 1 | b | 32  |
| 07-Jun | T | 1 | b | 22  |

|        |   |   |   |     |
|--------|---|---|---|-----|
| 07-Jun | T | 1 | b | 31  |
| 07-Jun | T | 1 | b | 0   |
| 07-Jun | T | 1 | b | 105 |
| 07-Jun | T | 1 | b | 52  |
| 07-Jun | T | 1 | b | 97  |
| 07-Jun | T | 1 | b | 43  |
| 07-Jun | T | 1 | b | 36  |
| 07-Jun | T | 1 | b | 24  |
| 07-Jun | T | 1 | b | 103 |
| 07-Jun | T | 2 | a | 1   |
| 07-Jun | T | 2 | a | 31  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 55  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 91  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 70  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 55  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 68  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 5   |
| 07-Jun | T | 2 | a | 17  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 10  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 23  |
| 07-Jun | T | 2 | a | 5   |
| 07-Jun | T | 2 | a | 53  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 12  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 20  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 9   |
| 07-Jun | T | 2 | b | 1   |
| 07-Jun | T | 2 | b | 19  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 16  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 44  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 45  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 36  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 30  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 2   |
| 07-Jun | T | 2 | b | 18  |
| 07-Jun | T | 2 | b | 22  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 20  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 5   |
| 07-Jun | T | 3 | a | 39  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 7   |
| 07-Jun | T | 3 | a | 11  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 25  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 122 |
| 07-Jun | T | 3 | a | 116 |
| 07-Jun | T | 3 | a | 25  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 64  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 35  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 20  |
| 07-Jun | T | 3 | a | 40  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 3   |
| 07-Jun | T | 3 | b | 11  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 47  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 20  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 35  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 37  |

|        |   |   |   |    |
|--------|---|---|---|----|
| 07-Jun | T | 3 | b | 28 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 23 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 28 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 28 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 50 |
| 07-Jun | T | 3 | b | 6  |
| 07-Jun | T | 3 | b | 45 |

## 9.8 Analisis estadístico

### 9.8.1 Programas

#### Primer análisis

```
%include "c:\compartida\sas\glimmix.sas" ;
%glimmix (data=tesis, stmts=%str(class fecha trat rep;
model ufc= trat rep trat*rep;
random fecha fecha*trat;
lsmeans trat rep trat*rep / pdiff adjust=dunnett;
repeated /type=un(1) group=trat),
error=poisson);
run;
```

#### Segundo análisis

```
%include "c:\compartida\sas\glimmix.sas" ;
%glimmix (data=tesis, stmts=%str(class fecha trat;
model ufc= trat ;
random fecha fecha*trat;
lsmeans trat / pdiff adjust=dunnett;
repeated /type=un(1) group=trat),
error=poisson);
run;
```

### 9.8.2 Salidas

#### Primer análisis

The SAS System

The Mixed Procedure

Model Information

|                    |          |
|--------------------|----------|
| Data Set           | WORK._DS |
| Dependent Variable | _z       |

Weight Variable        \_w  
Covariance Structures    Variance Components,  
                                 Unstructured  
Group Effect            Trat  
Estimation Method       REML  
Residual Variance Method   None  
Fixed Effects SE Method   Model-Based  
Degrees of Freedom Method   Containment

#### Class Level Information

Class   Levels   Values

Fecha        4   06-jun 07-jun 20-may 27-may  
Trat        6   00 A0.1 A0.2 D3 D5 H  
Rep        3   1 2 3

#### Dimensions

Covariance Parameters        8  
Columns in X                28  
Columns in Z                28  
Subjects                    1  
Máx. Obs Per Subject        216  
Observations Used            213  
Observations Not Used        3  
Total Observations            216

#### Parameter Search

|        |        |         |         |        |        |         |         |
|--------|--------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|
| CovP1  | CovP2  | CovP3   | CovP4   | CovP5  | CovP6  | CovP7   | CovP8   |
| 0.9946 | 0.5164 | 20.8402 | 14.9717 | 1.0765 | 152.12 | 46.2741 | 22.4334 |

#### Parameter Search

|              |                 |
|--------------|-----------------|
| Res Log Like | -2 Res Log Like |
| -191.9568    | 383.9137        |

#### The SAS System

#### The Mixed Procedure

#### Iteration History

| Iteration | Evaluations | -2 Res Log Like | Criterion  |
|-----------|-------------|-----------------|------------|
| 1         | 2           | 380.96040412    | 0.05859370 |
| 2         | 1           | 380.16453499    | 0.01041866 |

|   |   |              |            |
|---|---|--------------|------------|
| 3 | 1 | 380.03724506 | 0.00048704 |
| 4 | 1 | 380.03179823 | 0.00000130 |
| 5 | 1 | 380.03178766 | 0.00000033 |
| 6 | 1 | 380.03178411 | 0.00000000 |

Convergence criteria met.

#### Covariance Parameter Estimates

| Cov Parm   | Group     | Estimate |
|------------|-----------|----------|
| Fecha      |           | 1.2655   |
| Fecha*Trat |           | 0.9674   |
| UN(1,1)    | Trat 00   | 23.9120  |
| UN(1,1)    | Trat A0.1 | 16.1955  |
| UN(1,1)    | Trat A0.2 | 1.0793   |
| UN(1,1)    | Trat D3   | 152.15   |
| UN(1,1)    | Trat D5   | 49.0314  |
| UN(1,1)    | Trat H    | 21.7810  |

#### Fit Statistics

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| -2 Res Log Likelihood    | 380.0 |
| AIC (smaller is better)  | 396.0 |
| AICC (smaller is better) | 396.8 |
| BIC (smaller is better)  | 391.1 |

#### PARMS Model Likelihood Ratio Test

| DF | Chi-Square | Pr > ChiSq |
|----|------------|------------|
| 8  | 3.88       | 0.8676     |

#### Solution for Fixed Effects

| Effect    | Trat | Rep | Standard<br>Estimate | Error  | DF | t Value | Pr >  t |
|-----------|------|-----|----------------------|--------|----|---------|---------|
| Intercept |      |     | 4.6494               | 0.7586 | 3  | 6.13    | 0.0087  |
| Trat      | 00   |     | 0.9015               | 0.7121 | 15 | 1.27    | 0.2248  |

The SAS System

#### The Mixed Procedure

#### Solution for Fixed Effects

| Effect | Trat | Rep | Standard<br>Estimate | Error | DF | t Value | Pr >  t |
|--------|------|-----|----------------------|-------|----|---------|---------|
|--------|------|-----|----------------------|-------|----|---------|---------|

|          |      |   |         |        |     |       |        |
|----------|------|---|---------|--------|-----|-------|--------|
| Trat     | A0.1 |   | -1.1860 | 0.7263 | 15  | -1.63 | 0.1233 |
| Trat     | A0.2 |   | -1.9541 | 0.7117 | 15  | -2.75 | 0.0150 |
| Trat     | D3   |   | 1.3674  | 0.7304 | 15  | 1.87  | 0.0808 |
| Trat     | D5   |   | 0.4209  | 0.7242 | 15  | 0.58  | 0.5698 |
| Trat     | H    |   | 0       | .      | .   | .     | .      |
| Rep      | 1    |   | -0.9697 | 0.2404 | 177 | -4.03 | <.0001 |
| Rep      | 2    |   | -0.5565 | 0.2088 | 177 | -2.67 | 0.0084 |
| Rep      | 3    |   | 0       | .      | .   | .     | .      |
| Trat*Rep | 00   | 1 | 1.0371  | 0.2526 | 177 | 4.11  | <.0001 |
| Trat*Rep | 00   | 2 | 0.7315  | 0.2221 | 177 | 3.29  | 0.0012 |
| Trat*Rep | 00   | 3 | 0       | .      | .   | .     | .      |
| Trat*Rep | A0.1 | 1 | 0.9729  | 0.3024 | 177 | 3.22  | 0.0015 |
| Trat*Rep | A0.1 | 2 | 1.2767  | 0.2621 | 177 | 4.87  | <.0001 |
| Trat*Rep | A0.1 | 3 | 0       | .      | .   | .     | .      |
| Trat*Rep | A0.2 | 1 | 0.07995 | 0.2512 | 177 | 0.32  | 0.7507 |
| Trat*Rep | A0.2 | 2 | 0.1765  | 0.2176 | 177 | 0.81  | 0.4185 |
| Trat*Rep | A0.2 | 3 | 0       | .      | .   | .     | .      |
| Trat*Rep | D3   | 1 | 0.06313 | 0.3732 | 177 | 0.17  | 0.8659 |
| Trat*Rep | D3   | 2 | -0.6867 | 0.3852 | 177 | -1.78 | 0.0764 |
| Trat*Rep | D3   | 3 | 0       | .      | .   | .     | .      |
| Trat*Rep | D5   | 1 | 1.4604  | 0.3025 | 177 | 4.83  | <.0001 |
| Trat*Rep | D5   | 2 | 0.2396  | 0.3054 | 177 | 0.78  | 0.4337 |
| Trat*Rep | D5   | 3 | 0       | .      | .   | .     | .      |
| Trat*Rep | H    | 1 | 0       | .      | .   | .     | .      |
| Trat*Rep | H    | 2 | 0       | .      | .   | .     | .      |
| Trat*Rep | H    | 3 | 0       | .      | .   | .     | .      |

### Type 3 Tests of Fixed Effects

| Effect   | Num<br>DF | Den<br>DF | F Value | Pr > F |
|----------|-----------|-----------|---------|--------|
| Trat     | 5         | 15        | 6.35    | 0.0023 |
| Rep      | 2         | 177       | 12.63   | <.0001 |
| Trat*Rep | 10        | 177       | 17.42   | <.0001 |

### Least Squares Means

| Effect | Trat | Rep | Standard<br>Estimate | Error  | DF | t Value | Pr >  t |
|--------|------|-----|----------------------|--------|----|---------|---------|
| Trat   | 00   |     | 5.6317               | 0.7498 | 15 | 7.51    | <.0001  |
| Trat   | A0.1 |     | 3.7045               | 0.7567 | 15 | 4.90    | 0.0002  |
| Trat   | A0.2 |     | 2.2721               | 0.7505 | 15 | 3.03    | 0.0085  |

The SAS System

The Mixed Procedure

Least Squares Means

| Effect   | Trat | Rep | Standard |        | DF  | t Value | Pr >  t |
|----------|------|-----|----------|--------|-----|---------|---------|
|          |      |     | Estimate | Error  |     |         |         |
| Trat     | D3   |     | 5.3002   | 0.7651 | 15  | 6.93    | <.0001  |
| Trat     | D5   |     | 5.1282   | 0.7535 | 15  | 6.81    | <.0001  |
| Trat     | H    |     | 4.1407   | 0.7544 | 15  | 5.49    | <.0001  |
| Rep      |      | 1   | 4.2069   | 0.6011 | 177 | 7.00    | <.0001  |
| Rep      |      | 2   | 4.3074   | 0.6014 | 177 | 7.16    | <.0001  |
| Rep      |      | 3   | 4.5743   | 0.5998 | 177 | 7.63    | <.0001  |
| Trat*Rep | 00   | 1   | 5.6183   | 0.7511 | 177 | 7.48    | <.0001  |
| Trat*Rep | 00   | 2   | 5.7259   | 0.7509 | 177 | 7.63    | <.0001  |
| Trat*Rep | 00   | 3   | 5.5509   | 0.7512 | 177 | 7.39    | <.0001  |
| Trat*Rep | A0.1 | 1   | 3.4667   | 0.7647 | 177 | 4.53    | <.0001  |
| Trat*Rep | A0.1 | 2   | 4.1835   | 0.7590 | 177 | 5.51    | <.0001  |
| Trat*Rep | A0.1 | 3   | 3.4634   | 0.7647 | 177 | 4.53    | <.0001  |
| Trat*Rep | A0.2 | 1   | 1.8056   | 0.7527 | 177 | 2.40    | 0.0175  |
| Trat*Rep | A0.2 | 2   | 2.3153   | 0.7514 | 177 | 3.08    | 0.0024  |
| Trat*Rep | A0.2 | 3   | 2.6953   | 0.7509 | 177 | 3.59    | 0.0004  |
| Trat*Rep | D3   | 1   | 5.1102   | 0.7908 | 177 | 6.46    | <.0001  |
| Trat*Rep | D3   | 2   | 4.7736   | 0.8054 | 177 | 5.93    | <.0001  |
| Trat*Rep | D3   | 3   | 6.0168   | 0.7686 | 177 | 7.83    | <.0001  |
| Trat*Rep | D5   | 1   | 5.5610   | 0.7574 | 177 | 7.34    | <.0001  |
| Trat*Rep | D5   | 2   | 4.7534   | 0.7678 | 177 | 6.19    | <.0001  |
| Trat*Rep | D5   | 3   | 5.0703   | 0.7627 | 177 | 6.65    | <.0001  |
| Trat*Rep | H    | 1   | 3.6797   | 0.7756 | 177 | 4.74    | <.0001  |
| Trat*Rep | H    | 2   | 4.0929   | 0.7664 | 177 | 5.34    | <.0001  |
| Trat*Rep | H    | 3   | 4.6494   | 0.7586 | 177 | 6.13    | <.0001  |

#### Differences of Least Squares Means

| Effect | Trat | Rep | _Trat | _Rep | Standard |        | DF | t Value | Pr >  t | Adjustment  |
|--------|------|-----|-------|------|----------|--------|----|---------|---------|-------------|
|        |      |     |       |      | Estimate | Error  |    |         |         |             |
| Trat   | A0.1 | 00  |       |      | -1.9272  | 0.7085 | 15 | -2.72   | 0.0158  | Dunnett-Hsu |
| Trat   | A0.2 | 00  |       |      | -3.3596  | 0.7019 | 15 | -4.79   | 0.0002  | Dunnett-Hsu |
| Trat   | D3   | 00  |       |      | -0.3315  | 0.7175 | 15 | -0.46   | 0.6507  | Dunnett-Hsu |
| Trat   | D5   | 00  |       |      | -0.5035  | 0.7051 | 15 | -0.71   | 0.4862  | Dunnett-Hsu |

#### Differences of Least Squares Means

| Effect | Trat | Rep | _Trat | _Rep | Adj P  |
|--------|------|-----|-------|------|--------|
| Trat   | A0.1 | 00  |       |      | 0.0604 |
| Trat   | A0.2 | 00  |       |      | 0.0011 |
| Trat   | D3   | 00  |       |      | 0.9867 |
| Trat   | D5   | 00  |       |      | 0.9243 |

The SAS System

The Mixed Procedure

#### Differences of Least Squares Means

| Effect   | Trat | Rep | _Trat | _Rep | Estimate | Standard Error | DF  | t Value | Pr >  t | Adjustment  |
|----------|------|-----|-------|------|----------|----------------|-----|---------|---------|-------------|
| Trat     | H    | 00  |       |      | -1.4910  | 0.7060         | 15  | -2.11   | 0.0519  | Dunnett-Hsu |
| Rep      |      | 2   |       | 1    | 0.1005   | 0.08930        | 177 | 1.13    | 0.2619  | Dunnett-Hsu |
| Rep      |      | 3   |       | 1    | 0.3674   | 0.07783        | 177 | 4.72    | <.0001  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | 00   | 2   | 00    | 1    | 0.1076   | 0.07431        | 177 | 1.45    | 0.1493  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | 00   | 3   | 00    | 1    | -0.06743 | 0.07760        | 177 | -0.87   | 0.3860  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | A0.1 | 1   | 00    | 1    | -2.1517  | 0.7184         | 177 | -3.00   | 0.0031  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | A0.1 | 2   | 00    | 1    | -1.4348  | 0.7124         | 177 | -2.01   | 0.0455  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | A0.1 | 3   | 00    | 1    | -2.1549  | 0.7184         | 177 | -3.00   | 0.0031  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | A0.2 | 1   | 00    | 1    | -3.8127  | 0.7056         | 177 | -5.40   | <.0001  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | A0.2 | 2   | 00    | 1    | -3.3030  | 0.7042         | 177 | -4.69   | <.0001  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | A0.2 | 3   | 00    | 1    | -2.9230  | 0.7037         | 177 | -4.15   | <.0001  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | D3   | 1   | 00    | 1    | -0.5081  | 0.7461         | 177 | -0.68   | 0.4968  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | D3   | 2   | 00    | 1    | -0.8447  | 0.7615         | 177 | -1.11   | 0.2688  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | D3   | 3   | 00    | 1    | 0.3985   | 0.7225         | 177 | 0.55    | 0.5820  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | D5   | 1   | 00    | 1    | -0.05732 | 0.7106         | 177 | -0.08   | 0.9358  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | D5   | 2   | 00    | 1    | -0.8649  | 0.7217         | 177 | -1.20   | 0.2324  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | D5   | 3   | 00    | 1    | -0.5480  | 0.7163         | 177 | -0.77   | 0.4453  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | H    | 1   | 00    | 1    | -1.9386  | 0.7300         | 177 | -2.66   | 0.0086  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | H    | 2   | 00    | 1    | -1.5254  | 0.7202         | 177 | -2.12   | 0.0356  | Dunnett-Hsu |
| Trat*Rep | H    | 3   | 00    | 1    | -0.9689  | 0.7119         | 177 | -1.36   | 0.1753  | Dunnett-Hsu |

#### Differences of Least Squares Means

| Effect   | Trat | Rep | _Trat | _Rep | Adj P  |
|----------|------|-----|-------|------|--------|
| Trat     | H    | 00  |       |      | 0.1799 |
| Rep      |      | 2   |       | 1    | 0.4183 |
| Rep      |      | 3   |       | 1    | <.0001 |
| Trat*Rep | 00   | 2   | 00    | 1    | 0.7882 |
| Trat*Rep | 00   | 3   | 00    | 1    | 0.9953 |
| Trat*Rep | A0.1 | 1   | 00    | 1    | 0.0383 |
| Trat*Rep | A0.1 | 2   | 00    | 1    | 0.3709 |
| Trat*Rep | A0.1 | 3   | 00    | 1    | 0.0379 |
| Trat*Rep | A0.2 | 1   | 00    | 1    | <.0001 |
| Trat*Rep | A0.2 | 2   | 00    | 1    | <.0001 |
| Trat*Rep | A0.2 | 3   | 00    | 1    | 0.0008 |
| Trat*Rep | D3   | 1   | 00    | 1    | 0.9997 |
| Trat*Rep | D3   | 2   | 00    | 1    | 0.9586 |
| Trat*Rep | D3   | 3   | 00    | 1    | 1.0000 |
| Trat*Rep | D5   | 1   | 00    | 1    | 1.0000 |
| Trat*Rep | D5   | 2   | 00    | 1    | 0.9281 |
| Trat*Rep | D5   | 3   | 00    | 1    | 0.9988 |
| Trat*Rep | H    | 1   | 00    | 1    | 0.0948 |
| Trat*Rep | H    | 2   | 00    | 1    | 0.3074 |
| Trat*Rep | H    | 3   | 00    | 1    | 0.8452 |

## Segundo análisis

## The SAS System

### The Mixed Procedure

#### Model Information

|                           |                                      |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Data Set                  | WORK._DS                             |
| Dependent Variable        | _z                                   |
| Weight Variable           | _w                                   |
| Covariance Structures     | Variance Components,<br>Unstructured |
| Group Effect              | Trat                                 |
| Estimation Method         | REML                                 |
| Residual Variance Method  | None                                 |
| Fixed Effects SE Method   | Model-Based                          |
| Degrees of Freedom Method | Containment                          |

#### Class Level Information

| Class | Levels | Values |
|-------|--------|--------|
|-------|--------|--------|

|       |   |                             |
|-------|---|-----------------------------|
| Fecha | 4 | 06-jun 07-jun 20-may 27-may |
| Trat  | 6 | 00 A0.1 A0.2 D3 D5 H        |

#### Dimensions

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| Covariance Parameters | 8   |
| Columns in X          | 7   |
| Columns in Z          | 28  |
| Subjects              | 1   |
| Máx. Obs Per Subject  | 216 |
| Observations Used     | 213 |
| Observations Not Used | 3   |
| Total Observations    | 216 |

#### Parameter Search

| CovP1  | CovP2  | CovP3   | CovP4   | CovP5  | CovP6  | CovP7   | CovP8   |
|--------|--------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|
| 1.4080 | 1.2860 | 28.6307 | 30.6615 | 7.4194 | 238.82 | 77.3368 | 35.3763 |

#### Parameter Search

| Res Log Like | -2 Res Log Like |
|--------------|-----------------|
| -263.1347    | 526.2693        |

## The SAS System

## The Mixed Procedure

### Iteration History

| Iteration | Evaluations | -2 Res Log Like | Criterion  |
|-----------|-------------|-----------------|------------|
| 1         | 1           | 526.26934280    | 0.00000000 |

Convergence criteria met.

### Covariance Parameter Estimates

| Cov Parm   | Group     | Estimate |
|------------|-----------|----------|
| Fecha      |           | 1.4080   |
| Fecha*Trat |           | 1.2860   |
| UN(1,1)    | Trat 00   | 28.6307  |
| UN(1,1)    | Trat A0.1 | 30.6615  |
| UN(1,1)    | Trat A0.2 | 7.4194   |
| UN(1,1)    | Trat D3   | 238.82   |
| UN(1,1)    | Trat D5   | 77.3368  |
| UN(1,1)    | Trat H    | 35.3763  |

### Fit Statistics

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| -2 Res Log Likelihood    | 526.3 |
| AIC (smaller is better)  | 542.3 |
| AICC (smaller is better) | 543.0 |
| BIC (smaller is better)  | 537.4 |

### PARMS Model Likelihood Ratio Test

| DF | Chi-Square | Pr > ChiSq |
|----|------------|------------|
| 8  | 0.00       | 1.0000     |

### Solution for Fixed Effects

| Effect    | Trat | Estimate | Standard Error | DF | t Value | Pr >  t |
|-----------|------|----------|----------------|----|---------|---------|
| Intercept |      | 4.2181   | 0.8301         | 3  | 5.08    | 0.0147  |
| Trat      | 00   | 1.2871   | 0.8185         | 15 | 1.57    | 0.1367  |
| Trat      | A0.1 | -0.5453  | 0.8428         | 15 | -0.65   | 0.5274  |
| Trat      | A0.2 | -2.0457  | 0.8695         | 15 | -2.35   | 0.0327  |
| Trat      | D3   | 1.2228   | 0.8337         | 15 | 1.47    | 0.1631  |
| Trat      | D5   | 0.9645   | 0.8201         | 15 | 1.18    | 0.2578  |

Trat H 0  
The SAS System

# The Mixed Procedure

## Type 3 Tests of Fixed Effects

| Effect | Num<br>DF | Den<br>DF | F Value | Pr > F |
|--------|-----------|-----------|---------|--------|
| Trat   | 5         | 15        | 4.37    | 0.0118 |

## Least Squares Means

| Effect | Trat | Standard<br>Estimate | Error  | DF | t Value | Pr >  t |
|--------|------|----------------------|--------|----|---------|---------|
| Trat   | 00   | 5.5051               | 0.8276 | 15 | 6.65    | <.0001  |
| Trat   | A0.1 | 3.6728               | 0.8517 | 15 | 4.31    | 0.0006  |
| Trat   | A0.2 | 2.1723               | 0.8783 | 15 | 2.47    | 0.0258  |
| Trat   | D3   | 5.4409               | 0.8427 | 15 | 6.46    | <.0001  |
| Trat   | D5   | 5.1826               | 0.8292 | 15 | 6.25    | <.0001  |
| Trat   | H    | 4.2181               | 0.8301 | 15 | 5.08    | 0.0001  |

## Differences of Least Squares Means

| Effect | Trat | _Trat | Standard<br>Estimate | Error  | DF | t Value | Pr >  t | Adjustment  | Adj P  |
|--------|------|-------|----------------------|--------|----|---------|---------|-------------|--------|
| Trat   | A0.1 | 00    | -1.8324              | 0.8406 | 15 | -2.18   | 0.0456  | Dunnett-Hsu | 0.1617 |
| Trat   | A0.2 | 00    | -3.3328              | 0.8668 | 15 | -3.84   | 0.0016  | Dunnett-Hsu | 0.0067 |
| Trat   | D3   | 00    | -0.06424             | 0.8311 | 15 | -0.08   | 0.9394  | Dunnett-Hsu | 1.0000 |
| Trat   | D5   | 00    | -0.3225              | 0.8176 | 15 | -0.39   | 0.6988  | Dunnett-Hsu | 0.9936 |
| Trat   | H    | 00    | -1.2871              | 0.8185 | 15 | -1.57   | 0.1367  | Dunnett-Hsu | 0.4160 |

## GLIMMIX Model Statistics

| Description               | Value      |
|---------------------------|------------|
| Deviance                  | 12683.7041 |
| Scaled Deviance           | 12683.7041 |
| Pearson Chi-Square        | 13456.7265 |
| Scaled Pearson Chi-Square | 13456.7265 |
| Extra-Dispersion Scale    | 1.0000     |