



Artículo Científico

Diversidad y resistencia a antibióticos en bacterias asociadas a síntomas de infección bacteriana en cultivos de Costa Rica

¹**Lorena Uribe-Lorío***, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, San Pedro, San José, Costa Rica, CP 1501-2060; ¹**Lidieth Uribe**, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, San Pedro, San José, Costa Rica, CP 1501-2060; **César Rodríguez, Fernando García**, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San Pedro, San José, Costa Rica, CP 1501-2060; **Luis Felipe Aráuz**, ¹Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San Pedro, San José, Costa Rica, CP 1501-2060.

RESUMEN

Objetivo/antecedente. El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad y resistencia a antibióticos de uso agrícola en bacterias aisladas de 19 cultivos con síntomas de infecciones bacterianas.

Materiales y métodos. La colección de 116 bacterias se identificó mediante secuenciación del gen ARN 16Sr y el sistema Biolog, y se determinó la susceptibilidad y concentración mínima inhibitoria de la estreptomycin, tetraciclina y gentamicina utilizando la prueba de difusión en disco y E-test, respectivamente.

Resultados. Se identificaron 55 especies pertenecientes a 20 géneros bacterianos, destacando *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pantoea* y *Stenotrophomonas* como los más abundantes. El 27 % de los aislamientos fue categorizado como patógeno mediante Reacción hipersensible, entre ellos los fitopatógenos *Pseudomonas syringae*, *P. cichorii*, *Pantoea anthophila* y *P. stewartii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Dickeya oryzae*, *Erwinia billingiae*, *Pectobacterium aroidearum*, y *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*. Se observó resistencia a al menos un antibiótico en el 60 % de los aislamientos provenientes de 17 cultivos, aunque el tomate, palmito y lechuga presentaron la mayor proporción de bacterias resistentes (> 80 %). La resistencia a estreptomycin fue la más frecuente (35 %), seguida por tetraciclina (28 %) y gentamicina (9 %).

Conclusiones. Los resultados muestran resistencia en bacterias saprófitas y patógenas asociadas a 17 de 19 cultivos evaluados, lo cual constituye un riesgo ambiental, fitosanitario y de salud pública.

*Autor de
correspondencia:

Lorena Uribe-Lorío
lorena.uribe@ucr.ac.cr

Sección:
Edición periódica

Recibido:
26 Mayo, 2023

Aceptado:
05 Enero, 2024

Publicado:
26 Febrero, 2024

Cita:

Uribe-Lorío L, Uribe L, Rodríguez C, García F y Aráuz LF. 2024. Diversidad y resistencia a antibióticos en bacterias asociadas a síntomas de infección bacteriana en cultivos de Costa Rica. Revista Mexicana de Fitopatología 42(2): 13. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2305-5>



Palabras clave: Bacterias, Fitopatógenos, Antimicrobianos, Filosfera, Combate.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias asociadas a plantas sobreviven como epífitas o endófitas (Agrios, 2005), y en la mayoría de los casos, realizan funciones que mantienen el balance del sistema como la fijación de nitrógeno y el antagonismo contra fitopatógenos (Arauz, 2011; Nion y Toyota, 2015; Compant *et al.*, 2019; Hashem *et al.*, 2019). Estas bacterias comparten nicho con las bacterias fitopatógenas que utilizan las plantas como fuente de nutrientes y se han especializado en evadir sus defensas y en consecuencia invadir los tejidos de la planta hospedera (Vidaver y Lambrecht, 2004; Agrios, 2005; Kannan y Bastas, 2015).

En Costa Rica, se han reportado varios géneros como patógenos de plantas ornamentales y follajes como *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia* y el complejo de especies de *Ralstonia solanacearum* (Arauz, 2011; Quesada-González y García-Santamaría, 2014; Cubero-Agüero *et al.*, 2021; López, 2021; Vidaurre-Barahona *et al.*, 2021). La infección causada por estas bacterias puede manifestarse como manchas en frutos (*Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas campestris*), canchales (*Erwinia* y *Pseudomonas*) marchitamiento (*Ralstonia solanacearum*) y pudrición blanda (*Pectobacterium carotovorum* y *Dickeya dadanti*) (Vidaver y Lambrecht, 2004; Agrios, 2005; Arauz, 2011; Bellincampi *et al.*, 2014). La variedad de síntomas y de hospederos hacen a estos patógenos responsables de daños severos en cultivos y, por ende, en la economía del sector agrícola. Adicionalmente, estas enfermedades son más graves y frecuentes en zonas tropicales y subtropicales, donde las condiciones de calor y humedad son ideales para su desarrollo, y no hay disminución del inóculo por efecto de las bajas temperaturas del invierno (Arauz, 2011; Kannan y Bastas, 2015; Miller *et al.*, 2022). Por lo tanto, el combate de estos patógenos es vital para conservar la productividad de los agroecosistemas; sin embargo, pocas sustancias son eficaces o se encuentran disponibles para mitigar la pérdida de la cosecha (Stockwell y Duffy, 2012), entre las que se encuentran los antibióticos.

Actualmente, los antibióticos de mayor uso a nivel mundial son la estreptomina, oxitetraciclina, penicilina, ácido oxonólico y gentamicina (McManus *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 2021; Miller *et al.*, 2022), de los cuáles la estreptomina y oxitetraciclina son aprobados para la agricultura en Estados Unidos, a diferencia de la Unión Europea y otros países desarrollados donde no son permitidos (Miller *et al.*, 2022), debido a su importancia para el uso médico (WHO, 2019). La aplicación de antibióticos es el método más utilizado para el manejo de enfermedades bacterianas en algunos países de bajo o mediano ingreso (PBMI) (Miller *et al.*,

2022), tal es el caso en Latinoamérica y el Caribe donde son usados sin restricción a pesar del riesgo de desarrollo de resistencia (Rodríguez *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2008; MSP, 2018; Taylor y Reeder, 2020), y con resultados variables en el combate de enfermedades bacterianas en los cultivos (McManus *et al.*, 2002; Stockwell y Duffy, 2012), ya que, aunque las bacterias fitopatógenas tienen habilidad de penetrar en los tejidos vegetales y multiplicarse (Sundin *et al.*, 2016), la mayoría de las formulaciones son aplicadas en la parte aérea, de manera que su absorción, translocación y eficiencia son reducidas (McManus *et al.*, 2002; Agrios, 2005). Por ejemplo, la absorción de oxitetraciclina en cítricos vía foliar es muy limitada, por lo que se recurre a la inyección al tronco para el combate de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en este cultivo (Killiny *et al.*, 2020).

Los bactericidas y antibióticos son los compuestos más utilizados para el control de bacterias fitopatógenas en Costa Rica (Ramírez-Muñoz *et al.*, 2014; Durán-Quirós *et al.*, 2017; Blanco-Meneses *et al.*, 2023), entre los que se encuentran la oxitetraciclina, la gentamicina, así como mezclas de estos con estreptomycin (gentamicina y oxitetraciclina en Agri-Gent Plus 4 y 8, estreptomycin y oxitetraciclina en Agry-mycin 16.5) (Rodríguez *et al.*, 2006; Galt, 2009; MSP, 2018). La ausencia de un sistema de registro integrado en el país limita controlar el uso eficiente de estos productos en humanos, animales y vegetales (MSP, 2018). De la Cruz *et al.* (2008) determinaron que el consumo de antibióticos en el cultivo de *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus* y *Oriza sativa* en el Distrito de riego Arenal-Tempisque fue de 7.4-155.0 g ha⁻¹ al año tanto para estreptomycin como oxitetraciclina; otros estudios indican que existe variabilidad entre productores en las dosis, frecuencia de uso y período de carencia (tiempo de suspensión de la aplicación antes de la cosecha) (Durán-Quirós *et al.*, 2017; Blanco-Meneses *et al.*, 2023).

Los antibióticos pueden permanecer activos en la superficie de la planta al menos una semana (Stockwell y Duffy, 2012), lo que aunado a su uso frecuente puede generar bacterias resistentes (Silbergeld *et al.*, 2008; Alós, 2014; FAO, 2021). Al respecto, Rodríguez *et al.* (2006; 2008) identificaron bacterias epífitas resistentes a gentamicina y oxitetraciclina en muestras de lechuga (*Lactuca sativa*) y en suelos agrícolas, así como determinantes genéticos de resistencia, lo que implica una diseminación de bacterias resistentes entre los diferentes ambientes y/o una transferencia horizontal de genes de resistencia. No obstante, no se ha estudiado la presencia de bacterias fitopatógenas resistentes a antimicrobianos en el país por lo que este estudio tuvo como objetivo analizar la diversidad de una colección de bacterias aisladas a partir de lesiones provenientes de diferentes cultivos con síntomas de infección bacteriana en Costa Rica y evaluar su resistencia a los antibióticos estreptomycin, oxitetraciclina y gentamicina, utilizados para el manejo de enfermedades bacterianas de plantas en este país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos. Se analizaron 116 bacterias Gram negativas pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Las bacterias se aislaron durante el 2006 al 2009 de muestras provenientes de diferentes zonas agrícolas de Costa Rica. Se consideró tejido de la zona de avance de lesiones en plantas que presentaron síntomas asociados con patógenos bacterianos. En el Cuadro 1 se presenta información pertinente respecto al cultivo, tipo de tejido, síntoma observado y sitio de colecta.

Cuadro 1. Características de colecta de aislados bacterianos establecida a partir de síntomas de 19 cultivos en diferentes zonas de Costa Rica entre 2006 al 2009.

Planta hospedera	Nombre común	N° de muestras	Tejido	Síntomas observados	Sitio de colecta	N° de aislamientos
<i>Apium graveolens</i>	Apio	3	Tallo	Pudrición blanda (Figura 1D)	Cartago	6
<i>Bactris gasipaes</i>	Palmito	3	Hoja	Necrosis	Limón	6
<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis	Coliflor	2	Hoja	Mancha	Heredia	5
<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	Repollo	6	Hoja	Necrosis angular (Figura 1H), Mancha, Pudrición blanda	Heredia, Cartago	25
<i>Capsicum annuum</i>	Chile dulce	2	Fruto	Pudrición blanda (Figura 1E)	Cartago	9
<i>Cucumis melo</i>	Melón	1	Fruto	Pudrición blanda	Guanacaste	5
<i>Cucurbita pepo</i>	Zapallo	1	Fruto	Pudrición blanda (Figura 1G)	Cartago	3
<i>Curcuma longa</i>	Cúrcuma	2	Raíz	Pudrición blanda	Guanacaste	4
<i>Daucus carota</i>	Zanahoria	1	Raíz	Pudrición blanda	Alajuela	1
<i>Dracaena massangeana</i>	Dracaena	2	Tallo	Pudrición blanda (Figura 1F)	Alajuela	7
<i>Ficus carica</i>	Higo	1	Hoja	Mancha	Alajuela	1
<i>Lactuca sativa</i>	Lechuga Boston	2	Hoja	Mancha (Figura 1A)	Cartago	5
<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	Lechuga Iceberg	6	Tallo y Hoja	Pudrición blanda (Figura 1B), Mancha	Cartago	11
<i>Mangifera indica</i>	Mango	2	Fruto	Mancha (Figura 1I)	Alajuela	4
<i>Musa paradisiaca</i>	Banano	5	Tallo y Corona	Pudrición blanda, Necrosis del tallo	Limón	12
<i>Ornithogalum arabicum</i>	Ornamental	1	Hoja	Pudrición blanda	Alajuela	2
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol	2	Hoja	Mancha	Heredia	3
<i>Solanum lycopersicum</i>	Jitomate	3	Fruto y Hoja	Manchas del fruto y hoja, Pudrición blanda de fruto	Alajuela, Cartago	6
<i>Solanum tuberosum</i>	Papa	1	Raíz	Pudrición blanda	Cartago	1
Total		46				116

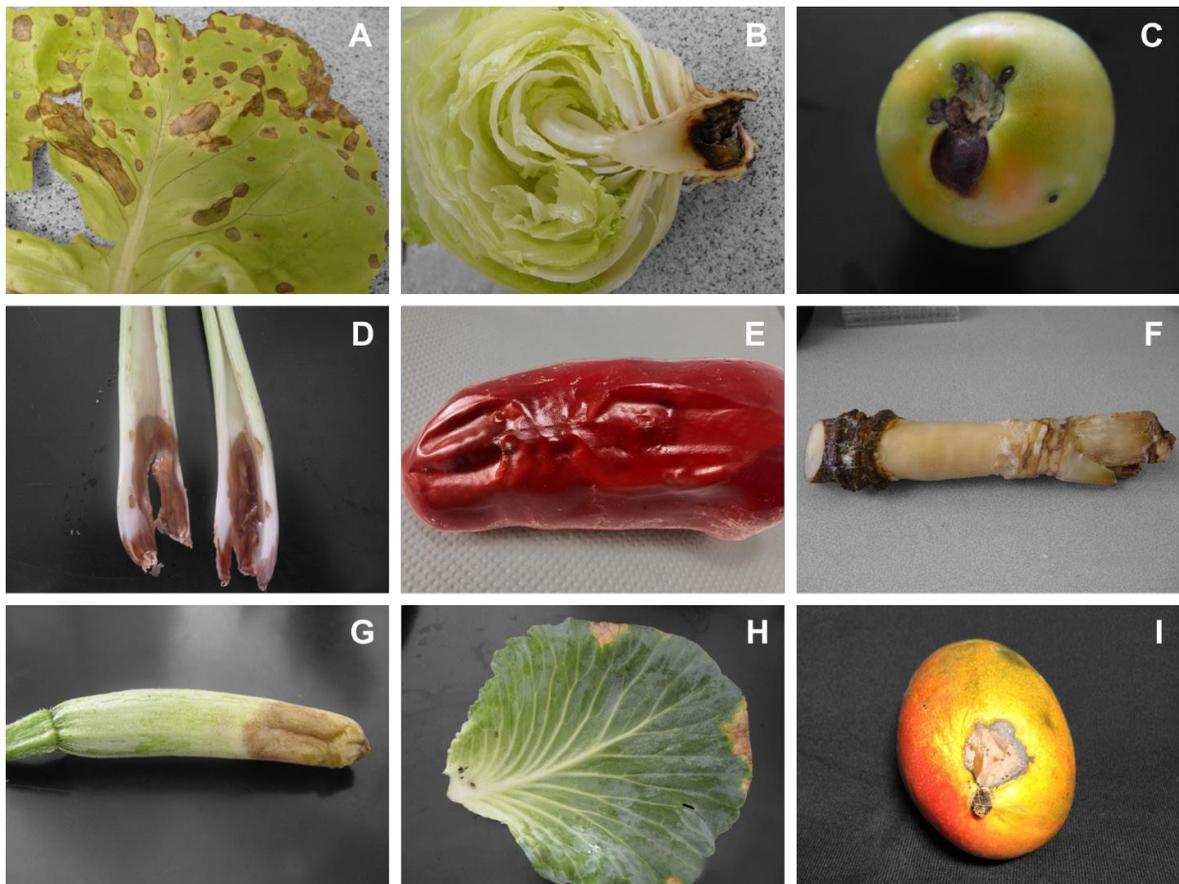


Figura 1. Síntomas de infección bacteriana de los que fueron aisladas las bacterias de la colección analizada en este estudio. A. Mancha de la hoja en Lechuga Boston, B. Pudrición blanda en Lechuga Iceberg, C. mancha necrótica en Jitomate. D. Pudrición blanda en Apio. E. Pudrición blanda en Chile dulce. F. Pudrición blanda en *Dracaena*. G. Pudrición blanda en Zapallo. H. Necrosis angular en Repollo. I. Mancha del fruto en Mango.

Identificación de la colección de bacterias mediante análisis del gen ARN 16S ribosomal.

Cada bacteria se inoculó en 3 mL de caldo nutritivo, se incubó por 24-48 horas a 30 °C, y el crecimiento obtenido fue centrifugado por 5 min a 10000 r.p.m, hasta obtener la biomasa. Se extrajo el ADN contenido en esta biomasa siguiendo el protocolo de extracción reportado por Fontecha (2003). Posteriormente, se realizó la amplificación del gen ARNr 16S utilizando cebadores universales: 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (TACGGYTACCTTGTTAC-GACTT) (Weisburg *et al.*, 1991). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en 50 µL de mezcla con 0.8 µL (200 µM) de cada dNTPs (Thermo Scientific), 2.5 µL (1.25 mM) de MgCl₂ (Thermo Scientific), 2.0 µL (0.4 µM) de cada cebador, 0.5 U de Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific), 5.0 µL de buffer con KCl y sin MgCl₂ 1X (Thermo Scientific) y ~10 ng de ADN genómico. Se amplificaron las reacciones

con el programa y condiciones reportadas por Fontecha (2003): Etapa de desnaturalización a 94 °C por 4 min, seguida por 34 ciclos compuestos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridización a 50 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 90 s, y por último una extensión a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1 %. Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante y fueron secuenciados en un equipo ABI PRISM 3130 con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied BioSystems) o, alternativamente, en la compañía Macrogen (Corea). Las secuencias resultantes fueron ensambladas utilizando el software BioEdit Sequence Alignment Editor Versión 7.2 (Hall, 1999). La búsqueda de homología se realizó utilizando la base de datos BLASTN del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para encontrar similitudes con secuencias depositadas en el GenBank (Altschul *et al.*, 1997), y utilizando una extensión de EzbioCloud (Yoon *et al.*, 2017) cuya base de datos almacena secuencias del gen del ARNr 16S de cepas de referencia y con asignaciones taxonómicas válidas y publicadas.

Análisis filogenético. Las secuencias se alinearon utilizando ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) en el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2013), y se realizó el análisis con secuencias de cepas tipo de referencia y *Bacillus subtilis* (NR112116) como grupo externo. Las distancias evolutivas se calcularon mediante la inferencia de Neighbour joining y se evaluó la topología del árbol realizando 1,000 remuestreos. El árbol fue visualizado utilizando la herramienta ITOL (<https://itol.embl.de.com>). Las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos GenBank del NCBI bajo el bioproyecto PRJNA898399.

Identificación de aislamientos por sistema semiautomatizado Biolog™. Se utilizó el sistema Biolog™ para la identificación de aislamientos que no presentaron resultados concluyentes en la identificación molecular. Este sistema compara las reacciones redox de 95 fuentes de carbono y otras sustancias con la base de datos que incluye bacterias ambientales entre ellas fitopatógenas. Para esto se sembraron los cultivos de bacterias de 24 horas de cada aislamiento en las placas de identificación siguiendo las instrucciones del fabricante. Las lecturas se realizaron 24 h después y se documentó la identificación más cercana según el software del equipo Biolog.

Perfil de susceptibilidad a antibióticos y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se analizó la susceptibilidad a los antibióticos estreptomicina, gentamicina y tetraciclina con el método de difusión en agar de Kirby-Bauer, usando mono-discos impregnados con cantidades estándar de antibióticos

comerciales (Oxoid), 10 mg en el caso de estreptomina y gentamicina y 30 mg para la tetraciclina. Los discos se colocaron sobre cultivos de cada aislamiento en el medio de cultivo Muller-Hinton, y posteriormente se midió el halo de inhibición de crecimiento (Sánchez y Guerrero, 2006), que se comparó con los puntos de corte únicos arbitrarios basados en las recomendaciones para bacterias de origen clínico de las mismas familias taxonómicas descritas a continuación: Resistente a Tetraciclina (≤ 14 mm), intermedio (15-18 mm), sensible (≥ 19 mm). Resistente a Gentamicina (≤ 12 mm), intermedio (13-14 mm), sensible (≥ 15 mm). Resistente a Estreptomina (≤ 11 mm), intermedio (entre 12-14 mm), sensible (≥ 15 mm), que corresponden a los cortes para *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. y enterobacterias (NCCLS, 2000). Se utilizaron como controles las cepas *E. coli* (ATCC-25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-15442). A los aislamientos categorizados como resistentes e intermedios se les determinó la CMI de estreptomina, gentamicina y oxitetraciclina utilizando el método epsilométrico E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia), que consta de una tira sólida con una escala de lectura en la parte superior y una gradiente exponencial de antimicrobiano en la parte inferior que cubre concentraciones adecuadas para determinar la CMI (Alippi *et al.*, 2013). Se siguió el protocolo reportado por Lang y García (2004), utilizando como medio de cultivo agar LB e incubando a una temperatura de 30 °C. Después del periodo de incubación se documentó el resultado de las concentraciones mínimas.

Relación fitopatogenicidad-resistencia a antibióticos. Con el fin de analizar si existe relación entre la resistencia a los tres antibióticos y la fitopatogenicidad de las bacterias analizadas, se utilizaron los datos de la reacción de hipersensibilidad (RH) (Cuadro 2), previamente generados (Herrera, 2009); para ello, se inocularon suspensiones de 24 horas de cada aislamiento en hojas de *Nicotiana tabacum* mediante la técnica de impresión, planteada por Trigiano *et al.* (2004). Se tomó como una RH negativa los niveles 0 a 2, desde la ausencia de reacción hasta un halo de clorosis mínimo sin presencia de necrosis, y una reacción positiva desde clorosis intensa con necrosis (nivel 3), hasta el desarrollo de la necrosis típica de RH delimitada por los haces vasculares o nervaduras (nivel 4), o necrosis que se extiende fuera de esa área (nivel 5).

RESULTADOS

Identificación de la colección de bacterias mediante análisis del gen ARN 16S y análisis filogenético. Se logró obtener 90 secuencias con la calidad necesaria para su identificación molecular, y los 26 aislamientos restantes se identificaron utilizando el Sistema Biolog™ (Cuadro 2). Los 116 aislamientos se agruparon en

Cuadro 2. Identificación y niveles de resistencia a estreptomycin, tetraciclina y gentamicina de aislamientos bacterianos pertenecientes a la colección de bacterias asociadas a síntomas de infección en cultivos colectados de 2006-2009 en Costa Rica.

Código	Hospedero	Sínt. ^a	Tejido	RH ^b	Identificación de cepas (ARN 16S y Biolog™)	CMI ^c (µg mL ⁻¹)		
						EST	TET	GEN
MA-6	<i>Apium graveolens</i>	PB	tallo	0	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	>1024*		
MA-7	<i>Apium graveolens</i>	PB	tallo	2	<i>Pseudomonas capeferrum</i> WCS358 ^T	512*	-	
MA-15	<i>Apium graveolens</i>	PB	tallo	1	<i>Pseudomonas arauntiaca</i> (Biolog)*	-		
MA-16	<i>Apium graveolens</i>	PB	tallo	2	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T	512*		
MA-79	<i>Apium graveolens</i>	PB	tallo	2	<i>Pseudomonas capeferrum</i> WCS358 ^T	-		
MA-86	<i>Apium graveolens</i>	PB	tallo	2	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T	128*	24	
MA-50	<i>Bactris gasipaes</i>	N	hoja	4	<i>P. stewartii</i> sp. <i>indologenes</i> LMG 2632 ^T			
MA-52	<i>Bactris gasipaes</i>	N	hoja	5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 19861 ^T	12	12	
MA-53	<i>Bactris gasipaes</i>	N	hoja	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 19861 ^T		12	
MA-54	<i>Bactris gasipaes</i>	N	hoja	5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 19861 ^T	12	24	256
MA-55	<i>Bactris gasipaes</i>	N	hoja	2	<i>Providencia rettgeri</i> DSM 4542 ^T	12	-	
MA-65	<i>Bactris gasipaes</i>	N	hoja	5	<i>P. stewartii</i> sp. <i>indologenes</i> LMG 2632 ^T	12	12	
MA-30	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	M	Hoja	0	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T			
MA-95	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	M	Hoja	5	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	-		
MA-110	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	M	Hoja	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Biolog)	-		
MA-142	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	M	Hoja	0	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> DSM 14405	>1024		
MA-143	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	M	Hoja	0	<i>Acinetobacter lactucae</i> NRRLB-41902 ^T	12*	-	32
MA-9	<i>Capsicum annuum</i>	PB	fruto	2	<i>Pseudomonas maumuensis</i> COW77 ^T			
MA-10	<i>Capsicum annuum</i>	PB	fruto	2	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T	16*	>256	-
MA-11	<i>Capsicum annuum</i>	PB	fruto	2	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T	-		
MA-14	<i>Capsicum annuum</i>	PB	fruto	1	<i>Acinetobacter lactucae</i> NRRL B-41902 ^T			
MA-19	<i>Capsicum annuum</i>	PB	fruto	5	<i>Pantoea anthophila</i> LMG 2558 ^T	>1024	-	
MA-33	<i>Capsicum annuum</i>	PB	fruto	4	<i>Pseudomonas punonensis</i> CECT 8089	-	>256	
MA-90	<i>Capsicum annuum</i>	PB	fruto	4	<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973 ^T			
MA-120	<i>Capsicum annuum</i>	PB	fruto	4	<i>Raoultella terrigena</i> ATCC 33257 ^T		>256	
MA-140	<i>Capsicum annuum</i>	PB	fruto	5	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	-	-	12
MA-128	<i>Cucumis melo</i>	PB	fruto	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104 ^T			
MA-129	<i>Cucumis melo</i>	PB	fruto	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)			
MA-130	<i>Cucumis melo</i>	PB	fruto	5	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	12	12	
MA-131	<i>Cucumis melo</i>	PB	fruto	1	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T		12	
MA-132	<i>Cucumis melo</i>	PB	fruto	3	<i>Achromobacter marplatensis</i> LMG 26685 ^T	>1024	12	
MA-2	<i>Curcuma longa</i>	PB	Raíz	4	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> LMG 2683 ^T	-	12	
MA-8	<i>Curcuma longa</i>	PB	Raíz	1	<i>Serratia marcescens</i> (Biolog)	-		
MA-38	<i>Curcuma longa</i>	PB	Raíz	0	<i>Enterobacter huaxiensis</i> 090008 ^T	-		
MA-61	<i>Curcuma longa</i>	PB	Raíz	2	<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973 ^T	>1024*		
MA-4	<i>Dracaena massangeana</i>	PB	Tallo	2	<i>Psychrobacter alimentarius</i> JG-100 ^T	12		
MA-27	<i>Dracaena massangeana</i>	PB	Tallo	1	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T			
MA-42	<i>Dracaena massangeana</i>	PB	Tallo	2	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 3738 ^T	48*		
MA-43	<i>Dracaena massangeana</i>	PB	Tallo	2	<i>Comamonas koreensis</i> KCTC 12005 ^T	12	-	
MA-88	<i>Dracaena massangeana</i>	PB	Tallo	0	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Biolog)	-		
MA-89	<i>Dracaena massangeana</i>	PB	Tallo	2	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T	-		
MA-136	<i>Dracaena massangeana</i>	PB	Tallo	0	<i>Pantoea agglomerans</i> (Biolog)			
MA-59	<i>Ficus carica</i>	M	hoja	0	<i>O. pseudogrignonensis</i> CCUG 30717 ^T	-	96	
MA-5	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i>	PB	hoja	0	<i>Pseudomonas putida</i> (Biolog)			
MA-13A	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i>	PB	tallo	4	<i>Pectobacterium aroidearum</i> SCRI 109 ^T	12		
MA-13B	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i>	M	hoja	4	<i>Pseudomonas capeferrum</i> WCS358 ^T	96		

Cuadro 2. Continúa...

Código	Hospedero	Sínt. ^a	Tejido	RH ^b	Identificación de cepas (ARN 16S y Biolog TM)	CMI ^c (µg mL ⁻¹)		
						EST	TET	GEN
MA-14C	<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	PB	tallo	5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 19861 ^T	-		48
MA-17	<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	PB	hoja	1	<i>Pseudomonas azotoformans</i> LMG 21611 ^T			
MA-23A	<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	M	hoja	3	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T	12		
MA-224	<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	M	hoja	4	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> NBRC 102199 ^T	12		
MA-43A	<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	PB	hoja	4	<i>Raoultella terrigena</i> ATCC 33257 ^T	12		
MA-82	<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	PB	hoja	1	<i>Pseudomonas extremorientalis</i> KMM 3447 ^T	-	24	
MA-60	<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	PB	hoja	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)			
MA-84	<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	PB	hoja	2	<i>Pseudomonas putida</i> (Biolog)	-		
MA-40	<i>Lactuca sativa</i>	M	hoja	1	<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973 ^T	32*		
MA-44	<i>Lactuca sativa</i>	M	hoja	2	<i>Pseudomonas punonensis</i> CECT 8089 ^T	-	>256	-
MA-49	<i>Lactuca sativa</i>	M	hoja	4	<i>Pseudomonas cichorii</i> ATCC10857 ^T			
MA-111	<i>Lactuca sativa</i>	M	hoja	0	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T	-	>256	
MA-112	<i>Lactuca sativa</i>	M	hoja	2	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T	-	128	
MA-115	<i>Mangifera indica</i>	M	fruto	2	<i>Erwinia billingiae</i> CIP 106121 ^T			
MA-124	<i>Mangifera indica</i>	M	fruto	2	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 3738 ^T			
MA-125	<i>Mangifera indica</i>	M	fruto	0	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)			
MA-127	<i>Mangifera indica</i>	M	fruto	1	<i>Pseudomonas putida</i> (Biolog)			
MA-24	<i>Musa paradisiaca</i>	PB	Tallo	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)			
MA-51	<i>Musa paradisiaca</i>	N	Tallo	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)	-	12	
MA-68	<i>Musa paradisiaca</i>	PB	Tallo	2	<i>Acinetobacter</i> sp. (Biolog)			
MA-72	<i>Musa paradisiaca</i>	PB	Tallo	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)	-	-	
MA-77	<i>Musa paradisiaca</i>	N	Tallo	2	<i>Aeromonas caviae</i> (Biolog)	-		12
MA-87	<i>Musa paradisiaca</i>	PB	Tallo	0	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T	>1024	>256	
MA-97	<i>Musa paradisiaca</i>	PB	Tallo	2	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)	-	12	
MA-101	<i>Musa paradisiaca</i>	PB	Tallo	2	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T		12	
MA-117	<i>Musa paradisiaca</i>	PB	Tallo	1	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911 ^T	-		
MA-118	<i>Musa paradisiaca</i>	PB	Tallo	4	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	-	>256	-
MA-119	<i>Musa paradisiaca</i>	PB	Tallo	1	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 3738 ^T	12	-	
MA-139	<i>Musa paradisiaca</i>	N	Tallo	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)	-	-	-
MA-1	<i>Ornithogalum arabicum</i>	PB	hoja	0	<i>Psychrobacter faecalis</i> Iso-46 ^T	-		
MA-13	<i>Ornithogalum arabicum</i>	PB	hoja	1	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 3738 ^T	24*	-	-
MA-37	<i>Phaseolus vulgaris</i>	M	hoja	4	<i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 19304 ^T	24*		
MA-70	<i>Phaseolus vulgaris</i>	M	hoja	5	<i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 19304 ^T			
MA-81	<i>Phaseolus vulgaris</i>	M	hoja	1	<i>Pseudomonas azotoformans</i> DSM 18862 ^T	-		
MA-12	<i>Solanum tuberosum</i>	PB	Raíz	0	<i>Psychrobacter aquaticus</i> CMS 56 ^T	-		
MA-18	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	PB	hoja	3	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> 10C ^T	12	-	256
MA-22	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	N	hoja	2	<i>Psychrobacter pulmonis</i> CECT 5989 ^T			
MA-23	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	2	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)			
MA-26	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	N	hoja	1	<i>Pseudomonas moraviensis</i> CCM 7280 ^T	-		
MA-28	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	N	hoja	0	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T	-	>256	
MA-29	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	N	hoja	0	<i>Serratia marcescens</i> (Biolog)	-	>256	
MA-32	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	PB	hoja	1	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T	-	-	256
MA-34	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	N	hoja	1	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	48*		24
MA-35	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	1	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T		>256	
MA-36	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	PB	hoja	5	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T			
MA-39	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	N	hoja	1	<i>Psychrobacter faecalis</i> Iso-46 ^T			
MA-41	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	N	hoja	2	<i>Pseudomonas capeferrum</i> WCS358 ^T	>1024*	-	-
MA-46	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	0	<i>Pseudomonas saponiphila</i> DSM 975 ^T			

Cuadro 2. Continúa...

Código	Hospedero	Sínt. ^a	Tejido	RH ^b	Identificación de cepas (ARN 16S y Biolog™)	CMI ^c (µg mL ⁻¹)		
						EST	TET	GEN
MA-48	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	0	<i>Pseudomonas laurylsulfativorans</i> AP3_22 ^T	-	-	
MA-57	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	1	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T	-	>256	
MA-76	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	1	<i>Serratia marcescens</i> (Biolog)	-		
MA-85	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	4	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	-		
MA-91	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	N	hoja	4	<i>Psychrobacter pulmonis</i> CECT 5989 ^T		24	
MA-96	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	2	<i>Pseudomonas hunanensis</i> LV ^T	-	18	
MA-98	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	N	hoja	2	<i>Carnobacterium inhibens</i> DSM 13024 ^T	-	>256	
MA-103	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	0	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T	32*		16
MA-104	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	4	<i>Escherichia hermannii</i> CIP 103176 ^T		-	>1024
MA-105	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Biolog)	24*		
MA-106	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	N	hoja	1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> CIP 64.6 ^T	-	>256	
MA-107	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	M	hoja	3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> DSM 14405 ^T		12	
MA-31	<i>Solanum lycopersicum</i>	M	hoja	1	<i>Pseudomonas fulva</i> (Biolog)	>1024*		
MA-56	<i>Solanum lycopersicum</i>	N	fruto	2	<i>Pseudomonas fulva</i> 12-X ^T	>1024*		
MA-74	<i>Solanum lycopersicum</i>	PB	fruto	3	<i>Dickeya oryzae</i> ZYY5 ^T	>1024		
MA-83	<i>Solanum lycopersicum</i>	N	fruto	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)	>1024*		
MA-113	<i>Solanum lycopersicum</i>	M	hoja	3	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T	-	-	-
MA-141	<i>Solanum lycopersicum</i>	M	hoja	2	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T	-	>256	-
MA-3	<i>Daucus carota</i>	PB	Raíz	1	<i>Pseudomonas azotoformans</i> LMG 21611 ^T	32*		
MA-20	<i>Cucurbita pepo</i>	PB	fruto	0	<i>Klebsiella michiganensis</i> W14 ^T	48		
MA-75	<i>Cucurbita pepo</i>	PB	fruto	1	<i>Pseudomonas corrugata</i> (Biolog)	-*		
MA-80	<i>Cucurbita pepo</i>	PB	fruto	2	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T	16*		

^a Síntomas. Tipo de lesión en tejido vegetal de donde se aisló la bacteria. M: Mancha, N: Necrosis, PB: Pudrición blanda

^b RH: Reacción Hipersensible. Datos tomados de Herrera (2009)

^c Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria utilizando e-Test (Solna). EST: Estreptomina, TET: Tetraciclina, GEN:Gentamicina

* Tomado de Méndez (2010).

20 géneros bacterianos, de los cuáles la mayoría se clasificaron como *Pseudomonas* (48 %), seguido por *Serratia* (12 %), *Pantoea* (9 %), *Stenotrophomonas* (6 %) y *Psychrobacter* (5 %). Los otros 15 géneros representaron menos de un 5 % de abundancia del total de la colección, 10 de estos con solamente un representante (Cuadro 2). Se identificaron un total de 55 especies bacterianas, pertenecientes la mayoría al filo Proteobacteria (53 especies), específicamente a la clase Gamaproteobacteria, con un aislamiento de Alfacaproteobacteria (*Ochrobactrum*) y Betaproteobacteria (*Achromobacter*). Se obtuvo además un aislamiento del filo Bacteroidetes (*Sphingobacterium*) y uno de Firmicutes (*Carnobacterium*).

Los aislamientos del género *Pseudomonas* se obtuvieron a partir de la mayoría de los cultivos analizados (Cuadro 2), a excepción de las muestras de *Ficus carica* (higo), *Bactris gasipaes* (palmito) y *Solanum tuberosum* (papa), y provienen de todos los sitios excepto uno. Dentro de este género, se identificaron patógenos de plantas reconocidos como *P. syringae*, *P. cichorii*, *P. corrugata* y *P. orizihabitans* además de otras 18 especies de origen ambiental. Los aislamientos de *Serratia marcescens* se recuperaron a partir de muestras de *Apium graveolens* (apio), *Musa paradisiaca* (banano), *Capsicum annuum* (chile dulce), *Brassica oleracea* var. botrytis (coliflor), *Curcuma longa* (cúrcuma), *Lactuca sativa* (lechuga Boston), *Brassica oleracea* var. capitata (repollo) y *Solanum lycopersicum* (jitomate), de las provincias de Cartago, Limón, Heredia y Guanacaste. Mientras *Pantoea*, con especies patógenas como *P. anthophila*, *P. stewartii*, *P. agglomerans* y *P. vagans*, fueron obtenidos de diversos cultivos como chile dulce, lechuga Iceberg y Boston, repollo, palmito y *Dracaena massangeana* (dracaena), también en las mismas provincias. Los aislamientos de *Stenotrophomonas*, siguiente género en abundancia de la colección, se encontraron en palmito, coliflor, repollo y lechuga en las provincias de Cartago, Limón y Heredia, con la mayoría de estas cepas clasificadas como *S. malthophilia* (Cuadro 2). Además, se identificaron fitopatógenos Gram negativas de *Dickeya oryzae*, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* y *Pectobacterium aroidearum* en muestras de jitomate, cúrcuma y lechuga Boston, respectivamente. Las relaciones filogenéticas entre las secuencias de los aislamientos y secuencias de referencia obtenidas de bases de datos curadas como EzbioCloud (Yoon *et al.*, 2017) se presentan en la Figura 2.

Perfil de susceptibilidad a antibióticos y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para efectos de este estudio, se consideró resistentes los aislamientos clasificados como resistentes o intermedios por la prueba de Kirby-Bauer, que además presentaron una CMI ≥ 12 ng mL⁻¹ (Figura 3) (Miernik y Rzczycka, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008). Se utilizó esta concentración basada en la recomendación para patógenos humanos entéricos, no entéricos y anaerobios según la guía CLSI (2017), ya que es superior a la CMI intermedia para estos gru-

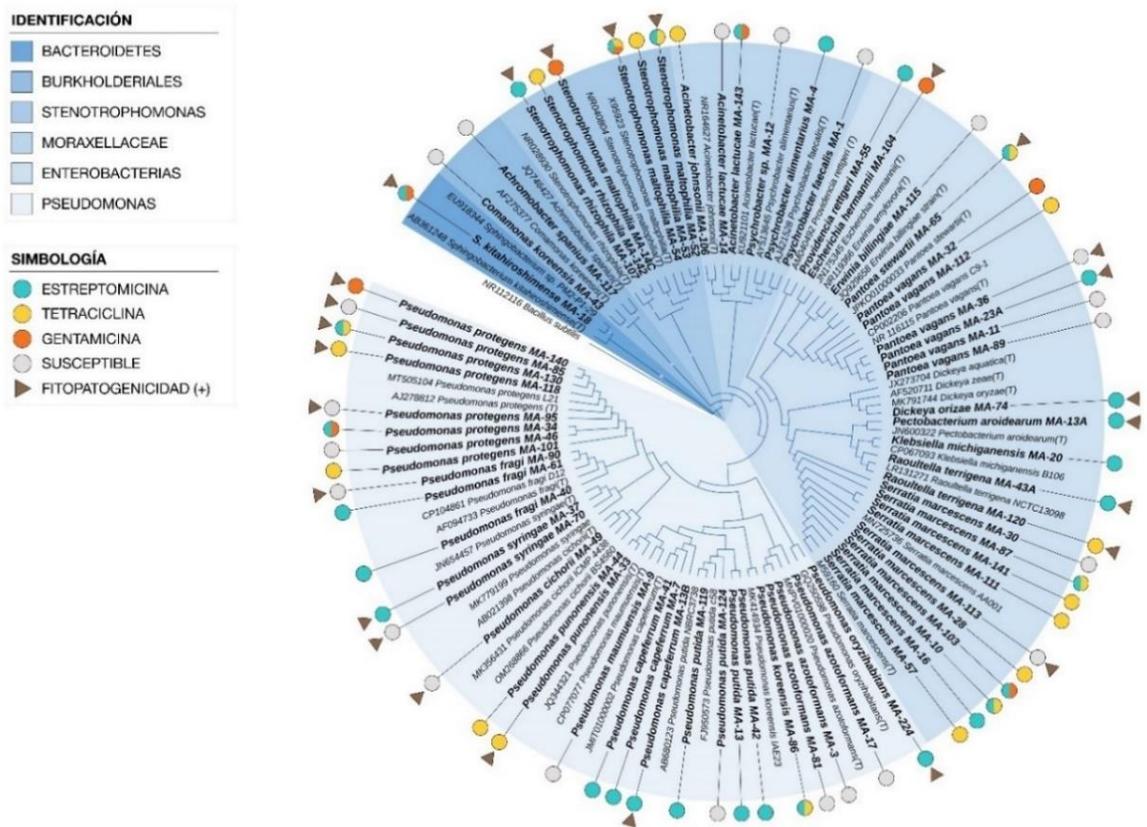


Figura 2. Cladograma construido con el método del vecino más cercano a partir de 70 secuencias parciales del gen ARNr 16S de bacterias aisladas de lesiones en plantas y secuencias de cepas de referencia. Se evaluó la topología del árbol realizando 1 000 remuestros y se utilizó la secuencia de *Bacillus subtilis* como grupo externo. Los símbolos en el exterior del árbol indican los aislamientos clasificados como resistentes a Estreptomicina, Tetraciclina y Gentamicina y sus combinaciones (círculos) y aquellos con Reacción hipersensible positiva (triángulos).

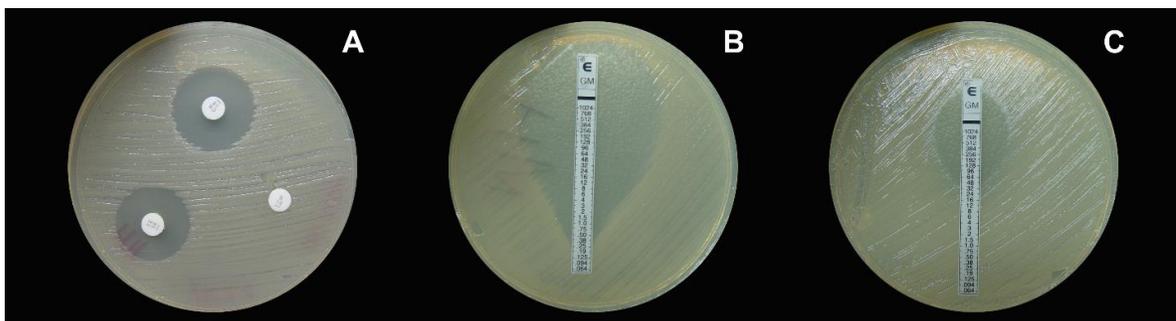


Figura 3. A. Halos que demuestran la sensibilidad a los antibióticos en discos (Oxoid) de gentamicina y tetraciclina y resistencia a estreptomicina (ausencia de halo) en la prueba de difusión en disco Kirby Bauer. B. Bacteria con una CMI de 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para gentamicina, determinada por el método epsilométrico (E-test). C. Bacteria con una CMI de 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el mismo antibiótico.

pos bacterianos. Según esta clasificación, se observó la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos estudiados en muestras provenientes de todos cultivos con excepción de mango y papa (Cuadro 3). La mayor proporción de aislamientos resistentes fueron identificados en las muestras de jitomate (83.3 %), palmito (83.3%) y lechuga Boston (80 %) (Figura 4). Los aislamientos obtenidos de repollo, banano, chile dulce y lechuga Iceberg presentaron los mismos fenotipos de resistencia a estreptomicina, tetraciclina y gentamicina, además de resistencias múltiples como estreptomicina-tetraciclina (Estr-Tet) (chile dulce y banano), y estreptomicina-gentamicina (Estr-Gent) en repollo. En el caso del palmito, se aisló la mayor cantidad de bacterias con resistencia múltiple Estr-Tet y Estr-Tet-Gent (Cuadro 3, Figura 4). Otro cultivo que presentó bacterias resistentes a los tres antibióticos analizados fue la lechuga Iceberg, cuyas muestras provienen de diferentes fincas de la provincia de Cartago. La resistencia múltiple también fue observada en muestras de coliflor (Estr-Gent), apio y melón (Estr-Tet), mientras que cultivos como jitomate, lechuga Boston y cúrcuma se les detectó aislamientos resistentes a estreptomicina y tetraciclina.

Se encontró resistencia a estreptomicina en bacterias aisladas de todos los cultivos excepto higo. Para este antibiótico, todos los aislamientos provenientes de jitomate y cúrcuma tuvieron una CMI máxima de $>1024 \mu\text{g mL}^{-1}$, los de apio una CMI de 128 a $>1024 \mu\text{g mL}^{-1}$ y en el caso de repollo, banano, melón y coliflor, de 12 a $>1024 \mu\text{g mL}^{-1}$, chile dulce de 16 a $>1024 \mu\text{g mL}^{-1}$ y lechuga Iceberg de 12 a $96 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los demás cultivos presentaron bacterias con CMI entre 12 y $48 \mu\text{g mL}^{-1}$. La resistencia a tetraciclina se detectó en bacterias provenientes de 10 de los 19 cultivos y aislamientos de repollo, banano, chile dulce, lechuga Boston y zanahoria tuvieron la CMI máxima de $>256 \mu\text{g mL}^{-1}$. A pesar de encontrarse con menor frecuencia, los aislamientos resistentes a gentamicina tuvieron CMI de 256 en el palmito, 16 a 256 en el repollo y de 12 a $48 \mu\text{g mL}^{-1}$ en banano, chile dulce y coliflor (Cuadro 2). Dentro de los géneros que tuvieron una mayor cantidad de aislamientos resistentes, se encuentran *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pantoea* y *Stenotrophomonas*, todos con miembros fitopatógenos y saprófitos caracterizados por su identificación molecular y la reacción de hipersensibilidad (Figura 2 y 5).

El género *Pseudomonas* fue detectado en muestras de 16 de los 19 cultivos de los que fue aislada la colección bacteriana, donde se identificaron 56 aislamientos de este género, de los cuáles 30 tuvieron una CMI mayor a $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Cuadro 3), por lo que se consideraron resistentes. Se observaron cinco de los seis fenotipos de resistencia estudiados, siendo la resistencia a estreptomicina predominante, con un rango de 12 a $>1024 \mu\text{g mL}^{-1}$ con el 65% de los aislamientos con CMI mayor a $32 \mu\text{g mL}^{-1}$, y cuatro de las bacterias con niveles máximos de CMI ($>1024 \mu\text{g mL}^{-1}$). En lo que respecta a la resistencia a tetraciclina, tres de los 11 aislamientos resistentes presentaron $>256 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CMI (máxima). Solamente dos bacterias tuvieron resistencia a gentamicina (CMI de 12 a $24 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Cuadro 2).

Cuadro 3. Géneros bacterianos identificados y frecuencia de bacterias resistentes a los antibióticos Estreptomicina (Estr), Tetraciclina (Tetra) y Gentamicina (Gent).

Filo	Clase	Género	N° de aislamientos	Aislamientos con CMI (E-test) $\geq 12 \mu\text{g mL}^{-1}$						N° (%) de resistentes
				Estr	Tet	Gent	Estr-Tet	Estr-Gent	Estr-Tet-Gent	
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	<i>Ochrobactrum</i>	1	0	1	0	0	0	0	1 (100.0 %)
Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter</i>	2	0	0	0	1	0	0	1 (100.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	4	0	1	0	0	1	0	2 (50.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Aeromonas</i>	1	0	0	1	0	0	0	1 (100.0 %)
Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Comamonas</i>	1	1	0	0	0	0	0	1 (100.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Dickeya</i>	1	1	0	0	0	0	0	1 (100.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Enterobacter</i>	2	0	1	0	0	0	0	1 (50.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Erwinia</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Escherichia</i>	1	0	0	1	0	0	0	1 (100 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Klebsiella</i>	2	1	0	0	0	0	0	1 (50.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Pantoea</i>	11	2	1	1	1	0	0	5 (45.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Pectobacterium</i>	1	1	0	0	0	0	0	1 (100 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Providencia</i>	1	1	0	0	0	0	0	1 (100 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	56	17	8	1	3	1	0	30 (53.6 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Psychrobacter</i>	6	1	1	0	0	0	0	2 (33.3 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Raoultella</i>	2	1	1	0	0	0	0	2 (100.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Serratia</i>	14	1	6	0	2	1	0	10 (71.4 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Stenotrophomonas</i>	7	1	2	1	1	0	1	6 (85.7 %)
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	<i>Sphingobacterium</i>	1	0	0	0	0	1	0	1 (100 %)
Firmicutes	Bacilli	<i>Carnobacterium</i>	1	0	1	0	0	0	0	1 (100 %)
TOTAL			116	28	23	5	8	4	1	69

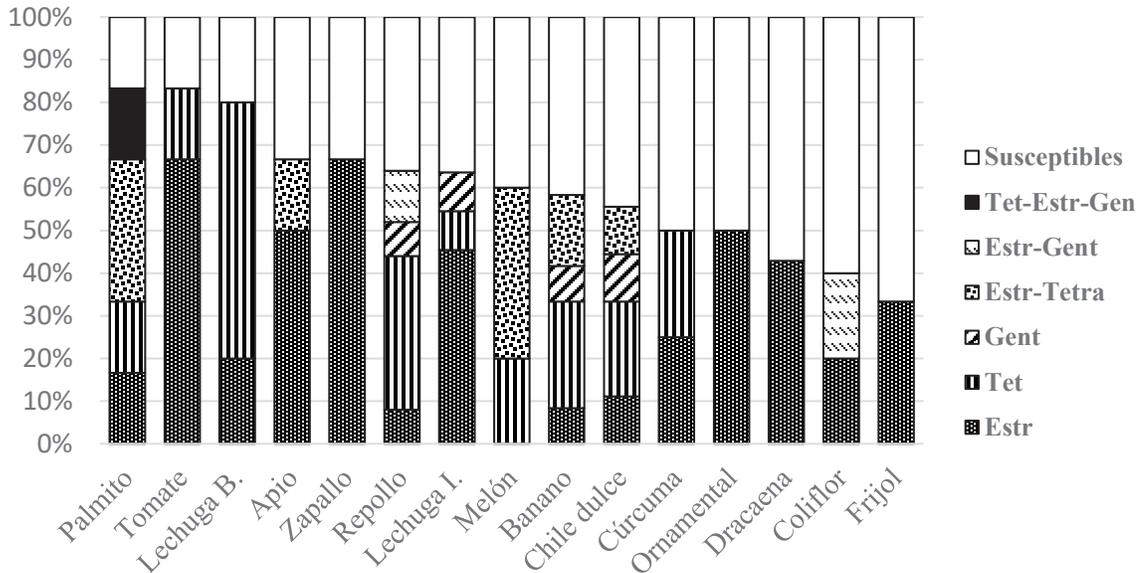


Figura 4. Proporción de bacterias resistentes ($CMI \geq 12 \mu g mL^{-1}$) a los bactericidas Estreptomicina (Estr), Tetraciclina (Tet) y Gentamicina (Gent) y sus combinaciones en los hospederos analizados que presentaron más de un aislamiento.

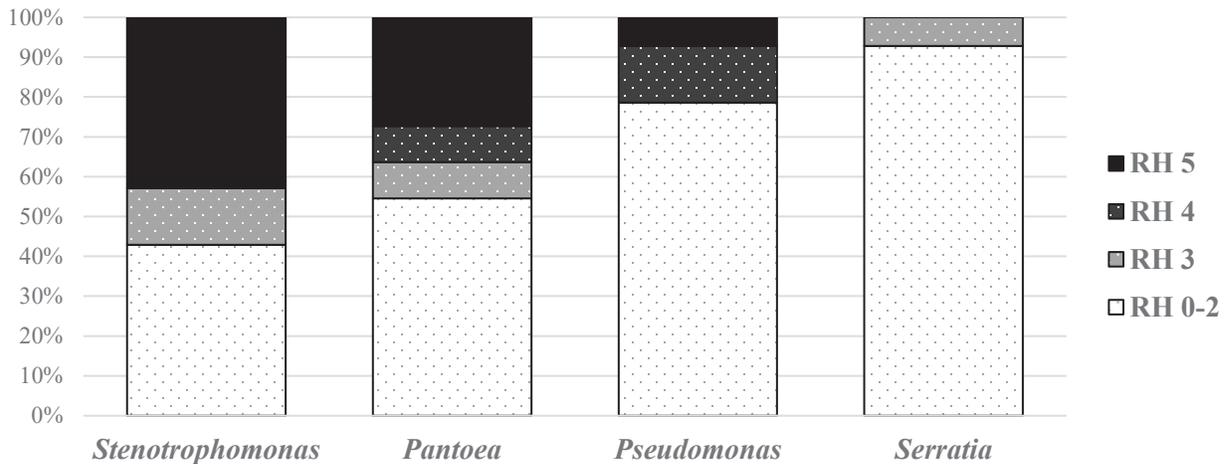


Figura 5. Tipos de Reacción de Hipersensibilidad (RH) en los géneros bacterianos más frecuentemente observados en muestras de cultivos con síntomas asociados a bacterias. Se considera bacteria fitopatógena los aislamientos con RH entre 3 y 5 (Herrera, 2009). Los niveles de RH de 0 a 2 se muestran de manera conjunta e indica no patogenicidad

Diez de las 14 aislamientos clasificados como *Serratia* mostraron resistencia (Cuadro 3), provenientes de seis de los ocho cultivos de los que se aislaron (repollo, jitomate, chile, lechuga Boston, apio y banano). La resistencia comúnmente observada fue para tetraciclina, donde ocho aislamientos resistentes presentaron CMI máxima para este antibiótico. Se detectaron también tres cepas resistentes a estreptomicina (CMI de 12 a 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y una a gentamicina (16 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Bacterias clasificadas como *Stenotrophomonas* mostraron CMI de 12 a $>1024 \mu\text{g mL}^{-1}$ a estreptomicina, entre 12 y 24 a tetraciclina, y de 48 a >256 gentamicina, con solamente un aislamiento (MA-110) susceptible a los tres antibióticos. Cinco de las 11 bacterias identificadas en el género *Pantoea* presentaron resistencia, con valores máximos solo para estreptomicina en el caso de MA-19 (chile dulce) (Cuadro 2, 3).

Relación fitopatogenicidad-resistencia a antibióticos. De acuerdo con los datos reacción de hipersensibilidad reportados por Herrera (2009), el 73 % de las bacterias de esta colección se clasificaron como no patógenas de plantas o RH negativa, ya que no presentaron clorosis ni necrosis alrededor del punto de inoculación (niveles de 0 a 2). Al comparar la taxonomía de los aislamientos con esa clasificación, se observó una mayor proporción de aislamientos con RH positiva (niveles 3 a 5) en los géneros *Stenotrophomonas* (57.2 %) y *Pantoea* (45.5 %), *Pseudomonas* (21.4 %) y *Serratia* (7.1 %), aunque algunas de las especies que presentaron esta reacción no corresponden a especies fitopatógenas reconocidas, sino especies de origen ambiental como es el caso de *P. protegens*, *P. fragi* y *P. punonensis* (Cuadro 2).

Al comparar la calificación del grado de patogenicidad con el número de cepas resistentes identificadas en cada categoría de RH (Figura 6), se encontró

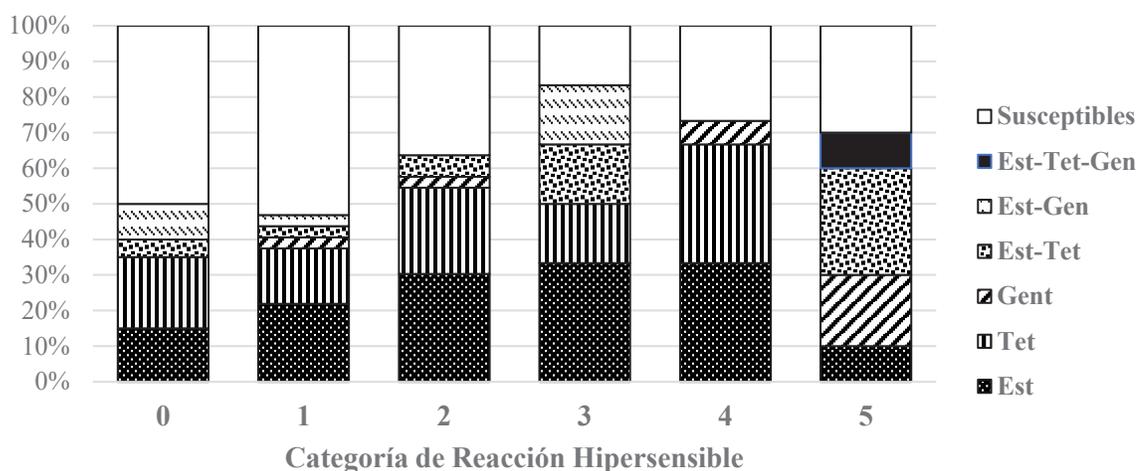


Figura 6. Proporción de cepas resistentes a los antibióticos estudiados de acuerdo con la escala de RH (niveles 0 a 5) determinada por Herrera (2009). En el eje Y se indica el porcentaje de aislamientos susceptibles dentro de cada categoría.

que el 45 % de esta población con RH negativa, presentó resistencia a alguno de los antibióticos estudiados, aunque la proporción fue menor a la encontrada en los aislamientos patógenos (RH +), en los que las bacterias resistentes representaron un 70 a un 83 %, correspondientes al nivel 3 y 5, respectivamente. Resistencia a los tres antibióticos fueron detectadas en todos los niveles de fitopatogenicidad, y una bacteria con RH 5 (*Stenotrophomonas malthophilia* MA-54), fue la única a la que se le detectó resistencia a los 3. En el nivel de mayor patogenicidad se detectó mayor proporción de bacterias con resistencia múltiple.

DISCUSIÓN

La diversidad de síntomas relacionados a enfermedades de plantas de origen bacteriano aumenta la dificultad de manejo en sistemas agrícolas (Aráuz, 2011). Más aún, algunos síntomas como manchas de frutos y hojas y pudrición blanda son compartidos por patógenos diferentes, haciendo necesaria la identificación en laboratorio por diferentes metodologías, ya que una adecuada identificación temprana permite un mejor control de la enfermedad (Kannan *et al.*, 2022). Por otro lado, la parte aérea de las plantas está predominantemente colonizada por una comunidad bacteriana diversa, tanto en forma de epífitas en la superficie de la planta como de endófitos en el tejido vegetal. Mientras que algunas bacterias asociadas a las plantas promueven su crecimiento, otras pueden ser patógenos de plantas o inclusive de humanos (Lindow y Brandl, 2003; Jackson *et al.*, 2013). Al respecto Jackson *et al.* (2013), al analizar la composición de la comunidad bacteriana de hortalizas de hoja verde mediante pirosecuenciación, identificó once filos diferentes, donde las Gamaproteobacterias, Betaproteobacterias y Bacteroidetes fueron los linajes dominantes. Estos filos coinciden con lo observado en este estudio, en el cual se encontraron los mismos grupos de Proteobacterias, además de Alfaproteobacterias. De los géneros identificados, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella* y *Enterobacter* son bacterias Gram negativas que tienen especies de patógenos en plantas. Es importante recordar que estos aislamientos provienen de la zona del borde de la lesión y que debido al proceso de aislamiento en el cual la muestra es desinfectada con hipoclorito antes de la disección, pueden aislarse también bacterias endófitas y oportunistas. Para poder discriminar los patógenos de plantas en esta colección, Herrera (2009) utilizó la técnica de reacción hipersensible (RH) en la planta indicadora *Nicotiana tabacum*. Esta técnica, que consiste en la inoculación de bacterias en el envés de las hojas de plantas para evaluar la capacidad fitopatogénica de las bacterias (Zurbriggen *et al.*, 2010), se caracteriza por la muerte de células cercanas al punto de reconocimiento del patógeno y la aparición de clorosis y necrosis delimitada en las hojas (Bellincampi *et al.* 2014).

En este estudio los géneros encontrados con mayor abundancia presentaron aislamientos clasificados como fitopatógenos, además de representantes saprófitos.

La diversidad de especies de *Pseudomonas* en el ecosistema del suelo influye tanto en el crecimiento de las plantas y su patogenicidad (Kumar *et al.*, 2017), esto debido a su versatilidad metabólica y plasticidad genética. Esta diversidad y capacidad metabólica puede ser la causa de que en esta investigación *Pseudomonas* fuese aislada a partir de 16 de los 19 cultivos analizados. *P. syringae*, la especie que ocupa el primer lugar en la lista de Mansfield *et al.* (2012) de las 10 principales especies bacterianas patógenas de plantas, fue identificada en este estudio, junto con *P. cichorii*, *P. corrugata* y *P. orizihabitans* (Höfte y De Vos, 2007; Pauwelyn *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2021). A pesar de que en otras especies de *Pseudomonas* no identificadas en esta colección se ha reportado resistencia natural a los aminoglucósidos (Krahn *et al.*, 2012), se encontró un amplio rango de CMI para estreptomycin, con más de la mitad de los aislamientos con CMI mayores a $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ para estreptomycin y la mayoría susceptible a gentamicina. Debido a la ubicuidad de este género en diferentes ambientes y su utilización como biofertilizante y biocontrolador, es importante estudiar si los genes que confieren resistencia están presentes en el cromosoma o en determinantes de transferencia horizontal de genes, en aislamientos de este género.

Serratia marcescens es una especie bacteriana genéticamente variable que se encuentra en diferentes entornos, incluyendo agua, suelo, plantas y como patógeno oportunista en humanos y animales (Besler y Little, 2017). Esta especie ha sido asociada tanto con infecciones nosocomiales en el ámbito médico como con enfermedades en plantas. Por ejemplo, cepas de *S. marcescens* han sido identificadas como causantes de la enfermedad de la vid amarilla de las cucurbitáceas y de la pudrición blanda en frutos de chile (Zhang *et al.*, 2005; Gillis *et al.*, 2017). En este estudio 14 aislamientos de *S. marcescens* de diferentes hospederos presentaron alta similitud a la secuencia de la cepa tipo *S. marcescens* ATCC 13880(T) aislada de un tanque de tratamiento de aguas residuales, por lo que su papel en la planta hospedera debe estudiarse con un mayor detalle. Esta especie presentó en 10 de 13 de aislamientos una CMI $\geq 12 \mu\text{g mL}^{-1}$, y su nivel de resistencia fue el máximo para tetraciclina, y en un amplio rango para estreptomycin, con solo un aislamiento resistente a gentamicina. Estos hallazgos concuerdan con un estudio realizado en Costa Rica donde aislamientos de *Serratia* obtenidos a partir de suelos aplicados con gentamicina y tetraciclina, fueron resistentes a tetraciclina y sensibles a gentamicina (Rodríguez *et al.*, 2007). A pesar de que *S. marcescens* presenta resistencia natural a los aminoglucósidos (Sandner-Miranda *et al.*, 2018), la mayoría de los aislamientos analizados en este estudio fueron susceptibles a la estreptomycin y gentamicina, y algunas cepas presentaron CMI máximas para tetraciclina por lo que se hace necesario un mayor estudio de sus determinantes de resistencia.

El género *Pantoea* comprende bacterias con diversas funciones en las plantas, incluyendo su papel como fitopatógenos, endófitos y epífitos (Doni *et al.*, 2021). Dentro de los patógenos de plantas se han identificado *P. citrea*, *P. ananas*, *P. eucalypti*, *P. stewartii*, *P. agglomerans*, *P. vagans* y *P. antophila* (Schaad *et al.*, 2001; Brady *et al.*, 2009) estas cuatro últimas identificadas en este estudio. En particular, *Pantoea stewartii* sp. *indologenes* MA-65, aislada de lesiones en hojas de palmito, es el agente causal de la bacteriosis del palmito que afectó a las plantaciones en Costa Rica en la década de 2000 (Mora-Urpí *et al.*, 2008). En este estudio, aislamientos clasificados como patógenos por análisis filogenético y de fitopatogenicidad presentaron resistencia a estreptomomicina y tetraciclina.

Especies del género *Stenotrophomonas* tiene representantes endófitos, y que se utilizan como agentes de biocontrol en la agricultura sostenible (Berg y Martínez, 2015). *S. maltophilia* se considera un patógeno oportunista emergente en el ámbito clínico, con resistencia natural a aminoglucosidos, aunque en menor medida a la gentamicina (Antón *et al.*, 2005; Berg y Martínez, 2015). En un estudio realizado en Costa Rica se encontró que los aislamientos de *Stenotrophomonas* sp. provenientes de plantas de lechuga presentaban resistencia a varios antibióticos, incluyendo tetraciclina y gentamicina (Rodríguez *et al.*, 2007). En este trabajo se observó que la mayoría de los aislamientos mostraron resistencia a los antibióticos evaluados con CMI entre 12-24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para tetraciclina y estreptomomicina, con excepción de MA-142 que tuvo un CMI máximo ($>1024 \mu\text{g mL}^{-1}$) para estreptomomicina y gentamicina. Entre los aislamientos resistentes se encuentran bacterias con un alto nivel de patogenicidad, las cuáles fueron recuperadas a partir de palmito (Cuadro 2), adicionalmente, el aislamiento MA-54 fue el único de la colección resistente a los tres antibióticos estudiados (Cuadro 2). Al presentar resistencia intrínseca, es importante realizar un análisis detallado en los aislamientos de *S. maltophilia* ante la posible presencia de genes de resistencia asociados a elementos móviles en el caso de la estreptomomicina y tetraciclina.

La mayoría de las bacterias fitopatógenas identificadas filogenéticamente y mediante la prueba de RH no han sido descritas en Costa Rica, a excepción de los aislamientos de *Erwinia billingiae* MA-115 y *Raoultella terrigena*, que fueron sometidos a pruebas de patogenicidad en plantas de mango y chile dulce respectivamente (cultivos de los que fueron aislados), y al comprobarse su virulencia por los Postulados de Koch, fueron descritos como fitopatógenos (Vidaurre-Barahona *et al.*, 2021; Cubero *et al.*, 2021). En esta colección de bacterias de taxonomía diversa, se observó que las bacterias con RH positiva, consideradas patógenas de plantas, presentaron una proporción más alta de resistencia (Figura 4). Esto podría deberse a su adaptación para sobrevivir en las partes superficiales y los tejidos vegetales, donde están más expuestas a los antimicrobianos aplicados en las hojas (Stockwell y Duffy, 2012).

La resistencia a los antibióticos estudiados en el 60 % de los aislamientos, puede ser resultado del uso de productos en los cultivos de donde se obtuvieron las bacterias. Es importante considerar que el criterio de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizado para definir la resistencia en este estudio es más alto que la concentración mínima inhibitoria (CMI) para bacterias susceptibles, pero más baja que la CMI para bacterias patógenas resistentes en humanos. Sin embargo, este criterio se ha utilizado en estudios previos en diferentes entornos, al considerarse que los microorganismos ambientales están expuestos a concentraciones mucho más bajas que las bacterias clínicas, pero también pueden desarrollar resistencia en el entorno natural (Popowska *et al.*, 2012; Sandegren, 2014; Nogrado *et al.*, 2021). La menor cantidad de bacterias resistentes a gentamicina observada (10 de 116), puede ser resultado de un menor uso de este antibiótico, o por motivos intrínsecos a la molécula y la persistencia en condiciones ambientales.

La presencia de bacterias resistentes en el 90 % de los hospederos analizados, los cuáles constituyen un conjunto diverso de plantas, genera preocupación por el estado actual de resistencia a esos antibióticos, ya que estos aislamientos fueron colectados entre 2006 y 2009. Los cultivos con mayor presencia de bacterias resistentes y fenotipos de resistencia a los tres antibióticos estudiados fueron el repollo, banano, lechuga Iceberg, palmito y chile dulce, los cuales pueden estar relacionados con un manejo más agresivo de las enfermedades bacterianas que afectan a estos cultivos, como la mancha angular en repollo causada por *Xanthomonas campestris*, el marchitamiento (*Ralstonia solanacearum*) en banano, las manchas foliares causadas por especies de *Pseudomonas* en lechuga, la bacteriosis (*P. stewartii*) en palmito, o la pudrición blanda común en hortalizas en climas tropicales (Bhat *et al.*, 2010). La alta proporción de bacterias resistentes de la colección asociadas a síntomas en cultivos, encontradas en 16 de los 19 cultivos de diversas regiones del país, puede derivarse de un amplio uso agrícola de antibióticos como la tetraciclina, estreptomycin y gentamicina, sin una regulación, dosis y registros adecuados, fenómeno común también en otros países latinoamericanos. Estos hallazgos proporcionan una base para investigar la evolución de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias fitopatógenas y no patógenas presentes en vegetales destinados al consumo humano en Costa Rica, y evidencia la necesidad de realizar estudios más detallados debido a su impacto en el control de enfermedades en los cultivos y en las comunidades microbianas asociadas.

CONCLUSIONES

El análisis de los 116 aislamientos de una colección proveniente de síntomas de pudrición blanda, necrosis y manchas de hojas, tallos, frutos de 19 cultivos,

mostraron la presencia de 20 géneros de los cuales *Pseudomonas* (48 %), *Serratia* (12 %), *Pantoea* (9 %) y *Stenotrophomonas* (6 %), fueron los más abundantes, con *Pseudomonas* como el género con mayor número de especies y aislamientos observados. Entre las bacterias fitopatógenas presentes en la colección se identificaron *Pseudomonas syringae*, *P. cichorii*, *P. corrugata*, *Pantoea stewartii* subsp. *indologensis*, *P. anthophila*, *Dickeya oryzae*, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* y *Pectobacterium aroidearum*, que estuvieron entre el 23 % de aislamientos positivos para la RH. Según las condiciones del estudio se detectó resistencia al menos uno de los tres antibióticos en el 60 % de los aislamientos evaluados siendo la resistencia a estreptomycin la más frecuente. La resistencia se observó en bacterias aisladas de 17 de las especies vegetales, donde el jitomate, palmito, lechuga, apio, zapallo y repollo mostraron la mayor proporción de aislamientos resistentes, lo que sugiere un mayor riesgo en la producción de estos alimentos a seleccionar bacterias resistentes a antibióticos. La información obtenida indica la necesidad de una mayor regulación en la venta y uso de productos antimicrobianos para mitigar los efectos de estas sustancias en el medio ambiente, los animales y las personas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Amy Wang por su colaboración en el muestreo y al personal del Área de Microbiología Ambiental del CIBCM (UCR). Además, agradecemos a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento de este estudio.

LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant pathology. 5 ed. Elsevier Academic Press. New York, USA. 922 p.
- Alippi AM, Reynaldi FJ y López AC. 2013. Evaluación del método epsilométrico Etest para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana de las abejas. Revista argentina de microbiología 45(4): 257-261. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70033-6](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70033-6)
- Alós J. 2014. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 33: 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>.
- Altschul SF, Madden T, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25:3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Antón D, Araque Y, De Donato M, Medina B y Marcano M. 2005. Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de cepas clínicas de *Stenotrophomonas maltophilia*. Kasmara 33:109-118. disponible en https://www.researchgate.net/publication/262704364_Caracterizacion_fenotipica_y_susceptibilidad_antimicrobiana_de_cepas_clinicas_de_Stenotrophomonas_maltophilia.
- Arauz L. 2011. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Segunda edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 519 p.
- Blanco-Meneses M, Castro-Zúñiga O y Calderón-Abarca A. 2023. Diagnóstico del uso de antibióticos en regiones productoras de tomate en Costa Rica. Agronomía costarricense: Revista de Ciencias Agrícolas 47: 87-99. <https://doi.org/10.15517/rac.v47i1.53967>

- Bellincampi D, Cervone F and Lionetti V. 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00228>.
- Berg G and Martinez JL. 2015. Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex? *Frontiers in microbiology* 6:241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00241>.
- Besler KR y and Little EL. 2017. Diversity of *Serratia marcescens* strains associated with cucurbit yellow vine disease in Georgia. *Plant disease*, 101:129-136. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0618-RE>.
- Bhat KA, Masoodi SD, Bhat NA, Ahmad M, Zargar MY, Mir SA and Bhat MA. 2010. Studies on the effect of temperature on the development of soft rot of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) caused by *Erwinia carotovora sub sp. carotovora*. *Journal of Phytology*, 2(2). Disponible en: www.journal-phytology.com
- Brady CL, Venter SN, Cleenwerck I, Engelbeen K, Vancanneyt M, Swings J and Coutinho TA. 2009. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59: 2339-2345. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.009241-0>.
- CLSI 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seven Informational Supplement. M100-S27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Compant S, Samad A, Faist H and Sessitsch A. 2019. A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*. 19: 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Cubero-Agüero D, Brenes-Guillén L, Vidaurre-Barahona D y Uribe-Lorío, L. 2021. *Raoultella terrigena* y *Pectobacterium carotovorum* en hortalizas en dos provincias de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 32: 178-195. <https://doi.org/10.15517/am.v32i1.40845>
- De la Cruz E, Fournier ML, García F, Molina A, Chavarría G, Alfaro M, Ramírez F and Rodríguez C. 2014. Hazard prioritization and risk characterization of antibiotics in an irrigated Costa Rican region used for intensive crop, livestock and aquaculture farming. *Journal of Environmental Biology* 35: 85-98.
- Doni F, Suhaimi NSM, Irawan B, Mohamed Z and Mispan MS. 2021. Associations of *Pantoea* with rice plants: As friends or foes? *Agriculture* 11:1278. <https://doi.org/10.3390/agriculture11121278>
- Durán-Quiros A, González-Lutz MI, Vargas-Hernández G, and Mora-Acedo D. 2017. Potential risk situations related to the application of pesticides in vegetable production systems. *Agronomía Costarricense* 41:67-77. <https://doi.org/10.15517/rac.v41i2.31300>
- FAO, 2021. El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2021-2025. Roma. <https://doi.org/10.4060/cb5545es>
- Fontecha, GA. 2003. Análisis comparativo de las comunidades de procariontes intestinales de *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera) mediante los polimorfismos en los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP) del gen ARNr 16S. Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica. 139 p.
- Galt RE. 2009. “It just goes to kill Ticos”: National market regulation and the political ecology of farmers’ pesticide use in Costa Rica. *Journal of Political Ecology*. <https://doi.org/10.2458/v16i1.21689>
- Sánchez CC y Guerrero GC. 2006. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible en [https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientomicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf](https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf)
- Gillis A, Santana MA, Rodríguez M and Romay G. 2017. First Report of Bell Pepper Soft-Rot Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Venezuela. *Plant Disease* 101:1671-1671. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0361-PDN>.
- Hall T. 1999. BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41: 95-98.
- Hashem A, Tabassum B and Fathi E. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal Biological Sciences* 26:1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>.
- Herrera K. 2009. Caracterización de la fitopatogenicidad de bacterias gram negativas aisladas de infecciones en plantas, mediante análisis fenotípico de la reacción de hipersensibilidad en *Nicotiana tabacum* y la detección molecular del gen efector hrpZ. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/17664>
- Höfte M and De Vos P. 2007. Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: Gnanamanickam SS (eds) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_14

- Jackson CR, Randolph KC, Osborn SL and Tyler HL. 2013. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. *BMC microbiology* 13:1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-274>.
- Kannan, VR and Bastas KK. 2015. Sustainable approaches to controlling plant pathogenic bacteria. CRC press. Florida, USA. 421p. <https://doi.org/10.1201/b18892>
- Kannan R, Solaimalai A, Jayakumar M, and Surendran U. 2022. Advance molecular tools to detect plant pathogens. Pp: 401-416. In: Rakshit A, Meena VS, Abhilash PC, Sarma BK, Singh HB, Fraceto L, Parihar M and AK Singh (eds.). *Biopesticides*. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00008-0>.
- Killiny N, Hijaz F, Gonzalez-Blanco P, Jones SE, Pierre MO and Vincent CI. 2020. Effect of adjuvants on oxytetracycline uptake upon foliar application in citrus. *Antibiotics* 9: 677. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100677>.
- Kumar A, Verma H, Singh VK, Singh PP, Singh SK, Ansari WA ... and Pandey KD. 2017. Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management. Pp:195-215. In: Singh V, Kumar P, Kumar J, Pattanayak A (eds.). *Agriculturally important microbes for sustainable agriculture*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5343-6_7
- Krahn T, Gilmour C, Tilak J, Fraud S, Kerr N, Lau CHF y Poole K. 2012. Determinants of intrinsic aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56: 5591-5602. <https://doi.org/10.1128/AAC.01446-12>.
- Lang L and García F. 2004. Comparison of E-test and disk diffusion assay to evaluate resistance of *Helicobacter pylori* isolates to amoxicillin, clarithromycin, metronidazole and tetracycline in Costa Rica. *International journal of antimicrobial agents* 24:572–577. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.07.009>.
- Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan P, McWilliam H, *et al.*, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-55. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>. Epub 2007 Sep 10.
- Li J, Zhou GH, Wang T, Lin T, Wang YW, Zhu PK, ... and Ma G. 2021. First report of *Pseudomonas oryzae* causing stem and leaf rot on muskmelon in China. *Plant Disease*, 105:2713. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0100-PDN>.
- Lindow SE and Brandl MT. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and environmental microbiology* 69:1875-1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003>.
- Lopez LM. 2021. Evaluación de cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum*) a la tolerancia de tres cepas de *Ralstonia solanacearum* bajo condiciones de invernadero. 1ra edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 24p.
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P ... and Foster GD. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13:614-629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>.
- McManus, PS, Stockwell, VO, Sundin, GW and Jones, AL. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual review of phytopathology* 40:443–465. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2104>
- Mann A, Nehra K, Rana JS, y Dahiya T. 2021. Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. *Current Research in Microbial Sciences* 2:100030. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100030>
- Miller SA, Ferreira, JP and LeJeune JT. 2022. Antimicrobial use and resistance in plant agriculture: a one health perspective. *Agriculture* 12:289. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020289>
- Miernik A and Rzezzycka M. 2007. The influence of selected antibiotics on aquatic microorganisms. *Polish Journal of Microbiology* 56:265. Retrieved from <https://search-proquest-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/scholarly-journals/influence-selected-antibiotics-on-aquatic/docview/2519021676/se-2>
- Mora-Urpí J, Arroyo-Oquendo C, Mexzón-Vargas R y Bogantes-Arias A. 2008. Diseminación de la “Bacteriosis del palmito” de peñibaye (*Bactris gasipaes* Kunth). *Agronomía mesoamericana* 19: 155-166. <https://doi.org/10.15517/am.v19i2.4998>
- MSP (Ministerio de Salud Pública). 2018. Plan de acción nacional de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos 2018-2025. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos-left/documentos-ministerio-de-salud/vigilancia-de-la-salud/normas-protocolos-guias-y-lineamientos/resistencia-a-los-antimicrobianos>. (Consulta julio 2022).
- NCCLS. (National Committee of Clinical Laboratory Standard). 2000. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility test. 7th Edition. Approved Standard Documents M2. National Committee of Clinical Laboratory Standard. Wayne. PA. USA.
- Nion YA and Toyota K. 2015. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and environments* 30:1-11. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14144>

- Nogrado K, Unno T, Hur HG and Lee JH. 2021. Tetracycline-resistant bacteria and ribosomal protection protein genes in soils from selected agricultural fields and livestock farms. *Applied Biological Chemistry* 64:1-9. <https://doi.org/10.1186/s13765-021-00613-6>
- Pauwelyn E, Huang CJ, Ongena M, Leclère V, Jacques P, Bleyaert P, ... and Höfte M. 2013. New linear lipopeptides produced by *Pseudomonas cichorii* SF1-54 are involved in virulence, swarming motility, and biofilm formation. *Molecular plant-microbe interactions*, 26:585-598. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-12-0258-R>.
- Popowska M, Rzczycka M, Miernik A, Krawczyk-Balska A, Walsh F and Duffy B. 2012. Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56:1434-1443. <https://doi.org/10.1128/AAC.05766-11>
- Quesada-González A y García-Santamaría F. 2014. *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 25:371-381 <http://dx.doi.org/10.15517/am.v25i2.15452>
- Ramírez-Muñoz F, Fournier-Leiva ML, Ruedert C y Hidalgo-Ardón C. 2014. Uso de agroquímicos en el cultivo de papa en Pacayas, Cartago, Costa Rica. *Agronomía mesoamericana* 25:337-345. <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/15441>.
- Robayo A. 2008. Caracterización bioquímica y molecular de bacterias Gram-negativas aisladas de lesiones causadas por fitopatógenos en cultivos de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Rodríguez C, Lang L, Wang A, Altendorf K, García F and Lipski A. 2006. Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline- and gentamicin-resistant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5870–5876. <https://doi.org/10.1128/AEM.00963-06>
- Rodríguez C, Wachlin A, Altendorf K, García F and Lipski A. 2007. Diversity and antimicrobial susceptibility of oxytetracycline-resistant isolates of *Stenotrophomonas* sp. and *Serratia* sp. associated with Costa Rican crops. *Journal of applied microbiology* 103:2550-2560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03496.x>.
- Rodríguez C, Altendorf K, García F, Smalla K and Lipski A. 2008. Spraying of oxytetracycline and gentamicin onto field-grown coriander did not affect the abundance of resistant bacteria, resistance genes, and broad host range plasmids detected in tropical soil bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 44: 589–596. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0242-6>
- Sandner-Miranda L, Vinuesa P, Cravioto A and Morales-Espinosa R. 2018. The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Frontiers in Microbiology* 9:828. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00828>. eCollection 2018.
- Sandegren L. 2014. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Upsala journal of medical sciences* 119:103-107. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.904457>
- Schaad N, Jones J and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition. The American Phytopathological Society. St Paul, USA. 373p.
- Silbergeld EK, Graham J, and Price LB. 2008. Industrial Food Animal Production. Antimicrobial Resistance, and Human Health. *Annual review of public health* 29:151-169. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090904>.
- Sundín GW, Castiblanco LF, Yuan X, Zeng Q and Yang CH. 2016. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 17: 1506-1518. <https://doi.org/10.1111/mpp.12436>
- Stockwell VO and Duffy B. 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties* 31:199-210. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2104>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, y Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30:2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Taylor P and Reeder R. 2020. Antibiotic use on crops in low and middle-income countries based on recommendations made by agricultural advisors. *CABI Agriculture and Bioscience* 1:1-14. <https://doi.org/10.1186/s43170-020-00001-y>
- Vidaurre-Barahona D, Wang-Wong A and Uribe-Lorío L. 2021. *Erwinia billingiae* causes bacterial Canker of Mango (*Mangifera indica*) in Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 32:306-315. <https://doi.org/10.15517/am.v32i1.40965>
- Vidaver AK and Lambrecht PA. 2004. Bacteria as plant pathogens. American Phytopathological Society. <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/intro/Pages/Bacteria.aspx> (consulta, agosto 2022).

- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173:697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
- WHO. World Health Organization. 2019. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. Geneva: World Health Organization; 2019. <http://who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en> (consulta mayo 2022).
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H and Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 67:1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.
- Zhang Q, Melcher U, Zhou L, Najjar FZ, Roe BA and Fletcher J. 2005. Genomic comparison of plant pathogenic and nonpathogenic *Serratia marcescens* strains by suppressive subtractive hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 71:7716-7723. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7716-7723.2005>.
- Zurbriggen MD, Carrillo N and Hajirezaei MR. 2010. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? *Plant Signaling & Behavior* 5:393-396. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10793>.