

Caracterización *in vitro* de bacterias fitopatógenas en dos extractos de propóleos de diferentes orígenes fitogeográficos*

Characterization *in vitro* of phytopathogens bacterias in two stract or several origin phytogeographics

Pablo González Rabelino; Augusto Zignago; Elisa Silvera-Pérez.

Unidad de Fitopatología. Departamento de Protección Vegetal. UDELAR, Uruguay.

E-mail: pgonza@fagro.edu.uy

RESUMEN. Las bacterias constituyen el segundo grupo en importancia como patógenos de plantas. Los géneros de mayor importancia son *Clavibacter*, *Agrobacterium*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. El propóleo ha demostrado acción antimicrobiana en bacterias patógenas. El presente trabajo tuvo como objetivos: evaluar "in vitro" tres concentraciones de dos extractos de propóleo de distinto origen en la inhibición de crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*, *Pseudomonas sevestanoi* subsp. *sevestanoi*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y el efecto bactericida de 15 aislamientos de Cmm. La actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos fue realizada mediante la técnica de antibiograma. Se determinó CMI de extractos de propóleo frente a aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Los extractos de propóleo de los dos orígenes inhibieron el crecimiento de *C. m.* subsp. *michiganensis* (Cmm) en todas la concentraciones evaluadas. El extracto de Canelones produjo mayor diámetro de inhibición que el de Rocha. Esta diferencia de inhibición se observa también en la dosis de 120 mg/mL para *X. campestris* pv. *cucurbitae* y *X. vesicatoria*. La bacteria *R. solanacearum* resultó inhibida en las concentraciones 120 y 80 mg/mL del propóleo de Canelones y 120 mg/mL del propóleo de Rocha. Ninguno de los extractos inhibió el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*, *A. tumefaciens*, *P. s.* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *P. s.* pv. *sevestanoi*, *X. a.* pv. *citri*, al igual que el control.

Palabras clave: Bacterias fitopatógenas, propóleo, control.

ABSTRACT. The bacterias constitute the second group in importance like pathogens of plants. The genus of more importance are *Clavibacter*, *Agrobacterium*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. The bee-glye has demonstrated microbial action bacterias. The present work had as objectives: to evaluate "in vitro" three concentrations of two extracts of bee-glye of different origin in the inhibition of growth of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*, *Pseudomonas sevestanoi* subsp. *sevestanoi*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and to determine the Inhibitory Minimum Concentration (IMC) and the effect germicide of 15 isolations of Cmm. The microbial activity of bee-glyes extracts was carried out by means of the antibiogram technique. IMC of bee-glye extracts was determined in front of isolations of *C. m. michiganensis michiganensis*. The extracts of bee-glye of the two origins inhibited the growth of *C. m. michiganensis* in all the evaluated concentrations. The extract of Cannelonis produced bigger inhibition diameter that that of Rocha. This inhibition difference is also observed in the dose of 120 mg/mL for *X. campestris* pv. *cucurbitae* and *X. vesicatoria*. The bacteria *R. solanacearum* was inhibited in the concentrations 120 and 80 mg/mL of the bee-glye of Cannelonis and 120 mg/mL of bee-glye of Rocha. None of the extracts inhibited the growth of *Pectobacterium carotovorum atroseptica*, *A. tumefaciens*, *P. s.* pv. *tomato*, *P. corrugata*, *P. s.* pv. *sevestanoi*, *X. to.* pv. *citri*, the same as the control.

Keywords: Bacteria phytopathogens, bee-glye, control.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias constituyen el segundo grupo en importancia como patógeno de plantas, causando grandes pérdidas económicas al agricultor (Lopes & Quezado-Soares, 1997). Los géneros de mayor importancia asociados a enfermedades de plantas son *Clavibacter*, *Agrobacterium*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Agrios, 2004).

El manejo de las enfermedades bacterianas fundamentalmente es realizado con aplicaciones de antibióticos y fungicidas a base de cobre (Lopes C.A., 2000). El uso frecuente e inadecuado de los mismos ha favorecido el surgimiento de cepas resistentes causando pérdida de eficacia del control químico. Cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* resistentes a estreptomycin (Stall *et al.*, 1962; Misanvalle *et al.*, 1990) y a compuestos cúpricos (Marco y Stall, 1983) han sido aisladas de plantas de tomate; asimismo han sido encontradas cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a estreptomycin (Silva *et al.*, 1995a) y cúpricos. (Silva *et al.*, 1995b)

El propóleo ha demostrado acción antimicrobiana en bacterias patógenas del reino animal (Sforcin *et al.*, 2000; Gebara *et al.*, 2002; Koo *et al.*, 2002), así como también en bacterias fitopatógenas. (Bianchini y Bedendo, 1998; Basim *et al.*, 2006)

El propóleo es una mezcla compleja de sustancias resinosas, gomosas e balsámicas recogidas por las abejas (*Apis mellifera*) de brotes, flores y exudados de plantas, a las cuales le adhieren secreciones salivares, cera y polen para la elaboración del producto final. Las abejas lo utilizan para la construcción, reparación de la colmena o para barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes. (Ghisalberti, 1979)

Se ha reportado que la actividad antimicrobiana de un extracto de propóleo fue más activa que las fracciones obtenidas por partición con diferentes solventes, sugiriendo que la actividad antimicrobiana es probablemente causada por el efecto sinérgico de varios compuestos (Santos *et al.*, 2002). El mecanismo de acción del propóleo es complejo y no se puede hacer una analogía con el modo de acción de los antibióticos clásicos. (Takaisi-Kikuni & Schilcher, 1994)

En estudios veterinarios, el propóleo inhibió determinados géneros Gram-positivos, tales como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Mycobacterium*, siendo parcialmente efectivo o inactivo en relación con géneros Gram-negativos como *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Salmonella*. (Pinto *et al.*, 2001; Prado Filho *et al.*, 1962; Grange & Davey, 1990; Mazzuco *et al.*, 1996)

Ha sido sugerido que la actividad antibacteriana puede estar asociada al alto contenido de sustancias del tipo flavonoides y fenoles presentes en el propóleo (Grange & Davey, 1990). La extracción de estos compuestos activos de los propóleos es más eficiente con etanol que los solventes metanol (González *et al.*, 2005) y agua (Park *et al.*, 1998). Estos compuestos pueden variar en proporción en función del origen geográfico de los propóleos. (Kujumgiev *et al.*, 1998; Tolosa *et al.*, 2002)

En la búsqueda de alternativas al control químico el propóleo podría ser utilizado para el control de enfermedades de plantas.

El presente trabajo tuvo como objetivos: evaluar “in vitro” tres concentraciones de dos extractos de propóleo de distinto origen en la inhibición de crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica* (Eca), *Xanthomonas vesicatoria* (Xv), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Agrobacterium tumefaciens* (At), *Ralstonia solanacearum* (Rs), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pseudomonas corrugata* (Pc), *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Xcc), *Pseudomonas sevastanoi* subsp. *sevastanoi* (Pss), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y el efecto bactericida de 15 aislamientos de Cmm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los propóleos fueron colectados de apiarios situados en los departamentos de Canelones y Rocha en Uruguay. La recolección se realizó mediante rejilla de plástico y los extractos de propóleo fueron preparados en una solución hidroalcohólica (70° etanol), calentando a 70 °C durante 30 minutos, (Park *et al.*, 1998) filtrados, centrifugados y esterilizados mediante membrana de nitrato de celulosa, 0,2 µ. (González *et al.*, 2005).

Las bacterias utilizadas fueron cedidas por el Servicio de Protección Agrícola, Ministerio de Agricultura y Pesca

(MGAP). Se trabajó con las bacterias fitopatógenas: Eca, Xv, Cmm, At, Rs, Pst, Pc, Xcc, Pss, Xac.

El análisis de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos fue realizado mediante la técnica de antibiograma de Bauer *et al.* (1966). Las bacterias fueron cultivadas en medio Nutriente Agar Dextrosado (NAD) a 27 °C durante 48 h. Las concentraciones de las suspensiones de células bacterianas se ajustaron a 0,4 A (550 nm) con espectrofotómetro, que correspondieron a 1×10^{10} - 1×10^{12} ufc/ml. Estas fueron incorporadas en 30 ml de NAD y dispensadas en placas de Petri de 15 cm de diámetro.

Los discos de papel (12,7 mm de diámetro) estériles fueron impregnados con los extractos provenientes de Canelones y Rocha a las concentraciones 40 mg/mL, 80 mg/mL, 120 mg/mL y etanol 70° (testigo), secados por un minuto y colocados sobre el medio inoculado de cada placa. Las placas fueron incubadas a 27 °C por 48 h. La variable medida fue el diámetro de inhibición (mm) con un calibre digital. El diseño experimental fue en bloques al azar con 4 repeticiones. Los datos se analizaron con el paquete estadístico SAS version 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC, 2006). El análisis de varianza (ANOVA) fue realizado y las medias fueron comparadas por Tukey ($\alpha = 0,05$).

Determinación de la CMI de extractos de propóleo frente a aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Para Cmm, la cual presentó mayor inhibición en el ensayo anterior, se determinó la CMI de 15 aislamientos frente a los dos extractos de propóleo. La CMI se determinó como la mínima concentración de extracto de propóleo que inhibe el crecimiento bacteriano mediante el método de dilución en agar.

Los quince aislamientos fueron obtenidos de colección, ocho correspondientes a la Unidad de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, UDELAR, seis del Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA) y una del Servicio de Protección Agrícola del MGAP fueron utilizados para la determinación de la CMI.

En tubos estériles de 50 mL se adicionó NAD estéril a 40 °C y los extractos de propóleos o de alcohol a concentración de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,30; 0,155; 0,08; 0,04 y 0,02 mg/mL. La concentración inicial de los extractos fue de 120 mg/mL (12 %). El contenido

de cada tubo (15 mL) se homogenizó y se virtió en una placa de Petri estéril. Se prepararon en saline 0,85 % p/v quince suspensiones de células bacterianas de los aislamientos de Cmm a partir de colonias en fase de crecimiento exponencial (72 h). La concentración fue ajustada con un espectrofotómetro a 0,1 Abs. equivalente a 10^8 ufc/ml. De cada suspensión se tomó una alícuota de 5 μ l y se inoculó en placas preparadas con las diferentes diluciones de propóleo o alcohol. Placas sin propóleo y alcohol se sembraron como control de viabilidad. Luego, se incubaron a 27 °C por 72 h y la CMI fue registrada.

Se determinó la actividad bactericida de las CMI de cada propóleo. En tubos de ensayo de 25 mL se adicionó Nutriente Broth Dextrosado (NBD) con los extractos de propóleos a las CMI y sin los extractos (testigos). Los tubos fueron sembrados con 10 μ l de suspensión bacteriana a una concentración de 10^8 ufc/mL, e incubados en agitación (140 rpm), luego 5 μ l fueron colectados y sembrados en placas de Petri con NAD. Los tubos y placas fueron incubados a 27 °C por 72 h. La determinación de la CMI y su efecto bactericida se repitió una vez.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos de propóleo de los dos orígenes inhibieron el crecimiento de *C. m.* subsp. *michiganensis* (Cmm) en todas las concentraciones evaluadas. El extracto de Canelones produjo mayor diámetro de inhibición que el de Rocha. Esta diferencia de inhibición se observa también en la dosis de 120 mg/mL para *X. c.* pv. *cucurbitae* (Xcc) y *X. vesicatoria* (Xv) (Tabla 1). La mayor actividad antibacteriana del propóleo proveniente de la zona de Canelones podría ser explicada por la variación en la composición química de los propóleos dada por la diversidad de la flora de cada zona como fue observado también en propóleos de diferentes orígenes geográficos. (Kujumgiev *et al.*, 1998; Tolosa *et al.*, 2002)

La bacteria *R. solanacearum* resultó inhibida en las concentraciones 120 y 80 mg/mL del propóleo de Canelones y 120 mg/mL del propóleo de Rocha. (Tabla 1)

El efecto antibacteriano de los propóleos sobre Cmm, Xv y Rs coincide con los resultados de Basim *et al.* (2006) y también fue observado por Bianchini & Benedo (1998) en Cmm.

C. m. subsp. michiganensis presentó mayor halo de inhibición (21-25 mm), comparado con los otros géneros (14-16 mm), esto puede deberse a la mayor sensibilidad de las bacterias Gram positivas al propóleo. (Castagna de Vargas *et al.*, 2004)

Ninguno de los extractos inhibió el crecimiento de *P. c. subsp. atroseptica*, *A. tumefaciens*, *P. s. pv. tomato*, *P. corrugata*, *P. s. pv. sevastanoi*, *X. a.*

pv. citri, al igual que el testigo (Tabla 1). Estos resultados no coinciden con los hallados por Basim *et al.* (2006), los cuales encontraron que el extracto de propóleo inhibió el crecimiento de *Pca*, *At*, *Pst*, *Pc* y *Pss*. Estos resultados se pueden explicar por la diferencias entre los propóleos utilizados en los trabajos e inclusive por el comportamiento de cada cepa bacteriana. Para el caso de *Xac* no fue estudiada por dichos investigadores.

Tabla 1. Diámetro de inhibición de crecimiento bacteriano (mm) bajo los discos de papel impregnados con extracto de propóleo de Canelones y Rocha a 120 mg/mL, 80 mg/mL, 40 mg/mL y etanol 70°

Bacterias	PROPOLEO CANELONES			PROPOLEO ROCHA			TESTIGO
	120 mg/ml	80 mg/ml	40 mg/ml	120 mg/ml	80 mg/ml	40 mg/ml	
Eca	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a
Xv	15,1 a	13,3 b	12,7 b	12,8 b	12,7 b	12,7 b	12,7 b
Cmm	25,6 a	25,2 ab	23,8 bc	22,5 cd	22,6 cd	21,1 d	12,7 e
At	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a
Rs	16,6 a	14,7 b	12,7 c	15,0 ab	13,4 bc	12,7 c	12,7 c
Pst	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a
Pc	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a
Xcc	16,27 a	14,5 b	12,9 c	13,2 bc	13,4 bc	12,7 c	12,7 c
Xac	13,1 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a
Pss	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a	12,7 a

Eca: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*; Xv: *Xanthomonas vesicatoria* Cmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*; At: *Agrobacterium tumefaciens*; Rs: *Ralstonia solanacearum*; Pst: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; Pc: *Pseudomonas corrugata*; Xcc: *Xanthomonas campestris* pv. *Cucurbitae*; Xac: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; Pss: *Pseudomonas sevastanoi* pv. *sevastanoi*

Las medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente por el test de Tukey (p > 0,05).

En el ensayo de la determinación de la CMI, los 15 aislamientos de *Cmm* fueron sensibles a los dos extractos de propóleo. Los valores de CMI oscilaron entre 10-0,02 mg/mL y 0,625-0,04 mg/mL para los propóleos de Rocha y Canelones, respectivamente (Tabla 2). Los valores de CMI del extracto de propóleo de Rocha presentaron mayor rango que el propóleo de Canelones, esta diferencia de amplitud, probablemente se deba a la sensibilidad de los aislamientos a los diferentes componentes de cada tipo de propóleo.

Todos los aislamientos de *Cmm* se desarrollaron en las placas con alcohol y en la placa testigo (datos no presentados). El alcohol utilizado como solvente del propóleo, no inhibió el desarrollo bacteriano en las concentraciones evaluadas.

Los aislamientos de *Cmm* se comportaron diferentes frente a los extractos. El 46 % de los aislamientos fueron sensibles al extracto de propóleo de Canelones a la concentración 0,3 mg/mL. mientras

para el propóleo de Rocha, la mayoría de los aislamientos (40 %) fueron sensibles a concentraciones más bajas (0,04 mg/mL). (Tabla 1)

Probablemente la diferencia de la CMI entre los dos extractos se deba a diferencias en el contenido de sustancias del tipo flavonoides y fenoles presentes en los propóleos, asociadas a la actividad antimicrobiana (Grange & Davey, 1990). Estos compuestos pueden variar en proporción en función del origen geográfico de los propóleos. (Kujumgiev *et al.*, 1998; Tolosa *et al.*, 2002)

Los valores de CMI del propóleo de Canelones y de Rocha presentaron efecto bactericida en el 80 % y 33 % de los aislamientos, respectivamente (Tabla 2). Las diferencias en la actividad bactericida pueden estar relacionadas con que la mayoría de los valores de CMI del propóleo de Rocha fueron más bajos que los de Canelones, pero estas no fueron concentraciones suficientes para matar las células bacterianas.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida de los extractos de propóleos frente a aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Aislamientos	Propoleo Canelones		Propoleo Rocha	
	CMI *	CB*	CMI*	CB*
DGSA	0,155	0,155	0,04	0,04
INIA1	0,30	0,30	0,30	0,30
INIA 2	0,155	0,155	0,04	ND
INIA 3	0,30	ND	0,08	ND
INIA 4	0,30	ND	0,30	ND
INIA 5	0,155	0,155	0,04	ND
INIA 6	0,155	0,155	0,02	ND
FAGRO 1	0,30	0,30	0,04	0,04
FAGRO 2	0,30	0,30	0,08	ND
FAGRO 3	0,30	0,30	0,30	ND
FAGRO 4	0,155	0,155	0,04	ND
FAGRO 5	0,155	0,155	0,04	ND
FAGRO 6	0,04	ND	0,02	ND
FAGRO 7	0,625	0,625	10,00	10,00
FAGRO 8	0,30	0,30	0,08	0,08

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CB: Concentración Bactericida. La CMI y CB expresada en mg/mL
ND: concentración bactericida no detectada

CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos el propóleo puede tener un potencial uso en el manejo de algunas enfermedades bacterianas, específicamente para la causada por *C. m.* subsp. *michiganensis*. Se deberán continuar los trabajos que confirmen estos resultados, para luego seguir con la etapa de investigación a campo. Asimismo se deberán realizar estudios de caracterización química de extractos de propóleos para seleccionar aquellos que posean mayor actividad antimicrobiana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G.: *Plant pathology*, San Diego: Academic Press, 2004.
2. Basim, E.; H. Basim y Ö. Musa: "Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against

plant bacterial pathogens". *Journal of Food Engineering*. 77: 992-996, 2006.

3. Bauer A. W.; M. M. Kirby; J. C. Sherris y M. Turck: "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method". *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-96, 1966.
4. Bianchini, L. and I.P. Bedendo: Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogenicas. *Sci. Agrícola*, [online]. Ene./Abr. 1998, vol.55, no.1 [citado 23 Julio 2007], p.149-152. Disponible en Web : http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161998000100024&lng=es&nrm=iso. ISSN 0103-9016, 1998.
5. Castaña de Vargas, A.; A. Pinto Loguercio; N. Mazzini Witt; Matiuzzi da Costa *et al.*: "Atividade antimicrobiana "in vitro" de extracto alcóolico de própolis". *Ciencia Rural*, vol 34 (1) 159-163, 2004.

6. Gebara, E.C.E.; L.A. Lima and M.P.A. Mayer: "Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria", *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 365-369, 2002.
7. Ghisalberti, E.L.: "Propolis a Review". *Bee World* 60: 59-84, 1979.
8. González, P.; L. Rauduviniče; P. Mondino; V. Gepp *et al.*: El propóleo como alternativa al control químico de enfermedades hortícolas. Resultados de Investigación en Cultivo y Poscosecha de Zapallo. Zafra 2004-2005 CRS. Progreso, p: 33-35, 21 de octubre de 2005.
9. Grange, J.M. and R.W. Davey: "Antibacterial properties of propolis (bee glue)". *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83(3): 159-160, 1990.
10. Kujumgiev, A.: "Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin", *Journal of Ethnopharmacology* 64: 235-240, 1998.
11. Kumazawa, S.; K. Hayashi; K. Kajiya; T. Ishii *et al.*: "Studies of the Constituents of Uruguayan Propolis". *J. Agric. Food Chemical*, 50: 4777-4782, 2002.
12. Koo, H.; B.P.F.A. Gomes; P.L. Rosalen; G.M.B. Ambrosano *et al.*: "In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens". *Archives of Oral Biology*, 45 141-148, 1999.
13. Mazzuco, H.; R.D. Silva; Jr. A. Berchieri and E.Oliveira: "Utilização da própolis e álcool etílico no controle de *Salmonella* em rações avícolas". *Scientia agricola*, 53: 1-5, 1996.
14. Lopes, C.A. y A.M. Quezado-Soares: Doenças Bacterianas das Hortaliças: Diagnose e Controle. EMBRAPA. Brasília, Brasil, 70 pp, 1997.
15. Lopes C. A.: Bacterioses de hotaliças: Situacion atual e perspectivas de controle. In: Zambolim, L. (ed) Manejo Integrado: Doenças, Pragas e Plantas Daninhas. Viçosa- MG Brasil, 2000.
16. Park, Y. K. and M. Ikegaki Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62 (11): 2230-2232, 1998.
17. Pinto, M.; J. Faria and D. Message: "Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite". *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 38(6): 278-283, 2001.
18. Prado Filho, L.G.; J.L. Azevedo and C.H. Flechtmann: "Antimicrobianos em própolis de *Apis mellifera* L". *Boletim da Indústria Animal*, 20: 399-403, 1962.
19. Santos, F.A.; E.M.A. Bastos; M. Uzeda; M.A.R. Carvalho *et al.*: "Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria", *Journal of Ethnopharmacology* 80: 1-7, 2002.
20. Sforcin, J.M.; Jr. A. Fernandes; C.A.M. Lopes; V. Bankova and S.R.C. Funari: "Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity". *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 243-249, 2000.
21. Silva, V. L. and C. A. Lopes: "Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a estreptomicina e oxitetraciclina em tomateiros pulverizados ou não com antibióticos agrícolas", *Fitopatologia Brasileira*, 20: 80-84, 1995a.
22. _____: "Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a cobre e tomateiros pulverizados com fungicidas cupricos". *Fitopatologia Brasileira*, 20: 85-89, 1995b.
23. Stall, R. E. and P. L. Thayer: "Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin", *Plant Diseases Reporter*, 46: 389-392, 1962.
24. Takaisi-Kikuni, N.B. and H. Schilcher: "Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance". *Planta Medica* 60: 222-227, 1994.
25. Tolosa, L. y E. Cañizares: "Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche". *Ars Pharmaceutica*, (43)1-2: 187-204, 2002.

Recibido: 24/04/2009

Aceptado: 15/09/2009