

Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth

Mileidy Cruz-Martín*, Yudith García-Ramírez, Cynthia Sánchez-García, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque, Michel Leiva-Mora, Marisol Freire-Seijo. * Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: mileidy@ibp.co.cu

RESUMEN

Aun no se cuenta con protocolos eficientes de micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth debido a dos problemas principales en la fase de establecimiento: la necrosis de los explantes y la presencia de microorganismos contaminantes. En este trabajo se realizó el aislamiento e identificación de un contaminante de alta frecuencia de aparición en una población de plantas *in vitro* de *Guadua* (*Guadua angustifolia* Kunth) en la fase de establecimiento. Además, se determinó la mínima concentración inhibitoria (MCI) mediante los métodos de dilución en Agar y difusión en Agar del Sulfato de Gentamicina. El contaminante aislado de la fase de establecimiento se identificó como perteneciente al género *Bacillus*. Se comprobó que este microorganismo mostró sensibilidad al Sulfato de Gentamicina y la MCI fue de $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por ambos métodos. El empleo de este antibiótico puede ser una alternativa para solucionar el problema de la presencia de contaminantes bacterianos en el cultivo de tejidos de *Guadua angustifolia* luego que se verifique su no fitotoxicidad.

Palabras clave: bambú, contaminación microbiana, Sulfato de gentamicina

ABSTRACT

Efficient protocols of *Guadua angustifolia* Kunth micropropagation are not reported due to two principal problems for establishing it: explants necrosis and microbial contamination. In this work a high frequent bacterial contaminant in the *in vitro* establishment of *Guadua* was isolated and identified. Besides, the minimal inhibitory concentration (MIC) of Gentamicin sulphate was determined by two methods: dilution and diffusion in Agar methods. Bacterial contaminant isolated was identified as belonging to *Bacillus* genus. Sensitivity of *Bacillus* sp. to Gentamicin sulphate was proved and the value of MIC ($1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) was obtained using both methods. The use of this antibiotic will be an alternative for the solution of *in vitro* bacterial contamination problems in *Guadua angustifolia* tissue culture once no existence of phytotoxicity is verified.

Keyword: Bamboo, microbial contamination, Gentamicin sulphate

INTRODUCCIÓN

La *Guadua* (*Guadua angustifolia* Kunth) es un bambú gigante que por muchos años ha estado ligada a la idiosincrasia, cultura y economía de diferentes pueblos. La *Guadua*, como recurso natural renovable, cuenta con grandes posibilidades económicas ya que su utilización permite disminuir costos cuando es empleada como materia prima. Los tallos se han utilizado en la fabricación de artesanías, muebles y multitud de enseres, así como, en un insustituible material de construcción de viviendas de toda clase y nivel social. Sus cualidades la hacen un material idóneo para estructuras sismorresistentes y como auxiliar en las construcciones de cemento. Por sus excelentes propiedades físico-mecánicas, su resistencia al ataque de insectos, su belleza y por la diversidad de aplicaciones que se le dan, representa una valiosa alternativa económica que ha coadyuvado a mitigar la problemática social del campo (Martínez, 2001).

En el mundo se utiliza la micropropagación como la principal biotécnica aplicada a varias especies de bambú, la cual se ha logrado con éxito en especies

asiáticas (Ramayake *et al.*, 2001). Sin embargo, en especies americanas como la *Guadua angustifolia* aun no se cuenta con protocolos eficientes de micropropagación, debido a dos problemas principales en el establecimiento: la necrosis de los explantes y presencia de microorganismos contaminantes (Fajardo, 2006).

En la fase de establecimiento de especies leñosas, la presencia de microorganismos es un serio problema que afecta su cultivo *in vitro* (Quintero 1997; Jiménez, 1998). El explante inicial constituye la fuente principal de contaminación, propiciado quizás, por las características anatómicas propias de las especies.

Varios son los métodos que se emplean para la eliminación de contaminantes microbianos durante el cultivo *in vitro* de plantas. Se han empleado con tales fines métodos físicos, biológicos y químicos (Leifert y Cassells, 2001). Dentro de este último, el uso de sustancias antimicrobianas, en particular antibióticos, ha resultado adecuado en los casos en que se identifica el microorganismo presente y se evalúa su susceptibilidad.

Teniendo en cuenta estos criterios este trabajo se propuso como objetivos aislar e identificar un contaminante de alta frecuencia de aparición durante la fase de establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* y evaluar su susceptibilidad frente a antibióticos para su control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Explantos de *Guadua angustifolia* Kunth. en fase de establecimiento, con presencia de contaminantes bacterianos (crecimiento uniforme, amarillento, brillante, alrededor de la base de los explantes).

Aislamiento e identificación

Los contaminantes bacterianos fueron aislados por agotamiento por estrías en medio de cultivo Agar Nutriente (BIOCEN) (AN). Las placas se incubaron a 30°C durante 24-72 horas. Los cultivos puros, obtenidos por resiembra en medio de cultivo bacteriológico, se conservaron en cuñas de medio de cultivo a 4 °C. Para su identificación, fueron examinadas microscópicamente y se tuvieron en cuenta los protocolos descritos por Klement *et al.* (1990).

Pruebas de susceptibilidad

Se evaluaron cuatro antibióticos con el objetivo de determinar el más adecuado para el control del contaminante bacteriano. Se ensayaron dos aminoglucósidos (Sulfato de Gentamicina (MERCK) 50mg.ml⁻¹ y Sulfato de Kanamicina (SIGMA) 100mg.ml⁻¹). Además, Ampicilina, Sal sódica (MERCK) 100 mg.ml⁻¹ como β- Lactámico y la Rifampicina (MERCK) 100mg.ml⁻¹ como inhibidor de ARN polimerasa.

Se empleó el método de difusión en Agar. El inóculo bacteriano que fue ajustado al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland (aprox. 1-2x10⁸ ufc.ml⁻¹) y se estrió en placas de Petri con medio de cultivo Agar Muller-Hinton (Biocen) (AMH) con el empleo de un hisopo estéril. Se agregaron 5 µl de cada solución del antibiótico a discos de papel de filtro (Ø 5 mm) Whatman 1 y se colocaron cuatro discos por placa de Petri, con ayuda de una pinza, que se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Al cabo de este tiempo se realizó la evaluación donde se midió el valor del diámetro del halo o zona de inhibición (mm), restándole el diámetro del disco de papel de filtro (5 mm.)

Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI)

Se procedió a determinar la MCI del antibiótico que mostró mejores resultados en el control bacteriano.

Se ensayaron dos métodos: dilución en Agar y difusión en Agar.

Dilución en Agar

Se ensayaron concentraciones decrecientes del antibiótico en diluciones seriadas dobles desde 64.0 a 0.25 mg.ml⁻¹ en medio de cultivo AMH. Se siguió el esquema de dilución de referencia según Jorgensen *et al.* (1993) que incluye una dilución final de la concentración de los antibióticos en el Agar de 1:10. Se prepararon dos réplicas de cada concentración del antibiótico. Además, se incluyeron placas con medio de cultivo AMH y AN libres de antibiótico para ser usadas como controles de crecimiento. Para la preparación de los inóculos el método utilizado fue el de suspensión directa de colonias según lo descrito por Jorgensen *et al.* (1993) y la inoculación de las placas se realizó según el protocolo propuesto por Alvarado-Capó *et al.* (2003). Se realizaron ocho aplicaciones por placa de Petri las cuales se tomaron como réplicas.

Las placas se incubaron a 30°C en la oscuridad durante 48h. Las evaluaciones se realizaron a las 24 y 48h. Para ello, las placas se colocaron sobre una superficie que no reflejara la luz, se comprobó el crecimiento bacteriano en los controles y se determinó la menor concentración del antibiótico que inhibió completamente el crecimiento bacteriano la cual fue tomada como MCI.

Difusión en Agar

Para este método se siguió un protocolo similar al descrito anteriormente para la evaluación de la susceptibilidad del contaminante a los cuatro antibióticos. Se emplearon concentraciones decrecientes en diluciones seriadas dobles del antibiótico seleccionado desde 64 a 0.25 mgml⁻¹. A las 48h se midió la zona de inhibición y se tomó como MCI la menor concentración que inhibió el crecimiento bacteriano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e Identificación

En el examen microscópico se detectaron células en forma de bastones (bacilos), con presencia de endosporas y fueron positivas a la tinción de Gram. De acuerdo con las diferentes pruebas realizadas, los contaminantes aislados se identificaron como pertenecientes al género *Bacillus* (Tabla1).

De forma general, en la literatura científica se refieren altos índices de contaminación microbiana en el establecimiento de explantes de *Guadua* (Marulanda *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2006), sin embargo, no se describen estudios relacionados con la identificación de estos microorganismos. Este trabajo

constituye el primer informe de identificación de *Bacillus* sp. como contaminante bacteriano en la fase de establecimiento de *Guadua angustifolia*.

La presencia de bacterias en los medios de cultivo tiene diversos efectos sobre las plantas *in vitro*. Generalmente no afectan directamente a estas, pero se alimentan y desarrollan muy rápidamente en el medio de cultivo utilizan los nutrientes de éste y producen una fuerte presión de competencia, de la cual normalmente el explante sale más perjudicado. Algunas bacterias también atacan a los tejidos de la planta y ocasionan enfermedades y degradación de los tejidos (Fontúrbel, 2001).

En particular el género *Bacillus* ha sido descrito como contaminante frecuente del cultivo *in vitro* de plantas (Alvarado-Capó, 2003; Thomas, 2004) y su predominio pudiera deberse a su alta capacidad de adaptación. En especies de *Bacillus*

se han descrito una amplia diversidad de habilidades fisiológicas, pudiendo encontrar aislados desde psicrófilos a termófilos, acidófilos a alcalinófilos, algunas cepas son tolerantes a las sales y otras tienen requerimientos específicos de estas (Claus y Berkely, 1986).

El género *Bacillus* se puede considerar como vitropatógeno ya que ha sido descrito como reductor del crecimiento en el cultivo de tejidos vegetales (Leifert *et al.*, 1994; Alvarado-Capó *et al.*, 2003) y por tanto, precisa ser eliminado del proceso.

Pruebas de susceptibilidad

De los cuatro antibióticos ensayados el Sulfato de Gentamicina fue el de mayor efectividad para el control del contaminante bacteriano ya que mostró mayor halo de inhibición con una menor concentración (Tabla 2).

Tabla 1. Principales características de la cepa del género *Bacillus* contaminante de establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth.

Características	<i>Bacillus</i> sp.
Color de la colonia en AN	Amarilla
Catalasa	+
Espora	+
Forma	Esférica
Posición	Central
Deformación del esporangio	-
Hugh y Leifson	
oxidativo	d
fermentativo	-
alcalino	-
Caseína	-
Almidón	-
Gelatina	+
Indol	-
Gas de la Glucosa	-
Rojo de Metilo	-

Tabla 2. Evaluación del efecto de cuatro antibióticos frente al crecimiento de *Bacillus* sp. mediante el método de difusión en Agar

Antibióticos	Halos de inhibición (mm)
Sulfato de Gentamicina (50mg.ml ⁻¹)	8
Sulfato de Kanamicina (100mg.ml ⁻¹)	0
Ampicilina, Sal sódica (100mg.ml ⁻¹)	2
Rifampicina (100mg.ml ⁻¹)	0

Similares resultados fueron alcanzados por Habiba *et al.* (2002) que al evaluar, mediante difusión en agar, diferentes antibióticos para el control de contaminantes bacterianos endófitos de bananos, encontraron que el ciento por ciento de los aislados fueron sensibles al Sulfato de Gentamicina. Además, lograron obtener explantes libres de contaminación bacteriana con el pretratamiento de estos en solución con Sulfato de Gentamicina a una concentración de 160mg.l^{-1} durante 1 hora y 40 minutos.

Falkiner (1990) refiere que los antibióticos que actúan específicamente en la pared celular de las bacterias pueden ser más satisfactorios para el control de contaminantes en cultivo de células de plantas. El sulfato de Gentamicina es una sustancia policatiónica que se une a las cargas negativas del lipopolisacárido de la pared celular bacteriana, penetra y se une a las subunidades 30 y 50S del ribosoma e inhiben la síntesis proteica (Mensa *et al.*, 1999).

Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI)

Dilución en Agar

El Sulfato de Gentamicina logró controlar a la cepa de *Bacillus* sp. a una concentración de 1mg.ml^{-1} que fue su MCI. Este antibiótico fue empleado por autores como Reed *et al.* (1997) para el control de contaminantes bacterianos de tejidos de Avellano (*Corylus avellana* L.) y resultó ser el más efectivo ya que logró el control de la mitad de los aislados a concentraciones por debajo de 6.25mg.ml^{-1} .

De igual forma, Alvarado-Capó (2003) encontró similares resultados al aplicar el Sulfato de gentamicina, ya que este antibiótico logró inhibir el crecimiento del 95.6% de los contaminantes de caña

de azúcar (*Saccharum* spp.híbrido) con concentraciones menores o iguales a 4mg.ml^{-1} .

El empleo de antibióticos en el cultivo *in vitro* de plantas para el control de la contaminación bacteriana ha tenido buenos resultados y no se ha planteado a las bacterias como altamente resistentes a los antibióticos. Autores como Kneifel y Leonhardt (1992), Barrett y Cassells (1994), Alvarado-Capó (2003) y Digonzelli *et al.* (2005) encontraron que las bacterias contaminantes analizadas fueron sensibles a un gran número de antibióticos.

Difusión en Agar

Se logró determinar la MCI del Sulfato de Gentamicina frente a *Bacillus* sp. empleando el método de difusión en Agar. La mínima concentración inhibitoria de este resultó ser 1mg.ml^{-1} . Además, se encontró relación entre el aumento del diámetro del halo de inhibición y el aumento de la concentración del antibiótico (Figura 1).

Los valores de MCI del Sulfato de Gentamicina para *Bacillus* sp. coincidieron en ambos métodos utilizados (dilución en agar y difusión en agar) lo cual indica la validez del método de difusión en Agar para este propósito. Similar resultado fue encontrado por Saikia *et al.* (2001) al determinar la zona de inhibición, mínima concentración inhibitoria y mínima concentración fungicida de varios aceites mediante el método de difusión en agar.

El contar con métodos estandarizados fáciles y eficientes que permitan obtener MCI de determinada sustancia frente a microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro*, constituye una herramienta importante para los laboratorios que se dediquen al cultivo de tejidos. Esto les permite trazar estrategias de trabajo para la eliminación de estos microorganismos.

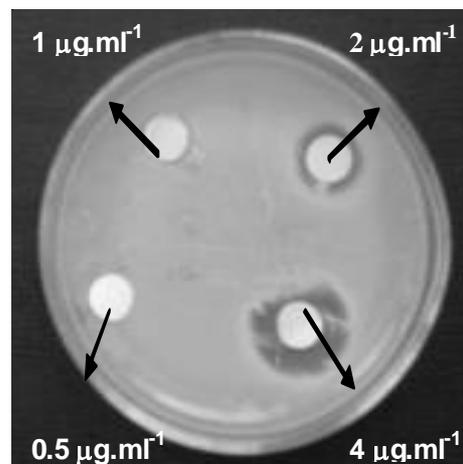


Figura 1. MCI del Sulfato de Gentamicina mediante el método de difusión en Agar frente a *Bacillus* sp. aislado en la fase de establecimiento de *Guadua angustifolia*.

CONCLUSIONES

Se identificó *Bacillus* sp. como contaminante de la fase de establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth y se demostró que el Sulfato de gentamicina resultó ser el antibiótico más efectivo para su control.

REFERENCIAS

- Alvarado-Capó, Y (2003) Incidencia, identificación y estrategias para la prevención y el control de contaminantes bacterianos en el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. Santa Clara
- Alvarado-Capó, Y, Cruz M, Portal N, García L, Freire M, Quiala E, Gómez R (2003) Estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacterianas en la micropropagación de la caña de azúcar. *Biotecnología Vegetal* 3 (2):77-82
- Barrett, C, Cassells A (1994) An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelagonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* av. 'Grand Slam' explants *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36: 169-177
- Claus, D, Berkely R (1986) Genus *Bacillus* Conh 1872, 174AL. En: Krieg NR y Holt J (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Williams and Wilkins. Baltimore
- Fajardo, L (2006) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Guadua angustifolia* Kunth. Tesis presentada para la obtención del grado científico de Master en Ciencias. IBP. UCLV. Santa Clara, Cuba
- Digonzelli, P, Díaz L, Carrizo de Bellone S (2005) Uso de PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar. *Rev. Fac. Agron.* 22(1): 23-33
- Falkiner, FR (1990) The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. *Int. Soc. Plant Tiss. Cult. Newsletter* 60: 13-23
- Fontúrbel, F (2001) Los vitropatógenos: consideraciones generales, detección y eliminación. *Biología.org*. El portal de Biología y Ciencias de la Salud. No. 6 [en línea] En: <http://www.biologia.org/?pid=5000&id=42&page=0> htm [consulta: septiembre 2006]
- Habiba, U, Reza Sh, Lal Saha M, Khan M, Hadiuzzaman S (2002) Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of Table Banana: Identification and prevention. *Plant Tissue Organ Cult.* 12(2): 117-124
- Jiménez, E (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez, JN (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. pp. 45-56. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara
- Jiménez, V, Castilla J, Tavares E, Guevara E, Montiel M (2006) *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 86:389-395
- Jorgensen, J, Cleeland R, Craig W, Doern G, Ferraro M, Finegold S, Hansen S, Jenkins S, Novick W, Pfaller M, Preston D, Reller L, Swenson J (1993) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Third Edition; Approved Standard*. En: NCCLS document M7-A3. Vol. 13 No 25. NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania
- Keneifel, W, Leonhardt W (1992) Testing of different antibiotics against gram positive and gram negative bacteria isolated from plant tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 29:139-144
- Klement, Z, Rudolph K, Sands D (1990) *Methods in phytobacteriology*. Akademiai Kiado. Budapest.
- Leifert, C, Morris C, Waites W (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 139-144
- Martínez, C (2001) La Caña Guadua. Sociedad Colombiana de Bambú [en línea] En: http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/fibras/ca%C3%B1a_colombia.htm [consulta: 2 diciembre 2005]
- Marulanda, M, Carvajalino M, Vargas C, Londoño X (2002) La biotecnología aplicada al estudio y aprovechamiento de la Guadua. Seminario - Taller Avances en la investigación sobre Guadua, Pereira
- Mensa, J, Gatell JM, Jiménez de Anta MT, Prats G (1999) *Guía de terapéutica Antimicrobiana*. Novena edición, pp. 1-125. Masson, S.A.
- Quintero, W, Mas G, Santos R, León S, Castro C, Bracho B (1997) Efecto de la temperatura y tiempo de inmersión en el control de la contaminación de yemas apicales de Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden, cultivadas *in vitro*. En resúmenes: VII Jornadas Científico Técnicas. pp. 101. Maracaibo, Venezuela
- Ramanayake, SM, Wannirachchi W, Tennakoon T (2001) Axillary shoot proliferation an *in vitro* flowering in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus strictus* Nees. *Plant Cell Tiss. Cult* 52:189-192
- Reed B, Mentzer J, Tanprasert P, Yu X (1997) Internal bacteria contamination of micropropagated hazenut identification and antibiotics treatment. En: Cassells A (Ed) *Pathogen and Microbial Contamination Management in micropropagation*, pp. 169-174. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Saikia, D, Khanuja S, Kahol A, Gupta S, Kumar S (2001) Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon* spp. Genetics Resources and Biotechnology Division, Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow
- Thomas, P (2004) Isolation of *Bacillus pumilus* from *in vitro* grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. *J Appl Microbiol.* 97(1):114-23