

Influencia de las concentraciones de sales MS y sacarosa del medio de cultivo para las plantas *in vitro* sobre el crecimiento de contaminantes bacterianos de la micropropagación de la caña de azúcar

Yelenys Alvarado Capó*, Mileidy Cruz Martín, Nayanci Portal González, Mayra Acosta Suárez y Michel Leiva Mora. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½ . Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e.mail: yelenys05@ibp.co.cu

RESUMEN

Se determinó la influencia de las concentraciones de sales MS y sacarosa del medio de cultivo para las plantas *in vitro* sobre el crecimiento cuatro cepas de bacterias contaminantes aisladas de la Fase de Multiplicación y dos de la Fase de Enraizamiento de la micropropagación de la caña de azúcar. Con cada uno de estos dos componentes se realizaron experimentos independientes en placas de Petri con los medios de cultivo para la multiplicación y el enraizamiento de las plantas *in vitro*. Se elaboraron tratamientos con varias concentraciones de sales MS expresadas en porcentaje (p/v): 0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0, así como de Sacarosa: 0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0g.l⁻¹. Las placas de Petri se inocularon con suspensiones bacterianas de las cepas a razón de 3.5µl por cada una para una concentración final de aproximadamente 10⁴ufc.ml⁻¹. Se evaluó el crecimiento o no de las mismas a las 24, 48 y 120h de incubación a 30°C y se registró siguiendo el criterio de: (+) crecimiento sobre el sitio de inoculación, (-) ausencia total de crecimiento sobre el sitio de inoculación. Se demostró que las concentraciones de sales MS y sacarosa limitaron el crecimiento bacteriano.

Palabras clave: *Bacillus*, bacterias, *Enterobacter*, *Saccharum* spp. híbrido, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*

ABSTRACT

The influence of MS salts and sucrose concentrations on the growth of four strain of bacterial contaminant isolated from multiplication stage and two from the rooting stage of the sugarcane micropropagation was determined. Independent experiments were carried out with each component in Petri dishes with the media for the multiplication and rooting of *in vitro* plants. Treatments were elaborated with different concentrations of salts MS expressed in percentage (p/v): 0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0, as well as of Sucrose: 0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0g.l⁻¹. The Petri dishes were inoculated with 3.5µl of each bacterial suspension to a final concentration of approximately 10⁴cfu.ml⁻¹. The growing or not of the bacterial strains was evaluated at 24, 48 and 120h of incubation at 30°C and it was registered following the approach of: (+) growth on the inoculation place, (-) total absence of growth on the inoculation place. It was demonstrated that the salts and sucrose concentration in multiplication and rooting media of the *in vitro* plants limited the bacterial growth.

Key Words: *Bacillus*, bacteria, *Enterobacter*, *Saccharum* spp. híbrido, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*

INTRODUCCIÓN

La interacción entre plantas y microorganismos forma parte de un ecosistema. Mientras una considerable cantidad de conocimientos se ha acumulado con respecto a las interacciones de plantas con microorganismos fijadores de nitrógeno y con microorganismos patógenos, poco se conoce acerca de otros tipos de interacciones tales como las que existen dentro del ecosistema del medioambiente del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales (Herman, 1996).

Típicamente, para el cultivo *in vitro* de plantas los explantes asépticos son cultivados bajo intensidad luminosa reducida, en pequeños contenedores con un medio de cultivo artificial que contiene: sacarosa, sales minerales, vitaminas y reguladores del crecimiento que exceden los niveles registrados en

el medioambiente natural (Leifert *et al.*, 1995). Estas condiciones unidas a las modificaciones que introducen las plantas durante su crecimiento pueden favorecer o limitar la presencia de bacterias.

En la búsqueda de vías para la detección temprana de los contaminantes bacterianos o métodos para su control se han realizado diferentes estudios (Leifert y Cassells, 2001; Thomas, 2004). Algunos incluyen la evaluación del efecto del pH sobre el crecimiento de los contaminantes bacterianos (Leifert *et al.*, 1994a) pero otros componentes del medio de cultivo como las sales o la sacarosa no han sido abordados. Específicamente en el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar no se tienen referencias en la literatura científica sobre este tema.

En este trabajo se realizaron experimentos para determinar la influencia de las concentraciones de

sales MS y sacarosa del medio de cultivo para las plantas *in vitro* sobre el crecimiento de bacterias contaminantes aisladas de las fases de multiplicación y enraizamiento de la micropropagación de la caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Influencia de las concentraciones de sales MS y sacarosa sobre el crecimiento bacteriano

Se realizaron experimentos independientes en los medios de cultivo para la multiplicación y el enraizamiento de las plantas *in vitro*. Los mismos se distribuyeron en placas de Petri de 90.0mm de diámetro.

Tratamientos:

- Sales MS (Murashige y Skoog, 1962) expresadas en porcentaje (p/v): 0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0.
- Sacarosa: Tratamientos: 0; 10.0, 20.0, 30.0 y 40.0g.l⁻¹

Cepas bacterianas

Se utilizaron cepas pertenecientes a la colección de microorganismos del Laboratorio de Fitopatología del IBP aisladas como contaminantes de las Fases de Multiplicación y Enraizamiento de la micropropagación de la caña de azúcar.

- Fase de Multiplicación: CCIBP-M72 *Stenotrophomonas maltophilia*, C C I B P - M 6 5 *Bacillus pumilus*, CCIBP-M27 *Bacillus subtilis*, CCIBP-M29 *Ochrobactrum anthropi*.
- Fase de Enraizamiento: CCIBP-Er35 *Bacillus pumilus*, CCIBP-Er8 *Enterobacter cloacae*.

Preparación de los inóculos bacterianos

Se realizaron suspensiones bacterianas individuales, con cada una de las cepas, en solución salina (0.9%) a partir de colonias aisladas, crecidas en Agar Triptona Soya (BioCen) por 18-20 horas. Para ello se empleó el método de suspensión directa de las mismas de acuerdo con lo descrito por Jorgensen *et al.* (1993). Cada suspensión se ajustó al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland (aproximadamente $1-2 \cdot 10^8$ ufc.ml⁻¹).

Posteriormente se diluyeron 1:10 y de cada uno se colocaron 150.0µl en pocillos de placas ELISA y se aplicaron sobre la superficie del agar con una pipeta multicanal (FINNPIPETTE) a razón de 3.5µl por cepa (para una concentración final de aproximadamente 10^4 ufc.ml⁻¹). La suspensión fue utilizada dentro de los 15min siguientes a partir de su preparación.

Como controles se emplearon placas de Petri con Agar Triptona Soya (ATS) y cada tratamiento se repitió tres veces. Se evaluó el crecimiento o no de las cepas

a las 24, 48 y 120h de incubación a 30°C y se registró siguiendo el criterio de: (+) Crecimiento sobre el sitio de inoculación, (-) Ausencia total de crecimiento sobre el sitio de inoculación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de las concentraciones de sales MS y sacarosa

Sales MS

Se determinó que el crecimiento de las bacterias contaminantes en los medios de cultivo para la multiplicación y el enraizamiento de las plantas *in vitro* de caña de azúcar con diferentes concentraciones de sales MS se vio limitado principalmente en las primeras 48h. Se observaron pequeñas colonias o finas películas, generalmente solo distinguibles a trasluz que se circunscribían al sitio de inoculación y disminuían en intensidad en la medida que aumentaba la concentración de sales MS. A las 120h de incubación, a pesar de que el 100.0% de las cepas había crecido, en todos los tratamientos se mantenían estas características. Como excepción *O. anthropi* (CCIBP-M29) y *E. cloacae* (CCIBP-Er8) mostraron un crecimiento más abundante que el resto, incluso en presencia de 200.0% de sales MS y desde las 24h en las menores concentraciones.

Savela y Uosukarnen (1994) encontraron que la característica principal de los contaminantes aislados de la Fase de Multiplicación *in vitro* de manzano (*Malus pumila*) fue su pobre crecimiento en los medios de cultivo de las plantas. Estos incluyeron a corineformes y *Pseudomonas mesophilica*.

Generalmente en los medios de cultivo para la multiplicación y el enraizamiento de las plantas *in vitro* se emplean concentraciones entre el 75.0 y el 100.0% de las sales MS (Jiménez *et al.*, 1997) aunque para determinados estudios de conservación (García *et al.*, 1999) pueden utilizarse el resto de las concentraciones incluidas en este experimento. Conocer el efecto de diferentes concentraciones de sales MS sobre el crecimiento de los principales contaminantes bacterianos puede contribuir a desarrollar estrategias de trabajo para su control. La disminución de la concentración de sales MS en el medio de cultivo no produjo un incremento sustancial del crecimiento bacteriano, por lo cual su posible uso con fines de detección temprana no se justificaría para la caña de azúcar.

En la tabla 1 aparecen los resultados del comportamiento individual de cada una de las cepas en el medio de cultivo para la multiplicación (MSM) y el enraizamiento (MSE) de las plantas *in vitro* a las 48h de incubación.

Tabla 1. Comportamiento individual de cepas de diferentes especies de bacterias contaminantes en los medios de cultivo para la multiplicación (MSM) y el enraizamiento (MSE) de plantas *in vitro* de caña de azúcar con diferentes concentraciones de sales MS a las 48h de incubación.

Especies	Cepas	Concentración de Sales MS (%)						Control	
		0	25	50	75	100	150	200	ATS
Crecimiento en MSM									
<i>S. maltophilia</i>	CCIBP-M72	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>B. pumilus</i>	CCIBP-M65	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>B. subtilis</i>	CCIBP-M27	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>O. anthropi</i>	CCIBP-M29	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en MSE									
<i>Bacillus pumilus</i>	CCIBP-Er35	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>E. cloacae</i>	CCIBP-Er8	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) crecimiento, (-) ausencia total de crecimiento. ATS – Agar Triptona Soya.

Sacarosa

Al igual que en el ensayo con diferentes concentraciones de sales MS el crecimiento de las bacterias contaminantes se vio restringido principalmente durante las primeras 48 horas y presentó semejantes características culturales. Interesante fue

el hecho de que no les fue imprescindible este carbohidrato para su metabolismo ya que en su ausencia crecieron (Tabla 2) quizás a expensas de fuentes de nitrógeno que se encuentran en algunas de las sales MS. No obstante, en los tratamientos donde se encontraba presente la sacarosa el crecimiento se diferenció por ser más mucoso.

Tabla 2. Comportamiento individual de cepas de diferentes especies de bacterias contaminantes en los medios de cultivo para la multiplicación (MSM) y el enraizamiento (MSE) de plantas *in vitro* de caña de azúcar con diferentes concentraciones de sacarosa (g.l^{-1}) a las 48h de incubación.

Especies	Cepas	Concentración de sacarosa (g.l^{-1})					Control	
		0	10	20	30	40	ATS	
Crecimiento en MSM								
<i>S. maltophilia</i>	CCIBP-M72	+	+	+	+	+	+	+
<i>O. anthropi</i>	CCIBP-M29	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	CCIBP-M27	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. pumilus</i>	CCIBP-M65	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en MSE								
<i>Bacillus pumilus</i>	CCIBP-Er35	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	CCIBP-Er8	+	+	+	+	+	+	+

(+) crecimiento, (-) ausencia total de crecimiento ATS – Agar Triptona Soya.

La sacarosa se adiciona al medio de cultivo de las plantas *in vitro* para permitir un rápido crecimiento heterotrófico ya que la producción de energía y carbohidratos por la fotosíntesis *in vitro* es muy poca debido a que los niveles de iluminación en las habitaciones destinadas a su crecimiento generalmente son bajos y no garantizan que se desarrolle adecuadamente este proceso (Leifert *et al.*, 1995).

Estos mismos autores han expresado que por la adición de azúcares y otras sustancias orgánicas a los medios de cultivo de las plantas *in vitro* estos se convierten en un buen sustrato para el crecimiento de algunas especies de bacterias que han sido

aisladas como contaminantes. Sin embargo, para el control de las cepas utilizadas en este estudio no tendría sentido la sugerencia de suprimir dicha fuente carbonada del medio de cultivo. Esta estrategia de trabajo ha sido planteada por Kubota y Tadokoro (1999).

Según Leifert *et al.* (1994b) como resultado de las altas concentraciones de nutrientes minerales y de carbohidratos pesados el potencial hídrico del medio de cultivo de las plantas es relativamente bajo, comparado con el que presentan los medios nutritivos generalmente usados para cultivar microorganismos y esto puede ser selectivo para aquellos tolerantes a las altas presiones osmóticas.

No obstante, Galinski (1995) afirmó que las bacterias son capaces de adaptarse a un cierto rango de cambios en la presión osmótica externa. Para balancear un incremento en los solutos osmóticamente activos en sus hábitats ellas acumulan solutos compatibles (compuestos osmoprotectores). Como la generalidad de los hábitats se caracterizan por una presencia baja o moderada de salinidad consideró que probablemente la mayoría de las bacterias podían ser ligera o moderadamente halotolerantes.

Aunque el medio de cultivo ejerció un efecto negativo sobre el crecimiento de la mayoría de las bacterias contaminantes utilizadas en estos ensayos, ellas fueron capaces de adaptarse y crecer (aún cuando su detección visual se dificultaba por el tipo de crecimiento). Teniendo en cuenta los elementos discutidos anteriormente pudiera plantearse que estas bacterias poseen como otra de sus características la halotolerancia. Esta parece requerirse para la supervivencia bacteriana en la superficie de las hojas de las plantas (Beattie y Lindow, 1995) y por ello pudiera ser una de las características distintivas de los contaminantes que se introducen con el explante inicial.

Leifert *et al.* (1994b) y Falkiner (1997) refirieron que las altas presiones osmóticas, el pH y determinados reguladores del crecimiento presentes en el medio de cultivo pueden hacerlo a menudo hostil y por esto inhibir o limitar el crecimiento de las bacterias.

Cuando se comparó el crecimiento de las cepas en estos medios de cultivo (multiplicación y enraizamiento) con respecto a los controles (Agar Tripton Soya) en los diferentes tratamientos estudiados (tanto para sales MS como sacarosa) se comprobó que era más escaso y tenue. Esto confirmó que aunque pueden crecer en los medios de cultivo para plantas requieren de otros nutrientes y condiciones para su mejor desarrollo o más tiempo para adaptarse a ese ecosistema artificial.

Este resultado apoyó la valoración hecha por otros autores de que las bacterias pueden permanecer latentes *in vitro*, sin producir crecimiento visible en el medio de cultivo, o síntomas en el tejido de las plantas porque requieren de nutrientes adicionales (George, 1993; Leifert *et al.*, 1994b). Además, coincidió con la observación frecuente de investigadores y productores que laboran en las biofábricas de que el crecimiento bacteriano se hace visible en el medio de cultivo de las plantas después de tres días (aproximadamente) de subcultivadas.

En la mayoría de los sistemas de cultivo *in vitro* la concentración inicial de nutrientes es muy alta pero decrece rápidamente por la actividad metabólica de los explantes (Leifert *et al.*, 1995) lo cual modifica las condiciones del medio de cultivo que le son adversas a las bacterias.

CONCLUSIONES

Se determinó que las concentraciones de sales MS y de sacarosa de los medios de cultivo para la multiplicación y el enraizamiento de las plantas *in vitro* de caña de azúcar var C87-51 tuvieron un efecto retardador del crecimiento de los contaminantes bacterianos.

REFERENCIAS

- Beattie, GA y Lindow SE (1995) The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu.Rev. Phytopathol.* 33: 145-172
- Falkiner, F (1997) Antibiotics in plant tissue culture and micropropagation what are we aiming at?. En: Cassells AC (Ed) *Pathogen and Microbial Contamination Management in micropropagation.* pp155-160. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Galinski E (1995) Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 37: 273-328
- García, L, Rodríguez M, Martínez Y, Sarría Z y Pichardo T (1999) Aplicación de la Biotecnología en los recursos genéticos de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Libro de Reportes Cortos. 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. Cuba. pp. 90-93. Santa Clara
- George, EF (1993) *Plant propagation by tissue culture.* Chapter 5, Part1. 2nd Ed., pp. 130-143. Exegetics Ltd
- Herman, EB (1996) *Microbial contaminations of plant tissue cultures.* Agritech Consultans, INC, SHRUB OAK
- Jiménez, E, García L, Suárez M y Alvarado Y (1997) Instructivo técnico para la micropropagación de la caña de azúcar. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara
- Jorgensen, JH, Cleeland R, Craig WA y Doem G (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, Villanova
- Kubota C y Tadokoro N (1999) Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. *Workshop on bioreactor technology. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35: 296-298
- Leifert, C y Waites WM (1992) Bacterial growth in plant tissue cultures media. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 460-466
- Leifert, C, Morris CE y Waites WM (1994b) 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- 183
- Leifert, C, Murphy K P y Lumsden PJ (1995) Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2): 83-109
- Leifert, C, Waites B, Keetley JW, Wright SM, Nicholas JR y Waites WM (1994a) Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in *Delphinium* tissue cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 149-155
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473- 497
- Thomas P (2004) A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. *Current Science* 87(1): 67:72