

## Empleo de Sulfato de gentamicina para el control de *Pantoea agglomerans*, contaminante de la multiplicación *in vitro* de *Solanum tuberosum* L cv. Desirée

Yelenys Alvarado-Capó\*, Nayanci Portal González, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Blanca Pérez  
\*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 yelenys@ibp.co.cu

### RESUMEN

La contaminación bacteriana es uno de los mayores problemas del cultivo de tejidos vegetales. El uso de sustancias antimicrobianas de origen sintético o natural ha devenido en alternativa para su solución. En la micropropagación de la papa (*Solanum tuberosum* L.) la contaminación bacteriana produce afectaciones cuantiosas. En este trabajo se evaluó el efecto del Sulfato de gentamicina en el control de un contaminante bacteriano de alta frecuencia de aparición. Se realizaron aislamientos, a partir del crecimiento del microorganismo sobre los medios de cultivo, en plantas *in vitro* de papa var. Desirée en fase de multiplicación. Para su identificación se emplearon pruebas tintoriales, fisiológicas y bioquímicas tradicionales así como el sistema de identificación de bacterias BIOLOG. Además, se determinó la mínima concentración inhibitoria (MCI) y la mínima concentración bactericida (MCB) del Sulfato de gentamicina frente a esta bacteria y se evaluó su efecto antimicrobiano y fitotóxico en la fase de multiplicación de las plantas *in vitro*. Se identificó como contaminante a *Pantoea agglomerans* y se comprobó que mostró sensibilidad al Sulfato de Gentamicina. La MCI del antibiótico fue de 0.625 mg.l<sup>-1</sup> mientras que la MCB fue de 1.25 mg.l<sup>-1</sup>. El mismo no produjo fitotoxicidad y controló la contaminación bacteriana en la micropropagación de la papa en fase de multiplicación en un 80% a una concentración de 2.5 mg.l<sup>-1</sup>.

Palabras clave: bacterias, contaminación microbiana, cultivo *in vitro*, papa

### ABSTRACT

Bacterial contamination is one of the principal problems of plant tissue culture. The use of natural or synthetic antimicrobial substances represent an alternative for it solution. In potato micropropagation bacterial contamination produce serious damages. In this paper the effect of Gentamicine sulfate on control of high frequently contaminant was evaluated. The microorganism was isolated from media culture of potato cv. Desirée *in vitro* plants in multiplication stage. Traditional tintorial, bioquematical and physiological test were performed for bacteria identification together with BIOLOG bacteria identification system. Besides, the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of Gentamicine sulfate were determined and it antimicrobial and phytotoxic effect in multiplication stage were evaluated too. *Pantoea agglomerans* was identified as potato contaminant and show sensibility to Gentamicine sulfate. The MIC was 0.625 mg.l<sup>-1</sup> and the MBC was 1.25 mg.l<sup>-1</sup>. The antibiotics controlled the contamination in the 80% of contaminated explants without phytotoxicity at 2.5 mg.l<sup>-1</sup>.

Key words: bacteria, *in vitro* culture, microbial contamination, potato

### INTRODUCCIÓN

La contaminación bacteriana es uno de los mayores problemas del cultivo de tejidos a escala comercial (Leifert y Cassell, 2001) ya que provoca cuantiosas pérdidas de material vegetal en los procesos productivos o de investigación. En la micropropagación de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es frecuente la presencia de contaminantes de diferentes especies (Everson *et al.*, 2003).

Los compuestos antimicrobianos pueden ser una alternativa para solucionar este problema si se tienen en cuenta aspectos tales como: que la contaminación en la población de plantas

cultivadas *in vitro* esté causada por un mismo microorganismo, que se realicen las pruebas de susceptibilidad y se determine la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI), la Mínima Concentración Bactericida (MCB) o la Mínima Concentración Fungicida (MCF) así como que se verifique su no fitotoxicidad (Alvarado-Capó, 2003).

Este trabajo se llevó a cabo teniendo en cuenta estas razones y con el objetivo evaluar el efecto antimicrobiano y fitotóxico del Sulfato de gentamicina aplicado en el cultivo *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) en fase de multiplicación para el control de un contaminante bacteriano de alta frecuencia de aparición.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Plantas *in vitro* de papa cv. 'Desirée' en fase de multiplicación sin contaminación visible en el medio de cultivo y contaminadas por bacterias (crecimiento uniforme, amarillento, brillante, alrededor de la base de los explantes).

### Aislamiento e identificación de los contaminantes bacterianos

Los contaminantes bacterianos fueron aislados por agotamiento por estrías al transferir crecimiento bacteriano con asa de platino a placas de Petri (Ø90 mm) con medio de cultivo Agar Nutriente (BIOCEN). Las placas se incubaron a 30 °C durante 24-72 h. Los aislamientos se purificaron por resiembra en Agar Nutriente y Agar Triptona Soya (BioCen) y se conservaron en tubos de ensayo a 4 °C. Posteriormente fueron examinadas microscópicamente y para su caracterización se tuvieron en cuenta los protocolos descritos por Lelliot y Stead (1987) y Klement *et al.* (1990). Como inóculos fueron usados cultivos crecidos sobre Agar Triptona Soya (BioCen) e incubados a 30 °C durante 24 h.

Después de la identificación preliminar, a las cepas se les realizaron pruebas descritas en los manuales tradicionales (Krieg y Holt, 1994). Como análisis complementarios se empleó el sistema de identificación de bacterias BIOLOG (BIOLOG Gram negative Microplates, Biolog, Inc.) que fue usado teniendo en cuenta las indicaciones de los fabricantes. Los resultados fueron leídos visualmente a las 4 y 24 horas y procesados mediante el software BIOLOG (Biolog MicroLog2 4.01B).

### Determinación de la Mínima Concentración inhibitoria (MCI) y la Mínima concentración bactericida (MCB) del Sulfato de gentamicina

A partir de ensayos preliminares mediante el método de difusión en disco se determinó la sensibilidad de este contaminante a diferentes antibióticos entre los cuales se seleccionó el Sulfato de Gentamicina.

La MCI se determinó por el método de dilución en caldo según el protocolo descrito por Jorgensen *et al.* (1993). Se emplearon concentraciones dobles decrecientes de Sulfato de gentamicina (SIGMA, solución 50 mg.ml<sup>-1</sup>) en medio de cultivo Caldo Mueller Hinton (BIOCEN). La MCB se definió al diseminar con espátula de Drigalski 0.1 ml de todos los tubos de ensayo sin crecimiento bacteriano aparente, en placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo Agar Mueller Hinton (BIOCEN).

La solución inicial del antibiótico se preparó a una concentración de 5 120 mg.l<sup>-1</sup> en agua bidestilada y desionizada y se esterilizó por filtración con membranas de policarbonato de 0.22 µm (Millipore).

### Determinación del efecto antibacteriano y fitotóxico del Sulfato de gentamicina en la multiplicación *in vitro* de la papa

En el medio de cultivo líquido para la multiplicación de papa compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962), tiamina 0.4 mg.l<sup>-1</sup>, mio-inositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 30g.l<sup>-1</sup>, pH 5.6), se incluyó el antibiótico en dos concentraciones (la mínima concentración bactericida y el doble de esta). En cada recipiente de cultivo se colocaron 10 explantes (segmento de tallo de aproximadamente 1cm con al menos una yema axilar). Incluyendo los controles que no contenían antibiótico (plantas libres de contaminantes con crecimiento visible sobre el medio de cultivo y plantas contaminadas), se ensayaron seis tratamientos, con 10 repeticiones cada uno (100 plantas *in vitro* por tratamiento). Los explantes subcultivados se colocaron en cámaras de crecimiento a una temperatura de 18 a 22 °C y luz artificial (aprox. 100 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad, por un período de 21 días. Diariamente se evaluó la manifestación de contaminación bacteriana a través de la turbidez detectada por observación visual de los frascos de cultivo que se confirmó por observación directa en un microscopio óptico (Olympus). Al final del período se cuantificó el número de yemas brotadas, se midió la altura (cm) de las plantas *in vitro* y se describieron las características fenotípicas de estas en cada tratamiento.

Aquellos recipientes de cultivo que no manifestaron turbidez se subcultivaron en medio de cultivo líquido para la multiplicación de papa sin antibióticos y se colocaron en condiciones de cultivo similares a las descritas anteriormente para observar la presencia de turbidez después de 21 días.

Los datos correspondientes al número de yemas brotadas y a la altura de las plantas *in vitro* se analizaron por medio de un ANOVA de clasificación simple y las diferencias entre las medias se procesaron a través de la prueba de rangos múltiples de Duncan, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

El procesamiento estadístico de los datos de las variables estudiadas se realizó con el paquete estadístico Statistic Package for Social Science (SPSS) versión 10.0 para Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento e identificación de los contaminantes bacterianos

Se identificó como contaminante de las plantas *in vitro* de papa en fase de multiplicación a *Pantoea agglomerans* (Tabla1). La cepa designada como CCIBP-Bas1 se incluyó en la colección de cultivos microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas (UCLV).

Tabla 1. Principales características de *Pantoea agglomerans* (CCIBP-Bas1), contaminante de plantas *in vitro* de papa cv. Desirée en fase de multiplicación.

Características	<i>Pantoea agglomerans</i>
Color de la colonia en AN	Amarillo
Motilidad	+
Catalasa	+
Hugh y Leifson	
oxidativo	-
fermentativo	+
alcalino	-
Oxidasa	-
Indol	-
Ureasa	-
Pigmento	
rojo	-
amarillo	+
Crecimiento en McConkey	+
Citrato de Simmons	+
Producción de H <sub>2</sub> S	-
Dihidrólisis de la arginina	-
Descarboxilación de la lisina	-
Acido de la Glucosa	+
Gas de la Glucosa	-
Hidrólisis del almidón	-
Formación de ácido de:	
Dulcitol	+
Inositol	+
Lactosa	+
Manitol	+
Rafinosa	+
Sorbitol	v
Sacarosa	+
Xilosa	+

v- reacción variable

Entre las características de esta especie se encuentran que es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, puede colonizar tejidos tanto de animales como de plantas (Krieg y Holt, 1986).

Savela y Uosukainen (1994) refieren a *Pantoea agglomerans* como contaminante del 56.0% de los explantes de manzano (*Malus pumila*) en la Fase de Establecimiento. Asimismo, de 33 cepas obtenidas por Cassells y Tahmatsidou (1996) como

contaminantes de *Hydrangea* e identificadas como pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, 11 correspondieron a esta especie.

Igualmente, Asis y Adachi (2004) informaron sobre la presencia de *Pantoea agglomerans* como un endofito diazotrofo en tallos de plantas de boniato (*Ipomoea batata*) cv. Koganesengan.

Otros contaminantes han sido identificados en la fase de multiplicación de la micropropagación de la papa.

Por ejemplo, Everson *et al.* (2003) encontraron a miembros de las familias *Acetobacteriaceae* y *Enterobacteriaceae* así como los géneros *Corynebacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

#### Determinación de la Mínima Concentración inhibitoria (MCI) y la Mínima concentración bactericida (MCB)

Se comprobó que *Pantoea agglomerans* CCIBP-Bas1 mostró sensibilidad al Sulfato de Gentamicina y que la MCI fue de 0.625 mg.l<sup>-1</sup> mientras que la MCB fue de 1.25 mg.l<sup>-1</sup>.

Estos resultados coincidieron con los referidos por Reed *et al.* (1997) para el control de contaminantes bacterianos del cultivo de tejidos de avellano (*Corylus avellana* L.) donde encontraron que el Sulfato de Gentamicina fue el más efectivo pues inhibió el crecimiento de aproximadamente la mitad de las cepas a concentraciones por debajo de 6.25 mg.l<sup>-1</sup>.

Otros antibióticos tales como Estreptomocina, Ampicilina, Cloranfenicol y Tetraciclina en concentraciones entre 32 y 256 mg.l<sup>-1</sup> (MCI) se refieren con buenos resultados en la inhibición del crecimiento de otros contaminantes bacterianos de papa (cv. Astrid, Baronesa y Eliza) (Everson y de Lucas, 2003).

#### Determinación del efecto antibacteriano y fitotóxico del Sulfato de Gentamicina en la multiplicación *in vitro* de la papa

El Sulfato de Gentamicina a las concentraciones ensayadas no produjo fitotoxicidad cuando fue añadido al medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de *Solanum tuberosum* cv. 'Desirée' (Tabla 2) y controló la contaminación bacteriana en un 80% a la concentración de 2.5 mg.l<sup>-1</sup> después de 21 días de cultivo (Figura 1). Cuando fueron subcultivados los explantes a medio de cultivo sin antibiótico, no se observó al final del período de incubación turbidez visible ni células bacterianas en observación al microscopio óptico lo que indicó la efectividad del antibiótico.

Tabla 2. Efecto del Sulfato de Gentamicina aplicado en el medio de cultivo para la multiplicación de plantas *in vitro* de papa cv. 'Desirée'.

Sulfato de Gentamicina (mg.l <sup>-1</sup> )	Número de yemas brotadas por recipiente de cultivo	Altura de las plantas <i>in vitro</i> (cm)
Plantas <i>in vitro</i> sin contaminación visible		
1.25	9.40 a	5.23
2.5	8.75 ab	5.31
0	9.22 a	5.25
Plantas <i>in vitro</i> contaminadas		
1.25	8.50 b	4.85
2.5	8.00 bc	4.76
0	7.30 c	4.95

Medias con letras no comunes difieren según la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

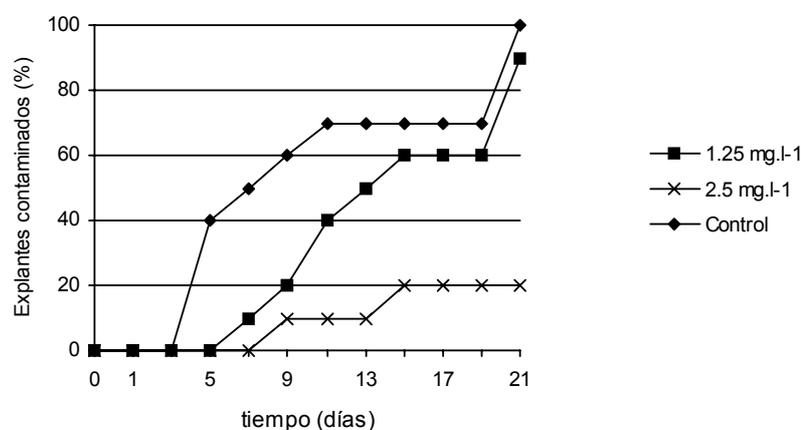


Figura 1. Control de la contaminación por *Pantoea agglomerans* en plantas *in vitro* de papa cv. 'Desirée' en fase de multiplicación por la inclusión de Sulfato de Gentamicina en el medio de cultivo.

En el resto de las evaluaciones fenotípicas efectuadas se observó que no aparecieron manifestaciones de clorosis, necrosis ni albinismo en las plantas brotadas, de forma similar al control sin contaminación visible. A diferencia de esto el control contaminado mostró clorosis y necrosis de la hoja basal, disminución del tamaño de las hojas y numerosas raíces aéreas.

La concentración del antibiótico que se puede añadir al medio de cultivo para el tratamiento de los tejidos vegetales contaminados está limitada únicamente por el efecto fitotóxico que este pueda ejercer y depende de la forma de aplicación, el genotipo, el tipo de tejido, etc. Conocer la MCB permite definir la estrategia de trabajo para su uso (George, 1993). En este caso los mejores resultados se alcanzaron con doble de la MCB (2.50 mg.l<sup>-1</sup>).

De forma general el éxito de la aplicación de antibióticos en el cultivo *in vitro* varía según los criterios, tipo y métodos de aplicación, concentración de microorganismos, etc., y depende en gran medida del desarrollo de un buen protocolo (Barrett y Cassells, 1994).

En el caso del Sulfato de Gentamicina, Díaz *et al.* (1998) lo emplearon en concentraciones de 10.0; 30.0 y 50.0 mg.l<sup>-1</sup> para el tratamiento de plantas *in vitro* de caña de azúcar y lograron mantenerlas libres de contaminantes visibles aunque a las concentraciones más altas encontraron fitotoxicidad.

Everson y de Luces (2003) informaron que solo Ampicilina no afectó la supervivencia y el desarrollo normal de plantas *in vitro* de papa cv. Baronesa contaminadas con bacterias, cuando fue aplicada al medio de cultivo y la recomendaron para la descontaminación. Sin embargo, el Cloranfenicol, la Tetraciclina y la Estreptomina produjeron efectos fitotóxicos severos en el crecimiento y el coeficiente de multiplicación.

## CONCLUSIONES

Se identificó a *Pantoea agglomerans* como contaminante de la fase de multiplicación de la micropropagación de la papa. El mismo pudo ser controlado en un 80% de los explantes contaminados por la aplicación de Sulfato de gentamicina a una concentración de 2.5 mg.l<sup>-1</sup> que no resultó fitotóxica.

## 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 de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Santa Clara
- Asis CA, Adachi K (2004) Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. Letters in Applied Microbiology 38 (1): 19-23
- Barrett, C, Cassells A (1994) An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelagonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. 'Grand Slam' explants *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 169-175
- Cassells, AC, Tahmatsidou V (1996) The influence of local plant growth conditions on non-fastidious bacterial contamination of meristem-tips of *Hydrangea* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47:15-26
- Díaz, P, Niubó, E, Simón M, Oliva O, Korneva S y Sánchez C (1998) Cultivo axénico de la caña de azúcar. Informe final del Proyecto CITMA Cod. 0300018. CENIC. Cuba
- Everson J, de Luces Fortes NR (2003) Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido. Pesq. agropec. bras. 38 (11):1273-1279
- Everson J, Turino ML, de Luces Fortes NR (2003) Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. Pesq. agropec. bras. 38 (7): 827-834
- George, EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part1. 2nd Ed., pp. 130-143. Exegetics Ltd. New York
- Jorgensen, JH, Cleeland R, Craig WA y Doern 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
- Klement, Z, Rudolph K, Sands DC (Eds.) (1990) Methods in phytobacteriology. Akademiai Kiado. Budapest
- Krieg, NR, Holt JG (1986) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th Edition. Vol. II. Williams and Wilkins. Baltimore
- Leifert, C, Cassells AC (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant 37(2): 133-138
- Lelliott, RA, Stead DE (1987) Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plant. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473- 497
- Reed, BM, Mentzer J, Tanprasert P, Yu X (1997) Internal bacteria contamination of micropropagated hazelnut identification and antibiotics treatment. En: Cassells AC (Ed) Pathogen and Microbial Contamination Management in micropropagation, pp. 169-174. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht