

***Bacillus subtilis*, contaminante bacteriano en la micropropagación de bananos (cv. FHIA-18, AAAB)**

Daymí Carrazana(1), Lidcay Herrera(1), Carlos M. Franco(2), Milagros García(3), María Soledad Delgado(3), Nieves Ramos(4)

- (1) Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Facultad de Química-Farmacía, carretera a Camajuaní, km 5 ½, CP 20 400, Santa Clara, Cuba.
- (2) Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, Facultad de Veterinaria, Avda. Carballo Calero, s/n., CP 27 002, Lugo, España.
- (3) Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Centro de Bioactivos Químicos, carretera a Camajuaní, km 5 ½, CP 20 400, Santa Clara, Cuba.
- (4) Biofábrica de Villa Clara, Carretera a Malezas km 1 ½, CP 20 400, Santa Clara, Cuba.

E-mail: daymic@uclv.edu.cu

RESUMEN: En la Biofábrica de Villa Clara se presentó una contaminación en la etapa de multiplicación que ocasionaba la muerte de las plantas “*in vitro*”. A partir de frascos con banano (cv. FHIA-18) se aisló y posteriormente se identificó, mediante kits bioquímicos comerciales y técnicas moleculares, a *Bacillus subtilis* y se determinó por el método de microdilución en tubos que la Concentración Mínima Inhibitoria del G-1 (principio activo del vitrofural) fue de 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente a la forma vegetativa y de 64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente a las endosporas de la bacteria. El análisis microbiológico de los frascos de cultivo y tapas desinfectados listos para la dispensación del medio de cultivo arrojó que el 76,66 % y el 56,33 %, respectivamente, presentaban contaminación bacteriana en su superficie interna. De esta, el 69,56 % en el primer caso y el 68,75 % en el segundo, pertenecían al género *Bacillus*. En el período evaluado el agua empleada en la elaboración del medio de cultivo no fue la fuente de entrada de *Bacillus* spp. al proceso de micropropagación. Considerando que la dosis de G-1 empleada como esterilizante químico fue de 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se explica la elevada incidencia de esta contaminación. Se recomienda el cuidadoso lavado y desinfección de los frascos y tapas contaminados para eliminarla.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, micropropagación, plantas “*in vitro*”, vitrofural, G-1

ABSTRACT: In the Biofactory of Villa Clara a high level of contamination caused the death of several “*in vitro*” plants of the banana variety FHIA-18. From these plantlets was isolated and identified the bacteria *Bacillus subtilis* by means of biochemical kits and molecular techniques. The MIC of the G-1 (active principle of vitrofural) was determined by microdilution in tubes, with a value of 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against the vegetative form and 64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for the endospore. The microbiological analyze of the culture flasks showed a 76,66 % of contamination in the inner site and 56,33 % in the tops, and among these microorganisms the 69,56% and the 68,79 % belonged to the genus *Bacillus*. The water employed to the preparation of the culture media showed no contamination with *Bacillus* spp. The dosage of the G-1 employed to disinfection (35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was no effective to avoid the microbial contamination. It recommended an efficient and carefully disinfection of the culture flasks and tops in order to avoid this contamination.

Key words: *Bacillus subtilis*, micropropagation, “*in vitro*” plants, vitrofural, G-1

INTRODUCCION

El medio de cultivo de tejidos vegetales es una excelente fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos, cuya presencia trae como resultado, generalmente, un incremento en la mortalidad de los tejidos, reducción del coeficiente de multiplicación y del enraizamiento de la planta “*in vitro*” (Kane, 2003).

En las Biofábricas comerciales cubanas pertenecientes al Ministerio de la Agricultura se micropropagan fundamentalmente plátanos y bananos (*Musa* spp.), siendo la contaminación bacteriana y fúngica una de las principales causas de pérdida de material vegetal. De forma general se concede mucha importancia a los hongos y muy poca a las bacterias.

En la Biofábrica de Villa Clara se presentó una problemática de contaminación debido a la aparición frecuente en la etapa de multiplicación de colonias en forma de “perla” o “lenteja” (según denominación del personal técnico de la misma), dentro del medio de cultivo que llegaba a cubrir totalmente su superficie, provocando clorosis y necrosis del tejido y finalmente la muerte de las plantas “in vitro” de bananos (cv. FHIA-18).

Con vistas a estudiar la situación referida se trazaron los objetivos siguientes: Aislar e identificar el contaminante microbiano, realizar el análisis microbiológico de los frascos de cultivo y tapas desinfectados listos para la dispensación del medio de cultivo y el agua empleada en su preparación, y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del G-1 (principio activo del vitrofural) frente a la forma vegetativa y las endosporas del contaminante aislado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron cuatro frascos de cultivo con plantas “in vitro” de banano (cv. FHIA-18) en la etapa de multiplicación que presentaban las colonias de agentes contaminantes descritas en la introducción. Se aisló, en todos los casos, una bacteria a la que se le realizaron extensiones fijadas y teñidas con tinción simple con violeta cristal, tinción diferencial de Gram y tinción especial de endosporas con verde malaquita y safranina. Las observaciones microscópicas se realizaron en microscopio óptico de campo claro (Olimpus-Vanox) a 1000 y 2000 x.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se tomó un aislado representativo de este contaminante y se envió al Laboratorio de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela (España) para su identificación mediante el empleo de kits bioquímicos comerciales (API CH 50 (estudio del empleo de 50 carbohidratos) + API 20 E (este último de forma complementaria), comercializados ambos por BioMerieux (Francia). Para

definir la especie se realizó la secuenciación de la subunidad 16S del ARN ribosomal bacteriano.

Con el objetivo de realizar el análisis microbiológico de los frascos de cultivo y tapas listos para la dispensación de medio de cultivo se llevó a cabo un muestreo en el flujo laminar por hisopado de la superficie interna de 30 frascos y 30 tapas listas para la dispensación del medio de cultivo. Los aplicadores con algodón fueron colocados en tubos de ensayo con caldo nutriente y se incubaron a 32 °C durante 48 horas. Los frascos y tapas fueron tomados en seis grupos de cinco, pertenecientes a diferentes lotes preparados durante 15 días.

Teniendo en consideración que una situación similar a la descrita se presentó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba, donde se determinó que la fuente de entrada del microorganismo aislado (*Bacillus* sp.) fue el agua empleada en la preparación de los medios de cultivo (Mirabal, 2005), se evaluó la misma. Para ello se tomaron en frascos de vidrio estériles, 10 muestras del agua empleada en la preparación del medio de cultivo, pertenecientes a lotes preparados durante 10 días, y se adicionaron 10 mL de agua de cada uno de estos a tubos de ensayo que contenían caldo nutriente, los cuales fueron incubados en las condiciones descritas con anterioridad.

En caso de presentarse turbidez en los tubos incubados se procedió al aislamiento de cultivos puros por diseminación en placas de Petri con agar nutriente mantenidas a 32 °C durante 72 horas. A los aislados bacterianos obtenidos se le realizaron extensiones fijadas y teñidas con tinción simple con violeta cristal y tinción diferencial de Gram para su posterior observación microscópica.

Con vistas a evaluar la susceptibilidad “in vitro” del aislado microbiano al G-1 (principio activo del vitrofural) se aplicó un método de microdilución en tubos frente al G-1, tomando como inóculo una suspensión de endosporas del aislado en un caso y en el otro un cultivo joven en fase de crecimiento exponencial (presencia de la forma vegetativa de la bacteria), y se

evaluó la efectividad de este esterilizante químico frente a ambas formas del contaminante bacteriano aislado. Para ello se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de acuerdo a los criterios de los documentos de las Normas de Procedimientos Estandar de Laboratorio (NCCLS, 1997).

La sustancia de ensayo fue el producto 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1) principio activo del vitrofural, del lote 02-3-93 con una pureza mayor o igual al 98 %, sintetizada en la Planta de Producción del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV). Se utilizó como solvente polietilenglicol 400 de calidad farmacéutica. La concentración final de G-1 fluctuó desde 128 a 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cuatro aislados bacterianos obtenidos presentaron idénticas características culturales en agar nutriente, formando colonias ligeramente mucoides de color crema. Los mismos eran bacilos Gram positivos con endospora elipsoidal central.

El resultado de la identificación muestra que la cepa puede ser *Bacillus subtilis* o *Bacillus amyloliquefaciens* con un predominante índice de afinidad de 64 % para el primero. La secuenciación del ARN ribosomal dio como resultado que el contaminante era *Bacillus subtilis*.

En 23 de los 30 frascos muestreados se aislaron contaminantes bacterianos (76,66 %), los cuales fueron detectados en todos los grupos analizados. Del total, cinco cepas fueron cocos Gram positivos (21,74 %), dos, bacilos Gram negativos (8,70 %), y 16, bacilos Gram positivos formadores de endospora elipsoidal central (69,56 %).

En 16 de las 30 tapas muestreadas se aislaron contaminantes bacterianos (56,33 %), siendo detectados en todos los grupos analizados. Del total, dos cepas fueron cocos Gram positivos

(12,50 %), tres bacilos Gram negativos (18,75 %) y 11 bacilos Gram positivos formadores de endospora elipsoidal central (68,75 %).

De las diez muestras de agua analizadas se aislaron contaminantes bacterianos en tres (30 %). Los mismos eran bacilos cortos Gram negativos.

Teniendo en cuenta la correspondencia de las características morfológicas de las colonias del contaminante visualizado con elevada frecuencia durante la multiplicación de diferentes especies vegetales en la Biofábrica de Villa Clara con las del aislado identificado en este estudio, puede inferirse que se trata de *Bacillus subtilis*. En el período analizado no parece ser el agua empleada en la preparación de los medios de cultivo la fuente de entrada del mismo. Esto no significa que con anterioridad esta bacteria no haya penetrado en el proceso de micropropagación por esta vía, del mismo modo que pudo provenir del ambiente del laboratorio, ya que miembros de este género son considerados tradicionalmente contaminantes introducidos como resultado de prácticas de laboratorio deficientes. De hecho, en un Sistema de Control de la Calidad basado en Puntos de Control Críticos *Bacillus* spp. son microorganismos indicadores en la etapa de preparación del medio de cultivo (Leifert y Waites, 1993). El material vegetal tomado como material de iniciación también pudo portar a este microorganismo endógenamente ya que hay autores que refieren a explantes de diversas especies de plantas como la vía de entrada de *Bacillus* spp. (Leifert y Waites, 1990; Mc Inroy y Kloepper, 1994 a y b; Van den houwe, 1998; Moutia y Dookun, 1999; Thomas, 2004).

Se determinó que la CMI del G-1 es de 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente a la forma vegetativa y de 64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente a las endosporas de la cepa de *Bacillus subtilis* aislada.

El G-1 es susceptible a la degradación por la acción de la luz solar y se conoce que a partir del cuarto día de dispensado su concentración comienza a descender. Si se tiene en cuenta que la CMI del G-1 frente al contaminante estudiado

es de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a la forma vegetativa y de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a una suspensión de endosporas, y que la dosis empleada en las biofábricas del país es de $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pudiera explicarse la elevada incidencia de esta contaminación, principalmente si el proceso de lavado y desinfección de los frascos y tapas contaminados no es altamente eficiente.

Debe señalarse que los contaminantes pertenecientes al género *Bacillus* son muy difíciles de eliminar debido a la elevada resistencia de sus endosporas y, en ocasiones, las formas vegetativas a diferentes tratamientos. Las endosporas son capaces de sobrevivir a temperaturas de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ o más, siendo además muy resistentes a biocidas, tales como: alcohol, hipoclorito y bicloruro de mercurio (Kunemann y Faaij-Groenen, 1988; Weber y otros, 2003). Como dato sorprendentemente curioso, investigadores del Centro Ames de la NASA (National Aeronautics and Space Administration) probaron que endosporas de *Bacillus subtilis* serían capaces de sobrevivir ante el impacto de un meteorito (Karmine, 2005).

Las endosporas de *Bacillus* spp. pueden sobrevivir al autoclaveo del medio, fundamentalmente en laboratorios que colocan el medio de cultivo en frascos de vidrio o plásticos antes del autoclaveo y en el alcohol empleado para la desinfección de los instrumentos usados en el subcultivo de las plantas “*in vitro*” (Boxus y Terzi, 1987). Si los

instrumentos no son esterilizados térmicamente el tiempo suficiente, luego de sumergirlos en el alcohol, las endosporas de *Bacillus* spp. pueden dispersarse a cultivos “limpios” (Singha y otros, 1987). A partir de los frascos de cultivo y tapas se aislaron cocos Gram positivos los cuales usualmente son habitantes normales de la piel de las manos e indicativos de fallas de asepsia durante la preparación de los frascos de cultivo y bacilos Gram negativos, cuya entrada en el proceso puede ser tanto endógena como ambiental (Thomas, 2004; Leifert y Waites, 1994).

En el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Holt *et al.*, 1994), se muestran las características de los géneros de bacilos y cocos Gram positivos formadores de endospora: *Amphibacillus*, *Oscillospira*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporohalobacter*, *Sulfobacillus* y *Syntrophosphora*, los cuales se descartan, por no coincidir sus características morfológicas y/o fisiológicas con las de las cepas de bacilos Gram positivos formadores de endospora elipsoidal central aisladas de los frascos de cultivo, perteneciendo las mismas al género *Bacillus*.

Según lo comentado con anterioridad es recomendable un cuidadoso lavado y desinfección de los frascos y tapas, antes de reinsertarlos en el proceso de micropropagación con vistas a propiciar la eliminación de las posibles endosporas de *Bacillus subtilis* presentes.

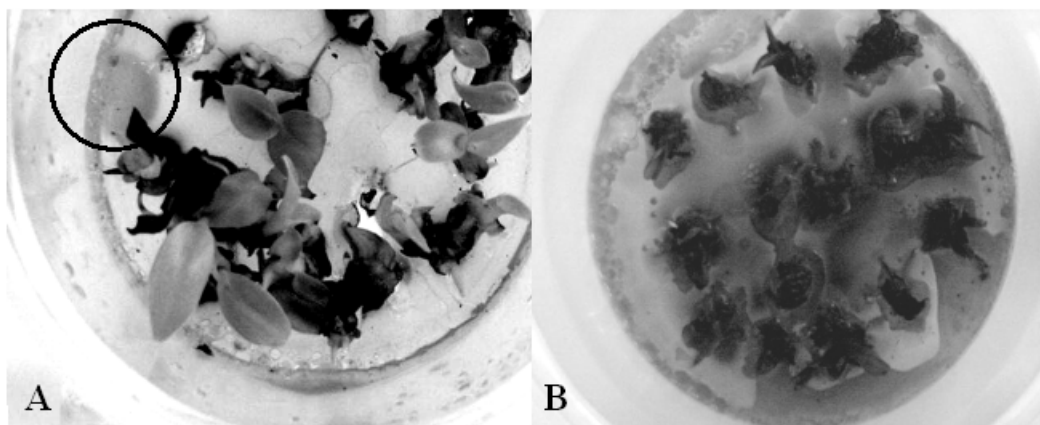


Figura.1. A) Colonia en forma de “perla” (*Bacillus subtilis*) presente en la etapa de multiplicación de bananos (cv.FHIA-18, AAAB).
B) Oscurecimiento del medio de cultivo y necrosis total de las plantas “*in vitro*” por la acción de *Bacillus subtilis*.

CONCLUSIONES

1. *Bacillus subtilis* es un contaminante bacteriano presente en la multiplicación de bananos (cv. FHIA-18) que aparece como colonias en forma de “perla” o “lenteja” dentro del medio de cultivo llegando a cubrir su superficie y ocasionando la muerte de las plantas *in vitro*.
2. La Concentración Mínima Inhibitoria del G-1 (principio activo del vitrofural) es de 32 µg.mL⁻¹ frente a la forma vegetativa y de 64 µg.mL⁻¹ frente a las endosporas del aislado de *Bacillus subtilis* identificado en este estudio.
3. El 76,66 % de los frascos listos para la dispensación de medio de cultivo analizados microbiológicamente presentó contaminación bacteriana en su superficie interna, de la cual el 69,56 % fueron *Bacillus* spp. El 56,33 % de las tapas presentó contaminación bacteriana correspondiendo el 68,75 % al género *Bacillus*. En el período evaluado el agua empleada para la elaboración del medio de cultivo no fue la fuente de entrada de *Bacillus* spp. al proceso de micropropagación.

BIBLIOGRAFÍA

- Kane, M. (2003): Bacterial And Fungal Indexing Of Tissue Cultures. En sitio web: <http://www.hos.ufl.edu/mooreweb/TissueCulture/class1/Bacterial%20and%20fungal%20indexing%20of%20cultures.doc>, Consultado abril, 2005.
- Mirabal, D. (2005): Comunicación Personal: Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba.
- NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test (NCCLS). Document M7-63, Villanova, Pennsylvania.
- Leifert, C.; C. E. Morris and W. M. Waites (1994): “Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plant: reason for contamination problems *in vitro*”. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 139 –183.
- Leifert, C and W. M. Waites (1993): Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points. En: *Physiology, Growth and Development of Plant in Culture*, pp 278-283, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- _____ (1990): “Contaminants of plant tissue culture”. *Int. Assoc. Plant. Tissue Cult. Newslett.* 60: 2-13
- Mc Inroy, J. A. and J. W. Kloepper (1994): Novel bacteria taxa inhabiting internal tissue of sweet corn and cotton En: Pudjer M.H., Stephens P.M. Bowen G.D. (Eds) *Improving plant productivity with ryzosphere bacteria*. CSIRO, pp. 190-199, Australia.
- _____ (1994): “Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de ápices caulinares de banano (*Musa AAA*)”. *Fitopatología Venezolana* 7(1): 14-17.
- Van den Houwe, I (1998). Elimination of endophytic bacteria from banana tissue cultures. *Annual Report INIBAP*, pp. 12
- Moutia, M. and A. Dookun (1999): “Evaluation of surface sterilization and hot water treatment on bacterial contaminants in bud culture of sugar cane”. *Expl. Agric.* 35: 265-274
- Thomas, P. (2004): “A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures”. *Current Science*, (87(1).
- _____ (2004): “Isolation of *Bacillus pumilus* from *in vitro* grapes as a long-term alcohol-surviving and rizhogenesis inducing covert endophyte”. *J. Appl. Microbiol.* 97: 114-123.
- Kunnemann, B. D. A. and G. P. M. Faaij-Groenen (1988): “Elimination of bacterial contaminants a matter of detection and transplanting procedures”. *Acta Hort.* 225: 183-189.
- Weber, D.J.; E. Sickbert-Bennett; M. F. Gergen and W. A. Rutala (2003): “Efficacy of selected hand hygiene agents used to remove *Bacillus atrophaeus* (a surrogate of *Bacillus anthracis*) from contaminated hands”. *The Journal of the American Medical Association*, 289(10).
- Karmine, T. H.; P. Fajardo-Cavazos and W. Nicholson (2005): Survivability of *Bacillus subtilis* spores after impact mediated ejection from e planet. *American*

Society for Gravitational and Space Biology, Twenty-first Annual meeting, nov. 1-4.

Boxus, P. H. and J. M. Terzi (1987): "Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation scheme". *Acta Hort* 212: 91-93.

Singha, S.; G. K. Bivssonette and M. L. Double (1987): "Methods for sterilizing instruments contaminated with *Bacillus* sp. from plant tissue cultures". *Hort. Sci.* 22: 659.

Holt, J. G.; N. R. Krieg, P. H. A. Sneath *et al.* (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9na ed. Williams and Wilkins. Baltimore, USA, 787 pp.

Recibido: 09/03/2006

Aceptado: 25/05/2006

UCLV
1956 - 2006

50 Aniversario
Jardín Botánico de Villa Clara

Carretera a Camajuaní km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, CP 54830, CUBA
Telf.: 2 1 1861
anoa@uclv.edu.cu