

NOTA TÉCNICA

PREPARACIÓN DE AGAR A PARTIR DE MOSTO DE DESTILERÍA Y HARINA DE SOYA PARA DETECTAR CONTAMINANTES MICROBIANOS EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Misterbino Borges¹, Joel Vázquez² y Aracelis Rodríguez²

RESUMEN

La detección temprana de la contaminación es esencial para prevenir pérdidas y lograr el éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la complementación del agar mosto de destilería (AMD) al 40 % con harina de soya (HS), para su uso más eficiente en la detección de contaminantes microbianos en el ambiente del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales a través del conteo total de microorganismos. Se establecieron los siguientes medios de cultivos para la detección de contaminantes bacterianos: 1) AMD al 40 %; 2) AMD al 40 % + 10 g/L de HS; 3) AMD al 40 % + 20 g/L de HS 4) agar nutriente (control) y para la detección de contaminantes fúngicos: 1) AMD al 40 %; 2) AMD al 40 % + 10 g/L de HS y 3) agar de dextrosa papa (control). Los resultados demostraron que el AMD al 40 % + 10 g/L de HS puede sustituir significativamente el agar dextrosa papa en la detección de contaminantes fúngicos y que el AMD al 40 % + 20 g/L de HS puede ser utilizado alternativamente por el medio agar nutriente para la detección de contaminantes bacterianos.

Palabras clave adicionales: Medio de cultivo, hongos, bacterias, agar nutriente

ABSTRACT

Agar preparation from distillery must and soybean meal for microbial contaminant detection in plant tissue culture environment

The early detection of the microbial contamination is essential to prevent losses and successfully achieve a plant propagation process by biotechnology. In the present experiment the complementary effect of the distillery must agar (DMA) at 40 % with soybean meal (SM) for efficient detection of microbial contaminants in the environment of plant tissue culture evaluated. The following combinations were used to detect bacterial contaminant detection: DMA at 40%; DMA at 40 % + 10 g/L SM; DMA at 40 % + 20 g/L SM, and nutrient agar (control); and for fungus contaminant: DMA at 40 %; DMA at 40 % + 10 g/L SM, and potato dextrose agar (control). The results showed that DMA at 40 % + 10 g/L SM can substitute significantly potato dextrose agar for fungi contaminant detection, and DMA at 40 % + 20 g/L SM may be used alternatively instead of nutrient agar for bacterial contaminant detection.

Additional key words: Culture medium, fungi, bacteria, nutrient agar

INTRODUCCIÓN

Las fuentes de contaminación de los cultivos usualmente son difíciles de determinar (Leifert y Waites, 1994). Los microorganismos contaminantes de los cultivos vegetales pueden originarse de los explantes, ambiente del laboratorio, operadores, insectos o de una técnica de esterilización inefectiva (Reed y Tanprasert, 1995).

Desde hace algunos años la detección de contaminantes en el proceso biotecnológico de propagación de vitroplantas en la mayoría de los centros de investigación y/o producción en Cuba se ha dificultado por la carencia de los medios de cultivo necesarios tales como agar dextrosa papa (hongos y levaduras) y agar nutriente (bacterias). Sin embargo, el mosto de destilería constituye un residual de gran interés, debido a que su vertimiento en el mar, los ríos, las presas y las

Recibido: Septiembre 12, 2002

Aceptado: Julio 11, 2003

¹ Universidad de Granma. Apdo. 21, Bayamo CP 85 100, Granma, Cuba. email: borges@udg.co.cu

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov" GP 2140, Bayamo 85 100, Cuba.

cuenas subterráneas, hacen que sea considerado uno de los contaminantes más importantes del país (Lara et al., 1994). Por otro lado, si no es aprovechado adecuadamente, pueden perderse grandes cantidades de nutrientes factibles para ser usados como sustrato, principalmente en la producción de proteína unicelular por vía fermentativa (Gómez y Romano, 1987), propagación masiva de biopreparados agrícolas de hongos entomopatógenos (Borges et al., 1997a) y detección de contaminantes bacterianos en el ambiente de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Vásquez et al., 1999). También este residual diluido al 40 % en agua ha sido suplementado con harina de soya (5 g/L) y cascarilla de café (20 g/L) para su aprovechamiento más eficiente en la producción masiva de hongos entomopatógenos (Borges et al., 1997b). Teniendo en cuenta lo antes expuesto el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de la complementación del agar mosto de destilería al 40 % con harina de soya para su utilización más efectiva como medio de cultivo en la detección de contaminantes microbianos en el ambiente de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recogió mosto procedente de la destilería de alcohol del complejo agroindustrial "Arquímides Colina" del municipio Bayamo, Cuba, directamente de la columna de destilación, a una temperatura de 96-100 °C en recipientes de vidrio de 20 L de capacidad, cerrados hasta su uso.

Medio de cultivo para bacterias y hongos

El mosto se diluyó en agua destilada hasta el 40% que corresponde al óptimo para el cultivo de bacterias (Vásquez et al., 1999) y hongos (Borges et al., 1997a). Para ser usado como medio de cultivo para bacterias se prepararon los siguientes tratamientos: mosto de destilería al 40% + agar 6 g/L (AMD al 40 %); AMD al 40% + harina de soya 10 g/L; AMD al 40% + harina de soya 20 g/L y agar nutriente como control, se ajustaron a pH 7, se esterilizaron a 121 °C durante 25 min y se vertieron en placas Petri de 20x100 mm. Como medio para hongos se utilizó AMD al 40%, AMD al 40% + harina de soya 10 g/L y agar dextrosa papa como control. Los medios se ajustaron a pH 5,6 y se procedió como en el caso anterior.

Determinación de los contaminantes microbianos

La detección de contaminantes se determinó mediante la colocación aleatoria (en las áreas asépticas del cultivo *in vitro*) de las placas Petri destapadas durante 10 min, las cuales contenían las diferentes variantes del medio de cultivo. Posteriormente se transfirieron a una incubadora a la temperatura de 30 °C donde al cabo de 24 y 72h se determinaron los contaminantes bacterianos y fúngicos, respectivamente, mediante el conteo de colonias. Todos los ensayos se realizaron según la metodología descrita por el Ministerio de la Agricultura de Cuba (MINAGRI, 1992) para la realización del control ambiental microbiológico en las áreas sépticas del cultivo de tejidos vegetales.

Análisis estadístico

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 30 repeticiones por cada tratamiento. Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple para determinar el efecto de los tratamientos. Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para probar el requisito de normalidad de los datos. Los datos fueron transformados por raíz cuadrada y se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para la comparación de las medias. Todos los análisis se realizaron con el paquete StatSoft (versión 4.2, Tulsa, Oklahoma).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de contaminantes bacterianos

El efecto de los diferentes medios de cultivo evaluados en la detección de contaminantes bacterianos se muestra en el Cuadro 1 donde los mejores resultados se encuentran en el mosto al 40% suplementado con 20 g/L de harina de soya (HS) y en el medio agar nutriente (control) los cuales difieren significativamente ($P \leq 0,05$) del resto de las variantes estudiadas. Esto, por una parte, parece reflejar el efecto de las proteínas, aminoácidos y vitaminas de la HS (Pérez, 1991), y por la otra, a los nutrientes aportados por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presente en alta concentración en el mosto de destilería (Borges et al., 1997a), representados por proteínas, aminoácidos y vitaminas del complejo B (Ipagleca, 1990) que desempeñan un papel importante en el desarrollo bacteriano. Resultados

semejantes fueron obtenidos por Borges et al. (1997b), quienes demostraron el incremento de la calidad nutritiva del mosto de destilería al 40 % con la complementación de 5 g/L de HS y 20 g/L de cascarilla de café para la producción más efectiva de biopreparados agrícolas.

Cuadro 1. Influencia de los medios de cultivo en la detección de contaminantes bacterianos.

Tratamientos	Número de colonias/placa
AMD 40%	2,0 c
AMD 40% + HS 10 g/L	2,4 b
AMD 40% + HS 20 g/L	3,4 a
Agar nutriente	3,3 a
SD = 0,09	

AMD: agar mosto de destilería; HS: harina de soya
Tratamientos con letras distintas difieren significativamente para $P \leq 0,05$ según la prueba de Duncan.

Detección de contaminantes fúngicos

La influencia de los distintos medios estudiados en la detección de contaminantes fúngicos se ilustra en el Cuadro 2 donde el tratamiento con 10 g/L de HS difiere significativamente ($P \leq 0,05$) del resto de las variantes evaluadas, lo que evidencia el efecto importante de la suplementación del AMD con HS sobre la estimulación del crecimiento, desarrollo y detección de los hongos contaminantes en el ambiente de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Estos resultados son similares a los alcanzados por Borges et al. (1997b) con la utilización del mosto de destilería al 40 % suplementado con 5 g/L de HS y 20 g/L de cascarilla de café para su utilización más eficiente en la producción masiva de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* y *Verticillium lecanii* donde demostraron un efecto favorable de la suplementación del mosto de destilería sobre el crecimiento, desarrollo y estimulación de la esporulación de los biopreparados estudiados, mostrando valores superiores al medio tradicional. Por otra parte, Pandit y Sam (1988) obtuvieron un buen crecimiento y desarrollo de *B. bassiana* en medios sintéticos, semisintéticos y naturales, donde el medio que contenía harina de soya fue el más adecuado debido a que permitió un rápido crecimiento y esporulación, aspecto esencial para la reproducción masiva de este hongo, además de la fácil disponibilidad de este componente natural.

Estos medios de cultivos permiten determinar la concentración de contaminantes microbianos en el ambiente del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y las fuentes de contaminación, aspectos vitales para reducir las pérdidas y lograr la eficiencia del proceso biotecnológico, confirmando lo planteado por Acosta et al. (1999) quienes señalan que son una valiosa herramienta de trabajo que permite determinar las fuentes de contaminación y diseñar un programa de medidas para su control y prevención. Por otro lado, Alvarado (1998) señala que el conocimiento de los microorganismos contaminantes, de las fuentes que lo introducen al cultivo *in vitro* y de los factores de riesgo, así como la aplicación de métodos para prevenir, detectar y controlar la contaminación puede conducir en el futuro a niveles de productividad cada vez más eficientes y logrará disminuir las consecuencias negativas de este fenómeno.

Cuadro 2. Influencia de los medios de cultivo en la detección de contaminantes fúngicos.

Tratamientos	Número de colonias/placa
AMD 40%	1,6 c
AMD 40% + MS 10 g/L	2,4 a
Agar dextrosa papa	2,0 b
SD = 0,18	

AMD: agar mosto de destilería; HS: harina de soya
Tratamientos con letras distintas difieren significativamente para $P \leq 0,05$ según prueba de Duncan.

CONCLUSIONES

El agar mosto al 40% suplementado con harina de soya a razón de 20 g/L puede ser utilizado alternativamente por el medio agar nutriente para la detección de contaminantes bacterianos en el ambiente del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, mientras que suplementado con 10 g/L de harina de soya puede sustituir al agar dextrosa papa para la detección de contaminantes fúngicos.

LITERATURA CITADA

1. Acosta, A., Y. Alvarado y A. Flores. 1999. Contaminantes fúngicos en la micropropagación de plantas con el uso de la esterilización química de los medios de cultivo. 5to Coloquio Internacional de

- Biotechnology of the Plants. Santa Clara, Cuba. pp. 239 - 240.
2. Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In: J.N. Pérez (ed.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. IBP. Santa Clara, Cuba. pp. 80 - 102.
 3. Borges, M., C. García, R. Fonseca y M. Leyva. 1997a. Aprovechamiento del mosto de destilería para la producción de biopreparados de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson y *Verticillium lecanii* (Zimm) Viégas. Rev. Protección Veg. 12(1): 33-37.
 4. Borges, M., C. García, R. Fonseca y M. Leyva. 1997b. Suplementación del mosto de destilería al 40% para su aprovechamiento más eficiente en la reproducción masiva *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson y *Verticillium lecanii* (Zimm) Viégas. Rev. Protección Veg. 12(1): 27-31.
 5. Gómez, R. y J. Romano. 1987. Complementación de las vinazas de destilerías para su utilización más eficiente en la producción de levadura forrajera. Inst. Cubano de Inv. Deriv. Caña de Azúcar, ICIDCA 21(3):1-7.
 6. Ipagleca. 1990. Manual de los derivados de la caña de azúcar. Inst. Cubano de Inv. Deriv. Caña de Azúcar, ICIDCA. México. pp. 427-434.
 7. Lara, D., V. M. Paneque y M. A. Martínez. 1994. Influencia del residual de torula, sobre algunas propiedades físicas de un suelo oscuro plástico gleyoso y su relación con los rendimientos agrícolas de la caña de azúcar. Cultivos Tropicales 15(2): 5-8.
 8. Leifert, C. y W. M. Waites. 1994. Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points. In: P.J. Lumsdem, J.R. Nichol and W.J. Davies (eds.). Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, Netherlands. pp. 363-378.
 9. MINAGRI. 1992. Micropropagación *in vitro* del plátano. Instructivo Técnico. Santa Clara. 22 p.
 10. Pandit, N. y D. Sam. 1988. Culture of *Baeuveria bassiana* and its pathogenicity to insect pest of jute (*Corchorus capsularis* and *C. olitorius*) and mesta (*Hibiscus cannabinus* and *H. sabdariffa*). Indian J. Agric. Sci. 58 (1): 75-77.
 11. Pérez, A. 1991. Datos y hechos acerca de la proteína de soya. ASA, México.
 12. Reed, B. y P. Tanprasert. 1995. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. Plant Tissue Culture and Biotechnology 1(3).
 13. Vázquez, J., M. Borges, N. Aguilera, L. Guedes y A. Rodríguez. 1999. Utilización del mosto de destilería para la detección de contaminantes bacterianos en el ambiente de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Reunión BioCat'99, Granma, Cuba. Resúmenes p. 31.