

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Facultad de Química y Farmacia

Departamento de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas

Trabajo de Diploma



Titulo: Evaluación de la susceptibilidad de contaminantes en el cultivo de tejidos vegetales frente a posibles inhibidores del crecimiento microbiano.

Autor: Oraida Paz Otero.

Tutores: MSc. Daymí Carrazana.
DrC. Lidcay Herrera.

Año de la Revolución Energética en Cuba.

Curso 2005-2006.

Resumen.

En la presente investigación se identificó atendiendo a la morfología de hifas y conidios a las cepas M₄₋₅ y M₃₋₃ pertenecen al género *Penicillium*, la cepa M₃₋₄ como *Cladosporium* cladosporioides y la cepa M₁₋₂ pertenece a la clase *Phycomycetos* contaminantes de la fase de multiplicación de *Musa* sp. (cv.FHIA 18), quedando en la fase de identificación una quinta cepa fúngica. Frente a los mismos se evaluó el efecto inhibitor de los sobrenadantes de *Bacillus subtilis*. *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas fluorescens*. *Serratia plymuthica*. “in vitro” mediante la técnica de medio envenenado, teniendo como resultados que: *Cladosporium* cladosporioides (M₃₋₄), *Penicillium* spp. cepas (M₄₋₅) y (M₃₋₃), y la cepa (M₁₋₂) pertenece a la clase *Phycomycetos* son hongos filamentosos aislados en las biofábricas de Ciego de Ávila y Sanctus Spiritus frente a los cuales se evaluó el posible efecto inhibitor de Quitosana, Vitrofuril y sobrenadantes bacterianos. La Quitosana inhibió significativamente a las cepas (M₄₋₇), (M₁₋₂) y (M₃₋₄), el Vitrofuril inhibió a la cepa (M₃₋₃) y el sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* inhibió el crecimiento de la colonia en la cepa (M₄₋₅). Los sobrenadantes de *Pseudomonas fluorescens*. y *Serratia plymuthica*. no mostraron efecto inhibitorio sobre ninguna de las cepas evaluadas. El sobrenadante de *Bacillus subtilis*. estimuló el crecimiento de la cepa (M₃₋₃). El crecimiento bacteriano de ninguna de las cepas bacterianas fue inhibido por los productos evaluados. Se en discos probó empleando el método de difusión en discos la posible acción inhibitoria de los productos referidos frente a cepas bacterianas aisladas de la multiplicación de *Musa* sp. (cv.FHIA 18) de manos e instrumental de operarios. Ningún tratamiento fue efectivo.

Índice.

Introducción.	1
Capítulo I: Revisión Bibliográfica	
1.1. Principales fuentes de contaminación.	3
1.1.2. El explante.	3
1.1.3. El ambiente.	4
1.1.4. El hombre.	4
1.1.5. Los equipos y el instrumental.	5
1.2. Microorganismos contaminantes.	6
1.2.1. Levaduras y hongos filamentosos.	6
1.2.2. Bacterias.	8
1.3. Relaciones entre componentes de ecosistema “in Vitro” y contaminantes bacterianos	9
1.3.1. Prevención de las fuentes de contaminación durante el proceso de micropropagación.	9
1.3.2. Control	10
1.3.3. Termoterapia.	10
1.3.4. Quimioterapia.	11
1.3.5. Biotización.	12
1.4. Mecanismo mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción.	14
1.4.1 Antibiosis.	14
1.4.2. Competencia.	16
1.4.3. Competencia por nutrientes.	16
1.4.4. Competencia por el espacio.	16
1.4.5. Interacción directa con el patógeno.	17
1.4.6. Inducción de resistencia.	18
1.5. Quitosana.	18
1.6. Vitrofurul.	20

Capítulo II: Materiales y Métodos

2.1.	Procedencia de las cepas bacterianas y fúngicas frente a las cuales fueron evaluados los posibles inhibidores del crecimiento.	22
2.1.1.	Cepas fúngicas.	22
2.1.2.	Cepas bacterianas.	22
2.1.3.	Procedencia de los posibles inhibidores.	23
2.2.	Prueba de susceptibilidad fúngica frente a los posibles inhibidores.	23
2.2.1.	Preparación de los posibles inhibidores químicos.	23
2.2.2.	Preparación de los posibles inhibidores biológicos.	24
2.2.3.	Preparación del inóculo.	25
2.2.4.	Montaje de la prueba de susceptibilidad fúngica.	25
2.3.	Prueba de susceptibilidad bacteriana.	26
2.4.	Método estadístico.	26
Capítulo III: Resultados y Discusión.		
3.1.	Identificación de las cepas fúngicas.	27
3.2.	Resultados de las pruebas de susceptibilidad fúngica.	27
3.3.	Prueba de susceptibilidad bacteriana.	39
Conclusiones.		41
Recomendaciones.		42
Bibliografía.		43

Introducción.

El plátano es un cultivo de propagación vegetativa del cual se requieren grandes cantidades de material de siembra en el campo, necesitando áreas considerables de terreno para la plantación y tiempo para la obtención de “semilla”. Por esta razón en los últimos años el métodos de micro propagación “in vitro” ha sido introducido gradualmente en algunos países, entre los cuales se destaca Cuba (Cuba, 1998).

Resolver los problemas que aún persisten en la búsqueda de tecnologías que faciliten la automatización y el mejoramiento de la calidad de las plantas previas a la climatización, resulta de gran importancia y aún constituyen limitaciones en este campo de la Biotecnología Vegetal en Cuba (Escalona, 1999).

Las pérdidas económicas durante la propagación comercial continúan siendo uno de los factores que ha provocado no pocos fracasos, producto de la contaminación microbiana. La mayoría de los laboratorios del área Latinoamericana tienen el 10% de pérdidas o más, siendo esta la causa de la poca rentabilidad de muchos de ellos (Arias, 1996).

Provenientes de la Universidad de Gent Bélgica se recibieron en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas cuatro cepas *Bacillus subtilis*, cepa ATCC 6051, *Serratia plymuthica*, cepa 1270, *Pseudomonas fluorescens*, cepa CMR12, *Pseudomonas aeruginosa*, cepa 7NSK2, con efecto biotizante . Las mismas al ser inoculadas en el medio de cultivo de multiplicación y enraizamiento de *Musa* spp. resultaron vitropatógenas por lo que se determinó evaluar el posible efecto inhibitor de una fermentación discontinúa de dichas cepas frente a aislados de hongos filamentosos provenientes de la fase de multiplicación de *Musa* spp..

Teniendo en consideración que también se ha reportado el efecto antifúngico de la Quitosana (wwwactigen@biopol.cl) y la probabilidad de obtener, en un futuro un producto con similares propiedades disponible a partir del exoesqueleto de crustáceos que resultan un subproducto de la industria pesquera en la región central del país, se incorporó esta sustancia al estudio.

El Vitrofurul, desde el año 1998 se ha ido incorporando paulatinamente a las biofábricas comerciales de Cuba como esterilizante, químico, como sustituto del autoclaveo por lo que se incluyó su evaluación en la presente investigación, la cual tiene como **objetivos:**

1. Identificar 5 cepas fúngica provenientes de la fase de multiplicación de *Musa spp.* obtenidas en las biofábricas de Ciego de Ávila y Sancti Spiritus.
2. Evaluar el efecto antifúngico de Quitosana, Vitrofurul, y los sobrenadantes de *Bacillus subtilis*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a las cepas fúngicas identificadas y compararlo con un tratamiento testigo sin inhibidor.
3. Evaluar el efecto antibacteriano de los posibles inhibidores referidos frente a 9 cepas bacterianas aisladas de la fase de multiplicación de *Musa spp.* y el muestreo de manos de operarias e instrumental empleado en la escisión de explantes en la biofábrica de Camagüey.

Capítulo I: Revisión Bibliográfica.

1.1. Principales fuentes de contaminación.

La contaminación microbiana es un problema multicausal y la determinación de la fuente que lo origina se dificulta a menudo, ya que los microorganismos pueden ser introducidos en varios puntos del proceso productivo, principalmente, por ineficiente desinfección de los explantes primarios utilizados en las fase de establecimiento, por inadecuada manipulación del material vegetal, deficientes técnicas de asepsia, incompleta esterilización del medio de cultivo, por fallos en el funcionamiento de la cabina de flujo laminar, o a través del ambiente de los locales de trabajo, además, pueden diseminarse en las habitaciones por ácaros, trips y hormigas (Leifert et al., 1994 ^a).

A continuación describiremos las principales fuentes de contaminación.

1.1.2. El explante.

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, la superficie y la rizosfera están habitado por microorganismos que pueden entrar al tejido a través de aberturas naturales, heridas u oportunistamente, y llegan a colonizar los tejidos vegetales (Matthews, 1991).

Según Cassells, los principales microorganismos asociados con la superficie de las plantas son: hongos, levaduras, bacterias, espiroplasmas y micoplasmas. Las áreas donde se encuentran mayor cantidad de nutrientes en las superficies de las plantas son: néctar, ceras, tejidos senescentes, etc. Las poblaciones de hongos y bacterias pueden desarrollarse en residuos de insectos, además, las hendiduras, pelos densos y superficies mucilaginosas pueden albergar microorganismos (Cassells, 1990).

En dependencia del tipo de explante utilizado, los microorganismos superficiales o endofitos de las plantas pueden ser introducidos al cultivo “in vitro”. Con el cultivo de meristemas, pueden ser eliminados muchos de ellos, no siendo así con frecuencia cuando el explante se toma a partir de hojas, pecíolos o tallos (Cassells, 1991).

Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociados a los tejidos de las plantas, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma se introducen en el cultivo de tejidos, se propagan con el material vegetal y pueden manifestarse sobre los medios de cultivo en la fase de establecimiento o permanecer sin expresarse por largos períodos de tiempo (Cassells, 1991).

1.1.3. El ambiente.

El ambiente de los locales de trabajo es una fuente de contaminación ya sea directa o indirectamente. A través de las corrientes de aire las partículas del suelo cargadas de esporas son arrastradas y penetran a los locales por los acondicionadores de aire son transportadas e introducidas por el hombre y permanecen en el ambiente por condiciones higiénicas inadecuadas (Alvarado, 1998).

Para realizar el cultivo de tejidos se requiere del mantenimiento de condiciones asépticas. El uso de aires acondicionados domésticos, los cuales intercambian constantemente aire con el ambiente, elevan las probabilidades de entrada de microorganismos. Es importante el estricto mantenimiento de la limpieza para disminuir la carga microbiana ambiental, así como la organización adecuada del proceso productivo (Alvarado et al., 1993).

1.1.4. El hombre.

El hombre interviene directamente en todas las operaciones y es una fuente primaria de contaminantes a través del estornudo, la tos, la conversación, etc. La presencia de microorganismos contaminantes que son habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano como por ejemplo: *Staphylococcus epidermidis* o *Candida albicans*, generalmente indican ineficientes técnicas de asepsia por parte de los operarios (Weller, 1997).

1.1.5. Los equipos y el instrumental.

La esterilización por calor húmedo en autoclave se emplea comúnmente para eliminar los microorganismos de los medios de cultivo, de la calidad de este paso depende en gran medida la continuidad del proceso.

Los problemas en la esterilización pueden deberse a fallos en el funcionamiento de las autoclaves o a errores en su manipulación. Determinados microorganismos son particularmente introducidos por esta vía, como por ejemplo: el género *Bacillus*, que puede contaminar los medios por insuficiente esterilización o mal funcionamiento de las autoclaves y pueden ser diseminados por el material vegetal (Boxus y Terzi, 1987; Leifert et al., 1994 a).

Las colonias bacterianas pueden detectarse dentro del medio a partir de las 24 horas de preparado y luego emergen a la superficie ocasionando daños severos a las plantas. Esta problemática es muy común en las biofábricas, de ahí la importancia de mantener en reposo los medios de cultivos por 24-72 horas para verificar la calidad de esterilización (Alvarado, 1998).

La cabina de flujo laminar si funciona adecuadamente proporciona condiciones de asepsia para trabajo en biotecnología vegetal, pero esto depende en gran medida del uso, cuidado y revisión periódica de los filtros. Los equipos destinados al tratamiento de agua (desionizadores, destiladores, etc.) también pueden introducir contaminación por fallos en el mantenimiento o procedimientos inadecuados, en sus resinas pueden abrirse oquedades donde los microorganismos, principalmente bacterias, se sitúan y multiplican (Alvarado, 1998).

En los laboratorios con clima centralizado, estos equipos también pueden introducir y diseminar contaminación. Cuando se combinan la limpieza ineficiente de los cuartos con la existencia de focos contaminantes y se producen fluctuaciones de temperatura en los conductos de aire, hongos filamentosos como *Cladosporium* sp., se pueden multiplicar y esparcir. Además, los instrumentos utilizados se esterilizan con calor seco y se flamean en alcohol, pero si esto no se hace por el tiempo suficiente las esporas de *Bacillus* spp., pueden sobrevivir y contaminar los cultivos (Alvarado, 1998).

1.2. Microorganismos contaminantes.

Los microorganismos que se introducen en el laboratorio son generalmente habitantes del suelo que se encuentran en el ambiente, saprofitos o patógenos de las plantas así como habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano que se han relacionado con procedimientos inadecuados, condiciones higiénico-sanitarias deficientes o incumplimiento de la disciplina tecnológica (Weller, 1997).

Su efecto negativo sobre las vitroplantas puede ser considerable si tenemos en cuenta que compiten con ellas por los nutrientes del medio. Tanto las bacterias como las levaduras, tienen un crecimiento superior con respecto a los tejidos vegetales en el medio de cultivo y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la secreción al medio de cultivo de metabolitos tóxicos. De esta forma pueden reducir el coeficiente de multiplicación, inhibir el enraizamiento y provocar la muerte del cultivo en poco tiempo (Cassells, 1991; Leifert et al., 1991; George, 1993).

Además de los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras, algunos organismos fastidiosos como los virus, viroides, micoplasmas y rickettsias, así como bacterias fitopatógenas se refieren a menudo como contaminantes en procesos de micropropagación de plantas carentes de un sistema diagnóstico para patógeno (Alvarado, 1998)].

Los microorganismos pueden introducirse en el proceso tanto en el explante inicial como en el laboratorio. De esta forma se reportan contaminantes endógenos, latentes o subliminales cuando aparecen asociados al explante en las diferentes fases de micropropagación y por otra parte se alude a aquellos microorganismos que se introducen en el laboratorio por técnicas inadecuadas de trabajo (Alvarado, 1998).

1.2.1. Levaduras y hongos filamentosos.

Las levaduras por la similitud de sus caracteres culturales, se confunden con las bacterias y esa es la causa por lo que en la mayoría de los laboratorios la

contaminación bacteriana se estima mucho más alta de lo que en realidad es (Leifert et al., 1994^a).

La mayoría de los hongos y levaduras aisladas de cultivo de tejidos de plantas que pertenecen a los géneros que están ampliamente distribuidos y que pueden encontrarse en edificaciones, ambientes externos, en el aire de los laboratorios y como saprofitos o patógenos en la superficie aérea de las plantas en el campo (Smith et al., 1986; Burge et al., 1991).

Las especies y géneros de hongos y levaduras encontradas en el aire de laboratorio, los medios vertidos sin plantas y los cultivos viejos, indican que la fuente de mayor contaminación fúngica es el aire del laboratorio, pero además los hongos y levaduras pueden ser introducidos por manipulación después del autoclaveo. Estos microorganismos provocan la más alta contaminación durante meses de alto contenido de esporas en el aire externo y en el laboratorio (Danby et al., 1994).

Los géneros fúngicos encontrados con mayor frecuencia han sido *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Microsporium*, *Phialophora*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Curvularia*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Cándida*, *Rhodotorula*, *Chryptococcus*, entre otros (George, 1993; Danby et al., 1994, Enjalric et al., 1998; Alvarado et al., 1993).

Se plantea que muchos de los microorganismos son considerados patógenos “in vivo” y también pueden causar daños en el cultivo de tejido por parasitismo directo. Algunos hongos patógenos como *Botrytis* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. han sido capaces de crecer inicialmente en el medio sin plantas, y lograr su establecimiento posterior en el tejidos de estas, después que el metabolismo y crecimiento de las mismas disminuyó (Danby et al., 1994). Los contaminantes fúngicos no deben encontrarse latentes en los medios de cultivo “in vitro”, así como tampoco ciertos patógenos obligados (Alvarado, 1998).

En muestreos realizados en laboratorios de tres países europeos se han encontrados con frecuencia levaduras como *Candida guilliermondii* f. *fumata* o *Candida parasitosis* y otras *Candida* spp., así como *Rhodotorula* spp. (Danby et al., 1994).

Un estallido repentino de hongos y levaduras como contaminantes asociados con infestación de ácaros, y trips ha causado grandes pérdidas en lugares infectados (Blake, 1988).

1.2.2. Bacterias.

La contaminación bacteriana es considerada la más común y una de las principales causas de pérdidas en los cultivos de tejidos vegetales (George, 1993; Leifert et al, 1994) la misma es la que ocasiona los daños más serios, después de los virus, porque las bacterias pueden ser sistémicas y su detección es más difícil pues la mayoría normalmente crecen muy poco en los medios de cultivo tales como Murashige y Skoog (1962) o lo hacen solo después de largos períodos de incubación (Kneifel y Leonhardt, 1992).

Las bacterias encontradas como contaminantes en el cultivo “in vitro” de plantas pertenecen a varios grupos ecológicos. Ellos incluyen a patógenos de plantas, epifitos, endofitos y contaminantes accidentales del aire y del hombre.

De este modo algunas bacterias entran al cultivo de tejidos con los explantes pero otras son introducidas durante el procedimiento de trabajo en el laboratorio (George, 1993; Leifert et al., 1994).

Se han aislado especie de bacterias pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobactrium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corinecbacterium*, entre otros (George, 1993; Leifert et al., 1994; Reed et al., 1995; Wilhelm, 1997).

Leifert y otros investigadores (1991) estudiaron la composición de las comunidades bacterianas que crecían sobre plantas “in vitro” de *Delphinium* sp. y *Hemerocallis* sp. y llegaron a la conclusión que pueden diferir considerablemente entre diferentes especies de plantas. Esto casualmente se atribuye a que especies de bacterias específicas de plantas han sido introducidas al cultivo “in vitro” con el material vegetal (George y Sherrington, 1984; Cassells, 1986; Cornu y Michel, 1987; Fisse et al., 1987).

1.3. Relaciones entre componentes de ecosistema “in vitro” y contaminantes bacterianos.

Varias bacterias no pueden ser detectadas en los medios de proliferación o elongación pero aparecen y a menudo pueden ser letales en el medio de cultivo para el enraizamiento (Boxus y Terzi, 1987).

Estudios realizados han mostrado que bacterias que usualmente no son patógenas de las plantas en el campo, pueden ser patógenas en el sistema de cultivos de tejido, debido a mutaciones, porque no tienen competencia con otros microorganismos y por tanto aumentan su número en las plantas, porque pueden obstruir los tejidos vasculares (Debergh y Maene, 1984) así como que las condiciones ambientales y fisiológicas de las plantas son diferentes en este proceso (Leifert et al., 1991^a).

La mayoría de los microorganismos contaminantes son “vitropatógenos”, es decir, organismos patogénicos a planta “in vitro” pero no patogénicos a las plantas crecidas en el campo (Herman, 1990^a).

1.3.1. Prevención de las fuentes de contaminación durante el proceso de micropropagación.

Durante todo el proceso de micropropagación es necesario mantener un estricto control sobre las fuentes que introducen contaminación (Alvarado, 1998).

El empleo de medios protectores para el cabello, nariz, boca y manos reducen los riesgos de contaminación, así como de ropa limpia y estéril, por tanto todo el personal que labore en el área aséptica debe usar correctamente el uniforme (Alvarado, 1998).

Leifert y colaboradores reportan la disminución de las pérdidas por contaminación bacteriana en un laboratorio comercial con capacidad de producción anual de 4 millones de vitroplantas de 5 a 3,5% por medio del lavado de las manos, antebrazos siguiendo protocolos establecidos para procedimientos quirúrgicos. Además lograron disminuir las pérdidas por debajo del 1% sometiendo a los trabajadores a rigurosos entrenamientos en métodos microbiológicos (Leifert, 1994^a).

Es conveniente utilizar microorganismos indicadores para señalar específicamente la fuente de contaminación. Los microorganismos indicadores son aquellos que se detectan en estados específicos, son los contaminantes primarios bajo condiciones determinadas (Leifert et al., 1994^a).

1.3.2. Control.

Según datos obtenidos, el empleo de antibióticos y fungicidas en esta etapa como componente del medio de cultivo para prevenir la contaminación o tratar de forma curativa a cultivos de tejidos contaminados (Leifert et al., 1991^b). El uso curativo de antibióticos es contra determinadas bacterias, en cultivos contaminados uniformemente y con un contaminante sensible al antibiótico usado. La eliminación de contaminantes no identificados suele ser muy peligrosa cuando se emplean antibióticos, provocando daños superiores al que pueda producir el contaminante debido a la fitotoxicidad de los antibióticos y fungicidas (Leifert et al., 1991^a).

A pesar de la incorporación profiláctica de antibióticos y antifúngicos utilizadas en el cultivo del tejido vegetal para prevenir el establecimiento de diferentes microorganismos en el laboratorio, su uso permanente puede favorecer el surgimiento de cepas antibiótico-resistentes, el tratamiento de mezclas no identificadas de poblaciones mixtas de microorganismos y su uso profiláctico debe ser eliminado (Leifert et al., 1994).

1.3.3. Termoterapia.

El principio básico de los tratamientos con calor, radica en que los microorganismos, a menudo, pueden ser inactivados con rangos de temperatura entre 30-40 °C, según autores (Cassells, 1986) durante tiempos que son ligeramente perjudiciales para los tejidos del hospedante.

El éxito de esta técnica depende de la capacidad que tenga el tejido de soportar altas temperaturas, que inactivan al patógeno, sin afectar significativamente el crecimiento del tejido vegetal. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta la relación entre la temperatura, lograda por la aplicación de agua o aire caliente, la duración del tratamiento y el porcentaje de infectividad, de manera que los primeros

son inversamente proporcionales al tercer cuando las plantas retornan a temperaturas más bajas (Cassells, 1986).

1.3.4. Quimioterapia.

Los contaminantes microbianos presentes sobre la superficie del explante, son eliminados, por inmersión del mismo en biocida de amplio espectro, tales como hipoclorito, alcohol, bicloruro de mercurio y/o sustancias químicas con una actividad más selectiva, como son los insecticidas, fungicidas y antibióticos (Sykes, 1965; Hugo, 1981; Hoffman et al; Russell et al; George y Sherrington, 1984).

La mayoría de los biocidas de amplio espectro son no sistémicos, pero si ellos fueran capaces de penetrar a los tejidos internos del explante, teniendo en consideración su toxicidad, podrían matar al tejido vegetal. Por lo tanto, una vez llevado a cabo el proceso de desinfección superficial, si el explante posee sus tejidos internos contaminados con bacterias y hongos, estos, inevitablemente, son transferidos al cultivo de tejidos (Leifert y Waites, 1994).

La mayoría de los laboratorios para la desinfección de los explantes aplica la inmersión en soluciones de hipoclorito de sodio o calcio, a una concentración y durante un tiempo que varían grandemente, en función del tipo de explante y la especie de la planta, para lograr una desinfección apropiada (George y Sherrington, 1984).

Leifert y colaboradores detectaron, en un análisis de las preparaciones comerciales de hipoclorito, procedentes de 4 laboratorios, que el contenido real de cloro activo en las mismas era mucho más bajo que el indicado por el fabricante (Leifert et al 1994). Por tanto, es recomendable determinar por análisis químico el contenido real de cloro activo, antes de utilizar estas preparaciones, ya que el mismo puede disminuir durante el almacenamiento, con el incremento de la temperatura del ambiente y, además, sobre la base de que no todas las preparaciones tienen el mismo contenido de cloro activo (Hoffman et al 1981).

La inmersión en alcohol ha sido usada como pre-tratamiento a la desinfección con el hipoclorito, ya que, según algunos autores, facilita la penetración a niveles superficiales del mismo a la planta (George y Sherrington, 1984). El alcohol ha sido usado para reducir el número de microorganismos de la superficie de las plantas donantes, antes de la escisión (Enjalric et al., 1994).

Siendo especialmente beneficioso, cuando los explantes se toman de plantas infectadas con patógenos, tales como *Erwinia carotovora*. (Berrger et al., 1994).

La desinfección con bicloruro de mercurio es especialmente útil cuando están presentes determinados contaminantes fúngicos, que hacen inefectiva la desinfección con hipoclorito, o los tejidos de la planta son muy sensibles a este producto (Mederos ,1991; Leifert y Waites, 1994^b). Sin embargo, teniendo en cuenta la elevada toxicidad y la persistencia de los compuestos de mercurio, su uso está restringido a tejidos vegetales que no pueden ser desinfectados por otra sustancia química (Leifert et al., 1994).

Debido a la acción sistémica de muchos de ellos, se ha reportado que pueden suprimir a los microorganismos cuando estos se encuentran en el interior del tejido vegetal (Brian, 1957; Agrios, 1990). Sin embargo, su aplicación ha de ser muy cuidadosa, debido a que se han reportado efectos inhibitorios de muchas de estas sustancias sobre el crecimiento de los tejidos vegetales (Dodds y Roberts, 1981) y algunos antibióticos pueden ser mutagénicos (Zamski y Umiel, 1978).

1.3.5. Biotización.

La biotización es un proceso que se realiza para obtener plantas libres de plagas y enfermedades o con un nivel mínimo de contaminación. La misma se está estudiando con gran empeño debido a la importancia que tiene y a las ventajas que puede aportar a la producción de plantas de alta calidad y libres de contaminación. Durante las últimas décadas los investigadores se han dado a la tarea de estudiar la vida de algunos habitantes de las plantas epifititas y endofíticas con el objetivo de adaptarlos a los procesos “in vitro” para favorecer la adaptación de los propágulos obtenidos mediante el cultivo de tejidos vegetales ante el estrés ambiental (Herman, 1996^a). En la naturaleza estos microorganismos habitan en el exterior e interior **12**

de los órganos de la planta (Sturz et al., 1997). Alguno de estos microorganismos como las bacterias y las micorrizas pueden inducir en las plantas mayor resistencia al estrés ambiental y por tanto aumentar su viabilidad y rendimiento en el campo. La inducción de la resistencia al estrés en plantas producidas “in vitro”, antes de la plantación ha sido tarea principal de un grupo de investigadores, utilizando para este fin inóculos microbianos en la micropropagación (Jooker et al., 1994; Elmeskaui et al., 1995; Nowak et al., 1995; Balla et al., 1997; Murphy et al., 1997; Wilhelm et al., 1997) pues la inducción de la resistencia está bien documentada en el crecimiento de plantas “en vivo” y esto se ha tenido en cuenta para el cultivo “in vitro” (Herman, 1996^a).

La biotización no es más que el proceso responsable del crecimiento “in vitro” de las plantas utilizando inóculos microbianos que favorecen cambios fisiológicos y de desarrollo, aumentando la resistencia al estrés de los propágulos frente a los factores bióticos y abióticos del medio estableciéndose una simbiosis artificial (Preinger et al., 1997).

La biotecnología ha abierto nuevas posibilidades en lo concerniente a la aplicación de microorganismos beneficiosos del suelo en el incremento del crecimiento de las plantas y el control biológico de microorganismos. El trabajo con rizobacterias se ha desarrollado de forma gradual y ascendente, teniendo como finalidad el aumento del rendimiento de los cultivos, disminuir el uso de los productos químicos y la contaminación ambiental.

La inoculación con *Azospirillum* sp. en las plantas cultivadas brindan un aumento significativo del sistema radical además de inducir resistencia a determinados agentes patógenos y proveer de elementos necesarios como el nitrógeno, producir hormonas que estimulan el crecimiento vegetal permitiéndole un desarrollo más saludable a la planta (Sharman y Nowak, 1998).

Las bacterias pertenecientes al género de *Pseudomonas*, originalmente aisladas como contaminantes en las raíces de cebolla resultaron promotores muy efectivos del del crecimiento de las plantas” in vitro” de *Glomus besiculiferumen*.

Las plantas obtenidas por este proceso no necesitaron de reinoculaciones futuras. Estas bacterias estimularon el crecimiento de las plantas, indujeron nuevos cambios de desarrollo y aumentaron la resistencia a bajos niveles de concentraciones de microorganismos. Las plantas inoculadas son más avanzadas, de tallos más robustos, con mayores depósitos de lignina alrededor del sistema vascular, un número mayor de raíces y de mayor longitud y su función estomática es prácticamente igual que las transplantadas de invernaderos (Sharman y Nowak, 1998).

La producción de cianuro de hidrógeno por cepas de *Pseudomonas* sp. fue efectiva en la reducción de la enfermedad de raíces negras en plantas de tabaco causadas por *Thielaviopsis basicola* (Voisard et al., 1989).

1.4. Mecanismo mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción.

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia. No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los microorganismos en la planta. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Fernández- Larrea, 2001).

1.4.1. Antibiosis.

En la rizófora del roble se calcula que exista alrededor de 45 mil billones de microorganismos. Solamente un escaso número de ellos es potencialmente patógeno para plantas. En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedades en la mayoría de los casos; es decir, existe un control biológico que funciona naturalmente (Vero y Mondino, 2002). **14**

De este modo los organismos patógenos de las plantas (bacterias y hongos fitopatógenos) están en competencia sobre las superficies vegetales con otros microorganismos saprofitos. Esta competencia implica complejas interacciones. Diversos microorganismos saprofitos tienen la capacidad de producir sustancias antibióticas que afectan a los patógenos. Existen varios ejemplos de antagonistas cuyo mecanismo de acción comprobado es la producción de antibióticos. El más conocido sin duda ha sido la producción de penicilina por *Penicillium notatum* descubierto en 1929. Otro ejemplo es el de *Trichoderma* sp. un reconocido hongo antagonista del que se conocen más de 33 especies presentes en los más diversos habitat. *Trichoderma* sp. actúa mediante diferentes mecanismos antagonizando ha diferentes patógenos de plantas entre los que se encuentra la antibiosis. Se ha comprobado que este hongo produce varias sustancias antibióticas entre las que se encuentran la harzianopiridona que ha demostrado ser efectiva en inhibir el crecimiento de numerosos hongos fitopatógenos, ente ellos *Venturia inaequalis* (causante de la sarna del manzano) (Pezet *et al.*, 1999).

La antibiosis es uno de los mecanismos más estudiados en los agentes de control biológico y numerosas evidencias indican que los metabolitos antifúngicos juegan un papel importante afectando la sobrevivencia de los patógenos en el suelo La facilidad de detectar a la antibiosis “in vitro” ha hecho que este sea el mecanismo de acción más reportado aunque existen dificultades para determinar cual es su rol en condiciones de campo. Algunos investigadores cuestionan la utilidad de la antibiosis como mecanismo de acción a la hora de seleccionar antagonistas de plantas debido a que la población de patógenos puede generar resistencia a los antibióticos y además de esto puede tener efecto negativo sobre la salud humana (Mondino y Vero, 1999).

La generación de resistencia frente a los antagonistas ha sido demostrada para *Agrobacterium tumefaciens* (bacteria causante de la agalla de corona de las plantas) resistentes al Agrisin 84, un antibiótico producido por una cepa de *Agrobacterium radiobacter* (bacteria controladora de la anterior), (Campbell, 1989). También se ha asimilado a la antibiosis como mecanismo de control biológico, con el uso de plaguicidas. Sin embargo otros investigadores opinan que no se **15**

puede comparar la liberación de una sustancia a escala microbiana con el uso masivo de plaguicidas (Vero y Mondino *et al.*, 2002).

1.4.2. Competencia.

Esta constituye un mecanismo de acción antagónica muy importante. Puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento porque si hay exceso no hay competencia (Fernández- Larrea, 2001).

1.4.3. Competencia por nutrientes.

La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio. *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* son dos hongos de poscosecha típicamente dependientes de los nutrientes, como hongos necrotróficos, sus esporas requieren de estas sustancias para germinar y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar al sustrato, las cuales se encuentran en las heridas de las frutas y es allí donde la competencia microbiana actúa inhibiendo el desarrollo de estos patógenos (Fernández- Larrea, 2001).

1.4.4. Competencia por espacio.

Este tipo de competencia también ha sido evaluado. Las levaduras son eficaces colonizadoras de la superficie de plantas y se destaca la producción de materiales extracelulares (especialmente polisacáridos) que restringen el espacio para la colonización por otros microorganismos (Fernández- Larrea, 2001).

Ha sido demostrado que *Pseudomona fluorescentes* producen sustancias de alta afinidad por el hierro (sideróforos). Estas bacterias son capaces de secuestrar el escaso hierro disponible en la solución de suelo impidiendo que este sea utilizado por los patógenos (Bagnasco, 1998).

Pero no solo en el suelo puede ocurrir competencia por hierro, *Rhodotorula glutinis* (una levadura antagonista) compite produciendo sideróforos en la herida de **16**

manzanas cosechadas evitando la podredumbre azul causada por *Penicillium expansum* (Calvente *et al.*, 1999).

La competencia por nutrientes es un mecanismo común de antagonismo. Levaduras antagonistas de hongos causantes de podredumbre postcosecha compiten por Nitrógeno en las heridas del fruto (Vero *et al.*, 2002).

1.4.5. Interacción directa con el patógeno.

Los antagonistas pueden actuar directamente sobre los patógenos de plantas. Numerosos hongos filamentosos y levaduras utilizan a los patógenos como alimento. Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* sp y *Gliocladium* sp. (Mondino y Vero, 2002). Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos. Ellas son el parasitismo y la predación:

a. Parasitismo.

Un tipo de interacción directa entre los antagonistas y los patógenos es el parasitismo. El parasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulosa, β 1, 3 - glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parasitados. Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* sp y *Gliocladium* sp. Ambos ejercen su acción mediante varios mecanismos, entre los cuales tiene un rol importante el parasitismo (Lecuona ,1996).

b. Predación.

En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en suelos supresores de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Campbell 1989).

1.4.6. Inducción de resistencia.

Las plantas como otros seres vivos del planeta han pasado por un proceso evolutivo desde su aparición sobre la tierra lo que les llevó a desarrollar mecanismos de defensa muy poderosos contra sus invasores (www.pmond@fagro.edu.uy).

Los microorganismos pueden evitar el desarrollo de enfermedades de plantas actuando indirectamente al inducir la resistencia de la planta (Baker y Cook., 1974).

Las plantas presentan entonces mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia. Todos ellos gobernados genéticamente (www.pmond@fagro.edu.uy).

Se entiende por resistencia inducida al aumento de las respuestas de defensa de las plantas provocada por un estímulo externo. Se ha demostrado que diferentes microorganismos actúan estimulando estas defensas, por ejemplo existen rizobacterias capaces de inducir resistencia en las hojas de pepino como la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o latente mediante uno o más organismos, lograda de manera natural a través de la manipulación del ambiente, del hospedador o del antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas (Baker y Cook., 1974).

Se puede inducir resistencia en productos cosechados mediante el uso de diferentes inductores como bajas dosis de luz ultravioleta, compuestos naturales de las plantas como quitosano (producto de la desacetilación de la quitina), y también mediante el uso de microorganismos antagonistas (www.pmond@fagro.edu.uy).

1.5. Quitosana.

Su nombre, derivado del griego kítos, significa cavidad o bóveda, y el sitio en que se encuentra, el caparazón de muchos artrópodos, también refiere su capacidad para enfrentar a diversos agentes externos. La Quitosana se obtiene de los desechos de la industria pesquera, como un escudo de alta eficiencia construido con pura química, que forma parte del caparazón que defiende a insectos, crustáceos, moluscos y otros seres vivos de su contacto con lo externo. La poseen en diversa cantidad jaibas, camarones, langostas, arañas y cucarachas. Incluso algunos **18**

hongos y algas. La quitina posee variados beneficios para el ser humano, útil en las industrias farmacéutica, de alimentos, cosmética y de empaques.

De basura a materia prima que filtra agua contaminada, ofrece consistencia a alimentos procesados, atrapa grasa, es bactericida y sirve como envoltura biodegradable, entre otros beneficios, la quitina está involucrada en la protección de varias especies. Ya en el laboratorio, los caparazones se limpian, se muelen hasta pulverizan y se someten a un proceso de hidrólisis ácida, utilizando ácido clorhídrico, el cual convierte a los carbonatos en cloruros y solubiliza los minerales, básicamente el calcio.

Ya desmineralizado, se aplica una hidrólisis alcalina, pues el álcali que se usa rompe la estructura de la matriz y hace solubles las proteínas, las cuales arrastran consigo grasas y pigmentos, componentes todos que constituyen el caparazón.

Después de ambas etapas se obtiene la quitina en polvo, que no es soluble en agua, lo que lo hace poco práctica para su aplicación. Así que se somete a un proceso llamado "desacetilar", que significa quitar de la sustancia una parte de su estructura, el grupo acetilo (www.invdes.com.mx).

Se estudió la desacetilación de quitina de conchas de camarón, con NaOH al 50% a temperaturas de 60 y 100°C por un tiempo de 2 h. Se obtuvo quitina por remoción de proteínas y minerales presentes en las conchas con un rendimiento de 24,06%. La quitina y la quitosana se identificaron mediante espectroscopia de infrarrojo y se caracterizaron en términos de nitrógeno total, cenizas y humedad. El comportamiento reológico del quitosano se estudió midiendo su viscosidad. La comparación de los espectros infrarrojos, de las muestras procesadas, permitió confirmar que el tratamiento termoalcalino provocó la desacetilación de la quitina solamente cuando la temperatura utilizada fue de 100°C, con un rendimiento de 76,56% respecto a la quitina. Este proceso representa una alternativa tecnológica para el tratamiento de los desechos del camarón, eliminando la contaminación ambiental generada por la disposición de estos y obteniéndose un producto, el quitosano, de amplia aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y petroquímica (wwwpostgluzpuntofijo@cantv.net).

Es un polímero natural de tipo catiónico, biodegradable y no tóxico, por lo que no contamina. Protege las partes tratadas de ataque de bioantagonistas como hongos, insectos y nemátodos. Esto se logra por inducción de una barrera física en semillas y raíces, así como también mediante los siguientes mecanismos:

- Activación de genes de resistencias.
- Activación de proteínas asociadas a respuestas de resistencias.
- Activación de quitinasa, B - gluconasa fenilalanina amonio liasa.
- Acumulación de Pisalina (antibiótico antifungal), callosa y lignina.

Esto confiere a la planta mayor tolerancia a problemas sanitarios de raíz y cuello aumentando la vitalidad de las células del huésped. Acelera la degradación de las paredes celulares de hongos y organismos que poseen quitina en su estructura, liberando quitosano adicional en este proceso. Estimula a las células vegetales a producir compuestos bioquímicos que fortalecen la pared celular, mejorando significativamente la resistencia a situaciones de estrés, sequía, excesos de humedad, trasplantes y heladas. Se desencadena un aumento en la masa radicular, lo que se traduce en un aumento en la velocidad de crecimiento y mayor vigor (www.actigen@biopol.cl).

1.6. Vitrofurul.

La principal materia prima para elaborar el Vitrofurul es el furfural, que se consigue a partir de los desechos de la caña de azúcar. Estos se obtienen en el central Amancio Rodríguez, de Las Tunas. El Vitrofurul se oferta de dos maneras: Queratofurulinol y Vitrofurul, este último es un esterilizante químico para producción de vitroplantas, registrado en 1999 y generalizado ya en todas las biofábricas del país con buenos resultados. Tiene una potente acción frente a bacterias y fuentes de hongos, y actúa sobre cepas resistentes a los principales antibióticos que están en el mercado (www.granma.cubaweb.cu).

Las biofábricas, centros para la multiplicación de los cultivos, se conciben para producir con el menor costo posible, en ellas se utiliza la luz solar en la **20**

mayoría de las áreas, entre otras alternativas más baratas, sin afectar los resultados. El propósito es crear plantas “in vitro” a partir de técnicas que aceleran su reproducción y la resistencia a enfermedades.

Los cambios propician una disminución de la mano de obra, que constituye alrededor del 70 por ciento de los gastos y la introducción del Vitrofur, agente esterilizante creado por el Centro de Bioactivos Químicos, de la Universidad Central de Las Villas, que sustituye la utilización de los autoclaves, equipos grandes consumidores de energía (www.granma.cubaweb.cu).

Materiales y Métodos.

El presente trabajo se realizó en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas en el período comprendido entre febrero y junio de 2006.

2.1. Procedencia e identificación de las cepas bacterianas y fúngicas frente a las cuales fueron evaluados los posibles inhibidores del crecimiento.

2.1.1. Cepas fúngicas.

<u>Cepas</u>	<u>Biofábrica</u>	<u>Fase</u>	<u>Subcultivo</u>	<u>Número de muestra</u>
CAM ₄₋₇	Ciego de Ávila	Multiplicación	4	7
SSM ₁₋₂	Sanctis Spiritus	Multiplicación	1	2
SSM ₃₋₃	Sanctis Spiritus	Multiplicación	3	3
SSM ₃₋₄	Sanctis Spiritus	Multiplicación	3	4
SSM ₄₋₅	Sanctis Spiritus	Multiplicación	4	5

Se realizaron preparaciones húmedas de gota aplastada montadas con lactofenol blanco o azul para la observación microscópica de hifas y conidios, utilizando microscopio óptico de campo claro (Olimpus - Vanox) a 400 x. La identificación se realizó por un especialista según claves especializadas.

1.1.2. Cepas bacterianas.

<u>Cepas</u>	<u>Biofábricas</u>	<u>Fase</u>	<u>Subcultivo</u>	<u>Número de muestra</u>
CAM ₂₋₈	Camagüey	Multiplicación	2	8
CAM ₄₋₄	Camagüey	Multiplicación	4	4
SSM ₁₋₃	Camagüey	Multiplicación	1	3

<u>Cepas</u>	<u>Biofábricas</u>	<u>Cabina de flujo laminar</u>	<u>Puesto</u>	<u>Sitio de muestreo</u>
CL ₄ id	Camagüey	No ₄	derecho	instrumental*
CL ₂ ii	Camagüey	No ₂	izquierdo	instrumental*
CL ₃ md1	Camagüey	No ₃	derecho	manos (cepa1) 22

CL ₃ md3	Camagüey	No ₃	derecho	manos (cepa3)
CL ₄ md	Camagüey	No ₄	derecho	manos
CL ₄ mi	Camagüey	No ₄	izquierdo	manos

*pinzas y bisturí

Las cepas bacterianas están en proceso de identificación pero los resultados no forman parte de este trabajo de Diploma.

2.1.3. Procedencia de los posibles inhibidores.

a. Inhibidores químicos.

Vitrofuril: cuyo principio activo es 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroetano (G-1) con una pureza mayor o igual a 98% sintetizado en la planta de producción del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central “Marta Abreu “ de Las Villas.

Quitosana: elaborada por la firma Chi Pro gmbH de Alemania cuya composición es la siguiente:

- 99% de quitina
- 0.05% de boro
- 0.05% de zinc

b. Inhibidores biológicos.

Bacillus subtilis, cepa ATCC 6051, *Serratia plymuthica*, cepa 1270, *Pseudomonas fluorescens*, cepa CMR12, *Pseudomonas aeruginosa*, cepa 7NSK2, provenientes del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y ciencias biológicas Aplicadas de la Universidad de Gent.

2.2. Prueba de susceptibilidad fúngica frente a los posibles inhibidores.

2.2.1. Preparación de los posibles inhibidores químicos.

Se pesó 0.0035 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de vitrofuril en una balanza analítica (Mettler AE160), los cuales fueron suspendidos en 100 mL de agua destilada esterilizada a 121°C durante 15 minutos en autoclave previamente, obteniéndose una concentración final de 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Se pesó 0.5g de quitosana en balanza analítica y se disolvió en 100 mL de agua destilada estéril, obteniéndose una concentración final de 0.5%(p/v).

2.2.2. Preparación de los posibles inhibidores biológicos.

Las cepas evaluadas (*Bacillus subtilis*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*) fueron cultivadas en cuñas de Agar Nutriente distribuidas en tubos, e incubadas durante 24h a $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Se tomó con un asa una porción de la biomasa y se suspendió en 10 mL de solución salina al 0.9% (suero fisiológico) comparándose con el tubo de 0.5 de la escala de Mc Farland ($0.5 \text{ mL de } 0.048 \text{ mol/L}^{-1} \text{ de BaCl}_2$, (1.75 % w/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) es añadido a 99.5 mL de 0.18 mol/L^{-1} (0.36 N) H_2SO_4 (1% v/v).

El inóculo bacteriano fue incorporado en un erlenmeayer que contenía 150 mL de Caldo King B (proteasa peptona: 20g, glicerina: 10g, K_2HPO_4 :1.5g, MgSO_4 1.5g, H_2O cantidad suficiente para 100 mL). EL mismo fue incubado durante 72h a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (Fermentación discontinua estática).



Figura #1: Fermentación discontinua estática.

Transcurrido este tiempo se decantó el sobrenadante y luego se centrifugó en una centrifuga (marca Hettich. Universal 32) a 5000 rpm durante 15 minutos.



Figura #2: Centrifugación.

Seguidamente se procedió a ultrafiltrar el sobrenadante empleando un filtro Millipore (0.22 μm). Dicho filtrado fue evaluado como posible inhibidor.



Figura #3: Ultrafiltración del sobrenadante.

Lo anteriormente descrito se realizó porque en estudios precedentes (resultados sin publicar) se demostró que estas cepas bacterianas resultaron vitropatógenas en las fases de multiplicación y enraizamiento de *Musa* sp.

2.2.3. Preparación del inóculo.

Las cepas fúngicas fueron cultivadas en placas de Petri de 9cm de diámetro conteniendo 10 mL de Agar Mueller Hinton (BioCen), colocándose un disco de 8 mm de micelio en su centro, posteriormente se incubaron a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un período de 10 días.

Para la prueba de susceptibilidad se tomó un inóculo consistente en discos de 8 mm de micelio tomados a la misma distancia del centro de la placa para las tres replicas evaluadas.

2.2.4. Montaje de la prueba de susceptibilidad fúngica.

La prueba de susceptibilidad frente a los hongos filamentosos se realizó en placas de Petri de 9 cm de diámetro, usando el medio de cultivo Agar Extracto de Malta (BioCen), el cuál fue fundido en una plancha de calentamiento incorporando los posibles inhibidores al descender la temperatura entre $45-50^\circ\text{C}$.

Luego se colocaron los discos del inóculo fúngico con ayuda de un sacabocao y una aguja en el centro de la placa. Se preparan 3 replica, después fueron incubadas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 8 días evaluando cada 24h a partir del cuarto día el diámetro menor y mayor de la colonia y calculándose el valor medio.

Se siguió el procedimiento referido empleando placas con Agar Extracto de Malta sin posible inhibidor las cuales fueron consideradas tratamiento testigo.

2.3. Prueba de susceptibilidad bacteriana.

La preparación de los inóculos bacterianos se llevo a cabo del mismo modo que en el acápite anterior **(2.2.1 y 2.2.2)**.

Se cortaron (ponchadora) discos de papel Watman No3 de 5 mm de diámetro, se colocaron en una placa de Petri, se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos en autoclave, y se secaron a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24h. Una vez secos se cargaron con 5 μL de los posibles inhibidores y se secaron a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24h.

Para montar el antibiograma se usaron placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo 10 mL de Agar Mueller Hinton (BioCen). Para ello se procedió a sembrar el inóculo hisopando la superficie del medio con aplicadores (madera y algodón) previamente esterilizados. Luego de 20 minutos de reposo se colocaron 4 discos (réplicas) por placa utilizando pinzas, las cuales se sumergían en alcohol y se flameaban a la llama. Se incubaron a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ evaluándose el diámetro (mm) del halo de inhibición a las 24 y 48h.

2.4. Método estadístico.

Se aplicó una prueba de varianza simple (ANOVA) para cada día de observación, por tratamientos, aplicándose una prueba de Test de Tukey para $p < 0.05$ para la comparación de cada uno de los valores medios de los diámetros de las colonias fúngicas. Los valores se procesaron en el paquete STATGRAPHICS versión 5.

Resultados y Discusión.

3.1. Identificación de las cepas fúngicas.

Las cepas M₄₋₅ y M₃₋₃ pertenecen al género *Penicillium*, la cepa M₃₋₄ fue identificada como *Cladosporium* cladosporioides y la cepa M₁₋₂ pertenece a la clase *Phycomycetos*, la cepa M₄₋₇ aún está en procesos de identificación.

3.2. Resultados de las pruebas de susceptibilidad fúngica.

En la tabla #1 se muestran los resultados de la prueba de susceptibilidad de la cepa en identificación M₄₋₇ frente a los posibles inhibidores evaluados y el testigo sin inhibidor, lo cuál se graficó en la figura #4.

Tabla #1: Diámetro medio de la colonia fúngica (Cepa M₄₋₇) frente a posibles inhibidores y testigo sin inhibidor.

Tratamientos	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Testigo	33.66 ^{ab}	46.50 ^{ab}	62.16 ^a	70.33 ^a	80.16 ^a
Vitrofuraf	31.00 ^b	42.50 ^{ab}	56.00 ^a	64.66 ^a	73.66 ^a
Quitosa	17.66 ^c	31.33 ^b	28.00 ^b	29.33 ^b	30.50 ^b
<i>B subtilis</i>	34.66 ^{ab}	42.66 ^{ab}	52.10 ^a	62.20 ^a	68.03 ^a
<i>P aeruginosa</i>	34.83 ^{ab}	45.50 ^{ab}	55.83 ^a	68.00 ^a	70.16 ^a
<i>P fluorescens</i>	41.50 ^a	50.50 ^a	62.16 ^a	67.50 ^a	75.83 ^a
<i>S plymuthica</i>	37.83 ^{ab}	52.16 ^a	60.33 ^a	68.66 ^a	76.50 ^a
EE (\bar{X})	±1.87	±3.23	±2.51	±2.82	±2.51

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren por Test de Tukey para p<0.05.

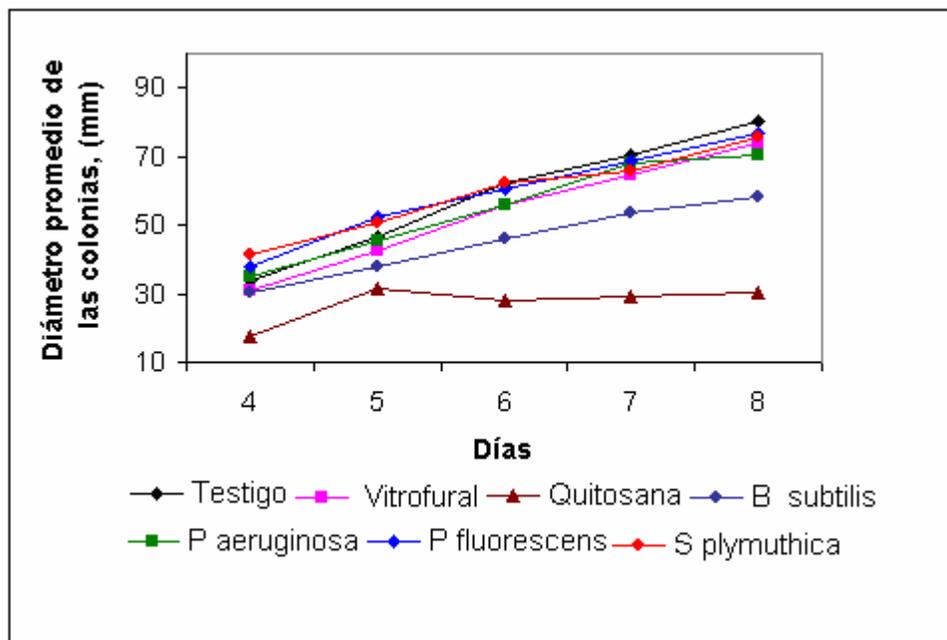
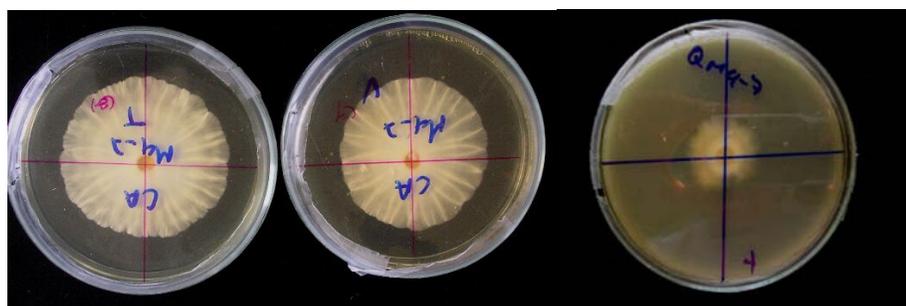


Figura #4: Comportamiento de los posibles inhibidores del crecimiento fúngico con el tiempo.

La Quitosana inhibió significativamente el crecimiento fúngico de M₄₋₇ respecto al testigo sin inhibidor y al resto de los tratamientos, los cuales no inhibieron el crecimiento fúngico. Este comportamiento se mantuvo de modo general durante todo el tiempo de evaluación.



A

B

C

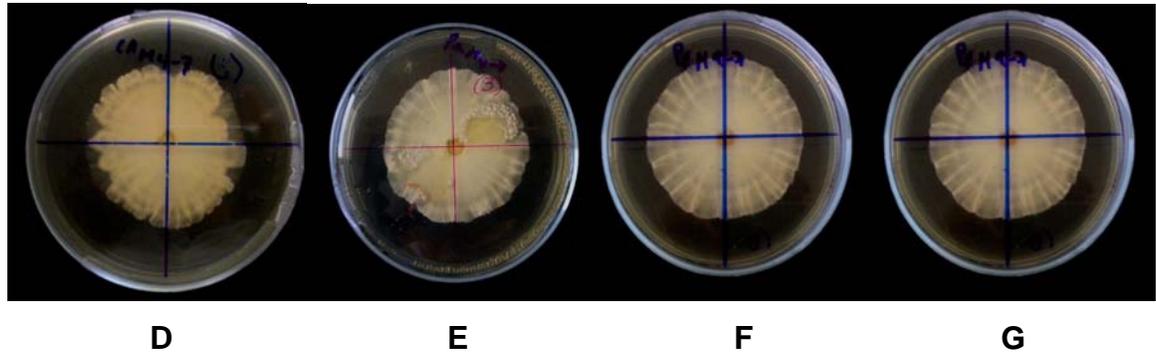


Figura #5: Prueba de susceptibilidad de la (cepa M₄₋₇) al sexto día de evaluación frente a:

- A: Testigo sin inhibidor.
- B: Vitrofurul.
- C: Quitosana.
- D: *Bacillus subtilis*.
- E: *Pseudomonas aeruginosa*.
- F: *Pseudomonas fluorescens*.
- G: *Serratia plymuthica*.

Tabla #2: Diámetro medio de la colonia fúngica (Cepa M₁₋₂) frente a posibles inhibidores y testigo sin inhibidor.

Tratamientos	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Testigo	74.16 ^b	88.50 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a
Vitrofurul	59.16 ^c	78.83 ^b	90.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a
Quitosana	20.33 ^d	21.66 ^c	22.50 ^b	23.50 ^b	25.00 ^b
<i>B subtilis</i>	85.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a
<i>P aeruginosa</i>	74.00 ^b	87.50 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a
<i>P fluorescens</i>	75.83 ^b	90.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a
<i>S plymuthica</i>	89.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a

EE (\bar{X})	± 1.85	± 0.82	± 0.10	± 0.10	± 1.8
------------------	------------	------------	------------	------------	-----------

Las letras no comunes en una misma columna difieren por Test de Tukey para $p < 0.05$.

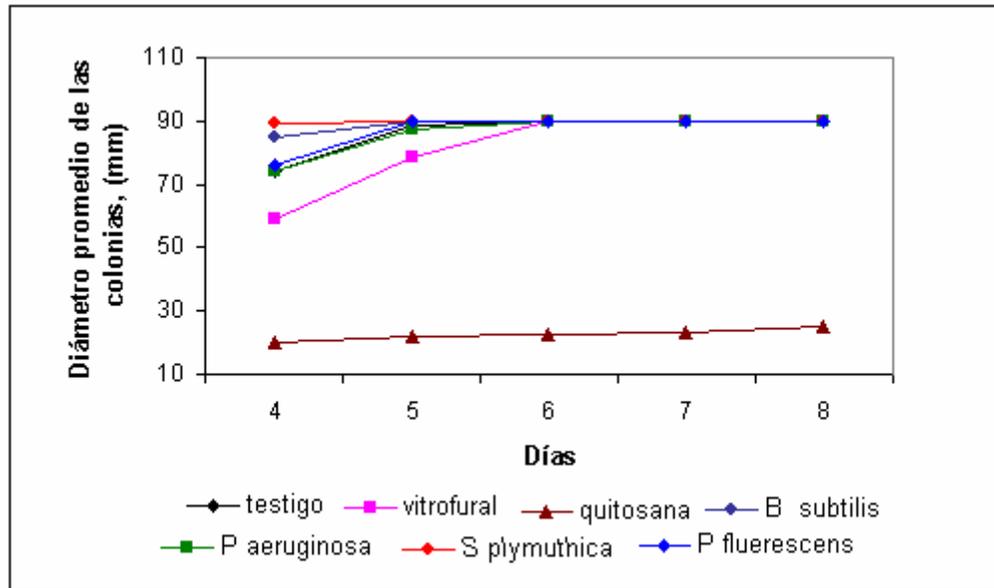
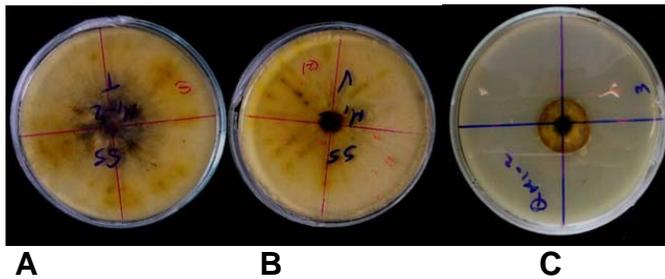


Figura #6: Comportamiento de los posibles inhibidores del crecimiento fúngico con el tiempo.

La Quitosana inhibió significativamente el crecimiento fúngico de M_{1-2} con respecto al testigo sin inhibidor y al resto de los tratamientos, los cuales no inhibieron el crecimiento fúngico. Este comportamiento se mantuvo de modo general durante todo el período de evaluación.

El Vitrofuroral inhibió significativamente a esta cepa fúngica respecto al testigo sin inhibidor y al resto de los tratamientos, manteniéndose este comportamiento hasta el quinto día de evaluación.



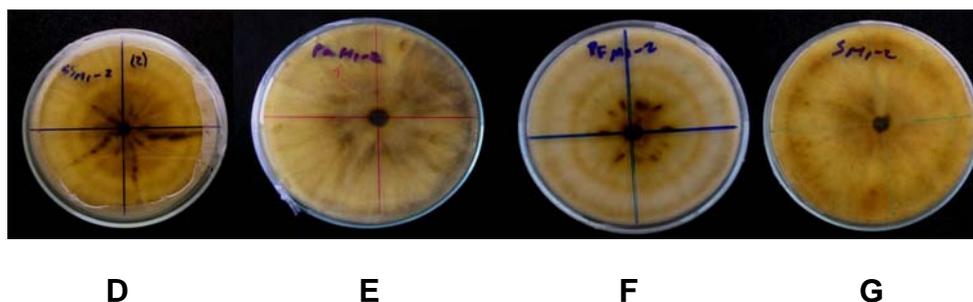


Figura #7: Prueba de susceptibilidad de la (cepa M₁₋₂) al sexto día de evaluación frente a:

- A: Testigo sin inhibidor.
- B: Vitrofuroral.
- C: Quitosana.
- D: *Bacillus subtilis*.
- E: *Pseudomonas aeruginosa*.
- F: *Pseudomonas fluorescens*.
- G: *Serratia plymuthica*

Tabla #3: Diámetro medio de la colonia fúngica (Cepa M₃₋₃) frente a posibles inhibidores y testigo sin inhibidor.

Tratamientos	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Testigo	10.88 ^c	13.66 ^c	16.66 ^b	18.50 ^c	20.83 ^c
Vitrofuroral	8.000 ^c	9.16 ^d	13.83 ^c	15.83 ^d	17.50 ^c
Quitosana	12.66 ^{bc}	18.16 ^{ab}	23.00 ^a	27.83 ^a	31.66 ^a
<i>B subtilis</i>	18.00 ^{ab}	19.83 ^a	22.66 ^a	25.00 ^b	26.33 ^b
<i>P aeruginosa</i>	13.66 ^{abc}	17.33 ^b	22.83 ^a	27.33 ^{ab}	29.00 ^{ab}
<i>P fluorescens</i>	20.16 ^a	19.66 ^a	22.33 ^a	25.83 ^{ab}	27.83 ^{ab}
<i>S plymuthica</i>	18.00 ^{ab}	20.33 ^a	23.16 ^a	26.16 ^{ab}	28.50 ^{ab}

EE (\bar{X})	±1.35	±0.47	±0.32	±0.50	±0.92
------------------	-------	-------	-------	-------	-------

Las letras no comunes en una misma columna difieren por Test de Tukey para $p < 0.05$.

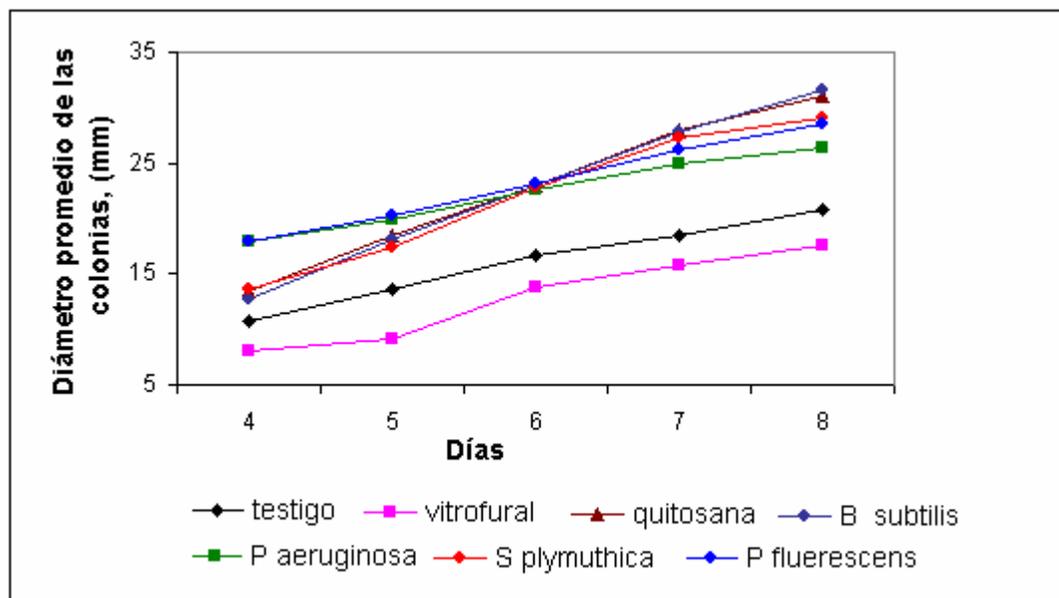


Figura #8: Comportamiento de los posibles inhibidores del crecimiento fúngico con el tiempo.

El comportamiento de M_{3-3} frente a la Quitosana difiere notablemente respecto a las demás cepas fúngicas evaluadas, observándose un incremento significativo del diámetro de la colonia a partir del quinto día cuando se compara con el testigo.

El crecimiento fúngica de esta cepa solo se vio inhibido por el Vitrofural. Al contrario de lo esperado el crecimiento de la cepa no resulta inhibida sino estimulada por el sobrenadante de las cepas bacterianas estudiadas y la Quitosana.

El crecimiento de M_{3-3} en presencia de *Bacillus subtilis* resulta incrementado significativamente cuando se compara con el testigo, lo cual pudiera hacer pensar en la posible liberación de algún factor estimulante del crecimiento.

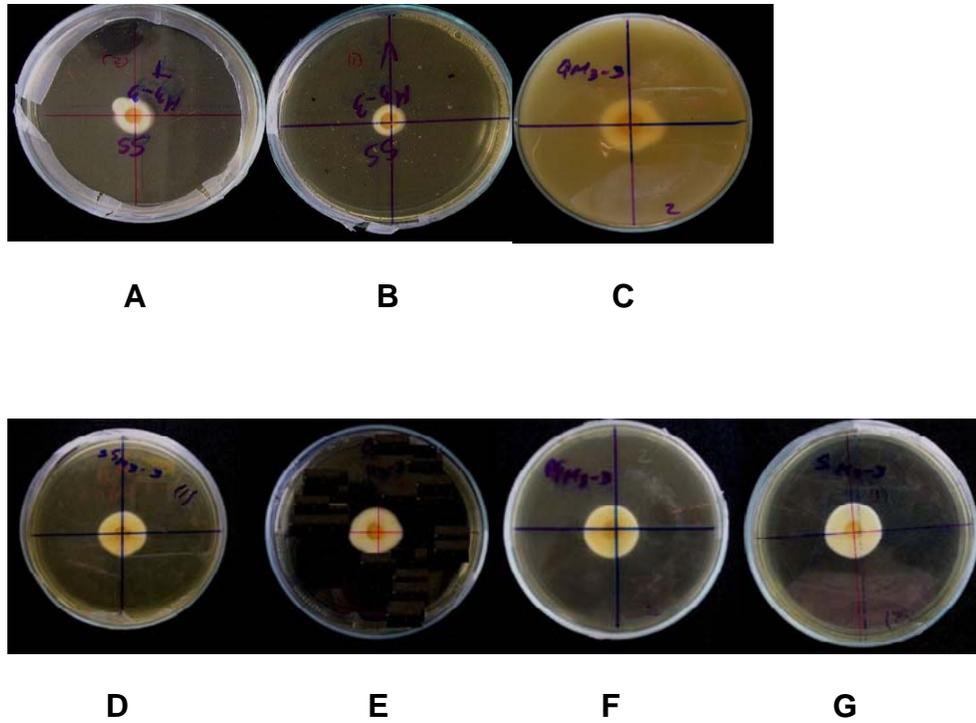


Figura #9: Prueba de susceptibilidad de la (cepa M_{3.3}) al sexto día de evaluación frente a:

- A: Testigo sin inhibidor.
- B: Vitrofuril.
- C: Quitosana.
- D: *Bacillus subtilis*.
- E: *Pseudomonas aeruginosa*.
- F: *Pseudomonas fluorescens*.
- G: *Serratia plymuthica*.

Tabla #4: Diámetro medio de la colonia fúngica (Cepa M_{3.4}.) frente a posibles inhibidores y testigo sin inhibidor.

Tratamientos	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Testigo	46.00 ^{bc}	62.83 ^{bcd}	72.50 ^{bcd}	76.33 ^b	79.00 ^{ab}
Vitrofuril	37.50 ^c	48.66 ^d	63.66 ^{cd}	70.50 ^b	80.16 ^{ab}

Quitosana	18.33 ^d	22.83 ^e	27.66 ^e	31.00 ^c	34.66 ^c
<i>B subtilis</i>	43.66 ^{bc}	51.33 ^{cd}	57.50 ^d	69.50 ^b	74.50 ^b
<i>P aeruginosa</i>	50.33 ^b	65.83 ^{abc}	75.16 ^{abc}	81.16 ^{ab}	84.30 ^{ab}
<i>P fluorescens</i>	51.83 ^{ab}	70.00 ^{ab}	81.83 ^{ab}	90.00 ^a	90.00 ^a
<i>S plymuthica</i>	59.83 ^a	79.66 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a	90.00 ^a
EE (\bar{X})	±1.93	±3.46	±3.12	±2.53	±2.84

Las letras no comunes en una misma columna difieren por Test de Tukey para $p < 0.05$.

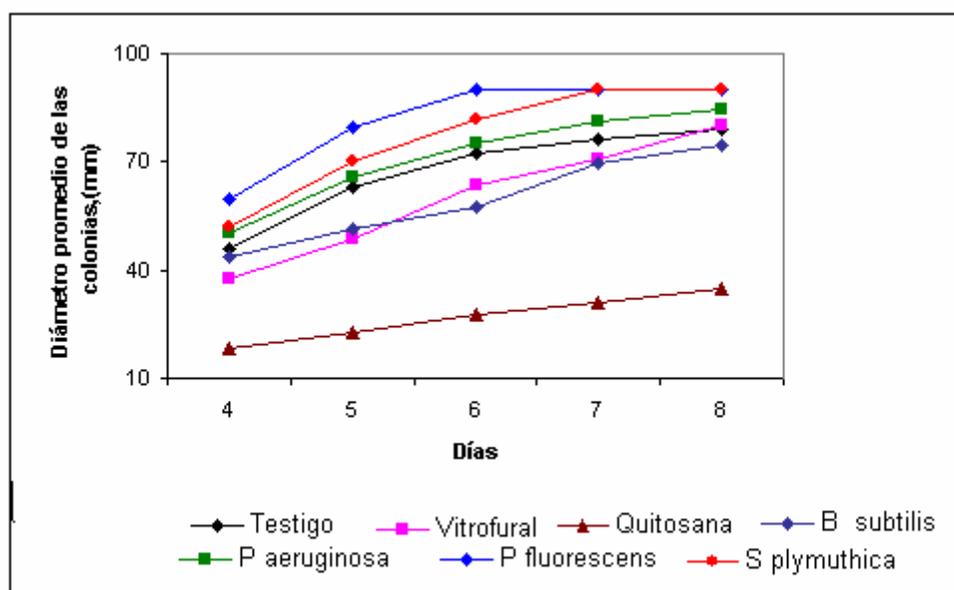


Figura #10: Comportamiento de los posibles inhibidores del crecimiento fúngico con el tiempo.

La Quitosana inhibió significativamente el crecimiento fúngico de M_{3-4} con respecto al testigo sin inhibidor y al resto de los tratamientos, los cuales no inhibieron el crecimiento fúngico. Este comportamiento se mantuvo de modo general durante todo el tiempo de evaluación.

Cuando esta cepa se enfrenta al sobrenadante de *Serratia plymuthica* difiere notablemente, observándose un incremento del diámetro de la colonia. Además

al enfrentarse al sobrenadante de *Pseudomonas fluorescens* difiere notablemente, observándose un incremento del diámetro de la colonia a partir del séptimo día.

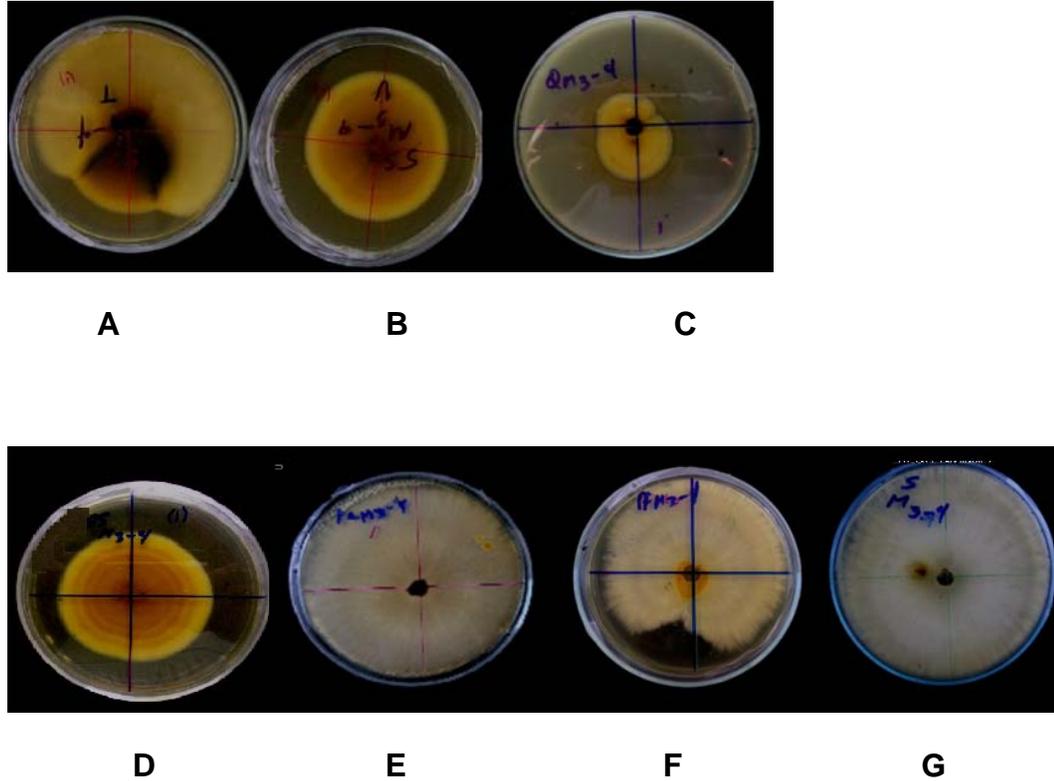


Figura #11: Prueba de susceptibilidad de la (cepa M₃₋₄) al sexto día de evaluación frente a:

- A: Testigo sin inhibidor.
- B: Vitrofurral.
- C: Quitosana.
- D: *Bacillus subtilis*.
- E: *Pseudomonas aeruginosa*.
- F: *Pseudomonas fluorescens*.
- G: *Serratia plymuthica*.

Tabla #5: Diámetro medio de la colonia fúngica (Cepa. M₄₋₅) 3 réplicas) frente a posibles inhibidores y testigo sin inhibidor.

Tratamientos	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Testigo	17.66 ^{ab}	22.16 ^{ab}	26.00 ^{ab}	28.00 ^{ab}	32.00 ^{ab}
Vitrofuraf	14.80 ^{ab}	19.66 ^{abc}	23.76 ^{cd}	27.66 ^{ab}	28.50 ^{bc}
Quitosana	13.50 ^b	18.00 ^{bc}	21.00 ^{de}	23.83 ^{bc}	26.83 ^c
<i>B subtilis</i>	21.50 ^a	23.83 ^a	28.83 ^a	31.83 ^a	34.33 ^a
<i>P aeruginosa</i>	15.16 ^{ab}	16.66 ^c	18.43 ^e	20.16 ^c	21.83 ^d
<i>P fluorescens</i>	17.66 ^{ab}	21.66 ^{ab}	25.16 ^{abc}	28.16 ^a	31.33 ^{ab}
<i>S plymuthica</i>	16.50 ^{ab}	22.16 ^{ab}	25.16 ^{abc}	27.66 ^{ab}	31.16 ^{ab}
EE (\bar{X})	±1.44	±1.02	±0.87	±0.87	±0.82

Las letras no comunes en una misma columna difieren por Test de Tukey para $p < 0.05$.

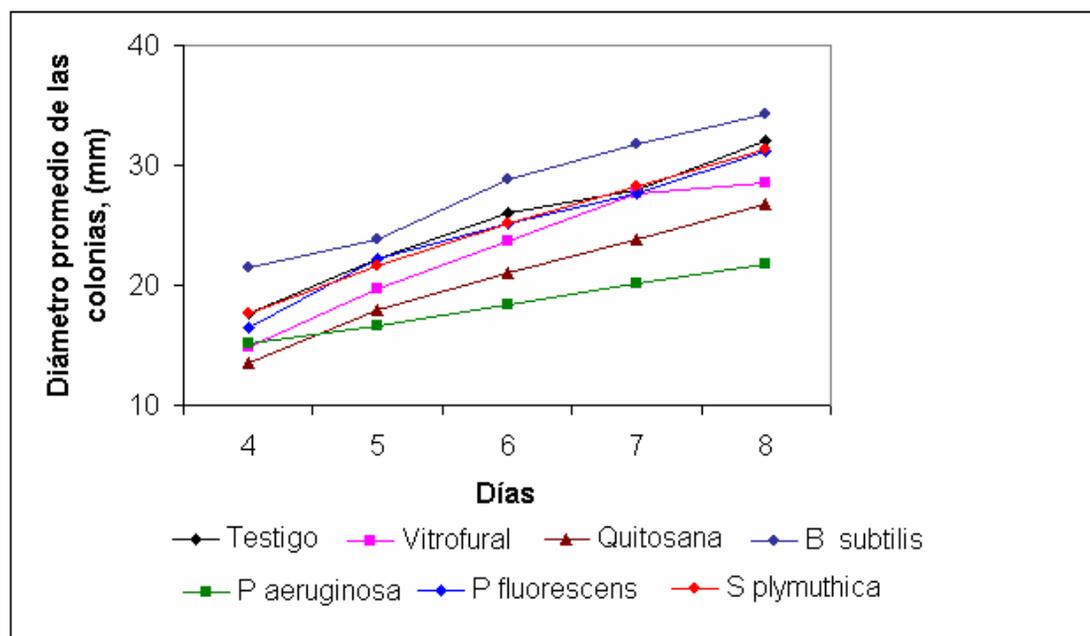


Figura #12: Comportamiento de los posibles inhibidores del crecimiento fúngico con el tiempo.

La cepa se comporto irregular frente a la Quitosana y Vitrofuraf, observándose diferencias significativas solamente el sexto día de evaluación. El sobrenadante **36**

de los posibles inhibidores biológicos no inhibió significativamente el crecimiento fúngico con la excepción de *Pseudomonas aeruginosa* que posee un efecto inhibitorio significativo a partir del quinto día de evaluación.

Esta cepa frente a la Quitosana manifestó un pequeño halo

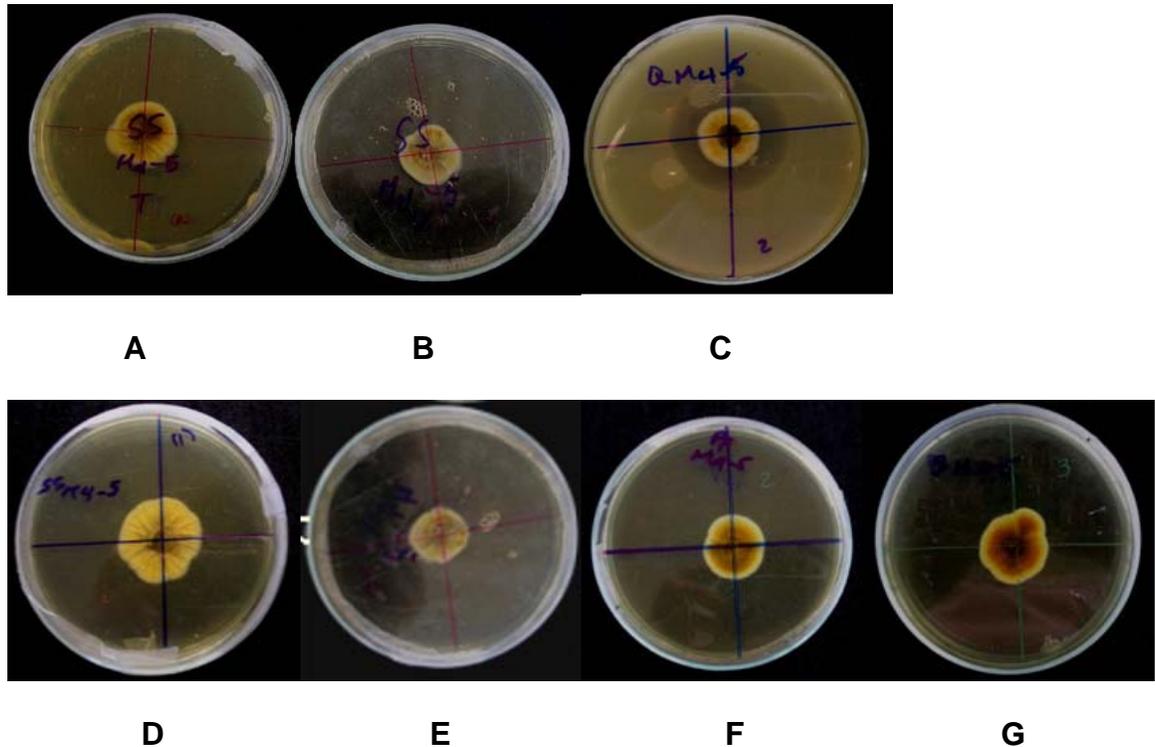


Figura #13: Prueba de susceptibilidad de la (cepa M_{4.5}) al sexto día de evaluación frente a:

- A: Testigo sin inhibidor.
- B: Vitrofuril.
- C: Quitosana.
- D: *Bacillus subtilis*.
- E: *Pseudomonas aeruginosa*.
- F: *Pseudomonas fluorescens*.
- G: *Serratia plymuthica*.

De modo general la Quitosana resulto ser el mejor inhibidor del crecimiento fúngico frente a *Penicillium* cepas (M₄₋₅) y (M₃₋₃), *Cladosporium* cladosporioides cepa (M₃₋₄), *Phycomycetos* cepa (M₁₋₂) y la cepa (M₄₋₇), Silvia y colaboradores, (2005) evaluaron el potencial fungicida o fungistático de la quitosana con diferentes grados de polimerización (bajo, medio y alto peso molecular) y concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%) en el desarrollo “in vitro” de dos cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas de frutos infectados de papaya y obtuvieron resultados positivos defendiendo el potencial fungicida de la Quitosana y la mayor concentración. En estudios “in vitro” del efecto inhibidor de la quitosana y extractos acuosos de plantas sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer*, con la excepción de la esporulación de *P. digitatum*, la quitosana a partir del 1.5% inhibió el crecimiento micelial y la esporulación en comparación con los extractos (Maribel ,2004).

Aunque en el estudio no se obtuvo resultados significativos con el sobrenadante de *Pseudomonas fluorescens* (cepa CMR12) como posible inhibidor existen reportes que demuestran una actividad antagónica de está bacteria (cepa PCL1606) frente a un espectro amplio de hongos patógenos del suelo y una capacidad alta de biocontrol frente a *R. necatrix*. Distintos análisis revelan que esta cepa produce un compuesto antifúngico no identificado anteriormente, que podría estar implicado en el biocontrol. Los mutantes deficientes en la producción de los mismos mostraron una capacidad de biocontrol reducida (Doña et al., 2003). Natalia (2003) aisló un antibiótico peptídico de *Pseudomonas fluorescens* el cual tiene efecto sobre la ultraestructura del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

El sobrenadante de *Serratia plymuthica* usado como posible inhibidor no fue efectivo en ninguna de las cepas probadas. Se tienen referencias que algunos de los mejores antagonistas de *P. infestans* tienen la capacidad de hidrolizar celulosa y glucano, como *Serratia* sp. (cepa 054), *Penicillium* sp. (cepa 071) y *Fusarium* sp. (Cepa 108) los cuales produjeron halos claros cuando se cultivaron en agar con celulosa y glucano (Garita et al., 1998).

Los géneros más prometedores para el biocontrol de patógenos vegetales son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* y *Serratia*. El mejor agente biológico de control para *Sclerotium cepivorum*, "in vitro" fue *Serratia marcescens* con 94.48% (método de estría en placa) y con 92.48% (método de disco en placa) de inhibición (www.raaa.org/resuinv2.html).

Pseudomonas aeruginosa inhibió significativamente el crecimiento de *Penicillium* (cepa M₄₋₅) en las demás no se manifestó el efecto inhibitorio. En ensayos realizados en condiciones controladas, en parcelas experimentales y en el campo para el control de enfermedades foliares y del suelo se encontró que *Pseudomonas aeruginosa* reduce la afectación por *Phytophthora nicotianae* en tabaco, *Phytophthora infestans* (en papa), *A. solani* (en papa y tomate), *Peronospora tabacina*, *Pseudoperonospora cubensis* (en pepino) y *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet (en banano) (Villa *et al.*, 2000).

Bacillus subtilis., no muestra efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas fúngicas evaluadas sino que se observó estimulación del crecimiento de la colonia M₃₋₃, superior al testigo sin inhibido. Se ha publicado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos. y también se observaron vacuolización y deformación de las hifas de *Rhizoctonia solani* y *Penicillium ultimum* provocadas por la formación de un compuesto volátil con propiedades fungicidas (Fernández- Larrea, 2001). Otros hongos frente a los cuales *Bacillus subtilis* ha mostrado un potente efecto inhibitorio son *Ascosphaera apis* (Reinald , 2004), y *Pythium aphanidermatum* (Sánchez, 2000).

3.3. Prueba de susceptibilidad bacteriana.

Los sobrenadantes bacterianos evaluados como posibles inhibidores así como la Quitosana y el Vitrofuril a las concentraciones probadas no inhibieron el crecimiento bacteriano, lo cual se evidencia al no observarse la formación de halo de inhibición.



CM4-4

CM3-1

CM2-8



CL3md (1)

CL2ii

CL4id



CL4md

CL3md (3)

CL4mi

Figura #14: Prueba de susceptibilidad bacteriana frente a *Pseudomonas fluorescens*.

Conclusiones.

1. *Cladosporium* cladosporioides (M₃₋₄), *Penicillium* spp. cepas (M₄₋₅) y (M₃₋₃), y la cepa (M₁₋₂) pertenece a la clase *Phycomycetos* son hongos filamentosos aislados en las biofábricas de Ciego de Ávila y Sanctus Spiritus frente a los cuales se evaluó el posible efecto inhibitor de Quitosana, Vitrofuril y sobrenadantes bacterianos.
2. La Quitosana inhibió significativamente a las cepas (M₄₋₇), (M₁₋₂) y (M₃₋₄), el Vitrofuril inhibió a la cepa (M₃₋₃) y el sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* inhibió el crecimiento de la colonia en la cepa (M₄₋₅).
3. Los sobrenadantes de *Pseudomonas fluorescens*. y *Serratia plymuthica*. no mostraron efecto inhibitorio sobre ninguna de las cepas evaluadas.
4. El sobrenadante de *Bacillus subtilis*. estimuló el crecimiento de la cepa (M₃₋₃).
5. El crecimiento bacteriano de ninguna de las cepas bacterianas fue inhibido por los productos evaluados.

Recomendaciones.

1. Se recomienda continuar el estudio de la Quitosana como inhibidor del crecimiento fúngico probando a concentraciones menores de 0.5%.
2. Continuar el estudio de los sobrenadantes bacterianos como posibles inhibidores del crecimiento fúngico variando las condiciones de fermentación y prolongando el periodo de evaluación.

Bibliografía.

- Agrios, G.N., 1990. Plant Pathology. Academic Press, Londres, U.K.
- Alderson, P.C. and Dullforce, W.M., Eds., University of Nottingham Trent Print Unit, Nottingham, U.K.
- Alvarado, Yelenys 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba: Ed Instituto de biotecnología de las plantas(IBP): 80-104
- Alvarado, Yelenys; L.Herrera y L. García. 1993. Estudio preliminar sobre la I contaminación microbiana en la Biofabrica de Villa Clara. Resúmenes Tercer Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Santa clara, Cuba: IBP: 35-36.
- Amski, E. and Umiel, N., 1978. Streptomycin resistance in tobacco II. Effects of the drug on the ultraestructure of plastids and mitochondria in callus cultures. Z. Pflanzanphysiol. 88: 317-325.
- Área de desarrollo. En: Botrytis: nuevas estrategias de control cultural, biológica y química en uva de mesa. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Chile. Santiago, Chile.82-88.
- Arias, O.1996. Tendencias actuales en la utilización de vitroplantas. IV Coloquio de Biotecnología. –Santa Clara, Cuba: IBP: 23.
- Baker, K. F and Cook, R.J. 1974. Biological control of Plant Pathogens. Freeman. San Francisco, USA.
- Berrger, F.; Waites, W.M. and Leifert, C, 1994,. An improved surface disinfection method for shoot explants from *Iris* rhizomes infected with bacterial soft rot (*Erwinia carotovora* sub sp. carotovora). J. Mort. Ski. 69: 1-4.
- Blake, S., 1988. Mites and trips as bacterial as fungal vectors between pant tissue cultures. Acta Hort: 225:163-166.
- Boxus, P. H., and Terzi, J. M., 1987. Big lotees due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation schem. Acta Hort. 212:91-93.
- Brian P.W., 1957. Effects of antibiotics on plants. Ann. Rev. Plant Pathol. 8: 413-426.
- Burge, H. A, M. L. Muilenberg y J. AChapman, 1991. Crop plant as a **43**

source of fungus spores of medical importance. Microbial ecology of leaves. Berlin: Springer/verlag: 22-236.

- Burns, J. A, Schwarz, O. J., 1996. Bacterial stimulation of adventitious rooting on *in vitro* cultured slash pine (*Pinus elate engeelm*) seedling explants. Plant Cell Rep. 15:405-408.
- Calvente, V.; Benuzzi, D. y M.I.S. de Tosetti. 1999. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. International Biodeterioration & Biodegradation 43.p. 167-172
- Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Cambridge 218p.
- Cárdenas, G, 2004. Quitosano: una alternativa a los pesticidas químicos, Proyectos Innova Bío Bío, No 536 viernes 15 de octubre.
- Carrera ,L. Universidad Nacional de Costa Rica
- Cassells, A C., 1991. Problem in tissue culture: culture contamination Micropropagation Oordrecht: Kluwer Academic Publishers. 31-45.
- Cassells, A.C., 1986. Production of healthy plants. In: -Proceedings of Institute of Horticulture Symposium: Micropropagation in Horticulture. pp. 51-71.
- Cuba, 1998. Ministerio de la agricultura. Instructivo técnico del cultivo de la malanga. C.de la Habana: CIDA: 3-9
- Danby, S., H. A S. Epton y C. Leifert., 1994b. Fungal contamination's of *Primula*, *Coffea*, *Musa* and *Iris* tissue cultures. En Phisiology, Growth and Developement of Plant in culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 379-385.
- Danby, S., Hampson, S. P., Joshi, S., Sigee, H. A, Epton, S, Leifert, S. 1994a. Activity of antifungal produced by *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* against comos fungal contamination of plant tissue cultures. En physiology, growth and development of plant in culture. Holland: Kluwer Academic Publisher: 404-408.
- Debergh, P. C. y L. Maene., 1984. Pathological and physiological. problems related to the *in vitro* culture of plant. Parasitica 40: 69-75.

- Dodds, J.H. and ROBERTS, L.W., 1981. Some inhibitory effects of gentamicin of plant tissue cultures. *In vitro*. 17: 469-476.
- Elmeskaoui, A, Damont, J. J. P., Pinches, Y., et. al. 1995. Tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza*. 5: 313-319.
- Enjalric, F.; CARRON, M.P. and LARDET, L., 1988. Contamination of primary cultures in tropical areas: the cause of *Hevea brasiliensis*. *Acta Hort*. 225: 57-65.
- Escalona, M. 1999. Micropropagación en sistema de inmersión temporal de la piña. Tesis (Doctor en Ciencias Agrícola) Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. P-94.
- Fernández- Larrea, V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 62 p. 96 - 100.
- Ferreira, J. H., Matter, F., Tomas, A.C., 1991. Biological control of *Ectypes* late grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*.81: 283-287.
- Fisse, J. J., Bátele, A. Y J. Pera., 1987. Endogenous bacteria elimination in ornamental plant. *Acta. Hort*. 212: 87-90.
- Garita, S., 1998. Efecto de los sustratos celulosa y glucano sobre antagonistas de *Phytophthora infestans* en tomate. web.catie.ac.cr/información/RMIP/rmip58/art6-a.htm
- George, E. F., 1993. Plant propagation by tissue culture. U K: Exegetic L TD: 130-143
- George, E. F. and Sherrington, P., D., 1984. Plant propagation by tissue culture.
- Herman, E. B., 1996a. Beneficial effect of bacterial and fungi on plant tissue cultures. *Agricell Rep*. 27:26-27.
- Herman, E. B., 1996b. Microbial contamination of plant tissue cultures. *Recent avances in plant tissue culture IV*. Shrub Oak (NY): AgritechCons, Inc.
- Herman, E. B., 1990a. Bacterial contamination in propagation. *Agricel reportó* 14: 41-43.

- Herman, E. B., 1990b. Non axenic plant tissue culture: possibilities and opportunities. *Acta Hort.* 280:112-113.
- Hoffman P.N.; Death, J.E. and Coates, D., 1981. The stability of sodic hypochlorite solutions. In: *Desinfectants: their use and evaluation of effectiveness.* pp. 77-83. Collins, C.H., Elwood, M.C., Bloomfield, S.F. and Fox, A., Eds., Academic Press, London, U.K.
- Hooker, J. E., Gianinazzi, S., Vestberg, M., 1994. The application of *arbuscular mycorrhizal* fungi to micropropagation system: and opportunity to reduce chemical input. *Agric. Sci. Finland.* 3: 227-232.
- Kneifel, W. y W. Leonhardt, 1992. Testing of different antibiotics against Gram positive and Gram negative bacteria isolated from plant tissue culture. *Plant cell! tissue and organ culture.* 29: 754-756.
- Leifert, C., Morris, C. E., Waites, W. M., 1994a. Ecology of microbial saprophyte and pathogen in tissue culture and yield-growth plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical review in plant science* 13(2): 139-183.
- Leifert, C., Waites, B., Keetley, W., Wright, S. M., Nicholas, R., 1994b Effect of medium acidification in filamentous fungi, yeast and bacterial contamination *in Oephimium* tissue culture. *Plant. Cell. Tisú. Org. Cult.*
- Leifert, C., Ritchie, J., Waites, M. N., 1991a. Contaminant of plant in tissue and cell culture. *Word Journal of Microbiology and biotechnology* 7: 452-469.
- Leifert, C., Murphy, K. P., 1991b. Effect of mineral nutrition on plant of tissue culture plant. *Horticulturated exploitation of recent biological development.* Preston, U. K: Lancashire Polytechnics Publication Service. 43-57.
- Matthews, R. E. F. 1991. *Plant Virology.* 5 Ed. New York: Academic Press: 88-103.
- Murphy, J. A., Mark, L., Perappuram, 1997. Microbial characterization and preparing of inoculum's of *in vitro* micorrization of stramberry in autotrophic culture. In: Cassell, A. L., ed. Dordrecht (NL): Kluwer Acad. Pú. b.
- Natalia, B, 2003. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas Facultad de Ciencias. Montevideo. Uruguay. Septiembre de 2003
- Nowak, J., Asiedu, S.K., Lazarovits, G., 1995. Enhancement of "in vitro" **46**

- growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plant cocultured with a plant growth promoting rhizobacterium. In: Carre, F. Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* culture: 173-180.
- Pezet, R. Pont, V. and Tabocchi, R. 1999. Simple analysis of 6-pentyl-pyridine, a major Antifungal Metabolite of *Trichoderma spp.*, Useful for Testing the Antagonistic Activity of these Fungi. *Phytochemical Analysis* 10.p. 91-98.
 - Preininger, E., Zatyko, J., et. AL, 1997. In vitro establishment of nitrogen fixing strawberry via artificial symbiosis with *Azomonas insignis*. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.* 33P: 190-194.
 - Reed, B. M., Buckley, P. M., Tanprasert, N., 1995. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagation Mint plant *in Culture*. University Collage: 1-21.
 - .R. Doña, F.M. Cazorla, G.V. Bloemberg, A. Pérez-García, B.J.J. Lugtenberg y A. de Vicente, 2003. Un compuesto antifúngico producido por *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 Está implicado en el biocontrol frente a la podredumbre radicular del aguacate causada por dematophora .Congreso Mundial del Aguacate V. 84-85.
 - Sharma, V.K., Nowak, J., 1998. *Verticillium* wilt suppression in tomato with *pseudomonad bacterium*. *Can. J. Microbial.* (in press).6.
 - Silvia, B.B., Mónica, H., 2005. Efecto del quitosano” in vitro” en el desarrollo y morfología de dos aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 23-1 (enero-junio).
 - Silvia, B.B., Mónica, H., 2004. Evaluación “in vitro” del efecto inhibidor del quitosano y extractos acuosos de plantas sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer*.. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 22-1 (enero-junio)
 - Silva, L.; Ciampi, L.; Fuentes, R.; Schobitz, R. 2000. Evaluación de biocápsulas bajo condiciones de campo para el control de *Rhizoctonia solani* AG-3 en papa. www.alerce.inia.cl/sochi9fit/VIII.htm
 - Smit, I. M., Dunez, J., Lelliot, A, Philip, H., Archer, A, 1986. European handbook of plant disease. Blackwell Scientific publication: 211-215. **47**

- Sturz, A V., 1997. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant Physiol.* 147:447-451
- Sykes, G., 1965. *Disinfection and sterilization* E and F.N. Spon Ltd., London, U.K.
- Vero, S., y Mondino, P. 2002. Control Biológico de enfermedades de plantas. En *Perfil Ambiente del Uruguay 2002*, Ana Domínguez y Rubén Prieto (Coordinadores).p. 81-92.
- Villa, Pilar; Marusia Stefanova; S. Palma; De. Gómez. 2000. Identificación de *Pseudomonas* sp., cepas PSS con efectos antagónicas contra hongos fitopatógenos. Informe de investigación. Instituto cubano de investigaciones de los derivados de la caña de azúcar (ICIDCA), La Habana, Cuba: 10 p.
- Voisard, C., Keel, C., Hass, D. and Defago, G., 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress back root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO Journal* 8: 351-358.
- Weller, R., 1997. Microbial communities on human tissue, an important source for contaminants in tissue cultures. Abstracts of the 2nd International Symposium on bacteria and bacterial contaminants of plant tissue culture. University College: 1-20.
- Wilhelm, E., Arthofer, W., Schafleitner, R., et. Al., 1997. *Bacillus subtilis* and endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight. *Kluwer Acad. Publ.*: 331-337.
- Wright, S. J., Thompson, R., 1985. *Bacillus volatilis* antagonizes cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 30: 263-267.
- wwwpmon@fagro.edu.uy
- wwwpostgluzpuntofijo@cantv.net
- www.raaa.org/resuinv2.html.