

Técnicas de purificación de aislamientos de *Phytophthora* contaminados por bacterias

Eréndira Solache-Huacuz, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Alina Estefanía Naranjo-Bravo, Marlene-Díaz Celaya y Sylvia Patricia Fernández-Pavía

Laboratorio de Patología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Resumen

Un gran número de enfermedades en cultivos agrícolas y en bosques son causadas por *Phytophthora* a nivel mundial. A pesar de los avances en el conocimiento de estos patógenos, aun causan importantes pérdidas económicas en la agricultura. Durante el proceso de aislamiento de oomicetes de tejidos vegetales enfermos o de suelo de siembra, es común obtener aislados contaminados por bacterias, aun con medio de cultivo selectivo con antibióticos. La contaminación bacteriana inhibe el crecimiento micelial de los oomicetes ya que las bacterias producen estructuras reproductivas más rápidamente. Lo anterior afecta estudios posteriores de caracterización genética y morfológica de esos aislamientos. Por lo cual, es indispensable contar con un método para purificar el micelio. La utilización de antibióticos principalmente tiene dos desventajas, el desarrollo de resistencia de las bacterias y su elevado costo. El objetivo de esta investigación fue evaluar tres técnicas para la purificación de micelio de *Phytophthora* contaminado con bacterias. El primer método consistió en la utilización de la celda de Van Tiegham en medio V-8. El segundo se basó en la acidificación (pH 3.5± 0.1) del agar papa dextrosa (APD), con ácido tartárico. El tercero denominado de superposición, consistió en colocar en una caja de Petri vacía un cubo de medio de cultivo con micelio contaminado y sobre este un cubo de medio limpio. Mediante las tres técnicas fue posible purificar el micelio de *Phytophthora*, lo cual fue verificado en caldo Luria. El método con el que se obtuvieron mejores resultados fue el medio de cultivo acidificado con 90% de aislamientos puros, seguido del de la celda con 25% y por último con el de superposición con 15%. La utilización de medio cultivo acidificado representa una alternativa de bajo costo para substituir la adición de antibióticos para la purificación de aislamientos de *Phytophthora* contaminados con bacterias.

Palabras clave: ácido tartárico, celda Van Tiegham, antibióticos

Abstract

Many diseases in agricultural crops and forests are caused by *Phytophthora* around the world. Even though there are advances in the knowledge of this pathogen, it still causes important losses in agriculture. During the isolation of *Phytophthora* from diseased tissue or soil, it is common to have isolates contaminated with bacteria even when selective culture media with antibiotics are used. Bacterial contamination inhibits mycelial growth of oomycetes since bacteria form reproductive structures faster. Interfering with studies of morphological and genetic characterization of such isolates. Therefore, it is necessary to have a method to purify the mycelium. Utilization of antibiotics presents two major disadvantages, development of bacterial resistance and the high cost of these products. The objective of this research was to evaluate three techniques to purify the mycelium of *Phytophthora* contaminated with bacteria. The first method consisted in the use of the Van Tiegham cell, the second one was based on acidification (pH 3.5± 0.1) of potato dextrose agar (PDA) media with tartaric acid. The third one called superposition, consisted in placing a cube of contaminated culture media with mycelium and on top of this a cube of clean media. It was feasible to purify *Phytophthora* mycelium with the three techniques; it was verified using Luria broth. The method that gave the best results was the acidified culture media, with 90% of pure cultures, followed by the cell method with 25%, and the least effective was the superposition method with 15%. The utilization of acidified culture media represents an alternative of low cost to substitute the addition of antibiotics to purify isolates of *Phytophthora* contaminated with bacteria.

Keywords: tartaric acid, Van Tiegham cell, antibiotics

Introducción

Un gran número de enfermedades en cultivos agrícolas y en bosques son causadas a nivel mundial por el oomicete fitopatógeno *Phytophthora*. A pesar de los avances en el conocimiento de este patógeno, aun continúa causando importantes pérdidas económicas en la agricultura. Durante el proceso de aislamiento de oomicetes de tejidos vegetales enfermos, de suelo de siembra o de agua de riego, es común obtener cultivos contaminados por bacterias aun utilizando medio selectivo con antibióticos (Erwin, 1996). La contaminación bacteriana afecta el estudio de los oomicetes de varias maneras; por una parte, inhiben el desarrollo de micelio y la formación de estructuras reproductivas, las bacterias contaminantes compiten por los nutrientes del

medio de cultivo, estas pueden producir antibióticos que afectan directamente al oomiceto, o los parasitan directamente. Lo anterior hace indispensable contar con procedimientos para purificar el micelio de la contaminación bacteriana (Pitt & Hocking, 2007). Las desventajas que presenta la utilización de antibióticos en los medios de cultivo son; el desarrollo de resistencia a los antibióticos de las cepas bacterianas, el alto costo de estos productos, y la inhibición de la germinación de las esporas de oomicetos cuando se utilizan altas concentraciones de antibióticos, lo que dificultará el aislamiento de los oomicetes. Además, en ocasiones es necesario adicionar más de un antibiótico al medio de cultivo porque los aislamientos de oomicetos podrían estar contaminados con bacterias Gram negativas y Gram

positivas (Erwin, 1996).

Existen métodos alternativos para la purificación de oomicetes que no incluyen el uso de antibióticos, los cuales se basan en la diferencia de crecimiento micelial con respecto al crecimiento de las colonias bacterianas. El micelio tiene la capacidad de crecer sobre la superficie y al interior del medio de cultivo, mientras que las bacterias pueden crecer sobre la superficie pero no al interior del medio de cultivo. La utilización de la celda de Van Tiegham para limpiar micelio contaminado con bacterias se basa en lo anterior (Erwin, 1996). La celda de Van Tiegham consiste de un cilindro de vidrio con 1.6 cm de diámetro y 1 cm de altura. El cilindro está dentado en uno de los extremos y liso en el otro extremo (Figura 1). La celda se coloca con la parte dentada dentro del medio de cultivo, y en el centro de esta se coloca un disco de medio con micelio del oomiceto contaminado con bacterias (Figura 2). El micelio del oomiceto crecerá hacia el interior del medio de cultivo por la pared interna de la celda. Cuando alcanza la parte dentada de la celda crecerá hacia arriba, buscando la superficie del medio de cultivo. Debido a que las bacterias no pueden crecer dentro del medio de cultivo, el micelio emergerá en la parte externa de la celda libre de bacterias.



Figura 1. La celda de Van Tiegham es un cilindro con una de las superficies dentadas.

Otro método que se basa en la diferencia de crecimiento del micelio con respecto al crecimiento bacteriano en medios de cultivo sólidos, consiste en colocar en una caja de Petri vacía, un cubo de medio con micelio contaminado y sobre este un cubo o un triángulo de medio limpio. El micelio crecerá al interior del cubo o triángulo de medio limpio, y emergerá en la superficie de estos libre de bacterias. El medio que se coloca sobre el cubo de medio con micelio contaminado puede ser medio selectivo. Se puede utilizar medio PARP si se quiere limpiar un cultivo de *Pythium* o medio PARPH si se quiere limpiar un cultivo de *Phytophthora* (Erwin, 1996, Ristaino et al., 2010). Un inconveniente de este procedimiento es que involucra el uso de antibióticos para la preparación del medio selectivo.

Otros protocolos se basan en acidificar el medio de cultivo a un pH de 3.5± 0.1, con ácido tartárico (0.14%) o con ácido láctico entre otros (Koike, 2007, Walker & White, 2005). Las bacterias por lo general no son capaces de crecer en medios de cultivo acidificados, ya que la mayoría tienen un pH favorable

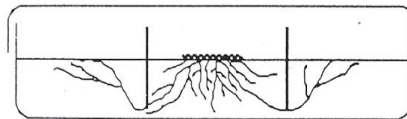


Figura 2. La celda de Van Tiegham se coloca en el centro de la caja. Se puede observar el crecimiento del micelio saliendo en un orificio de la parte dentada, hacia el interior del medio, el cual emergerá en la superficie.

de crecimiento entre 6.8-7.2. Mientras que los oomicetes tienen mayor capacidad de adaptación a la acidez que las bacterias, ya que el intervalo permisible de pH para el cultivo *in vitro* de los oomicetes oscila entre 3.5 y 10, con un crecimiento óptimo específico entre 4.5-5.5 para la mayoría de las especies (Erwin, 1996). El objetivo del presente estudio fue determinar la eficacia de tres técnicas para la purificación de aislamientos de especies de *Phytophthora* contaminados con bacterias; la celda de Van Tiegham, el método de superposición y la acidificación del medio de cultivo.

Materiales y métodos

Aislamientos

Se utilizaron 20 aislados de *Phytophthora* obtenidos de tejido vegetal enfermo y suelo agrícola, en medio selectivo harina de maíz agar y agar V8. Todos los aislados tenían contaminación bacteriana. Los aislamientos fueron identificados como *P. capsici* (15), *P. cinnamomi* (3) y *P. drechsleri* (2).

Medios de cultivo

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión por 20 minutos.

Harina de maíz agar

Se preparó agregando 17 g/L de medio harina de maíz agar (Fluka Analytical, Sigma) pulverizado en agua destilada.

Agar papa dextrosa acidificado

Se preparó agregando 39 g/L de APD (BD Bioxon) del polvo en agua destilada. Antes de vaciarlo en cajas Petri se le agregó una solución estéril de 14 ml de ácido tartárico al 10% (p/v).

V8 agar

El medio se preparó conforme a la siguiente formulación g/L: 3 de CaCO₃ (Sigma), Agar bacteriológico 20 (BD Bioxon), 160 ml jugo V8 (Campbell's) y 840 ml de agua destilada. Se vació en cajas de Petri cubriendo aproximadamente 8 mm de espesor.

Medio selectivo PARP (modificado)

El medio se preparó utilizando V8 agar o bien harina de maíz agar, como se describió en los párrafos anteriores. Después de que se esterilizó se le adicionaron los siguientes compuestos: pentacloronitrobenzeno (PCNB) 0.10 g/L, ampicilina (SIGMA) 0.27 g/L, rifampicina (SIGMA) 0.01 g/L y natamicina 0.02 g/L (Delvocid Instant). Este medio es una modificación del medio original PARP (Erwin, 1996), en el cual se substituyó la pimarcina por natamicina, por el alto costo del primero.

Caldo Luria-Bertoni

Este medio se preparó agregando 20 g/L de medio deshidratado LB (Difco). Posteriormente se colocaron alícuotas de 2 ml en tubos de ensaye con tapa de rosca para proceder a la esterilización por autoclave.

Métodos de Purificación

Celda de Van Tiegham

Las celdas de Van Tiegham se colocaron en la parte central de cajas Petri con medio V8 agar. Las celdas, previamente esterilizadas en autoclave, se colocaron en el medio de cultivo introduciendo el extremo del cilindro con la parte dentada hacia abajo hasta tocar el fondo de la placa. Se colocó un cubo de medio de cultivo con micelio contaminado en el interior de la celda, con la superficie que contiene el micelio en contracara de la superficie del medio V8. Se incubó a 25 °C por 24-48 h.

Medio acidificado

Cubos de medio de cultivo con micelio contaminado fueron colocados en contracara de la superficie de las placas de medio APD acidificado.

Método de superposición

Un cubo de medio con micelio contaminado se colocó en una caja de Petri estéril vacía, orientando el crecimiento micelial hacia arriba. Sobre este se colocó otro cubo de medio estéril cortado del mismo tamaño. Se incubaron a 25 °C por 7-12 días (Figura 3). Se utilizó un microscopio estereoscópico para observar si creció micelio en el cubo de medio colocado en la parte superior.

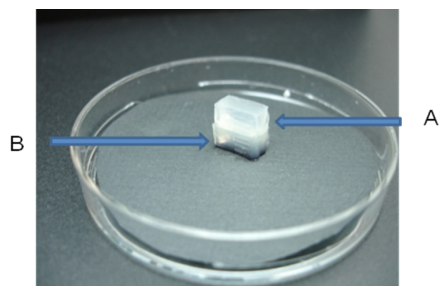


Figura 3. Método de superposición en el que se muestra el cubo de medio estéril (A) sobre el cubo con micelio contaminado (B).

El micelio que creció utilizando los diferentes métodos se transfirió a cajas Petri con medio V8 agar. En el caso del método de superposición se tomó el micelio de la parte superior del cubo, evitando obtener micelio de la parte lateral.

Confirmación de pureza en medio LB

El crecimiento micelial que se obtuvo utilizando las diferentes técnicas, se inoculó en medio LB para confirmar la eliminación de las bacterias. En condiciones estériles, se cortaron dos cubos de medio con micelio, se colocaron dentro de tubos de ensaye que contenían 2 ml de caldo LB estéril. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 24-48 hrs.

Resultados y discusión

El método de superposición permitió purificar 3 aislamientos (15%), por lo que se considera que su efectividad fue baja (Cuadro 1). Este método en el que se utilizó un cubo de medio limpio y otro de medio con micelio contaminado no se consideró eficaz, ya que en ocasiones el micelio contaminado creció por los lados del cubo limpio en lugar de crecer en su interior. Con este método se lograron purificar aislamientos pertenecientes a los tres taxones señalados.

Se repitió el experimento del método de superposición con algunas modificaciones con un aislamiento contaminado de *P. cinnamomi*, que no pudo ser purificado con el método normal de superposición. Se utilizó un bloque de medio limpio de mayor tamaño en forma de triángulo como lo reportan otros protocolos (Ristaino *et al.*, 2010). Se detectó que el micelio que emergió del triángulo de medio limpio si estaba libre de contaminación bacteriana. Lo anterior indicó que la efectividad de esta técnica fue la mayor de lo que se determinó en este estudio pero será necesario probarlo con un mayor número de aislamientos.

El método de la celda de Van Tiegham permitió purificar 5 aislamientos (25%) (Cuadro 1). Con éste método se purificaron aislados de *P. capsici* y *P. cinnamomi*. La utilización de la celda de Van Tiegham está limitada por su disponibilidad en las casas comerciales. En ocasiones es recomendable que un fabricante local elabore las celdas en base a una muestra de las mismas.

El método con el que se obtuvieron los mejores resultados fue con el medio de cultivo acidificado con ácido tartárico ya que se purificaron 18 de los aislamientos (90%) de los mostrados en el Cuadro 1. Sin embargo, el 10% de los aislamientos no crecieron en el medio de cultivo acidificado (Fig. 4). Se ha observado que algunos hongos tienen un crecimiento micelial reducido cuando se cultivan en un medio cultivo acidificado. Se ha reportado que los ácidos orgánicos utilizados para acidificar el medio de cultivo inhiben más el crecimiento de hongos que los inorgánicos, ya que los orgánicos bajan el pH intracelular (Walker & White, 2005). El ácido tartárico es un ácido orgánico que podría inhibir el crecimiento de oomicetes, por lo cual es necesario ampliar este estudio incluyendo más especies de *Phytophthora* para determinar si no existe un efecto inhibitorio.

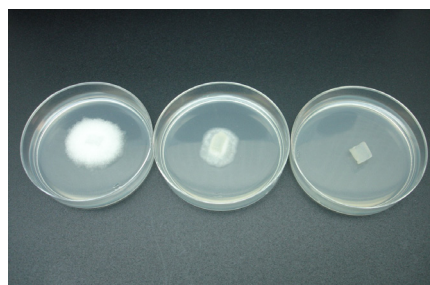


Figura 4. Crecimiento de diferentes aislamientos en medio acidificado.

El medio de cultivo acidificado es usado comúnmente para eliminar bacterias en el aislamiento de hongos. Sin embargo, existen pocos reportes sobre su utilización en la eliminación de bacterias en cultivos de oomicetes (Fernández-Pavía *et al.*, 2006). El costo del ácido tartárico es menor que el de los antibióticos

Especie	Total de Aislamientos	Celda de Van Tiegham	Medio acidificado	Superposición
<i>P. capsici</i>	11	.*	+**	-
	1	+	+	-
	1	+	-	-
	1	-	+	+
	1	+	+	+
<i>P. drechsleri</i>	1	-	+	-
	1	+	+	-
<i>P. cinnamomi</i>	2	-	+	-
	1	+	-	+

Cuadro 1. Aislamientos de *Phytophthora* que se purificaron utilizando las tres técnicas, algunos aislamientos se limpiaron con más de una técnica.

* aislamiento no purificado
** aislamiento purificado

ya que únicamente se invierten 3.70 pesos mexicanos por litro de medio de cultivo. Para algunos laboratorios de investigación, el uso de antibióticos en la purificación y cultivo de hongos fitopatógenos es inaccesible por su alto costo; además de que en ocasiones se requiere más de dos antibióticos para controlar la amplia diversidad de géneros bacterianos Gram Positivos y Negativos que lo impiden. La acidificación de medios de cultivo para eliminar contaminación bacteriana de aislamientos de oomicetos, es una alternativa viable para laboratorios con recursos limitados. Es importante señalar que no se recomienda mantener los aislamientos en este medio de cultivo por un tiempo prolongado ya que el micelio crece distorsionado.

El medio de cultivo acidificado representa una alternativa económica para purificar cultivos de oomicetos contaminados con bacterias. Además, es recomendable emplear medio de cultivo acidificado para obtener aislamientos de tejidos enfermos, como se ha reportado para *Phytophthora capsici* (Fernández-Pavía et al., 2006). La utilización de las técnicas de superposición y celda de Van Tiegham se recomienda solamente cuando los aislamientos no crezcan en medio cultivo acidificado.

Referencias

- Erwin DC, Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, pp. 562.
- Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G, López-Ordaz A, Fernández-Pavía YL. 2006. First report of *Phytophthora capsici* causing wilt in hydroponically grown cucumber in Mexico. *Plant Disease*, 90: 552.
- Koike ST, Gladders P, Paulus AO. 2007. *Vegetable Diseases*. A color handbook. Manson Publishing, Ltd, London, pp. 448.
- Pitt JI, Hocking AD. 2009. *Fungi and food spoilage*. Springer. London, pp. 519.
- Ristaino JB, Ivors K, Bonans P, Gómez-Alpizar L, Blanco-Meneses M. 2010. *Rapid diagnostic tools for Phytophthora on horticultural crops*. Workshop: Implementación de herramientas de diagnóstico rápido para *Phytophthora* en cultivos agrícolas en Centro América. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica Junio 28-Julio 2, 2010.
- Walker GM, White NA. 2005. Introduction to fungal physiology. In K Kavanagh (ed), *Fungi, Biology and Applications*, pp 1-34. John Wiley & Sons. 267 pp.