

Detección de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en Caña de Azúcar (*Saccharum* spp.), Saneamiento Mediante Técnicas Biotecnológicas.

Dagoberto Guillen¹, Ricardo Hernández², Lisbet Rodríguez³ y Rafael Gómez⁴.

¹Campus Oriente, Univ. Autónoma del estado de Morelos. México. E-mail: dagoguillen@yahoo.com; ²CETAS. Universidad de Cienfuegos, Cuba. E-mail: santaclara57@yahoo.es. ³Estación Experimental de la Caña de Azúcar (EPICA), Ranchuelo, VC, Cuba. ⁴Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), UCLV, Cuba

Palabras clave: Caña de azúcar (*Saccharum* spp.), *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, diagnóstico, saneamiento, plantas sanas, RSD.

Key words: Sugar cane (*Saccharum* spp.), *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, diagnosis, free plants, healthy plants, RSD.

RESUMEN

El raquitismo de los retoños (RSD), enfermedad producida por la bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, es una de las más generalizadas en las plantaciones cañeras cubanas y ocasiona notables pérdidas en el rendimiento agrícola. Una de las formas de combatirla es el tratamiento de la semilla para eliminar la bacteria del tejido, para lo cual se requiere de técnicas de saneamiento y un diagnóstico preciso para su detección, sobre todo como base para la producción de semilla por técnicas de propagación masiva. Este trabajo tuvo como objetivo el empleo de una técnica de diagnóstico sensible y masiva como el dot-blot, que permitió detectar la presencia del agente causal del RSD en materiales micropropagados por diferentes técnicas de saneamiento aplicadas para el control de dicho agente. Los resultados demuestran que la termoterapia y el cultivo de ápices meristemáticos, por sí solos, resultan ineficientes para la eliminación de este patógeno. Sin embargo, el uso de la electroterapia combinada con el cultivo de meristemo mostró posibilidades reales de obtener plantas sanas del 84-100% en Ja 60-5 y de un 25-80% en CP 52-43 utilizando (10, 15, 30 V por 5 min). El diagnóstico por dot-blot con un anticuerpo monoclonal de producción nacional en la detección de *L. xyli* subsp. *xyli*, con centrifugación de las muestras, previa a la colocación en la membrana de nitrocelulosa, resulta ser un protocolo adecuado para el análisis de un gran número de muestras que provienen de campo o que han sido tratadas durante el saneamiento.

ABSTRACT

The Ratoon stunting disease (RSD), due to the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, is one of the most generalized diseases in the Cuban sugar cane plantations, where a significant yield loss occurs. One of the ways to attack this disease is to treat the seeds for eliminating bacteria from tissues and therefore, cleaning techniques and a precise diagnostic for its detection are needed. There is a need to do it as a base for seed production through mass propagation techniques. The main objective of this work was to use a mass and sensitive diagnostic technique like dot-blot that permitted to detect the causal agent of this disease from materials micropropagated through different cleaning techniques applied to control such agent. Results showed that thermotherapy and apical meristem culture are not enough by itself for eliminating this pathogen. However, the combined use of electrotherapy with meristem culture showed real possibilities of obtaining healthy plants; that is, from 84 to 100% in Ja 00-5 and from 25 to 80% in CP 52-43 using 10, 15, 30 V per 5 min. The diagnostic by dot-blot using a monoclonal antibody of national production for detection of *L. xyli* subsp. *xyli*, through centrifugation of samples, before placing them in nitrocellulose membranes resulted to be a suitable protocol for analyzing a great number of samples from field conditions or samples treated for cleaning.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es el principal cultivo económico de muchos países. Se encuentra entre los diez primeros para la producción de alimento y proporciona entre el 60 y 70% del azúcar que se elabora mundialmente (Ahlfeld, 1996). Su cultivo en Cuba ocupa una superficie de 1.6 millones de ha, que representa el 27% de la tierra cultivable del país.

Las enfermedades de la caña de azúcar constituyen uno de los principales factores negativos para la producción azucarera mundial. Durante los últimos años ha crecido considerablemente el número de organismos patógenos y agentes etiológicos detectados sobre este cultivo y se han extendido, de forma notable, los que existían con anterioridad. Hasta la fecha han sido informadas más de 126 enfermedades en unos 109 países y regiones cañeras. Por tal motivo, es de suma importancia dominar la situación fitosanitaria de las plantaciones cañeras para estar en condiciones de prevenir o reducir las pérdidas ocasionadas por enfermedades en las cosechas (Chinea *et al.*, 2000).

El raquitismo de los retoños (RSD), una de las enfermedades más difundidas por las regiones cañeras del mundo, ocasiona cuantiosas pérdidas al cultivo de la caña de azúcar al reducir los rendimientos agrícolas hasta un 15-20% en caña planta; siendo mayores los deterioros en los retoños sucesivos. Por sus características aparentemente asintomáticas y su fácil forma de propagación, ha alcanzado una diseminación generalizada en las plantaciones cañeras de Cuba, que incluye todas las categorías de semilla certificada. Se estima además que la declinación, deterioro o rechazo de muchas variedades importantes ha tenido su origen en el raquitismo, con lo cual muchos años de trabajo pueden ser destruidos en un período de tiempo relativamente corto por esta enfermedad, cuyo agente causal es la bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. (Martín *et al.*, 2001).

Young *et al.* (2006) informan que el RSD es una de las enfermedades más difundidas en las regiones cañeras produciendo pérdidas superiores al 30%. La enfermedad es diseminada mecánicamente en los plantines pese al uso de termoterapia de los donantes. Dicha terapia reduce la incidencia, pero no erradica el agente. Por lo que aseguran que el uso de cultivares resistentes ofrecería las mayores posibilidades de manejo de la enfermedad.

Por otra parte (Gillaspie & Teakle, 1989) infieren que su control depende fundamentalmente del uso de semilla sana, utilizando para ello el tratamiento térmico de la semilla y el saneamiento por cultivo de meristemas. Sin embargo, la efectividad de ambos es variable y en ocasiones insuficiente, por tal razón (Peralta *et al.*, 1997), plantean la importancia del diagnóstico eficaz de las líneas que se obtengan, para garantizar una certificación del material de siembra saneado. Durante muchos años, el diagnóstico de esta enfermedad estuvo basado fundamentalmente en la observación de síntomas visibles en plantas indicadoras y el empleo de la microscopía electrónica, que sin duda hizo posible precisar la ubicación taxonómica de la bacteria, observar su posición en los haces vasculares de las plantas infectadas y su presencia en los vasos del metaxilema.

En la actualidad, sin minimizar la importancia de estos métodos convencionales de detección y conociendo la naturaleza fastidiosa de la fitobacteria que la produce, se hace necesario implementar y validar métodos más sensibles, rápidos y confiables que permitan detectar tempranamente la presencia del agente causal de la enfermedad a partir del jugo de la caña, sin necesidad de realizar el cultivo de la bacteria que tarda alrededor de 17-20 días aproximadamente (Peralta *et al.*, 1997). Para ello se han venido empleando ensayos inmunoenzimáticos (dot-blot), muy confiables en la detección de pequeñas concentraciones de antígenos proteicos con una metodología adecuada, de bajo costo y fácil utilización.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, fue necesario evaluar el empleo de otras técnicas de

saneamiento para eliminar la bacteria con la implementación de un diagnóstico confiable y de alta sensibilidad, que posibilite la certificación segura de las líneas obtenidas durante los diferentes procesos biotecnológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento empleado para la detección de Leifsonia xyli subsp. xyli mediante dot-blot

Se tomaron unas 100 muestras de plantas caña de azúcar variedad Ja 60-5 procedentes del Banco de Semilla de Ifraín Alfonso, Municipio Ranchuelo, VC (Cuba), a las que se analizó para detectar el agente causal del raquitismo de los retoños (RSD), a través de técnica de dot-blot, utilizando ascitis (AcM para *L. xyli* subsp. *xyli*), conjugado anti-IgG de ratón con fosfatasa alcalina, en membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm, con controles positivos liofilizados y extracto de tallos, control negativo de material vegetal *in vitro* de papa y como sustrato el nitroblue tetrazolium (NTB) y el 5 bromo 4 chloro 3 indolyl fosfato (BCIP). Las diluciones de trabajo fueron: anticuerpo monoclonal (ascitis): 1:10 en TBS + BSA 2%, conjugado F Alcalina: 1: 500 en TBS + BSA 2% y muestras puras (extractos de tallos directamente). Para el análisis se siguió el protocolo descrito por el CEMSA (1994).

Las muestras fueron jugo de caña extraídas con una pinza a presión, dividiéndose en alícuotas para ser almacenadas a -20°C. En este caso se hicieron modificaciones al protocolo original en la etapa de preparación de la muestra, adicionando un paso de clarificación del jugo por centrifugación a 15,000 rpm en centrífuga Eppendorf, para lograr eliminar la oxidación de la savia extraída y manchado de la membrana de nitrocelulosa.

Técnica de saneamiento de plantas enfermas procedentes del banco de semilla.

A las plantas diagnosticadas como positivas a RSD se les extrajeron los spindles para su multiplicación *in vitro* mediante cultivo de ápices y las yemas del tallo fueron sometidas a diferentes

tratamientos de termoterapia en agua caliente y aire caliente según se describe a continuación.

1. Saneamiento por cultivo de ápices meristemáticos.

De cada yema (spindles) sero positiva se extrajeron los meristemas de 0.5-0.7 mm y se sembraron en medio de establecimiento (Fig. 1). Se utilizaron tubos de ensaye (145 mm x 25 mm) con 10-ml de medio de cultivo. Los meristemas se mantuvieron en oscuridad en la primera semana para reducir la fenolización y luego, pasados a condiciones de iluminación solar durante cuatro semanas. Seguidamente se pasaron a fase de multiplicación donde los explantes fueron colocados en recipientes plásticos de 600-ml de capacidad con 70 ml de medio y 10 explantes por frasco. Se realizaron 3 subcultivos cada 21 días y posteriormente se pasaron a fase de enraizamiento y aclimatización. Las vitroplantas aclimatizadas se trasladaron a la Estación Territorial de la Caña de Azúcar (ETICA) para culminar su desarrollo.

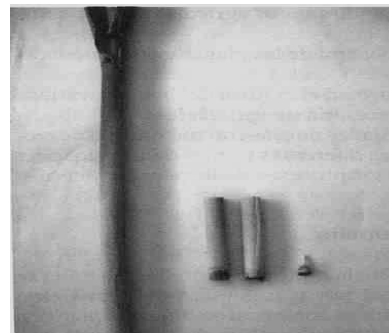


Fig. 1. Spindles o cogollo de caña de azúcar mondado y reducido a un ápice para luego ser tratado con una terapia.

Los medios utilizados para las tres fases de la micropropagación fueron los propuestos por Jiménez *et al.* (1997), con una intensidad lumínica de 2000 lux y una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Cuando creció el primer canuto se le efectuó el diagnóstico siguiendo el procedimiento ya descrito, pero cada muestra extraída se dividió en dos alícuotas y a una de ellas se le dio un golpe de centrifuga Eppendorf a 15,000 rpm.

2. Saneamiento por termoterapia

Se tomaron yemas de planta las que se dividieron en tres grupos aplicándosele los tratamientos siguientes:

Variante 1: Agua caliente a 50.5°C por dos horas = 50 yemas.

Variante 2: Agua caliente a 50.5°C por tres horas a dos yemas por planta = 50 yemas.

Variante 3: Cámara húmeda a 44°C durante cuatro horas y seguidamente a 25°C por cuatro horas más a yemas por planta = 50 yemas.

Una vez concluidos estos tratamientos se sembraron las yemas en cajas de poliespuma con suelo estéril para llevarlas a la ETICA, donde culminaron su desarrollo. Cuando crecieron se diagnosticaron, también por el procedimiento descrito.

3. Electroterapia y cultivo de ápices

Los tratamientos eléctricos fueron aplicados a partir de una fuente de corriente directa construida para el efecto (Hernández *et al.*, 1995) (Fig. 2). Se midió la corriente eléctrica de salida en (miliamperes) y el voltaje aplicado (volt). Se trabajó con dos variedades de caña de azúcar (Ja 60-5 y CP 52-43), estudiándose tres tratamientos de voltajes constantes de 30, 15, 10 volts por 5 min, se incluyó un testigo sin tratar y se hicieron 30 replicas por cada variante. El procedimiento *in vitro* se efectuó según el método tradicional de extracción de meristemas. Posterior a la aplicación de corriente se establecieron 50 ápices/tratamiento con aproximadamente 0.7 cm de longitud en el medio de cultivo propuesto por Santana (1994) y luego se multiplicaron según Jiménez (1995). En experimentos previos se delimitó la sensibilidad de la corriente al tejido y se seleccionó qué parte de la planta sería tratada, así como que plantas debían proceder de campo o vitroplantas adaptadas a condiciones controladas con más de tres meses de transplante.

A los 30 días se evaluó el porcentaje de regeneración y después del primer subcultivo se

tomaron 5 replicas de cada línea para el diagnóstico. Las copias de estas muestras negativas fueron enviadas al CENSA para su reconfirmación. Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el análisis de comparación de proporciones que brinda el paquete estadístico STATGRAPHICS para Windows versión 4.1 con un nivel de significación del 95%.



Fig. 2. Equipo de Electroterapia para la aplicación de corriente. Reg. Patent. 37/95 AO.1C/08 Res.1524/97. OPIC. Cuba.

4. Diagnóstico de material obtenido por diferentes técnicas biotecnológicas.

a. Material proveniente de embriogénesis somática

Para ello se tomaron plantas (6 meses) de la variedad C87-82 obtenidas en el IBP por embriogénesis somática (según metodología de Freire, 2001), extrayéndose el jugo que fue dividido en dos alícuotas de ellas una se le dio un golpe de centrifuga Eppendorf a 15,000 rpm y la otra sin centrifugar, con ambas se siguió el procedimiento de dot-blot antes mencionado.

b. Material proveniente de organogénesis indirecta

Unas 100 plantas con (6 meses) de sembradas, variedad Ja 60-5 obtenidas por organogénesis indirecta según la metodología de Gómez (1996) desarrolladas en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central de Las Villas, Cuba, se diagnosticaron con igual procedimiento

que el anterior.

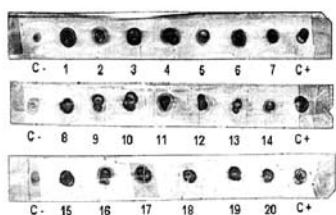
c. Material proveniente de cultivo de meristemos

La última vía a diagnosticar fueron vitroplantas obtenidas exclusivamente por cultivo de meristemos extraídas con un tamaño inferior a 0.4 mm, de los somaclones UCLV- Ja89-179 y UCLV-POJ89-112, según la metodología de Jiménez *et al.* (1997). En este caso se analizaron las líneas regeneradas *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diagnóstico y saneamiento de las plantas procedentes del banco de semilla

En el procedimiento empleado al aplicar la técnica de dot-blot a diferentes muestras de campo, pudimos evaluar que la misma detectó en un 100% muestras positivas a RSD, o sea, todas las plantas estaban enfermas (Fig. 3); lo cual coincide con lo expuesto por Damann (1992). Este plantea que esta enfermedad está muy generalizada en la producción e incluso en áreas de bancos de semilla por lo que se proponen diferentes estrategias con el fin de atenuar la presencia de esta bacteria y su temprana detección para disminuir pérdidas en los rendimientos.



Leyenda:
1-20 : Muestras
C+ : Control Positivo.
C- : Control Negativo

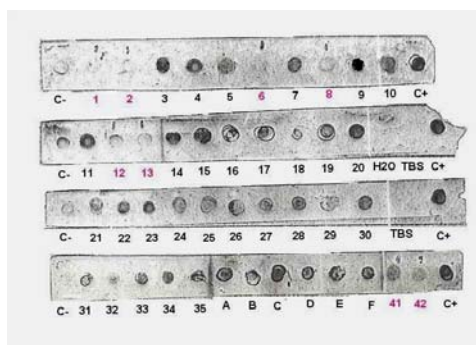
Fig. 3. Resultado del diagnóstico por dot-Blot hecho preliminarmente a las muestras del banco de semilla.

El empleo del cultivo de ápices meristemáticos es una técnica ya establecida para la micropropagación de la caña de azúcar, sin embargo, existen pocas referencias en la literatura de su uso como método de saneamiento a RSD. De los ápices sembrados se obtuvieron plantas regeneradas en un 30% (Fig. 4).



Fig. 4. Plantas obtenidas por cultivo de ápices meristemáticos y regeneradas en tubos de ensayo.

Como se muestra en la Fig. 5, en el diagnóstico a RSD, todas resultaron positivas para un 100% de muestras enfermas (muestras de la A-F). Los resultados obtenidos muestran que el cultivo de ápices meristemáticos no es suficiente para la eliminación de este patógeno.



Leyenda:
1-13 = Muest. Embriog. un golpe de centrifuga (tiras 1 y 2)
14-35 = Muest. Organog. un golpe de centrifuga (tiras 2, 3 y 4)
41-42 = Muest. Cult. de Merist. Centrif. A 15,000 rpm 20 min (tira 4)
A-F = Muest. Cult. de ápices un golpe de centrifuga (tira 4)
TBS = Solución de TBS

Fig. 5. Resultado del dot-blot en las muestras procedentes del cultivo *in vitro*

Similares resultados obtuvieron Peteira *et al.* (1992) quienes alcanzaron de un 96-100% de saneamiento al combinar el cultivo de ápices con termoterapia (50 °C durante 10 minutos) y quimioterapia (ácido giberélico 0.5 mg/L). La utilización de sistemas mixtos no solo ha logrado la eliminación del RSD sino también de otros patógenos de la caña de azúcar como los

causantes de la escaldadura foliar y el VMCA (Sordi & Tokeshi, 1988 y Matos, 2002). Aunque en nuestro caso el cultivo de ápices no resultó un método efectivo para el saneamiento a RSD si existen evidencias de que esta técnica ha tenido buenos resultados en la eliminación de virus y bacterias tanto en caña como en otros cultivos.

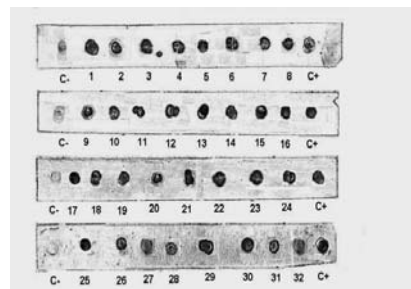
Es de destacar que los resultados fueron mejor observados en las muestras sometidas a un golpe de centrifuga, considerándose que de esta forma se eliminan los fenoles y no se mancha la membrana, lo cual coincide con resultados de Martínez *et al.* (1994) al usar similares protocolos en la técnica de dot-blot con centrifugación de las muestras antes de aplicarlas sobre la membrana de nitrocelulosa.

Saneamiento por termoterapia

Ante los tratamientos térmicos efectuados a las yemas, los resultados de regeneración en el tratamiento con agua caliente a 50.5 °C por tres horas fue de 0%, ya que al afectarse su germinación no se logró obtener ninguna planta y en el resto de los tratamientos fue de un 40% al obtenerse 16 plantas de las 40 yemas sembradas. Esta brotación es baja y coincide con los reportados en la literatura para tratamientos largos, dado que a medida que aumenta la temperatura disminuye la emergencia de yemas, así como la supervivencia de las plantas. Fitch *et al.* (2001) aclaran que los tratamientos con agua caliente no fueron satisfactorios para eliminar el virus, además de solo regenerar el 50% de las plantas tratadas. Asimismo, Pérez *et al.* (1998) reportan de un 30-44%, utilizando ese mismo tratamiento sobre propágulos de una yema de diferentes tamaños y diversas variedades

Al realizar el dot-blot se observó también una detección del 100% de RSD, no siendo efectivo el tratamiento térmico en ningún caso para la eliminación de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Fig. 6). Dichos resultados coinciden con los reportados por Ramallo & de Ramallo (2001), donde no obtuvieron saneamiento de RSD con el tratamiento

hidrotérmico a 50.5 °C/2 h aplicado a propágulos de una yema, en la mayoría de las variedades estudiadas, realizando la detección de la enfermedad mediante las técnicas de dot-blot e IFI, aunque lograron una atenuación de la bacteria. Resultados similares fueron obtenidos por investigadores de la EPICA de Jovellanos, Matanzas, Cuba, quienes no consiguieron erradicar el patógeno con ninguno de los tratamientos hidrotérmicos estudiados, incluyendo el de 50.5 °C/2 h, pero si disminuyó la concentración de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, según lo revelado por IFI (Pérez *et al.*, 1998).



Leyenda:
 1-16: Tto. Cámara húmeda
 C+: Control Positivo
 17-32: Tto. Agua a 50.5 °C 2 h
 C-: Control Negativo

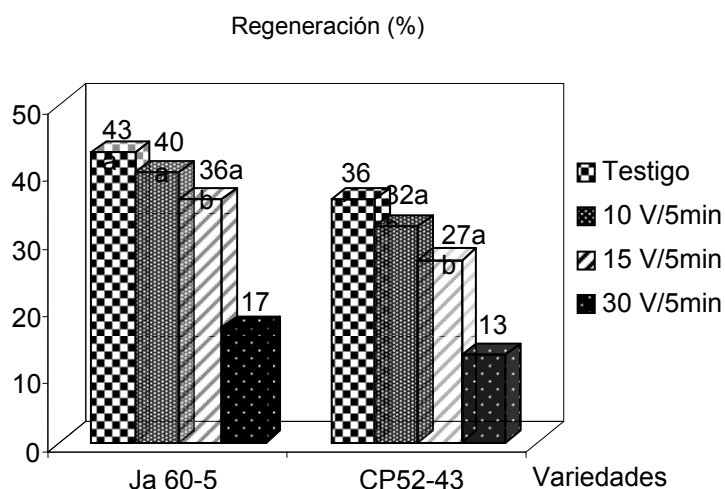
Fig. 6. Resultados del dot-blot en los tratamientos de termoterapia

Por otra parte (Piñón, 2001) afirma que para controlar el RSD es necesario que la semilla comercial haya recibido como mínimo tres tratamientos de hidrotermoterapia sucesivos, además de aplicar las medidas de control adecuadas, pues con uno solo no se logra la inactivación total del organismo causal de la enfermedad. Young *et al.* (2006) aseguran que la termoterapia de las plantas donantes reduce la incidencia del RSD, pero falla en la erradicación de la enfermedad.

Electroterapia y cultivo de ápices.

En la Fig. 7 se resumen los efectos de la corriente eléctrica sobre la regeneración de plantas

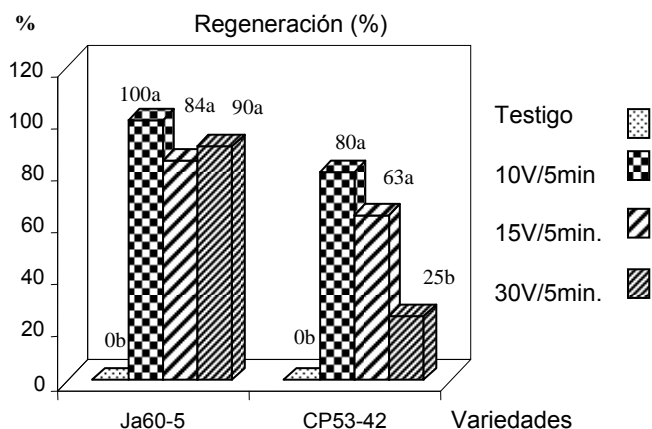
de diferentes variedades. Se muestra una respuesta similar de ambas variedades ante los diferentes tratamientos, observándose una disminución de este parámetro al aumentar el voltaje.



Letras minúsculas no coincidentes representan diferencias significativas entre tratamientos por variedad ($P < 0.05$).

Fig. 7. Efecto de los tratamientos de electroterapia en la regeneración de plantas.

Luego de la aplicación de la corriente eléctrica se observó una respuesta positiva en ambas variedades (Fig. 8). El porcentaje de plantas sanas fue mayor en todos los tratamientos aplicados con respecto al testigo en ambas variedades. En Ja 60-5, no existieron diferencias en cuanto al saneamiento a RSD en las tres variantes empleadas, lográndose hasta un 100% de sanidad cuando se aplicaron 10 V/5 min. Mientras que en CP 52-43 hay una disminución de este parámetro, cuando se somete al explante a 30 V/5 min, existiendo una respuesta diferencial entre variedades para este tratamiento.



Letras minúsculas no coincidentes representan diferencias significativas entre tratamientos por variedad ($P < 0.05$).

Fig. 8. Efecto de los tratamientos de electroterapia sobre el saneamiento a RSD.

Las plantas electroterapiadas pueden ser afectadas por los excesos de corriente y por la duración de los tratamientos, disminuyendo la regeneración de los explantes y la efectividad de la terapia, por lo que debe buscarse una combinación óptima para lograr una eficiencia adecuada (Hernández *et al*, 1997). Entre las alternativas utilizadas la aplicación 10 V/5 min fue la de mejores resultados, al combinar los mejores porcentajes de sanidad y regeneración, aunque no difieren mucho de lo logrado con 15 V/5 min, que es la que más se emplea en caña de azúcar. Esta técnica de saneamiento ha sido utilizada con alentadores resultados en varios cultivos para eliminar tanto virus como bacterias (Hernández, 1997).

Coincidiendo con Wagele (1978), en que con voltajes adecuados se logra una estimulación de los tejidos y se facilita su crecimiento más rápido y vigoroso, dicho crecimiento y organogénesis fue dependiente del tratamiento y del genotipo dado (Dawson, 1978; Golsworthy, 1987 citado por Hernández, 2000).

Otros investigadores como Matos (2002) informaron que la aplicación de 15 V/5 min producían la eliminación de escaldadura en un 100% en caña de azúcar con un 22% de

sobrevivencia. Estos porcentajes demuestran las posibilidades reales de saneamiento con electroterapia, corroborando los trabajos publicados hasta la fecha por Blanchard (1974) en el ajo, Hernández *et al.* (1995), Lozoya *et al.* (1996) y Bernal (1997) en la papa y finalmente, Hernández *et al.* (2002) en el banano.

Diagnóstico de plantas procedentes de diferentes técnicas.

En el diagnostico de las plantas procedentes de embriogénesis somática, de las 13 muestras analizadas, 6 resultaron negativas para un 46% de plantas sanas; en las obtenidas por organogénesis vía callo, de las 22 muestras analizadas el 100% resultaron enfermas y en el caso del cultivo de meristemo, las dos muestras resultaron negativas, o sea todas las plantas estaban sanas, confirmándose el diagnostico en el CENSA (ver Fig. 5).

Se pudo constatar que la técnica de dot-blot es capaz de detectar el agente causal del RSD en diferentes materiales provenientes del cultivo *in vitro*. En todos los casos se observa la ausencia de fenolización en las muestras colocadas en la membrana, cuando se aplica centrifugación, lo cual ofrece resultados más visibles y seguros. Lo anterior corrobora lo propuesto por Martínez *et al.* (1994), quienes plantean que el uso anticuerpos monoclonales para dot-blot, proporcionando una optima fijación de los antígenos bacterianos, introduce indudablemente mayor especificidad, en la técnica la cual se puede efectuar con un mínimo de error.

Esta técnica de dot-blot brinda un diagnóstico rápido, sensible, posibilita el trabajo con fluidos vasculares sin previa concentración y puede ser utilizada para detectar *L. xyli* en materiales procedentes de diferentes vías de cultivo. Es por ello que corroboramos los criterios de Iglesia *et al.* (2003) al incluirla para análisis de donantes y líneas procedentes del programa de micropropagación y otros métodos biotecnológicos, incluyendo los relacionados con la evaluación de

métodos de saneamiento o en obtención de semilla artificial.

Resultado del análisis por dot-blot

Los resultados del diagnostico en los diferentes tratamientos se pueden ver resumidos en la Tabla 1. Con el dot-blot se detecta la presencia del RSD en las variedades estudiadas de caña de azúcar, así como en los diferentes tipos de material obtenido por las técnicas biotecnológicas aplicadas.

Durante los últimos años se han venido empleando para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli* varias técnicas como la microscopía con contraste de fase (Roach, 1992; Ramallo *et al.*, 1999) y mas actualmente la inmunoflorescencia indirecta (IFI) (Peralta *et al.*, 1997; Ramallo *et al.*, 1999; Iglesia *et al.*, 2003).

Ambos métodos permiten la observación y el conteo directo de las células bacterianas, pero necesitan de un observador especializado para realizar la evaluación y es limitado el número de muestras que se pueden procesar por día. Peralta *et al.* (1997), Ramallo & de Ramallo (2001) y Ramallo *et al.* (2000), aplicaron un ELISA simple y rápido pero con sus limitaciones.

Tabla 1. Resumen de la detección del RSD empleando dot-blot con diferentes orígenes del material vegetal.

Vía	Variedad	Muestras analizadas	Muestras positivas	% Infección
Banco de semilla	Ja60-5	20	20	100
Cult. de ápices	Ja60-5	6	6	100
Embriogénesis	C87-82	13	7	54
Organogénesis	Ja60-5	22	22	100
Cult. de meristemos	UCLV-Ja89-179	5	0	0
	UCLV-POJ89-112	5	0	0

CONCLUSIONES

1. El cultivo de ápices entre 0.5–0.7 mm y la termoterapia no fueron efectivos para la eliminación del RSD, diagnosticándose un 100% de plantas enfermas después de aplicadas ambas técnicas de saneamiento.

2. La electroterapia obtuvo resultados muy satisfactorios al eliminar la infección entre un 60–100% cuando se aplicaron tratamientos de 10 y 15 V/5 min.

3. La centrifugación de la savia, previa a la colocación de las muestras en la membrana, favorece la observación del resultado al emplear la técnica de dot-blot, la cual fue eficiente al aplicarse con un gran número y en diferentes tipos de muestras, al utilizar un monoclonal de producción nacional.

RECOMENDACIONES

Implementar la clarificación previa de las muestras en el protocolo de dot-blot, para la detección del RSD en estudios de campo y en materiales saneados de caña de azúcar.

REFERENCIAS

- Ahlfeld H & Lichts FO (1996) World Sugar and Sweetener Year Book and World Sugar Statistics. F.O. (eds). Ahlfeld H. Linchts, Ratzeburg, Germany.
- Bernal FJ (1997) Técnicas de saneamiento para la obtención de papa (*S. tuberosum* L.) var. desirée libre del virus del enrollamiento de la hoja. Tesis de Grado. Maestría en Biotecnología Vegetal. Universidad Central de Las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.
- Blanchard RD (1974) Electrotherapy a new approach to wound healing. *Proc. Am. Phytopath. Soc.* 1: 133-134.
- China A & Pérez JR (1997) Secuencia y manejo de la hidrotermoterapia para el control de enfermedades de la caña de azúcar. *ATAC* 1: 31-34.
- China A, Nass H, Doboín C & Díaz MD (2000) Enfermedades y daños de la caña de azúcar en Latinoamérica. *Imprecolor CA*, Barquisimeto, Venezuela.
- Damann, K. E. 1992. Effect of sugarcane cultivar susceptibility on spread of ratoon stunting disease by the mechanical harvester. *Plant Dis.* 76: 1148-1149.
- Dawson WO (1978) Recovery of tobacco mosaic virus RNA replication after incubation at 40°C. *Intervirology* 9: 295-303.
- Fitch MM, Lehrer AT, Komor FE & Moore PH. (2001) Elimination of sugar cane yellow leaf virus from infected sugar cane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. *Plant Pathol.* 50: 676-680.
- Freire M (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido var. C87-51) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara.
- Gillaspie AG Jr. & Teakle DS (1989) Ratoon stunting disease. En: Diseases of sugarcane-major diseases. Ricaud C, Egan BT, Gillaspie AG Jr. & Hughes CG (eds). Elsevier Publishing: Amsterdam, pp. 59–80.
- Gómez R (1996) Selección *in vitro* a la enfermedad carbón (*U. scitaminea* Syd.) de la caña de azúcar (*Saccharum* sp, híbrido). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA. La Habana, Cuba.
- Hernández PR, Fontanella RJ, Noa CJ, Manso MR, Pichardo T, Cárdenas PH & Igarza C (1995) Electroterapia, nueva técnica para el saneamiento a virus en ajo (*Allium sativum* L.). *Reg. Patent.* 37/95 AO. 1C/08 Res. 1524/97. OPIC. Cuba.
- Hernández PR, Igarza CY, González Y, Peralta EL, Fontanella RJ, Noa CJ, Pichardo T, Alonso E, García L & Rodríguez M (1997) Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, híbrido). *Cuaderno de Fitopatología*, 3: 153-157.
- Hernández R (1997) Obtención de plantas libres de patógenos. *Curso Teórico-Práctico de Propagación Masiva de Plantas*. FAO: Francia. IBP, Santa Clara, Cuba, pp. 31-43.

- Hernandez PR (2000) "Electrotherapy" technique eliminates viral and bacterial infections. *Agricell Report* 34: 9-10.
- Iglesia LA, Díaz RM, Álvarez RE, Peralta GEL & Pazos AV (2003) Optimización del Diagnóstico múltiple de la Escaldadura foliar y el Raquitismo de los Retoños de la caña de azúcar. *Protección Vegetal*. 18 (1): 15-18.
- Jiménez (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, híbrido). Tesis de grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara, Cuba.
- Jiménez E, García L, Suárez M & Alvarado Y (1997) Instructivo técnico para la micropropagación de la caña de azúcar. *Instituto de Biotecnología de las Plantas*, Santa Clara. Cuba.
- Lozoya-Saldaña H, Abello JF & García de la RG (1996). Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes. *Amer. Potato J.* 73: 149-154.
- Martínez Y, Peralta EL & González M (1994) Detección de *Clavibacter xyli subsp. xyli* mediante la técnica de dot-blot utilizando anticuerpos monoclonales. *Protección Vegetal* 9: 57-62.
- Martín D, Iglesia A, Pazos. V & Peralta. E (2001) Obtención y evaluación de un anticuerpo policlonal específico de *Leifsonia xyli subsp. xyli*. *Protección Vegetal*. 16: 10-14.
- Matos M (2002) Escaldadura foliar: Evaluación de métodos para el saneamiento y comportamiento de variedades comerciales de caña de azúcar. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana, Facultad de Biología, La Habana, Cuba.
- Peralta GEL, Pedrosó M & Martínez Y (1997) Diagnóstico de Fitopatógenos. *Manual teórico-práctico*, CENSA, La Habana, Cuba.
- Pérez JR, Montalbán J, Figueredo Y, Matos M, Abrantes I, Barroso G & Delgado G (1998) Evaluación del sistema tradicional de producción de semilla empleado en Cuba para el control de enfermedades de la caña de azúcar. *Informe Final*. CITMA. INICA. La Habana, Cuba.
- Peteira B, González T, Orta C, Lagomasino I & Maribona R (1992) Saneamiento de RSD por cultivo de meristemo. *Protección Vegetal* 7: 97-101.
- Piñón D (2001) Hacia una fitoprotección ecológica de plagas en el SEFIT. En: *Curso de actualización en temáticas de sanidad vegetal (SEFIT)*. Piñón D (ed)., INICA, La Habana, Cuba.
- Ramallo J & de Ramallo NEV (2001) Aplicación de la hidrotermoterapia para la obtención de caña semilla de sanidad controlada. *Avance Agroindustrial*. 22: 16-18.
- Ramallo J, de Ramallo NEV & Roncedo M (1999) Achaparramiento de la caña soca: distribución e incidencia en Tucumán. *Avance Agroindustrial* 76: 17-20.
- Ramallo J, de Ramallo NEV & Ploper LD (2000) Diagnóstico de enfermedades de la caña de azúcar. Metodologías aplicadas por la EEAOC. *Avance Agroindustrial*, 21: 8-12.
- Roach BT (1992) Susceptibility to ratoon stunting disease in the *Saccharum* complex and the feasibility of breeding for resistance. *Sugar Cane*, 3: 11.
- Santana I (1994) Estudio de la variabilidad en las poblaciones de caña de azúcar obtenidas por el cultivo de tejido. Tesis de Grado de Doctor en ciencias Agrícola. INICA, La Habana, Cuba.
- Sordi R & Tokeshi H (1988) Cleaning leaf scald-infected sugarcane plants using *in vivo* thermotherapy plus meristem tip culture. *Summa Phytopathol*. 13: 93-112.
- Wagele R (1978) Procedimientos para influir en el crecimiento de las células e individuos bacterianos, animales y vegetales. *Rusia Patent*, 2841. 933 AL.
- Young AJ, Petrasovits LA, Croft BJ, Gillings BM & Brumbley SM (2006) Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli subsp. xyli*. causal agent of ratoon stunting disease of sugar cane. *Australian Plant Pathol*. 35: 503-511.

Estudio de la Actividad Ácido Láctica de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y su Relación con el Perfil de Plásmidos Durante el Almacenamiento en Refrigeración

Juan Carlos Sigala¹, Martha Patricia Tafolla², Jose Pablo Pérez-Gavilán.

¹Instituto de Biotecnología e ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. E- mail: pgavilan@servidor.unam.mx, 56229190

Palabras clave: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, actividad láctica, plásmido

RESUMEN

Se analizó si existe relación entre la disminución de la actividad ácido láctica y la pérdida de plásmidos en *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* cuando es almacenado en refrigeración. Se realizaron cinéticas de crecimiento de este microorganismo en un biorreactor y se determinó la producción de ácido láctico y la actividad láctica de muestras cosechadas en fase exponencial y fase logarítmica de crecimiento. Estas mismas muestras celulares se almacenaron en refrigeración con y sin control de pH y se estudió la viabilidad celular, la producción de acidez, el pH y el perfil de plásmidos a diferentes días. Los resultados resaltan la importancia de controlar el pH durante el almacenamiento en refrigeración de estas bacterias, ya que resultó ser el factor determinante en la disminución de la actividad y no la pérdida de material genético como en un inicio se pensó.

Key words: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, lactic acid activity, plasmid

ABSTRACT

The correlation between lactic acid activity decrease and the lost of plasmid in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* stored under refrigeration, was analyzed. Growth kinetics of this microorganism was performed in a bioreactor and samples were taken for lactic acid production and lactic acid activity from cells grown in exponential and

logarithmic growth phases. For this purpose, the cellular samples were stored in refrigeration with and without pH control and the cellular viability, acidity production, pH and plasmids profile at different days, were studied. The results emphasize the importance of controlling the pH during the bacterial storage in refrigeration as the determining factor in the activity reduction, and discarded the lost of the genetic material as the cause of its decline, as was initially thought.

INTRODUCCIÓN

Además de su ADN cromosomal, muchas bacterias poseen pequeñas moléculas de ADN circular llamados plásmidos los cuales se duplican de manera independiente y contienen información accesoria (Blanco, 1991). En las bacterias lácticas muchas cualidades de interés industrial, tales como el metabolismo de lactosa (Crown *et al.*, 1983; Maeda & Gasson, 1986), la producción de proteinasas (De Vos *et al.*, 1989) el transporte de citrato, los mecanismos de resistencia a fagos y la producción de bacteriocinas, se encuentran codificadas en plásmidos.

En aquellas cepas de *L. lactis* ssp. *lactis* consideradas buenas productoras de ácido láctico, los genes que codifican para el sistema de fosfotransferasa de lactosa (PTS lactosa), para la fosfo beta-galactosidasa y para la ruta de la tagatosa, puntos clave en el metabolismo de lactosa, se encuentran localizados en un solo operón identificado en plásmidos de 28 a 60 kb.

El significado comercial de las bacterias lácticas utilizadas en la manufactura de los productos lácteos fermentados se debe en gran medida a la capacidad de convertir la lactosa y otros azúcares en ácido láctico. *L. lactis* ssp. *lactis* forma parte de los denominados cultivos iniciadores (CI) los cuales se utilizan en la elaboración de todos los productos lácteos fermentados y su intervención como materia prima es determinante en la calidad del producto final. En nuestro país existe una gran demanda por los cultivos iniciadores y estos son distribuidos exclusivamente por compañías extranjeras.

Respecto al almacenamiento de los cultivos, la refrigeración representa una buena alternativa ya que requiere de equipo más sencillo y económico comparado con procesos de liofilización o congelación. Se ha encontrado que los cultivos líquidos refrigerados mantienen una viabilidad y una actividad láctica aceptable por un tiempo de 15 días. Sin embargo, pasado este tiempo las bacterias pierden casi en su totalidad la capacidad de producir ácido. Anteriormente se planteó la posibilidad de que esta disminución de actividad estuviera ligada a la pérdida de plásmidos. Con base en esto, se desarrollo el presente trabajo para abundar en el conocimiento de los aspectos relacionados con la actividad, los plásmidos y el efecto del pH en cultivos líquidos refrigerados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

La cepa empleada es *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM147, perteneciente a la Colección de Cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM-48) de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. Dicha cepa se mantuvo en leche descremada estéril al 11% de sólidos totales, se resembró cada 2 semanas y se almaceno a 4°C.

Medios de cultivo

Leche descremada al 11% de sólidos totales, Agar APT (Agar, triptona, extracto de levadura, fosfato ácido de potasio, citrato de sodio, glucosa,

tween 80, silfato de magnesio, cloruro de manganeso, sulfato ferroso) (Evans y Nivel, 1951 y Deibel, Evans y Nivel, 1957), medio liquido Elliker modificado (Klaenhammer *et al.*, 1978), Agar Reddy modificado (Reddy *et al.*, 1969 y Reddy *et al.*, 1972) y medio industrial para fermentación (Goldhaber, 1982).

Cinéticas en biorreactor.

Se llevo a cabo en una jarra de acero inoxidable de 5 L adaptada a una consola New Brunswick Sci. Co. M-19-1400 que cuenta con agitación magnética, control de pH y de temperatura (Stanburry & Whitaker, 1989). Las condiciones fueron las siguientes (Córdova, 1990 y Chavarri *et al.*, 1988).

Tabla 1. Condiciones empleadas durante las cinéticas en biorreactor

Medio de cultivo	Medio industrial (MI)
Volumen de inóculo	5% v/v
Volumen operativo	3 L
Temperatura	29°C
pH	6.9-7.0
Agente neutralizante	NaOH 20% (5N)
Agitación	200 rpm
Tiempos de cosecha	4 y 8 h

Al momento de la cosecha de bacterias se interrumpió el control de temperatura con una unidad de enfriamiento Haake-KT33 que bombea agua entre 2 y 4°C. La velocidad de agitación y el control de pH se mantuvieron constantes. Cuando se alcanzó la temperatura de 4°C se colectaron las muestras, un litro para la muestra con control diario de pH (muestra MA) y 500ml para la muestra sin control de pH (muestra MB) y posteriormente se refrigeraron.

Determinaciones

Cuenta de microorganismos viables (CMV)

Se hizo por el método de vaciado en placa en agar APT a partir de diluciones decimales. Las cajas se incubaron a 29°C por 48 h y el conteo se expreso en UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml).

Producción de ácido láctico

Se determino a partir de la cantidad de NaOH al 20% que fue necesario añadir para mantener el pH constante (pH 6.9 o 7), considerando que para neutralizar una mol de ácido láctico (PM= 90 g/mol) se requiere de una mol de NaOH (PM= 40 g/mol).

Actividad láctica.

Expresa la capacidad que tiene una cepa de producir ácido láctico bajo las siguientes condiciones: 50 ml de leche descremada al 11% de sólidos totales pasteurizada (63°C, 30 min) se inoculó al 1% con los caldos de fermentación y se incubo a 30°C durante 6 h. Al cabo de este tiempo se tomó una alícuota de 9 ml y se tituló con NaOH 0.1N utilizando fenolftaleína como indicador; el gasto de NaOH 0.1N se expresa como % de ácido láctico. Bajo estas condiciones, el % de ácido láctico producido por el microorganismo menos la acidez inicial de la leche se denomina AL.

Actividad específica (AE)

Se expresa en nanomoles de ácido láctico producido por UFC en 5 h. Se obtuvo un valor de referencia a partir de un cultivo ejemplar para poder comparar los valores que se obtendrían a lo largo de la experimentación, este fue de 1.5×10^{-5} nanomoles de ác. láctico por UFC en 5 h de crecimiento. Para efecto de la experimentación se consideraron valores de AE anormales sólo aquellos que eran 10 veces mayores o menores que la referencia.

Medición de pH.

Se efectuó con un electrodo Beckman convencional adaptado a un potenciómetro Beckman 40.

Extracción de Plásmidos y Electroforesis.

Obtención de paquete celular.

La cepa de interés se sembró en 10 ml de medio líquido M-17 (Terzaghi & Sandine, 1975) con un inóculo al 1% y se incubó a 29°C toda la noche. Al día siguiente se resembró en 10 ml de medio Elliker modificado (inóculo al 2%) durante 4 h a 29°C y se centrifugó en frío a 3,000 rpm por 10 min para obtener así el paquete celular.

Extracción de plásmidos

Tabla 2. Soluciones empleadas para la extracción de plásmidos

<i>Solución I</i>	50mM Tris (pH 8) y 1mM EDTA (pH 8)
<i>Solución II</i>	50mM glucosa, 25mM Tris.Cl (pH 8), 10mM EDTA (pH 8) y lisozima (10 mg/ml)
<i>Solución III</i>	0.2 N NaOH y 1% de SDS (dodecil sulfato de sodio)
<i>Solución IV</i>	5M acetato de potasio (60ml), ácido acético glacial (11.5ml) y H ₂ O (28.5ml)

- Se suspendió y se lavo el paquete celular en 3 ml de solución I fría. Se centrifugo en frío a 3000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se vuelve a suspender y a lavar en 1 ml de solución fría y en un tubo Eppendorf se centrifuga a 5,000 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se resuspendió en 10 µl de solución II. Se incubó a 37°C por 5 min.
- Se adicionaron 200 µl de solución III recién preparada y se mezcló. Se dejo en hielo por 5 min.
- Se adicionaron 150 µl de solución IV fría. Se mezcló y se dejo en hielo por 3 min.
- Se centrifugo a 12,000 rpm por 6 min a 4°C
- Se agregaron 2 µl de solución de RNA asa (10 mg/ml) y se incubo a 37°C por 5 min.
- Se adicionó 500 µl de fenol preparado y se mezcló.

- Se adicionaron 150 µl de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)
- Se centrifugo a 10,000 rpm por 8 min a temperatura ambiente
- Se removió la fase superior acuosa translúcida.
- Se adicionaron 0.6 vol de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se mantuvo a temperatura ambiente por 45 min
- Se centrifugo a 12,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante aspirando con la micropipeta
- Se enjuagó el pellet de ADN con 50 µl de etanol al 70% frío. Se centrifugo a 12,000 rpm por 5 min a 4°C
- Se secó el pellet de ADN a temperatura ambiente por 5 min
- Se redisolvió el ADN en 10 µl de agua estéril y se guardó en congelador (-20°C). Al día siguiente se corrió la electroforesis.

Esta metodología de extracción de plásmidos se basó fundamentalmente en la técnica propuesta por Sambrook et al. (1989) con modificaciones por lo descrito por Currier & Nester (1976) Klaenhammer et al. (1978), LeBlanc & Lee (1979), Anderson & MacKay (1983), Orberg & Sandine (1984) y Frère (1994).

Electroforesis

Se llevo a cabo en un gel de agarosa (Aldrich et al., 1976) al 0.8% en buffer TAE (20 mM Tris, 10 mM ácido acético y 2 mM Na₂EDTA, pH 8) a 80 V durante 2.1 h. El volumen de muestra de ADN plasmídico en cada pozo de gel fue de 10µl. Los géles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 15 min. El peso molecular de los plásmidos fue estimado a partir de una gráfica semilogarítmica de peso molecular contra movilidad relativa (rf), empleando los marcadores de peso molecular comerciales fago lambda digerido con *Hind*III o digerido con *Hind*III y *Eco*RI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de plásmidos

Se realizó la extracción de plásmidos de una cepa lactosa positiva (*lac*⁺) y una cepa lactosa negativa (*lac*⁻), con la finalidad de observar si la deficiencia para coagular la leche se relaciona con la pérdida de algún plásmido. Para ello, a partir de un cultivo viejo refrigerado de *L. lactis* en leche descremada al 11% de sólidos totales, se sembró superficialmente en placas de agar Reddy modificado y se incubó en anaerobiosis a 29°C por 48 h. En este medio las cepas *lac*⁻ son más pequeñas, de color blanco y no presentan halo (Reddy et al., 1969). Para la *lac*⁺ se sembró de manera superficial en placas de agar APT, incubándolas a 29°C por 48 h en anaerobiosis. En la Fig. 1 se muestran los perfiles de plásmidos de una cepa *lac*⁺ y de una cepa *lac*⁻ de *L. lactis* ssp. *lactis*.

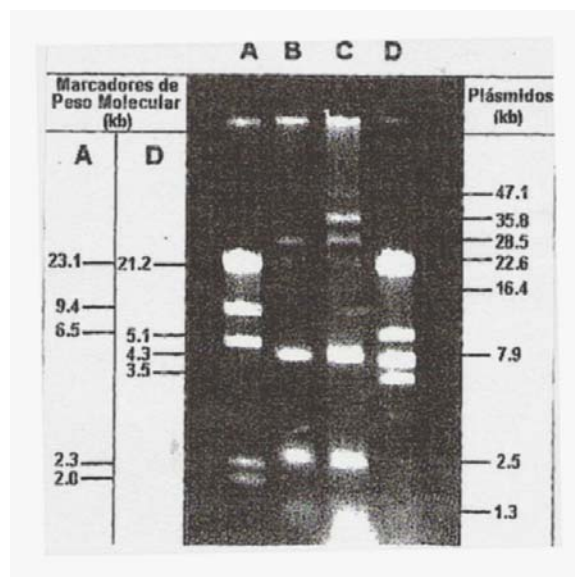


Fig. 1. Perfil de plásmidos de *L. lactis* ssp. *lactis* lactosa⁺ y lactosa⁻. (A) Marcador de peso molecular (fago λ cortado con *Hind* III). (B) *L. lactis* ssp. *lactis* *lac*⁻. (C) *L. lactis* ssp. *lactis* *lac*⁺. (D) Marcador de peso molecular (fago λ cortado con *Hind*III y *Eco*RI).

En el perfil de plásmidos de la cepa *lac*⁺ se observan 8 bandas de diversos pesos moleculares. También se observa que el perfil de plásmidos de la cepa *lac*⁻ carece de la segunda banda (35,792 pb);

podríamos afirmar que en ese plásmido específicamente, se encuentra localizado el operón de lactosa necesario para el transporte e hidrólisis de este disacárido por el sistema fosfo enol piruvato-fosfo transferasa (PTS) y de la vía de la tagatosa, tal y como se ha reportado en la bibliografía para otro tipo de cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* lactosa positivas a lo largo de los últimos años (Mckay *et al.*, 1972; Mckay & Baldwin, 1974; Efstathiou & Mckay, 1976; Klaenhammer *et al.*, 1978; Crow *et al.*, 1983; Gasson, 1983 y Sinha 1989). En varias de estas referencias se ha establecido que el plásmido en cuestión suele ser de los de mayor peso molecular del perfil y va de las 28 a las 60 kb, lo cual también coincide con nuestros resultados.

Tabla 3. Pesos moleculares de los plásmidos de la cepa Lac⁺ de *L. lactis* ssp. *lactis*.

Número de plásmido	Peso molecular (pb)
1	47,122
2	35,792
3	28,461
4	22,632
5	16,420
6	7,886
7	2,507
8	1,320

Los pesos moleculares de los plásmidos son mostrados en la Tabla 3. Como puede apreciarse en esta tabla, el perfil de plásmidos es muy parecido a los reportados en la bibliografía, en especial a los obtenidos por Sinha (1989), Orberg & Sandine (1984) y Anderson & McKay (1983).

Como es sabido en la industria láctea, los iniciadores deficientes son aquellos que no coagulan la leche después de 16 h de incubación a 21°C o después de 6 h a 29°C, empleándose un inóculo al 1%. Esta deficiencia no solamente se debe a la pérdida de la capacidad para metabolizar la lactosa sino que también interviene el sistema de

proteinasas que dota a las células de los péptidos y aminoácidos necesarios para su crecimiento. Algunos investigadores han encontrado una pérdida simultánea de la capacidad de metabolizar lactosa y de producir proteinasas (McKay & Baldwin, 1974) e incluso otros lo asocian a un mismo plásmido de alto peso molecular entre 50 y 60 kb (Gasson, 1983). En nuestro trabajo sólo se evaluó la calidad de la cepa en relación a su capacidad de producir ácido. Las cepas que carecían del segundo plásmido de 35.8 kb las hemos identificado como lac⁻ pero cabe la posibilidad de que su deficiencia se deba a la carencia del sistema de proteínasa o a un efecto combinado. Por el momento se ha demostrado la pérdida de un plásmido específico en aquellas cepas deficientes para coagular la leche.

Cinéticas en biorreactor

L. lactis ssp. *lactis* alcanza la fase estacionaria de crecimiento pasadas las 6 h. Era de interés llevar a cabo una cinética a las 8 h de incubación (F8), para tener una población en fase estacionaria de crecimiento y una cinética a las 4 h (F4) para tener una población en fase exponencial, para que se pudieran contrastar los resultados obtenidos en ambas situaciones.

Tabla 4. Resultados de las determinaciones de cuenta total de microorganismos, producción de ácido láctico, actividad y actividad específica durante las cinéticas a las 4 y 8 h de

DETERMINACION	CINETICA	
	4 h	8 h
Cuenta total de microorganismos (UFC/ml)	5.26 x 10 ⁹	1.78 x 10 ¹⁰
Producción de ac. láctico (g ac. láctico/L de medio)	8	37.7
Actividad	0.44	0.48
Actividad específica (nmoles de ac. láctico/UFC en 5 h)	1.5 x 10 ⁻⁵	1.5 x 10 ⁻⁵

Incubación. Los valores de actividad específica (AE) obtenidos en las dos cinéticas de trabajo están cercanos al valor de referencia (1.5×10^{-5} nmol ácido láctico/UFC en 5 h), por lo tanto, se consideran valores normales. La AE es útil al equiparar la capacidad de producción de ácido de muestras que contengan distinta cantidad de bacterias como ocurre en el transcurso de las cinéticas de este trabajo.

El tiempo de duplicación promedio fue de 60 min \pm 0.1. Este valor coincide con lo descrito por Sandine (1996) para varias bacterias lácticas mesófilas.

Almacenamiento a 4°C

En las muestras almacenadas a partir de la cinética de 8 h fue necesario agregar 27.4 ml de NaOH al 20% para tener control de pH cercano a la neutralidad, de los cuales 25 ml fueron agregados los primeros 7 días. En cuanto a la cuenta total de microorganismos, se observa una fuerte disminución de la población microbiana; a los 30

días de almacenamiento prácticamente todas las bacterias han muerto, independientemente del control de pH (Tabla 5). La actividad para este conjunto de muestras también disminuye al transcurrir el tiempo. Por otro lado, los valores de AE se consideran normales pues estuvieron cercanos a la referencia excepto en el caso de la MB-F8 a los 29 días, en donde el valor fue diez veces mayor. Esto último pudiera significar que las bacterias sobrevivientes son incluso mejores productoras de ácido o por lo menos no han perdido esta capacidad; esto se corroboró al sembrar algunas de estas colonias en leche y la coagularon perfectamente después de un periodo normal de incubación.

Para el caso de las muestras cosechadas y almacenadas a partir de la cinética de 4 h, se controló el pH agregando un total de 93.6 ml de NaOH al 20%. En cuanto a la cuenta total de microorganismos, la diferencia más notable se presenta al término del almacenamiento en la

Tabla 5. Resultados de pH, cuenta total de microorganismos, actividad y actividad específica durante el almacenamiento a 4°C de ambas cinéticas con y sin control de pH (= se refiere a un valor de AE igual al de la referencia).

DETERMINACIÓN	ALMACENAMIENTO A 4°C											
	Cinética de 4 h						Cinética de 8 h					
	Control de pH MA-F4			Sin control pH MB-F4			Control de pH MA-F8			Sin control de pH MB-F8		
	Día 1	Día 14	Día 28	Día 2	Día 15	Día 29	Día 1	Día 14	Día 28	Día 2	Día 15	Día 29
pH	7	7	7	5.58	4.78	4.68	7	7	7	5.6	5.24	5.02
Cuenta total de bacterias. (%)	100	82.5	67.3	100	67.3	0.7	100	35	1.5	100	29	2.1
Actividad (%)	100	78.2	65.6	100	61	2.2	100	74	21.4	100	58.2	7.1
Actividad específica	=	=	=	=	=	> 10 veces	=	=	=	=	=	> 10 veces

Muestra sin control de pH, pues apenas sobrevive un 0.7% de la población; en esta misma muestra se presenta la mayor disminución de actividad. Los valores de AE para estas muestras se consideraron normales excepto la del día 29 sin control de pH, que nuevamente fue diez veces mayor a la referencia.

El grupo de células con mejor comportamiento durante el almacenamiento fue la muestra cosechada en fase exponencial y con control de pH durante el almacenamiento (MA-F4). Estas células presentan una actividad metabólica alta al ser cosechadas de tal forma que al neutralizar el ácido láctico producido durante el almacenamiento, se ven estimuladas a seguir consumiendo la lactosa y demás nutrientes, sin peligro de daño por efecto de la disminución de pH, lo que las hace sobrevivir de mejor manera.

Por otro lado, el control de pH en la muestra cosechada a las 8 h (MA-F8) fue favorable únicamente los primeros 15 días de almacenamiento; esto quizá se deba a que estas bacterias fueron cosechadas en plena fase

estacionaria de crecimiento lo cual implica tener una desacelerada actividad metabólica ocasionando que las células gradualmente mueran, no obstante tener un pH cercano a la neutralidad. Sin embargo, los valores de actividad siempre fueron mejores en la muestra que contó con control de pH debido a que no existió daño por exposición prolongada al ácido láctico.

Por otra parte, se observó en los perfiles de plásmidos de todas las muestras una disminución gradual de la concentración de material genético ya que las bandas fueron cada vez menos intensas. Esto indica que existe una pérdida general del material genético durante el almacenamiento, independientemente de que las células provengan de una población en fase exponencial o en fase estacionaria de crecimiento y de que se tenga un control o no de pH.

En la tabla 6 se han agrupado los porcentajes de las poblaciones de las diferentes muestras durante el almacenamiento que presentaron determinado plásmido en su perfil.

Tabla 6. Porcentaje de células en las que aparece determinado plásmido en su perfil

HORAS DE COSECHA	CONTROL DE pH	DIA DE ALMACENAMIENTO	NÚMERO DE PLÁSMIDO Y PESO MOLECULAR (pb)							
			1 47,122	2 35,792	3 28,461	4 22,632	5 16,420	6 7,886	7 2,507	8 1,320
8	SI	1	90	90	10	90	90	100	100	100
		14	100	100	80	100	100	100	100	100
		28	80	100	60	80	20	100	100	100
	NO	2	90	100	50	90	80	100	100	100
		15	100	100	70	100	90	100	100	100
		29	80	100	60	100	40	100	100	100
4	SI	1	90	90	90	100	90	90	100	90
		14	90	100	20	80	80	100	100	90
		28	90	100	60	80	40	100	100	100
	NO	2	100	100	70	100	100	100	100	100
		15	90	90	30	90	80	100	100	100
		29	60	100	70	70	30	100	100	100

Como ya se había mencionado, al comparar los perfiles de los plásmidos de las cepas lac⁺ con las cepas lac⁻ se determinó que el plásmido que contenía la información necesaria para el metabolismo de lactosa era el número dos (36 kb) por lo que era importante conocer el comportamiento que pudiera tener esta banda a lo largo del almacenamiento, ya que en el trabajo de Córdova (1994) se sospechaba que la disminución de la actividad durante el almacenamiento pudiera estar ligada a la pérdida de algún plásmido.

A lo largo del almacenamiento se observó que el plásmido número dos se conservó en el 90 o 100% de las poblaciones de las diferentes muestras y a diferentes días. Es claro que no existe una pérdida específica y gradual de este plásmido y por lo tanto no es responsable directo de la disminución de la actividad ácido láctica. Como ya ha sido establecido anteriormente, parece ser que el control de pH favorece la supervivencia de las células, siendo este el factor determinante para tener una buena actividad.

Los plásmidos más inestables fueron el número tres de 28,461 pb y el número cinco de 16,420 pb. En las dos muestras de la cinética a las 8 h, la mayor pérdida del plásmido tres se presentó en los primeros días de almacenamiento y en las muestras de la cinética a las 4 h, a la mitad del almacenamiento; en ambos casos el control de pH no parece influir en la aparición de este plásmido. En todas las muestras en los primeros 15 días, el plásmido cinco aparece en un 80 a 100% de la población, pero al cabo del periodo sólo aparece en un 40% tanto en la MA-F4 como en la MB-F8, en un 30% de la MB-F4 y en un 20% en la MA-F8. Se observa que este plásmido disminuye invariablemente al término de los periodos de almacenamiento independientemente del control de pH.

CONCLUSIONES

- La disminución de la actividad láctica de *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*, cuando es

almacenado en refrigeración en el medio líquido en el que fue producido, no se debe a la pérdida específica de uno o más plásmidos, sino al marcado deceso de células, de tal forma que cuando se realiza la determinación de la actividad, el inóculo cada vez es menor.

- El control de pH en las muestras almacenadas a 4°C evita la muerte celular, lo que a su vez provoca el tener valores de actividad aceptables
- El control de pH origina mejores resultados en las muestras cosechadas a las 4 h que en las de 8 h; la vida útil para cada caso es de 28 y 14 días respectivamente.
- Se propone conservar las bacterias lácticas en refrigeración empleando el mismo medio en el que fueron producidas y contando con control de pH.

REFERENCIAS

- Aldrich MJ, Sánchez D, Elwell L & Falkow S (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127: 1529- 1537.
- Anderson DG & McKay LL (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from *Streptococcus lactis*. *Appl. Environm. Microbiol.* 46: 549-552.
- Blanco A (1991) Química biológica. Editorial El Ateneo. 5ª edición, 2ª reimpresión. Argentina
- Córdova AMS (1994) Variaciones en la capacidad de producción de ácido láctico y pH durante la producción y almacenamiento de las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM147 y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* BM 149 y su correlación con el perfil de plásmidos. Tesis de grado de maestría en biotecnología. UACPyP, CCH, UNAM, México, PP 59
- Crow VL, Davey, GP, Pearce LE & Thomas TD (1983) Plasmid linkage of the D-tagatosa 6-phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: Effect

- on lactose and galactose metabolism. *J. Bacteriol.* 153: 76-83
- Currier TC & Nester EW (1976) Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.* 76: 431-441
- Chavarri FJ, De Paz M, & Núñez M (1988) Optimization of fermentation parameters for the production of concentrated starters from nonbitter *Streptococcus lactis* INIA 12. *J. Food Sci.* 53: 1854-1857.
- Deibel RH, Evans JB & Niven CF (1957) Microbiological assay for the thiamin using *Lactobacillus viridescens*. *J. Bact.* 74: 818-821.
- De Vos WM & Simons G (1988) Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci: the phosphor-alfa-galactosidase and beta-galactosidase genes and their expression products. *Biochimie* 70: 461-473.
- De Vos WM, Vos P, Simons G & David S (1989) Gene organization and expression in mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Science.* 72: 3398-3405.
- Evans JB & Niven CF (1951) Nutrition of the heterofermentative Lactobacilli that cause greening of cured meat products. *J. Bact.* 62: 599-603.
- Frère J (1994) Simple method for extracting plasmid DNA from lactic acid bacteria. *Letters in Appl. Microbiol.* 18: 227-229.
- Gasson MJ (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1-9.
- Goldhaber (1982) Estudios para la producción y conservación de algunos microorganismos de interés lactológico. Tesis de grado de maestría en ciencia y tecnología de alimentos. UI. México. PP 126.
- Klaenhammer TR, McKay LL & Baldwin KA (1978) Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Appl. Environm. Microbiol.* 35: 592-600.
- Kuhl SA, Larsen LD & McKay LL (1979) Plasmid profiles of lactose-negative and proteinase-deficient mutants of *Streptococcus lactis* C10, ML3 y M18. *Appl. Environm. Microbiol.* 37: 1193-1195.
- Leblanc DJ & Lee LN (1979) Rapid screening procedure for detection of plasmids in Streptococci. *J. Bacteriol.* 140: 1112-1115
- Maeda S & Gasson M (1986) Cloning, expresión and location of the *Streptococcus lactis* gene for phospho- β -galactosidase. *J. Microbiol.* 132: 331-340.
- McKay LL & Baldwin KA (1974) Simultaneous loss of proteinase-and-lactose-utilizing enzyme activities in *Streptococcus lactis* and reversal of loss by transduction. *Appl. Bacteriol.* 28: 342-346.
- McKay LL, Baldwin KA & Zottola EA (1972) Loss of lactose metabolism in lactic Streptococci. *Appl. Bacteriol.* 23: 1090-1096.
- Orberg PK & Sandine WE (1984) Microscale method for rapid isolation of covalently closed circular plasmid DNA from group N Streptococci. *Appl. Environm. Microbiol.* 47: 677-680.
- Reddy MS, Vedamuthu ER, Washam CJ & Reinbold GW (1969) Differential agar médium for separating *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Appl. Microbiol.* 18: 755-759.
- Reddy MS, Vedamuthu ER, Washam, CJ & Reinbold GW (1972) Agar medium for differential enumeration of lactic Streptococci. *Appl. Microbiol.* 24: 947-952.
- Sambrock J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Book 1. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.
- Sandine WE (1996) Commercial production of dairy starter cultures. In: Dairy starters cultures. Cogan TM & Accolas JP (eds) VCH Publishers Inc. USA., pp. 191-206.
- Sinha RP (1989) A new simple method of curing plasmids in lactic Streptococci. *FEMS Microbiol. Letters*, 57: 349-352.

- Stanbury PF & Whitaker A (1989) Principles of fermentation technology. Pergamon Press. USA.
- Terzagui BE & Sandine WE (1975) Improved medium for lactis streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. 29: 807-813.