

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN (Granada) C. S. I. C.

y

FACULTAD DE FARMACIA. UNIVERSIDAD DE GRANADA

Prof. Dr. V. Callao Fábregat

TECNICA DE DESINFECCION DE SEMILLAS PARA SU CULTIVO
ASEPTICO, CON VISTAS A LA INOCULACION BACTERIANA
ESPECIFICA (1)

por

J. M. BAREA, M. ESCORIHUELA y V. CALLAO

OBJETO

La inoculación microbiana de semillas como mecanismo de fertilización biológica es una práctica cada día más estudiada y su aplicación agrícola más desarrollada.

Entre los ensayos científicos de este tipo destacan los estudios concernientes a la llamada bacterización *zobium*. En esta línea de investigación, uno de los más importantes problemas a resolver es la selección de razas de *Rhizobium* para que puedan ser utilizadas como inóculo fertilizante. La mejor manera de seleccionar una raza en el laboratorio es inocular cada una de las estirpes disponibles en semillas de la Leguminosa específica, previamente germinada en condiciones asepticas, para evitar influencias de razas bacterianas extrañas.

Por ello, conseguir estos cultivos asépticos de Leguminosas se convierte en escalón primordial para estudiar la bacterización con *Rhizobium*.

El objeto es conseguir un método sencillo y eficaz para obtener cultivos asépticos de Leguminosa basada en la germinación de las semillas en condiciones de esterilidad, lo cual, presupone un tratamiento previo y adecuado de las semillas para eliminar las f

INTRODUCCION

Contaminación microbiana de las semillas.

Es lógico pensar que las semillas, que han estado en íntimo contacto con el inmenso y universal

serán portadores de gran número de esos microseres contaminantes. Hace más de dos siglos que, científicamente, se reconoció la transmisión por las semillas de gérmenes productores de enfermedades de las plantas; aunque,

(1) Extracto de la Tesina presentada por la Srta. María Escorihuela Mestre para obtener el Título de Licenciado-Graduado en Farmacia.

sin lugar a dudas, los agricultores conocían el problema, de modo empírico, mucho antes.

En estos aspectos, tenemos que hacer referencia al trabajo de CROCKER & BARTON (1957), en el que los autores realizan un profundo estudio, con amplia revisión bibliográfica de la transmisión de enfermedades por las semillas.

Los mencionados autores inician su revisión bibliográfica citando una observación pionera de Jethro Tull en 1733 que recomendaba sumergir semillas de trigo en agua del mar para eliminarlas de una infección fúngica. Posteriormente, hacen referencia a diversos trabajos en los que se describen numerosos agentes y virus se incluyen insectos que dan lugar.

También merece ser destacado en este sentido el trabajo de ORTON (1931), que expone el modo en que el microorganismo patógeno es transportado por las diversas semillas.

No entramos a comentar con más intensidad los referidos trabajos sino que nos centramos en el estudio del control de los microorganismos contaminantes y en los diversos agentes que los eliminan respetando la adecuada germinación de la semilla.

Control de microorganismos contaminantes.--Agentes desinfectantes y esterilizantes.

La bibliografía sobre este tema es exhaustiva y con la denominación de desinfectante, esterilizante, empleados en la asepsia de las semillas.

No obstante, vamos a intentar una somera y esquemática revisión de los mismos.

Agentes físicos.

En primer lugar, hemos de considerar el tratamiento más simple consistente en el lavado de las semillas, que aunque no pueda ser considerado como técnica de desinfección propiamente dicha, lógicamente eliminará algunas formas microbianas, pero carece de todo interés para nuestros fines.

Otro procedimiento empleado es el tratamiento por el calor. CALVERT & MUSKETT (1944) aplican agua a 50° durante 30 minutos sin provocar apreciable disminución de la germinación. MILLER & McWHORTER (1948) emplean vapor de agua y LEHMAN (1925) calor seco.

De igual modo, ha sido aprovechada la acción germicida de las radiaciones infrarrojas (SMYK & MILKOWSKA, (1956), en la desinfección de semillas.

Agentes químicos.

Muchísimos compuestos químicos han sido utilizados para estos fines y a pesar de que el margen de seguridad para el control de enfermedades no es satisfactorio, se han realizado numerosas investigaciones para estudiar la influencia de diferentes desinfectantes entre los cuales citaremos el trabajo de KINNARD (1951).

Sería interminable comentar aquí el sin fin de productos empleados en este sentido, máxime cuando las casas comerciales rivalizan en la obtención de marcas registradas cuyo número se eleva cada día más en el comercio. Teniendo en cuenta además que nuestro trabajo no persigue un estudio de aplicación a gran escala, nos ocuparemos solamente de los agentes "clásicos, de aquellos productos químicos que suelen en la pequeña escala de laboratorio.

En primer lugar, comenzaremos por tratar los iones metálicos, Mercurio, Cobre y Plata han sido empleados con gran frecuencia.

FOSTER (1947) utiliza el cobre como sulfato y óxido. El ión cúprico es actualmente base de diversos productos

El mercurio (ión mercúrico) ha sido estudiado tanto en compuestos inorgánicos como orgánicos. COLENO (1950) lo emplea integrado en un compuesto orgánico y obtiene excelentes resultados en experiencias de germinación. BONNIER Y BRAKEL (1970) lo utilizan como Cl_2Hg en un procedimiento que a escala de laboratorio consideramos muy satisfactorio, máxime porque se refiere a semillas de Leguminosa.

El Cl_2Hg a veces ha sido aplicado junto con formaldehído, tal como hace ANDREN (1943), pues este último producto ya presenta "per se" interés como desinfectante.

En efecto, el formaldehído ha sido utilizado con gran profusión y su empleo discutido en numerosos trabajos (CROCKER & BARTON, 1957).

También merece atención primordial entre los compuestos utilizados el Cloro fundamentalmente en forma de hipoclorito:

(19-36)

AFANASIEV (1939) utilizan los polvos de gas, el clásico producto esterilizante, consignado como tal en nuestra Farmacopea. GAUTHERET (1959), recomienda el empleo de los polvos de gas por su gran efectividad y porque el producto antiséptico se destruye en un tiempo más o menos corto. OLIVARES (1963) utiliza el cloro hipoclorito cálcico, pero previamente sumer-

ge las semillas en alcohol del 95%, por lo que ya se inicia la operación de esterilización.

Muy variados compuestos se han empleado por tanto en la desinfección de semillas, y para concluir esta breve revisión bibliográfica citaremos los trabajos de GOODMAN & HENRY (1947), que emplean subtilina; GAWEL & BOLLEN (1960) que esterilizan semillas con ácido peracético y FOX et al. (1963) que emplean el Azobenceno.

En todos los trabajos citados, aparece un denominador común: la búsqueda de las condiciones óptimas de actuación de un agente desinfectante o esterilizante para que evite la contaminación de las semillas sin que se afecte la germinación.

Técnicas empleadas por los diferentes autores.

Aparte de los métodos de desinfección seguidos para llevar a cabo tales prácticas a escala agrícola, hemos de comentar las técnicas de esterilización propiamente dicha, empleadas por los investigadores en el laboratorio para que se desarrolle el cultivo asépticamente una vez tratada la semilla con alguno de los productos antes mencionados.

Estas úl

podemos considerar divididas en dos grupos:

a) Aquellas que utilizan un recipiente común de germinación. Como ejemplo citaremos la técnica de BONNIER & BRAKEL (1970), que depositan las semillas previamente tratadas sobre una placa de petri con medio de cultivo microbiano (que detecta las contaminaciones).

b) Las que emplean recipientes individuales para cada semilla con la ventaja del aislamiento de los granos (evita que una semilla contaminada pueda transmitir esta contaminación a las demás). Como por ejemplo de éstas, podemos citar la técnica de OLIVARES (1963), que emplea tubos de ensayo.

MATERIAL Y METODOS

Fueron utilizadas semillas de judía de la variedad comercial "garrafal encarnada" y los siguientes agentes desinfectantes:

a.—Cloruro mercúrico (BONNIER & BRAKEL, 1970).

b.—Polvos de gas (Cloro hipoclorito cálcico) de un 37 % de riqueza en cloro activo, valorada por la técnica de MONTEQUI (1960). Posteriores determinaciones realizadas al estudiar la reproducibilidad de los resultados pusieron de manifiesto un descenso en la riqueza de este producto, por ello, se empleó el siguiente agente desinfectante.

c.—Lejía comercial de hipoclorito en la que la casa fabricante consignaba una riqueza de 80 g. de cloro activo por litro. Valorada por el procedimiento de MONTEQUI (1960), fue confirmada dicha riqueza.

d.—Dipholatan (desinfectante orgánico de síntesis).

Como técnica de cultivo fue utilizada la descrita por OLIVARES (1963) empleando tubos de ensayo de 20 x 2 cm. en los que se introdujo una tira de papel filtro de 15 x 1,5 cm. En el fondo del tubo se depositaron 2 ó 3 ml. de agua.

Los tubos fueron posteriormente esterilizados al autoclave y una vez fríos, se depositó en cada uno de ellos una semilla previamente esterilizada y lavada asepticamente para eliminar restos de agente desinfectante.

Las semillas se

lectura de semillas germinadas y no germinadas, desglosándose de estas las que ofrecían contaminación microbiana visible.

Los agentes esterilizantes fueron empleados de la siguiente manera:

Cloruro mercúrico.—Seguimos la técnica de BONNIER & BRAKEL (1970).

Las s

previamente esterilizados que contenían la solución de Cloruro mercúrico. Fueron estudiadas las concentraciones 1 %, 2,5% y 5% de este producto empleadas durante 5', 15', 20', 25, y 30'.

Después de la correspondiente esterilización, las semillas fueron lavadas ocho veces con agua estéril.

Polvos de gas.—Fue seguida la técnica descrita por OLIVARES (1963).—Las semillas se sumergen en alcohol de 95° por 2 ó 3 minutos, pasados los cuales, se llevan a un matraz estéril que contiene solución de cloro-hipoclorito cálcico. Se estudiaron las concentraciones del 3,5%, 5% y 7% y los tiempos de esterilización 15', 30', 45', 60', 75', 90', 105', y 125'. Tres lavados con agua estéril son suficientes para eliminar el antiséptico.

Solución de cloro activo.—Se siguió la técnica descrita para el cloruro mercúrico

tivo y los tiempos de esterilización de 5', 10', 15', 20', 25' y 30'.

Dipholatan.—Se siguió la técnica descrita pa diándose las concentraciones del 0,01%, 0,1% y 1% y los tiempos de esterilización de 5', 10', 15', 20', 25', y 30'.

En cada concentración

ra de los agentes se emplearon 50 semillas. Todas las operaciones fueron repetidas dos veces por lo que el total de semillas estudiadas fue de 100 por cada concentración, tiempo de esterilización y agente esterilizante.

RESULTADOS

Vienen expresados en las Tablas I, II, III y IV.

En cada Tabla se expone el tipo de agente esterilizante, su concentración, el tiempo en minutos que las semillas estuvieron en contacto con él, así como el porc y las que aparecieron contaminadas.

TABLA I
CLORURO MERCURICO

% Cl ₂ Hg	Tiempo	Porcentaje de semillas		No germinadas
		Germinadas	Contaminadas	
2,5	0'	63	30	7
2,5	5'	80	15	5
2,5	10'	90	5	5
2,5	15'	99	0	1
2,5	20'	90	0	10
2,5	25'	85	0	15
2,5	30'	75	0	25
5	0'	64	29	7
5	5'	83	17	10
5	10'	80	5	15
5	20'	78	0	22
5	25'	70	0	30
5	30'	64	0	36

Explicación en el texto.

TABLA II
POLVOS DE GAS

% Polvos de gas	Tiempo	Porcentaje		No germinadas
		Germinadas	Contaminadas	
3,5	0'	61	30	9
3,5	45'	65	82	7
3,5	60'	76	15	9
3,5	75'	70	14	16
3,5	90'	68	14	18
3,5	105'	63	11	26
3,5	125'	60	10	30
7	0'	61	29	10
7	45'	67	23	10
7	60'	81	12	7
7	75'	98	0	2
7	90'	72	0	28
7	105'	66	0	34
7	125'	65	0	35

Explicación en el texto.

TABLE III
SOLUCION DE CLORO ACTIVO

% Cloro activo	Tiempo	Porcentaje de semillas		No germinadas
		Germinadas	Contaminadas	
0,8	0'	60	30	10
0,8	5'	63	28	9
0,8	10'	75	20	5
0,8	15'	87	10	3
0,8	20'	95	4	1
0,8	25'	100	0	0
0,8	30'	90	0	10
4	0'	61	29	10
4	5'	96	3	3
4	10'	85	5	10
4	15'	81	3	16
4	20'	80	2	18
4	25'	75	0	25
4	30'	70	0	30

Explicación en el texto.

TABLE IV
DIPHOLATAN

% Diphola	Tiempo	Porcentaje de semillas		No germinadas
		Germinadas	Contaminadas	
0,01	0'	61	29	10
0,01	5'	67	26	7
0,01	10'	75	25	0
0,01	15'	79	21	0
0,01	20'	87	13	5
0,01	25'	85	10	5
0,01	30'	80	10	10
0,1	0'	62	28	10
0,1	5'	98	1	1
0,1	10'	88	2	10
0,1	15'	78	2	20
0,1	20'	72	3	25
0,1	25'	68	3	29
0,1	30'	67	2	31

Explicación en el texto.

DISCUSION

Técnica de cultivo aséptico elegida.

Nos ocupamos en primer lugar de discutir la técnica de cultivo elegida por nosotros.

Esta técnica que seguimos (OLIVARES, 1963) presenta solamente una desventaja aparente frente a la BONNIER & BRAKEL (1970), y es que en esta última se detectan con enorme precisión las contaminaciones microbianas, pues al incubar las semillas sobre un soporte nutritivo, la presencia de una forma microbiana se pondría de manifiesto por la formación de la consiguiente colonia sobre el medio de cultivo.

En la técnica que hemos adoptado, puede quizás, pasar desapercibida una contaminación en los primeros días, pero la propia semilla sería un medio de cultivo adecuado y a los 5 días (tiempo que efectuado la semilla) pensamos que ya se desechado un tubo dudoso.

También pensamos que la técnica en placa de Petri aparte de exigir la confección de un medio de cultivo (BONNIER & BRAKEL, 1970), tiene el gran riesgo de que el micelio de un hongo contaminante, o la colonia de una bacteria móvil, etc., pueden alcanzar las semillas próximas, transmitir la contaminación y falsear los resultados de recuento. De cualquier forma, empleando un número reducido de semillas por placa, pueden conseguirse óptimos resultados, pero en este caso sería engorroso el manejo de excesivo material, teniendo en cuenta la gran cantidad de semillas que hemos tenido que manejar para poder obtener unos resultados de garantía.

En contraste, la técnica de germinación individual (en tubo de ensayo) seguida en nuestras experiencias, aísla totalmente una semilla de sus vecinas, las lecturas serán correctas y cualquier contaminación circunscrita a la semilla contaminada.

*Empleo de los distintos agentes esterilizantes.**Cloruro mercúrico.*

A la vista de la Tabla I, podemos deducir que el empleo de Cl_2Hg al 2,5% (tal como lo utilizan) BONNIER & BRAKEL, 1970), representa una concentración óptima de empleo. Mientras que los mencionados autores mantienen las semillas germinar, (aunque no citan el tanto por ciento de germinación) nosotros hemos encontrado que a ese tiempo se obtiene un 80% de germinación. Sin embargo, manteniendo las semillas 15 minutos en esteri-

lización, se logra el 100%, por ello, elegimos este tiempo y concentración de Cl_2Hg como óp

nutos apenas se apreciaba inhibición de la germinación y sí un descenso rápido de la contaminación, lo que se traduce en que una cifra máxima de semillas se transforman en plántulas asépticas. Tiempos de esterilización superiores a los 20 minutos inhiben la germinación, aunque la contaminación desciende a un valor mínimo.

Cuando se utiliza una concentración de Cl_2Hg doble de la anterior, al 5%, la inhibición de la germinación se manifiesta desde los primeros minutos de contacto con el agente desinfectante, aunque la rápida disminución de la contaminación hace que se obtenga un máximo de germinación a los 5 minutos de esterilización. Semillas mantenidas más tiempo en contacto con el Cl_2Hg al 5% demuestran después una más pobre germinación.

Polvos de gas.

Según se deduce de la Tabla II, el empleo de polvos de gas a una concentración del 3,5%, que utilizan OLIVARES (1963) y GAUTTHERET (1959), es inadecuada para la esterilización del tipo de judías empleado por nosotros. La disposición de algunos patógenos en el interior de las semillas (ORTON, 1931) impide la actuación del cloro activo de manera positiva, a esa concentración y a pesar de tener las semillas en contacto con el agente esterilizante 125 minutos no se consigue eliminar la contaminación, mientras que la capacidad de germinación se

En cambio, cuando empleamos una concentración del 7% de polvos de gas, encontramos a los 75 minutos de esterilización un tiempo óptimo para la germinación. La disminución de la contaminación es marcadísima; sin embargo, la cosecha de plántulas asépticas pronto disminuye debido a que tiene lugar una inhibición de la capacidad de germinación. A partir de los 75 minutos establecidos como óptimo, tiempos superiores de esterilización provocan el efecto claramente deducido de la destrucción de los tejidos del germen de viabilidad en las semillas.

Como decíamos en el capítulo de Material y Métodos, la reproducibilidad de resultados es difícil de conseguir con los Polvos de gas, merced a que el producto pierde gran parte de su actividad con el tiempo. Tenemos que apuntar que los tiempos de actuación óptimos de este clorohipoclorito cálcico, coincidiendo con los encontrados por otros autores arriba citados son muy elevados por lo que este clásico método de esterilización nos parece menos convincente que los otros estudiados en el presente trabajo.

Solución de cloro activo.

Este producto tal como lo expende el comercio (pequeños fracos de 100 ml) presenta, con respecto a los polvos de gas las ventajas apuntadas de más estabilidad y reproducibilidad de resultados.

Como se deduce de la Tabla III, cuando se emplea a la concentración de 0,8 g de Cl activo por 100 ml, se consiguen muy óptimos resultados: 1.º, porque elimina rápidamente las contaminaciones; 2.º, hace descender la cifra de no contaminación, dato interesante éste quizás debido a que elimina contaminaciones inaparentes

paces fisiológicamente de germinar; y 3.º, porque tras 25 minutos de esterilización, producen una cosecha óptima de plántulas asépticas.

Al emplear la concentración del 4%, los efectos anteriormente observados son ahora más acusados. A los 5 minutos de esterilización se consigue una adecuada cosecha, sin embargo, la germinación pidamente. Debemos añadir que el pH = 8,5 de la solución, coopera a la actividad del producto de manera inespecífica.

Dipholatan.

El empleo de este producto orgánico de síntesis es también un cuadro típico de capacidad esterilizante en función del tiempo y concentración.

En la Tabla IV, puede observarse que débiles concentraciones, 0,01% no consiguen eliminar contaminaciones profundas de las semillas por lo que la cosecha de plántulas no supera el 90% a pescar esterilización. Por el contrario, su empleo a una concentración del 0,1% tiene lugar satisfactorio proceso de esterilización con activación de la germinación e inhibición de la contaminación.

RESUMEN

Se estudia una técnica de cultivo aséptico utilizando tubos de ensayo en cada uno de los cuales se coloca una semilla previamente esterilizada. La concentración y tiempo de actuación óptimos de los agentes estudiados para esterilizar semillas de judía son los siguientes:

- a.—Cloruro mercúrico: 2,5% durante 15'
- b.—Polvos de gas: 7% durante 75'
- c.—Solución comercial de cloro activo: 8 g de Cl₂ por litro durante 25' o 40g de Cl₂ por litro durante 5'
- d.—Dipholatan: 0,1% durante 5'

SUMMARY

A test tube technique for aseptic culture of legume seeds has been studied.

Every seed was placed, previously sterilized, in each test tube.

The optimal concentration and sterilizing time for the agents studied for french been sterilization are the following:

- a.—Mercuric chloride: 2,5% for 15'
 b.—Calcium hypochlorite: 7% for 75'
 c.—Commercial solution of active chloride: 8 g per litre of Cl₂ for 25' o
 40 g per litre for 5'
 d.—Dipholatan: 0,1% for 5'

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ANDREN, F.—(1944) Some results of the 1943 cereal seed grain disinfection experiments. *Staten Växtskydanstalt, Väx.* 1944 (8): 19-23. *Chem. Abstr.* 39: 1947. 1945.
- 2.—BONNIER, Ch. et BRAKEL, J.—“Lutte Biologique contre la faim — Légumineuses-Rhizobium. páginas (1970).
- 3.—CALVERT, E. L. and MUSKETT, A. E.—(1944). Blind seed disease of rye-grass (*Nature* 153: 287-288).
- 4.—COLENO P.—(1950). The disinfection of peanut seeds. *Oleagineux.* 5: 149-55. *Chem. Abstr.* 44: 9104. 1950.
- 5.—CROCKER, W. and BARTON, L. V.—Physiology of seeds. An introduction to the Experimental Study of seed and Germination Problems (1957). Edit. Waltham, Mass. U. S. A. Un libro con 267 páginas.
- 6.—DIPHOLATAN.—Quelques résultats d'utilisation. Edit. California Chemical S. A. Francaise, París. Un libro con 88 páginas.
- 7.—FOSTER, A. A.—(1947). Acceleration and retardation of germination on some vegetable seeds resulting from treatment with copper fungicides (*Phytopath.* 37: 390-398).
- 8.—FOX, H. M., GEOGHEGAN, M. J., SILK, J. A. and SUMMERS, L. A.—(1963). Azobenzene derivatives as seed treatments *An n.Appl. Botany* 52: 33-44.
- 9.—GAUTHERET, R. J.—(1959). *La culture des Tissus Végétaux. Techniques et Réalisations.* Masson et Cie. París.
- 10.—GAWELL, L. J. and BOLLEN, W. B.—(1960). Sterilization of grass seeds with peracetic acid. *Agron. J.* 52: 718-19.
- 11.—GIRTON, R. E.—(1936). Sterilization of corn grains with sodium hypochlorite. *Plant Physiol.* 11: 635-39.
- 12.—GOODMAN, J. J. and HENRY, A. W.—(1947). Action of subtilin in reducing infection by a seed-borne pathogen. *Science* 105: 320-21
- 13.—KINNARD, M. A.—(1951). L'influence des désinfectants sur la faculté germinative des semenc
- 14.—LEHMAN, S. G.—(1925).—Studies on treatment of cotton seed (North Carolina Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. 26, 71 pp.)
- 15.—MILLER, P. W. and McWHORTER, F. P.—(1948). The use of vapor-heat as a practical means of disinfecting seed (*Phytopath.* 38: 89-101).
- 16.—MONTEQUI, R.—*Química Inorgánica Aplicada.* Octava edición (1960). Pgs. 341-42.
- 18.—ORTON, C. R.—(1931). Seed-borne parasites. A. bibliography (*West Virginia Agric. Exp. Sta. Bull.* 245: 1-47).
- 17.—OLIVARES, J.—(1963). Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Granada.
- 19.—SMYK, B. and MILKOWSKA, A.—(1956). The influence of infra-red rays on the disinfection of grains. *Acta Microbiol. Polon.* 5: 133-35.
- 20.—SPAETH, J. N. and AFANASIEV, M.—(1939). The effect of sterilization with calcium hypichlorie on germination of certain seeds. *J. Forestry* 37: 371-72.