

1992

084684333

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DE CACTACEAS PRODUCIDAS *in vitro*

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
ROSALBA GUTIERREZ ROJO

GUADALAJARA, JAL., DICIEMBRE DE 1993.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente

Número

Sección

C. ROSALBA GUTERREZ ROJO
P R E S E N T E . -

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis "EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CACTACEAS PRODUCIDAS in vitro" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Benjamín Rodríguez Garay.

Al contestar este oficio ctesee fecha y número

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
Guadalajara, Jal. 5 Noviembre 1993.
EL DIRECTOR



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS

EL SECRETARIO

M. EN C. MA. GEORGINA GUZMAN GODINEZ

c.c.p.- El Dr. Benjamín Rodríguez Garay; Director de tesis.-pte.
c.c.p.- El expediente del alumno.

EPB>MGGG>Cglr.

C. Dr. Eulogio Pimienta Barrios
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E.

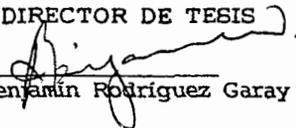
Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la Pasante Rosalba Gutiérrez Rojo, código número 084684333, con el título "Evaluación de la actividad antimicrobiana de cactáceas producidas in vitro", consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos .

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 22 de noviembre de 1993.

EL DIRECTOR DE TESIS


Dr. Benjamín Rodríguez Garay

SINODALES

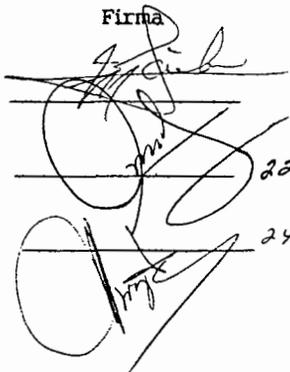
Nombre

Firma

1.- Biol. Marisela Mendoza M.

2.- Q.F.B. Rosa Ma. Domínguez Arias

3.- Q.F.B. Margarita Bonilla


22 XI-93
24-NOV-93.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en la división de Biotecnología del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco A.C. bajo la dirección del Dr Benjamin Rodríguez Garay.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Benjamín Rodríguez Garay, jefe del Departamento de Cultivo de Tejidos Vegetales por el apoyo en la dirección del presente trabajo.

Al Ing. Gerardo Franco Martínez, por su colaboración, enseñanzas y sugerencias durante la realización del presente trabajo.

Al Ing. Rafael Soñero Quintana por su valiosa ayuda en la toma de fotografías

Al Dr. Gonzalo Flores Martínez y a todo el personal del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CIATEJ.

A la Tec. en alimentos Ma. del Socorro Morales Contreras, Esther Leos Montoya y el Biol. Eduardo Padilla Camberos, por la ayuda brindada durante la realización del trabajo.

A la Familia Guillén principalmente a los Ing. Diego, Miguel y Javier Guillén por su ayuda y colaboración en la dirección de cómputo.

A Juan Mercado Ponce por sus atenciones y servicios de fotocopiado y material didáctico, así como todo el apoyo que incondicionalmente me brindó durante la realización del trabajo.

A tí que siempre estás conmigo en las buenas y en las malas.

DEDICATORIA

Por que nunca terminaré de agradecer su apoyo y confianza y por que éste trabajo es también fruto de su esfuerzo. con todo mi cariño y respeto:

A MIS PADRES.

A la memoria de mi abuelita Ma. del Refugio Yañez Mercado

Por que uno es el resultado de los otros, con el respeto que me merecen todos MIS MAESTROS.

INDICE

RESUMEN

I INTRODUCCION1

II ANTECEDENTES4

2.1 Las cactáceas

2.1.1 Generalidades

2.1.2 Clasificación

2.1.3 Descripción botánica de las especies utilizadas.

2.2 Cultivo de Tejidos Vegetales

2.2.2 Historia del cultivo de tejidos vegetales.

2.3 Micropropagación

2.4 Las bacterias y su importancia

2.5 Efecto de los antibióticos

2.6 Plantas con propiedades antimicrobianas en cultivo de tejidos vegetales.

2.7 Los metabolitos secundarios

2.8 Producción de metabolitos secundarios

HIPOTESIS	24
OBJETIVOS	
III METODOLOGIA	25
3.1 Obtención del material biológico	
3.1.1. Micropropagación de brotes	
3.1.2. Cultivo de Células en suspensión	
3.2 Condiciones medioambientales de incubación	
3.3 Obtención de extractos a partir de brotes y células de las diferentes especies de cactáceas cultivadas <i>in vitro</i> .	
3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de brotes y células de las diferentes especies de cactáceas producidas <i>in vitro</i> .	
IV RESULTADOS	31
V DISCUSION	45
VI CONCLUSIONES.....	50
VII APENDICE	51
VIII BIBLIOGRAFIA	54

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fué evaluar la actividad antimicrobiana de las cactáceas *Stenocereus queretaroensis* y *Leuchtenbergia principis* cultivadas *in vitro*, así como probar la salinidad como factor abiótico de estrés (elicitor) que incrementa la producción de sustancias con actividad antimicrobiana.

Se prepararon extractos con las cactáceas antes mencionadas y posteriormente se aplicaron en placas inoculadas con las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Agrobacterium rhizogenes*, con las cuales se logró observar que las 2 especies probadas son antibióticamente activas contra las bacterias antes mencionadas, sin embargo, *S. queretaroensis* mostró mayor actividad antimicrobiana.

Por otra parte, el factor de estrés utilizado funcionó como elicitor pues con las 2 especies utilizadas se observó un incremento en el tamaño de las halos de inhibición por parte de los extractos estresados.

I. INTRODUCCION

El conocimiento de las plantas ha sido una motivación constante para el hombre desde tiempos muy remotos. Derivando su alimento de éste recurso, ha ido más allá, y en sus inicios en el conocimiento de la naturaleza, las plantas medicinales han sido el germen de los jardines botánicos en el antiguo y nuevo mundo, así como de numerosas investigaciones en el campo científico. Es indudable que el hombre tuvo que aprender a distinguir aquellas plantas que eran comestibles y las que no lo eran, así como las que tenían propiedades curativas de las venenosas, desarrollando un conocimiento empírico el cual fué transmitiendo al principio verbalmente y después en forma escrita.

El reino vegetal posee muchas especies de plantas que se sabe contienen sustancias con valor tanto nutricional como medicinal y otras que están aún por descubrirse y que se ensayan constantemente respecto a su valor farmacológica (particularmente por sus propiedades antibióticas, narcóticas, citotóxicas etc.). Como resultado de los modernos descubrimientos biotecnológicos nuevas drogas vegetales encuentran su camino hacia la medicina en estado de sustancias purificadas (Trease y Charlet, 1982).

Gracias a la aparición de las ciencias biológicas se logró comprender la estructura y funcionamiento de las plantas y su aplicación para resolver algunos de los problemas del hombre. Así nace también la biotecnología que hace referencia a la aplicación de las ciencias biológicas en la medicina, farmacología, agronomía e ingeniería química.

La biotecnología se define como la utilización de microorganismos, sistemas o procesos biológicos para la producción de bienes y servicios; es una área que en los últimos 5 años ha causado gran impacto en los medios científicos, tecnológico, social y financiero de todo el orbe.

Esta importancia es debida a 3 factores

- El potencial de las tecnologías biológicas para producir una extensa variedad de substancias .
- El descubrimiento de las técnicas de ingeniería genética, fusión celular y cultivo de tejidos (vegetales y animales) y sus posibles aplicaciones.
- El hecho de que los procesos biotecnológicos emplean como materias primas principales recursos renovables para la producción de bienes y servicios (Sánchez,1985).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales consisten en cultivar en medios de cultivo adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y tallo, primordios de hojas, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos, tallo, hojas y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Street,1977).

Cualquier parte de la planta separada de ésta y desinfectada, es un explante con el cual se puede iniciar un cultivo.

Las principales aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales se encuentran divididas en 5 áreas fundamentales:

- 1.- Micropropagación
- 2.- Preservación de germoplasma
- 3.- Mejoramiento genético
- 4.- Biosíntesis de metabolitos
- 5.- Investigación básica

Históricamente, los compuestos generados por los vegetales han sido separados de acuerdo al tipo de metabolismo del cual se generaron pudiendo ser primarios ó secundarios.

La definición más popular de metabolito secundario se refiere a los compuestos que no juegan un papel indispensable para la planta y que no están en todas las vegetales o por lo

menos en la mayoría. Hoy se sabe que éstos juegan un papel muy importante en las plantas como: competencia por el ecosistema por medio de sustancias químicas, mecanismos de defensa, atrayentes de insectos polinizadores entre otros. El hombre en particular, ha utilizado algunos de los metabolitos secundarios como: drogas, solventes, saborizantes de alimentos, pigmentos para cosméticos etc. (Gibson y Pain citados por López y Lozoya, 1985).

Las células vegetales representan una fábrica natural de éstos compuestos, sin embargo, en algunos casos el suministro de éstos por las plantas puede ser muy limitado debido a diversos factores.

Uno de los métodos que han sido utilizados para incrementar la producción de éstos es el uso de "elicitores". El término elicitador es usado para compuestos de origen biológico y no biológico, como pueden ser agentes físicos y/o químicos de estrés que causan un incremento en la producción de "fitoalexinas", cuando es aplicado a plantas o cultivos celulares.

Las fitoalexinas, son en general compuestos que son acumulados por las plantas en respuesta a la presencia de un agente estresante (Buitelaar et al., 1992).

Exámenes preliminares de gran número de plantas nos sugieren que una gran mayoría contienen sustancias con potencial antimicrobiano.

En éste trabajo se estudiaron algunos aspectos relacionados con la producción de sustancias con actividad antimicrobiana en cactáceas producidas *in vitro*, así como la influencia de la salinidad como un factor abiótico de estrés ó elicitador.

II. ANTECEDENTES

2.1 LAS CACTACEAS

2.1.1 GENERALIDADES

Las cactáceas son originarias del continente americano y se consideran entre las plantas más notables que caracterizan las zonas áridas y semiáridas con fuerte insolación, sin embargo, las hay propias de bosques y selvas tropicales donde crecen en lugares húmedos y sombreados, gracias a sus características bioquímicas y fisiológicas tan especiales han logrado invadir habitats muy diversos (Soltero, 1990).

Nuestro país es el más importante centro de dispersión de cactáceas en el mundo, teniendo 60 de los 153 géneros descritos actualmente de los cuales 23 son endémicos (Bravo, 1978).

Desde las épocas prehispánicas éste grupo de plantas ha sido un valioso recurso alimenticio, ritual y medicinal para los mexicanos. Una de las primeras drogas estudiadas química y fisiológicamente (mezcalina) fué extraída desde 1888 de una cactácea conocida comunmente como "Peyote" (*Lophophora williamsii*).

El uso ritual de ésta planta por los indígenas de México fué observado por los conquistadores españoles, quienes también observaron la utilización de las pencas de nopal (*Opuntia ficus-indica*) para producir colorantes indirectamente por la cría de la cochinilla (López y Lozoya, en prensa).

Poco tiempo después del descubrimiento de América las cactáceas ya eran conocidas en Europa y a principios del siglo XIX se consideraban plantas de colección que alcanzaron precios muy elevados.

La riqueza con que cuenta nuestro país en materia de cactáceas es indiscutible, existiendo una gran cantidad de especies susceptibles de explotación (Soltero, 1990).

Para la mayoría de la gente el mayor atractivo de muchas cactáceas han sido los brillantes colores de sus flores y frutos. Las sustancias que dan los colores antes mencionados son referidos por algunos botánicos como metabolitos secundarios (López y Lozoya, en prensa). Como propuesta alternativa para el estudio y explotación de compuestos secundarios de éstas plantas, se vislumbran las técnicas de la biotecnología, la cual permitirá un uso del recurso sin afectar las poblaciones naturales de las cactáceas.

2.1.2 CLASIFICACION

Hunt en 1967 (del herbario de Kew), describió un moderno sistema de clasificación para las cactáceas, separandolas en 3 tribus mayores: Cacteeae, Opuntieae y Pereskieae.

Dentro de la tribu Cacteeae se encuentran los cactus más diversos; existen 2 subtribus. la Cactinoe y la Cereinoe de las cuales Cactinoe tiene gran importancia económica al igual que las de la tribu Opuntieae (Clayton, 1987).

Las cactáceas mexicanas están representadas por cerca de 740 especies, cifra que supera la de cualquier otro país, lo que convierte a México definitivamente en el país con mayor riqueza cactoflorística (Arias-Montes, 1990).

2.1.3 DESCRIPCION BOTANICA Y DISTRIBUCION DE LAS ESPECIES UTILIZADAS

Leuchtenbergia principis (cactus agave)

Plantas pequeñas, simples o cespitosas, de 25cm. de altura y 15 cm. de diámetro llegando a medir hasta 50cm. de altura, con tubérculos muy largos, por lo que adquieren aspecto agavoideo. Tallo cilíndrico, corto, carnoso, de 5 a 7 cm. de diámetro más o menos leñoso y suberosa, tuberculado. Tubérculos dispuestos en 8 y 13 series espiraladas, muy largos y delgados, de 5 a 12.5 cm de longitud de color verde azulado con tintes rojizos. Areólas situadas en el ápice de los tubérculos, en la porción truncada, sustentadas por una escama

pequeña. Axilas lanosas. Espinas largas y delgadas, suaves, papiráceas, torcidas. Espinas radiales 8 a 14, de cerca de 5 cm. de longitud. Espinas centrales 1 a 3, de alrededor de 10 cm. de longitud, también papiráceas blancas. Flores una en cada areóla, emergiendo en la región florífera de las areólas de los tubérculos jóvenes de 5 a 6 cm. de diámetro; pericarpelo cilindroide, tubo receptacular infundibuliforme, estambres primarios insertos en torno del ápice del anillo nectarial que es grande, los demás en toda la pared del receptáculo hasta la garganta; anteras pequeñas, redondeadas; estilo grueso; lóbulos del estigma de 9 a 14, lineares, irregulares, amarillos; cavidad del ovario con óvulos numerosos en funiculos cortos, cuya inserción no llega hasta la base de la cavidad del ovario. Fruto largamente ovoide o piriforme, escamoso, blanquecino, verdoso con tintes de color rosa o salmón, pruinoso, al principio carnoso, después seco, abriéndose por la base. Semillas en forma de gorro, con hilo basal muy profundo que incluye el micrópilo; testa finamente tuberculada, negro mate, grisáceo o de color castaño negruzco; embrión algo curvo con cotiledones pequeños; perisperma presente; plántulas con hojas cotiledonares triangulares, pequeñas, con los primeros tubérculos largos y con espinitas subuladas. Conductos lactíferos muy abundantes en el parénquima cortical.

Crece en pasto y en vegetación xerófila. Se le ha encontrado en los estados de San Luis Potosí, Nuevo León, Zacatecas, Coahuila, Tamaulipas y el Altiplano. Fue relativamente abundante en la sierra de Parras y Sierra de La Paila, Coahuila, así como en Matéhuala y Saltillo (Bravo, 1978).

Stenocereus queretaroensis (Pitaya de Querétaro)

Planto candelabriforme, con troncos bien definidos de 5 o 6 m. de alto o más. Tronco leñoso como de 1 m. de alto y 35 cm. de diámetro o más. Ramas como de 15 cm. de diámetro, de color verde, a veces con tintes rojizos; el conjunto de ramas forman una copa muy amplia a veces como de 4 m. de ancho, castillas de 6 a 8, prominentes, separadas por amplios intervalos. Areólas distantes entre sí como 1 cm.; con fieltro café oscuro casi negro,

glandulosa. Espinas radiales 6 a 9, las inferiores como de 3 cm. de largo, gruesas, aciculares desiguales. Espinas centrales 2 a 4, gruesas como de 4 cm. de largo. Flores en los lados de las ramas pero hacia la extremidad, infundibuliformes, de 10 a 12 cm. de largo pericarpelo con escamas ovaladas de 2 mm. de largo. Fruto globoso hasta ovoide, como de 6cm. de largo, rojizo; areólas con lana amarillenta y espinas numerosas, largas, del mismo color, cuando el fruto madura, las areólas se desprenden quedando el pericarpio desnudo. Semillas de 2.5mm. de largo y 1.5 a 1.8 mm. de ancho; testa negra toscamente verrucosa.

La planta se caracteriza por las areólas oscuras, negras. Se cultiva por su fruto comestible muy agradable, que se conoce con el nombre de Pitaya de Querétaro. Existen variedades hortícolas que producen frutos de colores diversos. De ésta especie se han aislado algunos colorantes para la industria cosmética como los triterpenos, entre ellos uno denominado ácido queretaróico.

Es una especie nativa de Querétaro, Jalisco y Michoacán. Donde también es objeto de cultivo más o menos intensivo; de Jalisco se han señalado los alrededores de Guadalajara, Chapala, Zapotlán, Sayula, Villa de la Playa; en Guanajuato, León; de Querétaro, en la cercanías de la ciudad y en Michoacán cerca de Jiquilpan. (Bravo, 1978).

2.2 EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El éxito del cultivo de tejidos vegetales como un método de propagación para estudios morfogénéticos, fisiológicos, bioquímicos y otros, está muy influenciado por la composición del medio de cultivo utilizado y otros parámetros ambientales de cultivo.

De acuerdo al tipo de material vegetal utilizado, los cultivos *in vitro* pueden clasificarse en: 1.-Cultivo de órganos, 2.- Cultivo de tejidos, 3.- Cultivo de células. El término de cultivo de tejidos se usa frecuentemente para referirse indistintamente a cualquiera de las modalidades anteriores (Ochoa, 1985).

Es importante señalar que las células aisladas (callo, células en suspensión y protoplastos) pueden dividirse para formar nuevos callos, órganos o embriones y, eventualmente, dar lugar a nuevas plantas completas. En ésta propiedad de regenerar nuevos individuos a partir de células es donde radica el potencial del cultivo *in vitro* tomando el concepto de totipotencia el cual se refiere a la característica de las células de regenerarse en un nuevo organismo .

Las técnicas para cultivar tejidos y células *in vitro* han tenido un enorme desarrollo que permite en la actualidad aplicarlas a un gran número de especies vegetales. Estas han producido un gran avance en el conocimiento básico de la biología de las plantas y han abierto nuevas posibilidades para la solución de problemas agrícolas y hortícolas entre otros.

2.2.2 HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Desde hace 120 años aproximadamente, en las investigaciones de fisiología vegetal se han utilizado las técnicas de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales.

Los primeros intentos de ésta técnica fueron realizados por Sacks (1860) y Knops (1861), quienes observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas y prepararon una solución nutritiva que las contenía, la cual ha sido utilizada por muchos investigadores desde entonces.

Posteriormente, Haberlandt (1898) realizó un intento de cultivo de células aisladas en 3 géneros de monocotiledoneas sin obtener éxito ya que no observó división celular, pero proporcionó información sobre las interrelaciones e influencias correlativas de la células e introdujo el concepto de totipotencialidad.

Haberlandt y Kotte (1922), cultivaron ápices radiculares de chichara y maíz en un medio enriquecido con sales orgánicas, glucosa, peplana, asparagina y varios aminoácidos.

Robbins (1922), enriqueció el medio de cultivo con glucosá, sales orgánicas y agar para el cultivo de ápices radiculares de varias especies.

En los 30 años siguientes los progresos logrados fueron muy pocos y desafortunados en cultivo de células aisladas.

Sin embargo, el trabajo pionero fué el de White (1934), con cultivo de ápices de raíz de tomate (*Lycopersicum esculentum*) con un medio líquido conteniendo sales inorgánicas, extracto de levadura y sacarosa, en donde obtuvo un crecimiento activo y demostró también que el extracto de levadura se podía sustituir por 3 vitaminas del grupo B: tiamina, piridoxina y niacina.

Gautheret (1934) reportó el cultivo de cambium de *Salix caprea* y *Populus nigra*, en medio solidificado conteniendo solución Knop, glucosa y cisteína hidrocloreada.

Robbins (1936) estudió el efecto de los micronutrientes inorgánicos y señaló que el zinc, magnesio y boro son necesarios para el cultivo de ápices radiculares. En 1937, descubrió la importancia de la vitamina B para el crecimiento de las raíces

Went y Thimann (1937), descubrieron la auxina AIA (ácido indolacético) y su importancia en el crecimiento de raíces.

Nobecout (1937-1938), obtuvo proliferación celular en cultivos de raíces de zanahoria y fué el primero en obtener callosidades con crecimiento limitado.

Nobecouri y Gautheret en Francia, al igual que White en Estados Unidos en 1939, reportaron un crecimiento indefinido de tejido de raíz donde se observó la formación de callosidades sembradas en medio semisólido.

El cultivo de callos ha contribuido al estudio de las enfermedades vegetales, pues existen ciertas enfermedades en las cuales los síntomas son la formación de tumores. En algunos casos, su origen es genético y en otros es bacteriológico o viral.

Van Oberbee et al., (1941) utilizaron el agua de coco para cultivar embriones de *Cocos* y *Datura*, observando resultados semejantes.

Coplin y Steward, (1948) dieron a conocer el efecto del agua de coco en células aisladas de raíces de zanahoria, donde observaron crecimiento de células diferenciadas. Años más tarde usando agua de coco en combinación con 2,4-D, promovieron la división celular. Con el uso del agua de coco condujeron a la identificación de otra clase de hormonas vegetales y demostraron una vez más la totipotencialidad.

Morel y Martin (1952), fueron los primeros investigadores que lograron obtener plantas de *Dalia* libres de virus a partir de meristemas apicales.

Muir et al., (1954), transfirieron segmentos de tejido de callo a medio líquido en agitación y tienen éxito al obtener cultivos en suspensión conteniendo células aisladas y pequeños terrones o agrupaciones celulares.

Skoog (1955), identificó la 6-furfurilaminopurina (cinetina) observando la habilidad de éste regulador de crecimiento vegetal para iniciar la división celular. Incluyendo citoquininas en los medios de cultivo que hizo posible la proliferación de células y la formación de callos de un gran número de especies vegetales. Induciendo además, la formación de estructuras organizadas de algunas de esas especies.

Skoog y Miller (1957), usando combinaciones de auxinas y cinetina, controlaron la formación de brotes y raíces en cultivos de collos de tabaco. Por lo tanto es posible inducir la formación de raíces decrementando el % de cinetina en relación con auxina, mientras que al invertirlas se induce la formación de yemas que se desarrollan más tarde como brotes.

Muir (1958) con la técnica de nodriza y crecimiento en microcámaras aisló y describió las características de los clones celulares aislados.

Murashige y Skoog, (1958) desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido de tejidos de tabaco. En la actualidad, las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies.

Las actividades en éste campo se iniciaron en México en 1970 a raíz de la firma de un convenio de colaboración científica entre México y Japón que trajo a varios investigadores japoneses al Colegio de Postgraduados de Chapingo. Posteriormente un grupo de investigadores del departamento de bioquímica vegetal de la división de estudios de postgrado de la Facultad de Química de la UNAM, comenzó a emplear las técnicas del cultivo de células y tejidos vegetales como una nueva metodología de gran potencial para apoyar la investigación bioquímica básica en plantas.

En 1975, la visita del doctor Yasuyuki Yamada, de la universidad de Kioto, propició que se estableciera una relación académica con la Asociación Internacional de Cultivo de Tejidos Vegetales (IAPTC).

El 18 de Junio de 1980, se estableció la Asociación Mexicana de Cultivo de Tejidos Vegetales.

En lo que ha ésta disciplina se refiere, México y otros países del Tercer Mundo podrían obtener grandes beneficios a corto y largo plazo, ofreciendo posibilidades interesantes de desarrollo para la horticultura y la industria farmacéutica nacional (Cita de Navarro y Vera, 1988).

2.3 MICROPROPAGACION

La multiplicación intensiva de plantas empleando las técnicas *in vitro* ha sido una poderosa herramienta en la floricultura del siglo XX. Este éxito ha propiciado el empleo de la micropropagación de hortalizas, frutales y más recientemente especies forestales, principalmente aquellas en peligro de extinción. Los resultados disponibles hacen suponer que la micropropagación substituirá los sistemas convencionales de multiplicación de muchas especies.

Debido a la versatilidad de los sistemas de micropropagación, se han realizado investigaciones con el objeto de micropropagar especies que crecen en zonas áridas como son la mayoría de los cactáceas. Estas especies han sido fuente de productos destinados tanto a la alimentación humana y del ganado, así como de una diversidad de usos industriales. La posibilidad de multiplicar masivamente, copias de individuos sobresalientes, hace muy atractivo el uso de la micropropagación (Villalobos y Escobar, 1985).

El primer investigador que sugirió el uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para la propagación de las cactáceas fue Maushet en 1977.

El desarrollo de dichos métodos de propagación para estas especies podría ayudar a la preservación y diseminación de muchas especies en peligro de extinción (Clayton, 1987).

Mauseth (1977) utilizando el medio basal de Lin y Staba brevemente modificado probando 6 combinaciones de auxinas y citocininas logró el crecimiento de callo en diferente proporción con todas las combinaciones en la mayoría de las especies probadas y 11 de éstas fueron cultivadas exitosamente. Además sugirió cambiar constantemente el medio en el que se encuentra el callo pues éste se puede resecar y perder friabilidad.

Mauseth (1979) logró inducir la formación de raíces y yemas axilares en 10 diferentes especies de cactáceas con una modificación al medio de Lin y Staba (Mauseth y Halperin 1975) probando diferentes concentraciones de BAP (benzilaminopurina) reportó que las concentraciones más efectivas fueron 1 y 10 mg/lit de BAP.

Johnson y Emiro (1979), investigaron el potencial del cultivo de tejidos en la propagación de cactáceas en medio MS adicionado con varios reguladores de crecimiento para 8 diferentes especies, reportando que la organogénesis y proliferación de callo puede ser controlada con los reguladores de crecimiento probados. Logrando la elongación de brotes en 2 especies y la formación de raíces en 4 especies.

Starling (1985) logró la propagación de *L. principis* en medio basal MS con alta concentración de citocininas y baja concentración de auxinas con el que logró tazas considerables de producción de brotes.

Clayton et al., (1990) investigaron el efecto del medio basal con diferentes concentraciones de auxinas y citocininas en la propagación de brotes axilares de 11 diferentes especies de cactáceas en peligro de extinción, reportando que poco o casi nada de auxinas pero una concentración moderada de citocininas fue suficiente para producir brotes axilares. Todas las especies enraizaron con medio sin hormonas. Sin embargo, varias especies enraizaron en medio con auxinas. Todas éstas plantas fueron colocadas en invernadero.

Rodríguez et al., (1990) lograron la micropropagación de especies tales como *E. missouriensis*, *O. erinacea*, *L. principis* entre otras, en el laboratorio de cultivo de tejidos de CIATEJ.

Rodríguez y Rubluo (1992) estudiaron la respuesta morfogenética *in vitro* de *Aztekium ritteri* obteniendo calla, brotes, estructuras embrionarias y en algunos casos se consiguió propagación masiva donde 2 brotes de 60 produjeron raíces en un medio suplementado con IBA.

2.4 LAS BACTERIAS Y SU IMPORTANCIA

La potencialidad de algunos microorganismos para producir enfermedades es muy grande, principalmente el de las bacterias que siguen presentes en la población y que son culpables de una morbilidad considerable.

Esto tiene gran importancia especialmente en los niños en quienes existe un riesgo mayor de que se desarrollen infecciones gastrointestinales y nasofaríngeas. Según se ha indicado un elevado porcentaje de la población presenta una sensibilidad aumentada a las infecciones. Dicha susceptibilidad existe en el recién nacido y personas enfermas, débiles, quemados, etc.

Muchas de las bacterias asociadas con infecciones son miembros de la microbiota normal del hombre como son *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y varias bacterias intermedias del grupo *Escherichia-Salmonella*.

En éste apartado se presentarán las características y la posible importancia clínica de 2 bacterias y su significación médica así como la importancia en la producción de raíces de plantas por parte de *Agrobacterium rhizogenes*.

Escherichia coli

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y su nombre se deriva de la raíz griega "colon" (intestino largo).

Los procesos patológicos producidos con mayor frecuencia por ésta bacteria en el hombre son los que afectan el tracto urinario y a los riñones por vía hematológica o linfática, aunque con mayor frecuencia, siguen las vías ascendentes desde la uretra y a través de la vejiga hasta alcanzar los uréteres y el riñón.

E. coli es un microorganismo que interviene con frecuencia en las peritonitis, apendicitis, e infecciones de la vesícula biliar y las vías biliares en conjunción con otras bacterias entéricas. También suele hallarse en la piel del peritoneo y en los genitales, infectando con

infectando con frecuencia pequeñas heridas que se contaminan con orina o con heces, siendo el más frecuentemente detectado en los procesos sépticos gram negativos que dan lugar a una bacteremia. La frecuencia de ésta enfermedad se ha encontrado en niños de corta edad y en individuos superiores a los 60 años, las intervenciones quirúrgicas o las exploraciones instrumentales del conducto intestinal biliar o del tracto genito-urinario pueden favorecer la aparición de éste tipo de sépsis (Davis et al., 1979).

Agrobacterium rhizogenes

Pertenece a la familia *Rhizobiaceae* y su nombre deriva de las raíces griegas "agrus" (campo), "bakterion" (pequeño bacilo), "rhiza" (raíz) y "gennaio" (productor).

Esta bacteria gram negativa es causante de que se formen raíces veludas y con deformaciones en forma de una masa entrelazada y fibrosa. Puede ser huésped cuando existe una previa lesión en el tejido de las plantas (Buchanan y Gibbons, 1984).

Por medio de las técnicas de cultivo de tejidos se ha logrado inducir la formación de raíces de plantas con *A. rhizogenes*, la cual, una vez que ha expresado el gene específico para tal función pierde su importancia en las plantas, es decir la presencia de la bacteria para la planta resulta innecesaria. Sin embargo, se ha pensado en la posibilidad de encontrar una substancia de origen vegetal la cual al ser aplicada inhiba su crecimiento cuando se requiera, eliminando así el uso de antibióticos que podrían perjudicar el crecimiento de los vegetales.

Staphylococcus aureus.

Pertenece a la familia *Micrococcaceae* bacteria gram positiva, cocos redondos que se dan en característicos cúmulos parecidos a racimos de uvas. Su nombre deriva de la raíz griega "staphyle" (racimo de uvas). Su aspecto en agar sangre es, colonias grandes pigmentadas de color oro; generalmente hemolítico beta. La mayoría de las cepas patógenas son positivas a coagulasa, ADNasa, fosfatasa y manitol.

El *S. aureus* tiene un amplio poder patógeno y distribución ubicua; es la causa más frecuente de furúnculos y ántrax, así como de osteomielitis; es capaz de producir una gran variedad de enfermedades, tales como neumonía, endocarditis, meningitis e impetigo. La enterocolitis estafilocócica es un proceso agudo y fulminante que se produce cuando el *S. aureus* coloniza la mucosa intestinal y el contenido del intestino, ésta enfermedad suele ser secuela de un tratamiento con antibióticos de amplio espectro o un proceso terminal en pacientes con shock grave o con una hemorragia intestinal (Davidshon and Henry, 1977).

Ciertas cepas elaboran una enterotoxina que produce intoxicaciones alimentarias.

Parece que hay un número infinito de variantes que han de tenerse en cuenta dentro del grupo de las bacterias designado *S. aureus*. Debido a que los estafilococos originan con frecuencia mutantes resistentes a los antibióticos en la actualidad han pasado a ocupar una posición especial para la quimioterapia antibacteriana (Davis et al., 1979).

2.5 EFECTO DE LOS ANTIBIOTICOS

La destrucción de microorganismos por medio de fármacos, se inició con los estudios pioneros de Erlich, que culminaron con la obtención del salvarsan para el tratamiento de la sífilis y la introducción de las sulfamidas en 1935. Desde entonces se han sintetizado numerosas sustancias con actividad antibacteriana cada vez mayor y con una menor toxicidad.

El término antibiótico se refiere a sustancias elaboradas por microorganismos vivos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Es bien conocida la historia del descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1929, su aplicación, tratamiento y desarrollo subsiguiente de nuevos antibióticos.

Los antibióticos ejercen su efecto en 3 formas principales

- 1.- Evitando la síntesis de pared celular
- 2.- Inhibiendo la síntesis de proteínas esenciales
- 3.- Afectando la permeabilidad de la membrana celular

Los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas son generalmente bacteriostáticos, mientras que los demás son bactericidas.

La tendencia de muchas bacterias a hacerse resistentes a los antibióticos, constituye un problema muy serio, especialmente en cuanto a los estafilococos y bacilos tuberculosos que han causado un número alarmante de infecciones serias.

La evolución de la resistencia aumentada de las bacterias no está del todo aclarado. Se sabe que todas las poblaciones bacterianas son heterogéneas en cuanto a su susceptibilidad.

El número de bacterias resistentes dentro de una población puede aumentar espontáneamente como resultado de una mutación o quizá debido a una adaptación, en algunas cosas se presenta en función de la producción de una enzima específica que destruye el fármaco. También es posible que un organismo pueda llegar a ser dependiente de un antibiótico.

Recientemente se ha demostrado que las bacterias resistentes a los fármacos contienen un elemento genético extracromosómico compuesto de ADN, el factor <R> . Series de genes que determinan su resistencia están unidas al factor R, que se produce y translada de célula a célula, transmitiendo así la resistencia a cepas antes sensibles (Mitsuhashi, citado por Davidsohn y Henry en 1977). Es importante por lo tanto elegir el antibiótico más conveniente con la ayuda de pruebas de susceptibilidad. Aunque la relación entre los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* y la respuesta al tratamiento con antibióticos no es siempre directa (Davidsohn y Henry, 1977).

2.6 PLANTAS CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Con el descubrimiento de la penicilina y otros antibióticos se incrementó el interés por la investigación y búsqueda de sustancias con actividad bactericida. Esta propiedad en las plantas ha sido reconocido desde hace ya muchos años y desde el inicio de éste siglo, han sido objeto de numerosas investigaciones, obteniendo en la mayoría de los casos resultados satisfactorios.

Carlson y Douglas, (1947) probaron los extractos de 14 plantas con solución salina, amortiguador pH 4, amortiguador pH 9, H₂SO₄ al 1.5% y eter, los cuales se encontró, inhibían a *E. coli* y *S. aureus*.

Carlson et al., (1947) en un exámen preliminar con 550 plantas con las que prepararon y probaron extractos con solución salina, ácida, eter, ácido débil pH 4 y base débil pH 9, detectaron sustancias antibióticamente activas contra *E. coli* y *S. aureus*.

Mc Cleary et al., (1960) en un ensayo en el que probaron un extracto etanólico de Peyote (*Lophophora williamsii*), separaron una sustancia llamada "peyocactin" que mostró actividad antimicrobiana contra un gran número de bacterias gram + , gram - y una especie de hongos imperfectos, la cual inhibía el crecimiento de bacterias tales como: *B. subtilis* (USDA 220), *E. coli* (ATCC 8677), *S. aureus* (USDA 2091), *Streptococcus pyogenes*, *S. epidermis* entre otras.

Mathes (1963) cuando creció álamo (*P. tremuloides*) *in vitro* por 3 semanas sobre agar obtuvo sustancias antimicrobianas que produjeron zonas de inhibición cuando las placas fueron inoculadas con *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Penicillium*, *Saccharomyces cerevisiae* entre otras.

Campbell et al., (1964) en cultivos de plantas de lechuga y coliflor suplementadas con agua de coco y ANA (ácido naftalenacético), lograron inhibición en el crecimiento de *S. aureus* y *Mycobacterium phlei*.

Khanna y Staba (1968) estudiaron la actividad de 24 plantas en cultivos de células en suspensión y calló contra *E. coli*, *S. aureus*, *Mycobacterium smegmatis* y *C. albicans* reportaron que los extractos de calló fueron más activos contra *S. aureus* y *E. coli*, además encontraron que el medio contenía sustancias activas contra gram-, más que contra gram+ , y que en general los tejidos vegetales presentaron mayor actividad contra gram+. Mathes (1963) había reportado anteriormente actividad antimicrobiana en el medio con agar de aproximadamente el 65% de 29 cultivos estudiados. En éste estudio el 80% de 24 cultivos probados tuvo actividad antimicrobiana. Campbell et al., (1964) habían hecho una observación similar en cultivos de lechuga y coliflor.

Khanna et al., (1971) reportaron actividad antimicrobiana en medios de cultivo con agar viejo y extractos de callos de 10 diferentes especies de plantas contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *S. typhosa*.

Veliky y Genest (1972) detectaron una significativa actividad antimicrobiana en extractos de células en suspensión de *Cannabis sativa*. Presentando una mayor actividad contra *B. megaterium*, *S. aureus* y *E. coli*. Siendo inactivos contra *P. aeruginosa* y *C. albicans*.

Veliky y Latta (1974) probaron extractos de varias plantas encontrando que los extractos de *Lactuca sativa*, *Cannabis sativa* e *Iponema sp.* fueron los más activos, mostrando actividad contra *S. aureus*, *B. megaterium*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis*.

Akgul (1989) probó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de semillas de comino contra 10 bacterias y 10 mohos asociados con comida en descomposición. El aceite fue probado a 0.01, 0.05 y 0.1% encontrándose que ciertas bacterias como *E. aerogenes*, *B. cereus* y *B. subtilis* fueron inhibidas completamente por 0.05 y 0.1% de aceite. Los mohos fueron más resistentes que las bacterias aunque en algunos retardó la esporulación.

Viramontes (1991) obtuvo un liofilizado de Peyote (*Lophophora williamsii*) después de determinar la dosis mínima inhibitoria que se encuentra entre 40 a 200 mg/ml contra las bacterias *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

2.7 METABOLITOS SECUNDARIOS

Existen cuatro categorías principales de productos secundarios: aceites esenciales, glucósidos, alcaloides y enzimas. Los primeros consisten en mezclas de terpenoides que se usan como saborizantes, perfumes y solventes. Los segundos incluyen flavonoides, saponinas y glucósidos cianogénicos, también se puede mencionar el aceite de mostaza que se emplea como

colorante para alimentos. Los alcaloides son un grupo muy diverso que incluye más de 4000 compuestos conocidos. Casi todas los alcaloides naturales son de origen vegetal. Estos compuestos generalmente son muy activos fisiológicamente en los humanos y por consiguiente son de gran interés en la producción de fármacos. Algunos ejemplos de alcaloides son la morfina, cocaína y atropina. Entre las enzimas aisladas están principalmente las hidrolasas, tales como proteasas, amilasas y ribonucleasas (Reyes y Loyola, 1985).

2.8 PRUEBAS DE PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Desde hace más de 20 años Carew y Slaba (1965) señalaron que los cultivos celulares de plantas representan una interesante alternativa biotecnológica para obtener compuestos secundarios. Este argumento ha sido repetido en numerosas revisiones bibliográficas en las que se propone además la utilización de medios adecuados, elicitores y otras alternativas para optimizar la producción de dichos compuestos. A pesar de las posibilidades potenciales, solo un producto, "chiconina" ha sido dado a conocer y manufacturado comercialmente. En la producción de productos antimicrobianos, la producción biotecnológica es la única posibilidad para la obtención de los productos secundarios correspondientes, por lo que el interés comercial en la producción de compuestos secundarios se ha incrementado notablemente en los últimos años (Becker 1987).

Fujita y Tabata (1987) reportaron que en 1983 lograron obtener una producción comercial del metabolito "chiconina" con células de *Lithospermum erythrorhizon* y señalaron además la importancia de los componentes del medio, las fitohormonas y la densidad celular en la regulación de la producción de metabolitos secundarios.

Algunas veces los metabolitos secundarios pueden ser producidos por órganos diferenciados de las plantas como son las raíces adventicias, sin embargo, el crecimiento de ésta es muy lento por lo que se utiliza la bacteria *A. rhizogenes* para inducir la formación de las raíces.

Eilert et al., (1987) ensayaron la respuesta de los cultivos celulares de *Papaver somniferum* y *Catharanthus roseus* utilizando elicitores, para la acumulación de compuestos secundarios (alcaloides), obteniendo con *P. somniferum* una acumulación de 6.6mg/g peso seco del compuesto llamado "Sanguinarina" utilizando una preparación de *Botrytis* como elicitador, otros elicitores fueron menos eficientes con una acumulación de 2.9 peso seco. El compuesto no solo se acumuló en las células sino que del 10 al 20 % del total de sanguinarina se acumuló en el medio. Además demostraron que la reelicitación incrementa la producción del compuesto. Con *C. roseus* bajo las mismas condiciones encontraron que el elicitador más efectivo fue la preparación *P. aphanidermatum* reportando que: "una línea celular no acumuló ningún alcaloide, cuatro respondieron a la acumulación de "triptamina" y solo una línea celular respondió a la acumulación de varios alcaloides".

Buiterlaar et al., (1992) probaron varios elicitores bióticos y abióticos para incrementar la producción de "Thiofeno" por raíces de *Tagetes patula* reportando que en general los elicitores bióticos fueron efectivos, logrando el incremento mayor el elicitador de extracto de *Aspergillus niger* con un incremento de 85% comparado con el control. Los elicitores abióticos por su parte tuvieron un efecto relativamente muy bajo.

Panda et al., (1992) estudiaron el efecto de nutrientes especiales sobre el crecimiento y producción de alcaloides en cultivos de *Holarrhela antidysenterica* con respecto al incremento en el rendimiento del alcaloide "conessina", una droga terapéutica usada en el tratamiento de disenteria y alteraciones helmínticas, obteniendo una síntesis del alcaloide de 0.66/100g peso seco celular, lo cual representa 4.25 veces más de lo obtenido en medio estándar.

Park y Martínez (1992) mostraron que una estrategia efectiva para incrementar la liberación de ácido rosmarínico es la permeabilización continua de células de *Coleus blumei* precondicionadas con DMSO (dimetil sulfóxido), conservándose al mismo tiempo la viabilidad celular. Cuando las células no precondicionadas se permeabilizan con DMSO pierden viabilidad y el producto realzado es relativamente bajo 0.49g de ác. rosmarínico/100g peso seco celular, con 1% de DMSO. Por otra parte, precondicionando las células el producto elevado alcanzó un máximo de 2.85g de ác rosmarínico/100g peso seco celular con 5% de DMSO, el cual fué el 66.4% del total de ác. rosmarínico producido.

HIPOTESIS

Las cactáceas *Leuchtenbergia principis* y *Stenocereus queretaroensis* contienen sustancias capaces de inhibir el crecimiento microbiano: éstas cuando se les aplica un factor abiótico de estrés (salinidad), pueden incrementar la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana.

OBJETIVOS

- 1.- Detectar actividad antimicrobiana en *Leuchtenbergia principis* y *Stenocereus queretaroensis* producidas *in vitro*.
- 2.- Aplicar el factor salino de estrés para observar posibles variaciones en la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana.

III. METODOLOGIA

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material vegetal fueron brotes producidos *in vitro* de las siguientes especies:

Brotes:

Leuchtenbergia principis

Stenocereus queretaroensis

Células en suspensión:

Stenocereus queretaroensis

3.1.1 MICROPROPAGACION DE LOS BROTES

Se sembraron los brotes de cada especie en frascos de alimento infantil, conteniendo 25 ml del medio MSC [medio básico Murashige y Skoog (1962) adicionado con las vitaminas L-2 (Phillips y Collins, 1979), 0.02mg/l de ácido naftalenacético (ANA) y 5 mg/l de 6-furfuril aminopurina (KIN)] utilizado para la producción de brotes (Clayton et al, 1990).

Las resiembras a medio de cultivo fresco se efectuaron cada 4 semanas.

Para preparación de medio para brotes estresados sola se le agregó al medio MSC 2.4% de NaCl, tomando ésta como la cantidad de NaCl que posee el agua de mar (Greenberg et al., 1980). El estrés salino se aplicó a los brotes por espacio de 2 semanas.

3.1.2 CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION

Se transfirieron fragmentos de tejido de collo a medio liquido 322 [Medio básico de Murashige y Skoog adicionado con las vitaminas L-2 (Phillips y Collins, 1979) y con los reguladores: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 3mg/l, ANA 2mg/l y KIN 2mg/l] en matraces erlenmeyer que fueron colocados en agitación durante el periodo de cultivo para obtener células aisladas, tomando las partes más friables de éste para hacer más rápido el establecimiento del cultivo.

Para lo preparación de células en suspensión estresadas se agregó 2.4% de NaCl al medio 322. El estrés salino se aplicó a las células durante 3 días.

Los cepos de bacterias que se utilizaron fueron:

Escherichia coli ATCC-8739 (B 046)

Staphylococcus aureus ATCC-6538 (B 047)

Agrobacterium rhizogenes LBA 9402

Todas del banco de cepos de CIATEJ.

3.2 CONDICIONES AMBIENTALES DE INCUBACION

Los brotes fueron incubados a $27 \pm 2^\circ \text{C}$, bajo un fotoperiodo de 16 hrs. y con una intensidad luminoso de 1500 lux (lámpara).

Los matraces con las células en suspensión fueron colocados en agitador orbital, con una agitación de 150 rpm, a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ con fotoperiodo de 16 hrs. y con una intensidad luminoso de 1500 lux (lámpara).

3.3 OBTENCION DE EXTRACTOS A PARTIR DE BROTES Y CELULAS EN SUSPENSION DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE CACTACEAS CULTIVADAS *in vitro*

Los brotes y células de cada especie por separado fueron macerados (las células se filtraron con un embudo y papel filtro antes de ser maceradas) en un mortero hasta tener un volumen de 10 ml. de cada especie vegetal (Fig. 1a), a las cuales se les agregó 5 ml. de una solución de NaCl al 0.9% esterilizada en autoclave durante 15 min. a 120 lbs/pg² (Fig. 1b). Esta suspensión se mantuvo en agitación durante 1 hr. a temperatura ambiente y posteriormente se distribuyeron 2ml en cada uno en 4 tubos de ensayo (Fig. 1c).

Al tubo No. 1 se le agregó 2 ml. de solución salina al 0.9%

Al tubo No. 2 se le agregó 2 ml. de H₂SO₄ al 1.5%

Al tubo No. 3 se le agregó 2 ml. de solución amortiguadora pH 4.0

Al tubo No. 4 se le agregó 2 ml. de solución amortiguadora pH 9.0

Cada tubo de ensayo fue mezclado con un agitador vortex durante medio minuto y sellados con una película de plástico adherible para ser guardados en una bolsa de plástico negra en refrigerador durante 24 hrs. como se muestra en la figura 1d (Carlson y Douglas, 1947).

3.4 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BROTES Y CELULAS EN SUSPENSION DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE CACTACEAS PRODUCIDAS *in vitro*

Las diferentes bacterias se sembraron en sus respectivos medios:

E. coli y *S. aureus* en medio TSA (tripticaseína soya agar) y se incubaron a 37°C durante 24 hrs. y *A. rhizogenes* en medio YMB (Caldo manitol levadura) a 37°C durante 48 hrs (Fig. 1e).

Posteriormente con el material previamente esterilizado y en campana de flujo laminar se removieron las bacterias, agregándole a cada caja 10 ml. de su respectivo medio, con la ayuda de una asa bacteriológica, utilizando para ésto el mismo medio en el que fueron sembradas pero en estado líquido, esto es, YMB y TSA pero sin utilizar agar en su elaboración (Fig. 1f).

El líquido con las bacterias fué vaciado en frascos estériles y se hicieron diluciones de éstas, utilizando medio líquido del mismo que se utilizó para la remoción como diluyente (Fig 1g).

Para *E. coli* se utilizó la dilución 1:10 con una densidad óptica de 1.550.

Para *S. aureus* se utilizó la dilución 1:12 con una densidad óptica de 1.400

Para *A. rhizogenes* se utilizó la dilución 1:3 con una densidad óptica de 0.400 (Salinas, 1993).

Con un hisopo estéril impregnado con la dilución de bacterias se sembraron cajas Petri de vidrio (100 mm x 20 mm) las cuales contenían medio específico para cada bacteria el cual fue preparado con anterioridad (Fig. 1h). Una vez sembradas las cajas se colocaron los penicilindros fabricados de vidrio según medidas de la AOAC (Herlich, 1990).

Se distribuyeron 4 penicilindros en cada caja, uno para cada extracto a probar (fig. 1i). Las cajas fueron rotuladas con marcador indeleble indicando nombre de la bacteria y

localización justo abajo del penicilindro donde fueron colocado cada uno de los extractos a probar (Fig 1j).

Antes de aplicar los extractos, el tubo No. 2 que contenía el macerado de la planta y ácido sulfúrico al 1.5% se neutralizó con una solución de NaOH 0.1N. Luego con una micropipeta se depositó en su respectivo penicilindro los diferentes extractos (Herlich, 1990).

Se taparon las cajas y se incubaron a 27°C, *E. coli* y *S. aureus* durante 24hrs. y *A. rhizogenes* durante 48hrs.

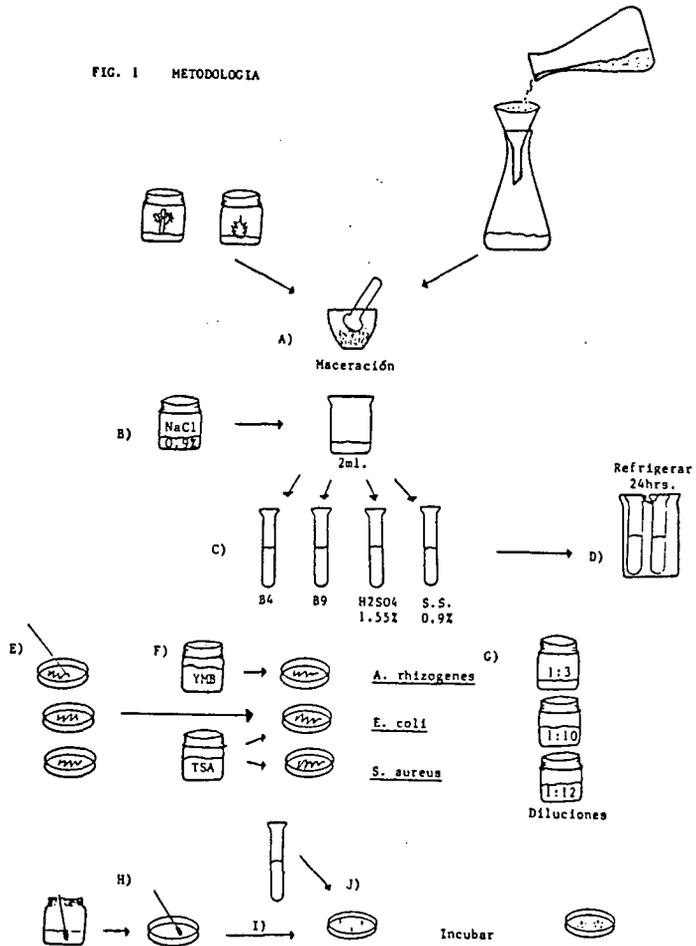
Una vez transcurrido éste tiempo se observaron y reportaron resultados midiéndose en milímetros los halos de inhibición provocados por los extractos.

Las pruebas de evaluación de la actividad antimicrobiana de los brotes tanto estresados como no estresados de *S. queretaroensis* y *L. principis* se hicieron por triplicado con cada bacteria, posteriormente las medias entre tratamientos se compararon utilizando la prueba de "t" de Student (Steel y Torrie, 1980).

Las pruebas de evaluación de la actividad antimicrobiana de las células en suspensión estresadas y no estresadas para *S. queretaroensis* se hicieron de la siguiente manera: 3 para cada bacteria pero la primera con las células estresadas, la segunda con células estresadas pero con tres lavados con solución salina fisiológica antes de la preparación de los extractos y la tercera con células sin estrés.

También se hicieron 2 pruebas de la actividad antimicrobiana de las soluciones utilizadas para la preparación de los extractos (control).

FIG. 1 METODOLOGIA



IV. RESULTADOS

4.1 MICROPROPAGACION DE CACTACEAS

4.1.1 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

a. Micropropagación de los brotes.

Se micropropagaron brotes de las especies *Leuchtenbergia principis* y *Stenocereus queretaroensis* y se mantuvieron libres de contaminación hasta el momento de ser utilizados en la elaboración de los extractos.

b. Iniciación del cultivo de células en suspensión.

La proliferación celular se obtuvo a partir de callo de *S. queretaroensis* manteniéndose libres de contaminación en el medio descrito anteriormente durante 2 semanas para posteriormente ser utilizadas en la preparación de los extractos

4.2.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BROTES DE *S. queretaroensis* PRODUCIDOS *in vitro*.a.) Contra *E. coli*.

1. Los extractos obtenidos con solución salina (S.S.) formaron halos de inhibición con una media de 1mm. tanto para los brotes estresados como para los no estresados.
2. Los extractos obtenidos con la solución de ácido sulfúrico al 1.55% (neutralizados) formaron halos de inhibición con una media de 0,66mm para los brotes sin estrés y una media de 1mm. de inhibición irregular y difusa para los brotes estresados.
3. Los extractos obtenidos con la solución amortiguadora pH 4 formaron halos de inhibición con una media de 1mm para los brotes sin estrés y de 2,66mm para los brotes estresados.
4. Los extractos obtenidos con la solución amortiguadora pH 9 formaron halos de inhibición con una media de 0,33mm para los brotes sin estrés y de 1,33mm con inhibición irregular y difusa para los brotes estresados. (Ver tabla 1)

Tabla 1 Actividad antimicrobiana de extractos de brotes de *S. queretaroensis* contra *E. coli*

Extracto Especie	mm. de inhibición			
	S.S. 0.5%	Ac.Sulfúrico 1.55%	Amortiguadores	
			pH 4	pH 9
<i>S.</i> <i>queretaroensis</i> (sin estrés)	1mm	1mm	1mm	&
	1mm	1mm	2mm	1mm
	1mm	&	&	&
Media \bar{x}	1	0.66	1	0.33
<i>S.</i> <i>queretaroensis</i> (con estrés)	2mm	3mm	2mm	3mm
	1mm	0	4mm	0
	&	&	2mm	1mm
Media \bar{x}	1	1	2.66	1.33

& Inhibición dentro del penicilindro y un halo pequeño de menos de 1mm fuera.

~ Inhibición con crecimiento irregular y difuso.

b.) Contra *S. aureus*:

1. Los extractos obtenidos con la solución salina (S.S.) formaron halos de inhibición con una media de 0.33mm para los brotes sin estrés, mientras que los brotes estresados solo mostraron inhibición dentro del penicilindro y un halo pequeño de menos de 1mm fuera del mismo.
2. Los extractos obtenidos con la solución de ácido sulfúrico al 1.55% (neutralizados) formaron halos de inhibición con una media de 0.66mm para los brotes sin estrés y de 0.33mm para los brotes estresados.
3. Los extractos obtenidos con la solución amortiguadora pH 4 formaron halos de inhibición con una media de 0.33mm para los brotes estresados mientras que los brotes sin estrés no mostraron inhibición.
4. Los extractos obtenidos con la solución amortiguadora pH 9 formaron halos de inhibición con una media de 0.66mm para los brotes sin estrés y de 1.33mm para los brotes estresados. (Ver tabla 2)

Tabla 2 Actividad antimicrobiana de extractos de brotes de *S. querejetaensis* contra *S. aureus*.

Extracto Especie	mm. de inhibición			
	S.S. 0.9%	Ac.Sulfúrico 1.55%	Amortiguadores	
			pH 4	pH 9
<i>S.</i> <i>querejetaensis</i> (sin estrés)	0	0	0	0
	1mm	2mm	cont.	2mm
	0	0	0	0
Media \bar{x}	0.33	0.66	0	0.66
<i>S.</i> <i>querejetaensis</i> (con estrés)	&	1mm	0	4mm
	&	&	1mm	1mm
	&	&	&	&
Media \bar{x}	0	0.33	0.33	1.33

& Inhibición dentro del penicilindro y un halo pequeño de menos de 1mm fuera.

~ Inhibición con crecimiento irregular y difuso.

cont.- contaminación

c.) Contra *A. rhizogenes*:

1. Los extractos obtenidos con solución salina (S.S.) no mostraron inhibición con los brotes sin estrés, sin embargo, formaron halos de inhibición irregular y difusa con una media de 0.66mm con los brotes estresados.
2. Los extractos obtenidos con solución de ácido sulfúrico al 1.55% (neutralizados) formaron halos de inhibición irregular y difusa con una media de 0.66mm para los brotes sin estrés y de 1.33mm para los brotes estresados.
3. Los extractos obtenidos con solución amortiguadora pH 4 formaron halos de inhibición con una media de 7mm para los brotes sin estrés y de 8.66mm para los brotes estresados.
4. Los extractos obtenidos con solución amortiguadora pH 9 formaron halos de inhibición con una media de 1.33mm para los brotes sin estrés y de 2mm con inhibición irregular y difusa para los brotes estresados. (Ver tabla 3, fig 2).

Tabla 3 Actividad antimicrobiana de extractos de brotes de *S. queretaroensis* contra *A. rhizogenes*.

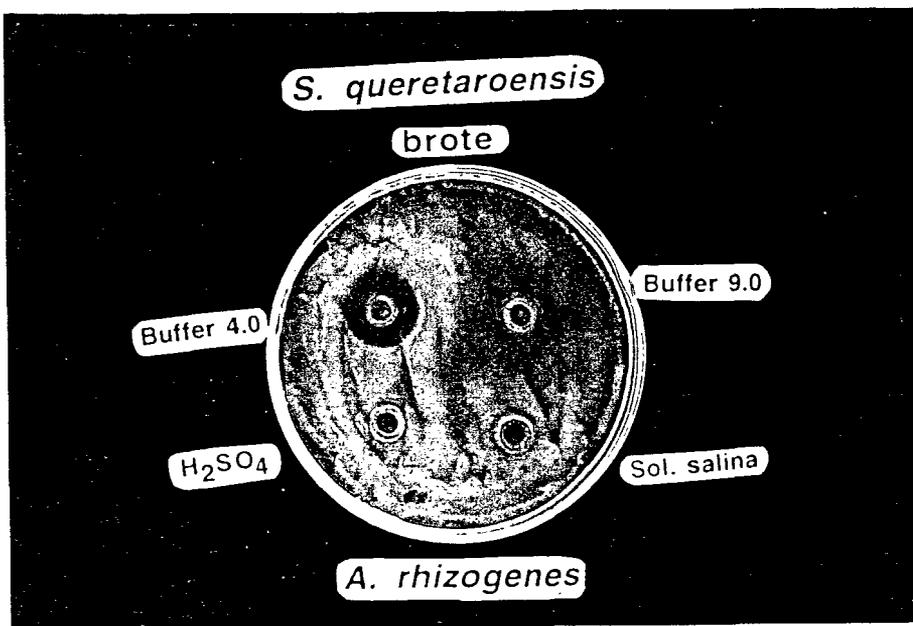
Extracto Especie	mm. de inhibición			
	S.S. 0.9%	Ac.Sulfúrico 1.55%	Amortiguadores	
			pH 4	pH 9
<i>S.</i> <i>queretaroensis</i> (sin estrés)	0	2mm	9mm	3mm
	0	0	5mm	0
	&	&	7mm	1mm
Media \bar{x}	0	0.66	7	1.33
<i>S.</i> <i>queretaroensis</i> (con estrés)	0	4mm	11mm	5mm
	2mm	0	8mm	1mm
	0	0	7mm	0
Media \bar{x}	0.66	1.33	8.66	2

& Inhibición dentro del penicilindro y un halo pequeño de menos de 1mm fuera.

~ Inhibición con crecimiento irregular y difuso.

En la primera de las tres pruebas los extractos de ácido sulfúrico estresado y no estresado mostraron inhibición dentro del penicilindro e inmediatamente después un halo pequeño de crecimiento bacteriano muy espeso y enseguida la inhibición con crecimiento irregular y difuso.

A)



B)

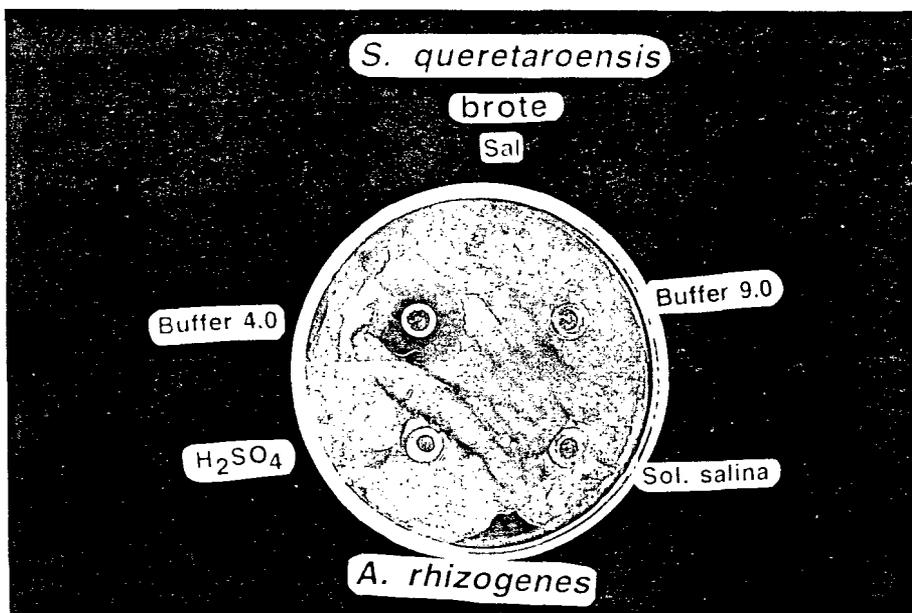


Figura 2. Actividad antimicrobiana de extractos de brotes *S. queretaroensis* contra *A. rhizogenes*. A) extractos sin estrés B) extractos estresados.

Se observó que independientemente de la forma y tamaño de los halos que se formaron con los diversos extractos, las placas a las que se les aplicaron los extractos de brotes estresados presentaban un crecimiento bacteriano disminuido cuando se compararon con aquellas a las que se les aplicaron los extractos de brotes sin estrés.

4.2.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BROTES DE *L. principis* PRODUCIDOS *in vitro*.

a.) Contra *E. coli* :

1. Los extractos obtenidos con solución salina (S.S.) formaron halos de inhibición con una media de 0.66mm con brotes sin estrés, mientras que con los brotes estresados mostraron inhibición solo dentro del penicilindro.
2. Los extractos obtenidos con solución de ácido sulfúrico al 1.55% (neutrolizados) formaron halos de inhibición irregular y difusa con una media de 1mm con los brotes sin estrés e inhibición solo dentro del penicilindro por parte de los brotes estresados.
3. Los extractos obtenidos con solución amortiguadora pH 4 formaron halos de inhibición con una media de 0.66 mm para brotes sin estrés y de 0.33mm para los brotes estresados.
4. Los extractos obtenidos con solución amortiguadora pH 9 formaron halos de inhibición irregular y difusa con una media de 0.66mm con los brotes sin estrés e inhibición solo dentro del penicilindro por parte de los brotes estresados (Ver tabla 4)

Tabla 4 Actividad antimicrobiana de extractos de brotes de *L. principis* contra *E. coli*.

Especie	mm. de inhibición			
	S.S. 0.9%	Ac.Sulfúrico 1.55%	Amortiguadores	
			pH 4	pH 9
<i>L. principis</i> (sin estrés)	1mm	*	1mm	*
	1mm	3mm	1mm	2mm
	0	0	*	0
Media \bar{x}	0.66	1	0.66	0.66
<i>L. principis</i> (con estrés)	*	*	1mm	*
	&	&	&	&
	*	*	&	*
Media \bar{x}	0	0	0.33	0

& Inhibición dentro del penicilindro y un halo pequeño de menos de 1mm fuera.

~ Inhibición con crecimiento irregular y difusa.

* Inhibición solo dentro del penicilindro

b.- Contra *S. aureus*:

1.- Los extractos de *L. principis* tanto de brotes estresados como de no estresados no presentaron actividad contra *S. aureus* con excepción de una de las repeticiones de los extractos de brotes estresados con ácido sulfúrico al 1.55% (neutralizados) que presentó una inhibición de 1mm.

c.) Contra *A. rhizogenes*:

1. Los extractos obtenidos con solución salina (S.S.) no mostraron inhibición con los brotes sin estrés, sin embargo, formaron halos de inhibición irregular y difusa con una media de 0.66mm con los brotes estresados.

2. Los extractos obtenidos con solución de ácido sulfúrico al 1.55% (neutralizados) no mostraron inhibición.

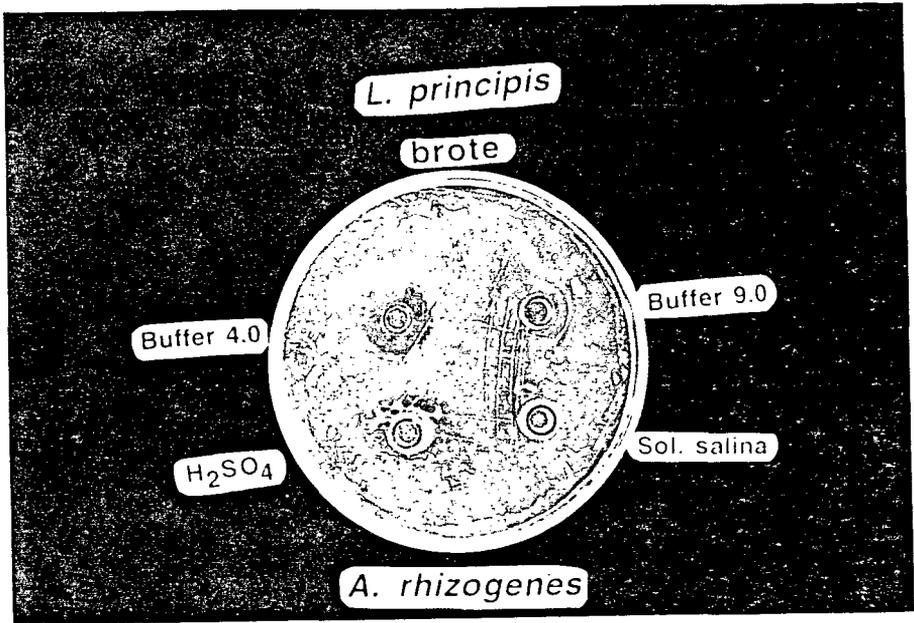
3. Los extractos obtenidos con solución amortiguadora pH 4 formaron halos de inhibición con una media de 7.66mm para brotes sin estrés y de 10mm para brotes estresados.

4. Los extractos con solución amortiguadora pH 9 formaron halos de inhibición irregular y difusa con una media de 0.66mm para los brotes sin estrés y no mostraron ningún tipo de inhibición los brotes estresados (Ver tabla 5, fig 3).

Tabla 5 Actividad antimicrobiana de extractos de brotes de *L. principis* contra *A. rhizogenes*.

Extracto Especie	mm. de inhibición			
	S.S. 0.9%	Ac.Sulfúrico 1.55%	Amortiguadores	
			pH 4	pH 9
<i>L. principis</i> (sin estrés)	*	*	7mm	*
	0	0	6mm	2mm
	0	0	10mm	0
Media \bar{X}	0	0	7.66	0.66
<i>L. principis</i> (con estrés)	0	0	9mm	0
	1mm	0	12mm	0
	0	0	9mm	0
Media \bar{X}	0.66	0	10	0

A)



B)

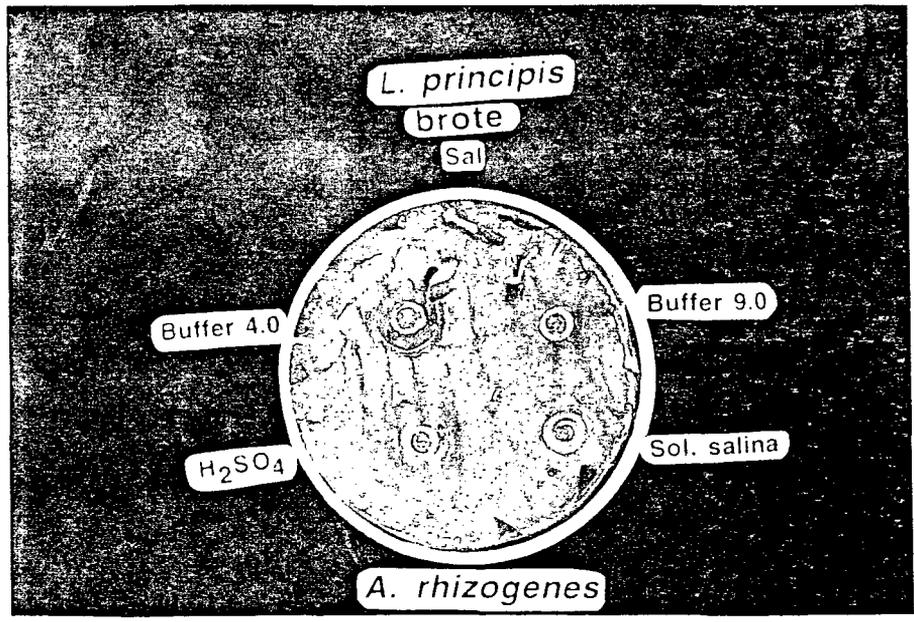


Figura 3: Actividad antimicrobiana de extractos de brotes *L. principis* contra *A. rhizogenes*. A) extractos sin estrés B) extractos estresados.

4.2.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CELULAS EN SUSPENSION DE *S. querejaroensis* PRODUCIDAS *in vitro*.

1. Células estresadas con 2.4% de NaCl durante 3 días

El extracto de solución salina (S.S.) formó un halo de inhibición de 1mm contra *E. coli* y no mostró inhibición contra *S. aureus* y *A. rhizogenes*.

El extracto de solución de ác. sulfúrico al 1.55% (neutralizado) formó halos de inhibición de 1mm. contra *E. coli*, 2mm contra *S. aureus* y no hubo inhibición contra *A. rhizogenes*

El extracto de solución amortiguadora pH 4 formó halos de inhibición de 2mm irregular y difusa contra *E. coli*, 1mm contra *S. aureus* y 5mm contra *A. rhizogenes*.

El extracto de solución amortiguadora pH 9 formó halos de inhibición irregular y difusa de 2mm contra *E. coli* y 1mm contra *S. aureus* y no presentó inhibición contra *A. rhizogenes*.

(Ver tabla 6)

2. Células estresadas con 2.4% de NaCl durante 3 días y con tres lavados con solución salina fisiológica antes de la preparación de los extractos.

El extracto de solución salina (S.S.) mostró inhibición solo dentro del penicilindro con un halo pequeño de menos de 1mm fuera del mismo contra *S. aureus*.

El extracto de solución de ác. sulfúrico al 1.55% (neutralizado) presentó inhibición dentro del penicilindro y un halo pequeño de menos de 1mm fuera contra *E. coli* y *S. aureus*, mientras que contra *A. rhizogenes* no mostró inhibición.

El extracto de solución amortiguadora pH 4 formó halos de inhibición de 1mm contra *E. coli*, 5mm contra *A. rhizogenes* e inhibición dentro del penicilindro con un halo pequeño de menos de 1mm fuera del mismo contra *S. aureus*.

El extracto de solución amortiguadora pH 9 mostró inhibición dentro del penicilindro y un halo pequeño de menos de 1mm fuera del mismo contra *E. coli* y *S. aureus*, mientras que contra *A. rhizogenes* no mostró inhibición. (Ver tabla 6)

3. Células sin estrés

El extracto de solución salina (S.S.) presentó inhibición de 1mm contra *E. coli* mientras que contra *S. aureus* y *A. rhizogenes* no mostró inhibición.

El extracto de solución amortiguadora pH 4 solo formó un halo de inhibición de 5mm. contra *A. rhizogenes*.

Los extractos de Solución de ácido sulfúrico al 1.55% (neutralizado) y solución amortiguadora pH 9 no presentaron inhibición. (Ver tabla 6)

Tabla 6 Actividad antimicrobiana de extractos de células en suspensión de *S. queretaroensis*.

Extracto Bacteria	mm. de inhibición				
		S.S. 0.9%	Ac.sulfúrico 1.55%	Reguladores	
				pH 4	pH 9
<i>E. coli</i>	1	1mm	1mm	2mm	2mm
	2	0	&	1mm	&
	3	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	1	0	2mm	1mm	1mm
	2	&	&	&	&
	3	1mm	0	1mm	0
<i>A. rhizogenes</i>	1	0	0	5mm	0
	2	0	0	5mm	0
	3	0	0	5mm	0

& Inhibición dentro del penicilindro y un halo pequeño de menos de 1mm fuera.

~ Inhibición con crecimiento irregular y difuso

Las placas a las que se les aplicaron los extractos de células estresadas presentaron crecimiento bacteriano disminuido al compararlas con la placa a la que se aplicaron los extractos de células sin estrés.

4.2.4 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA PREPARACION DE LOS EXTRACTOS (como controles).

Las solución salina (S.S.), solución de ácido sulfúrico 1.55% y la solución amortiguadora pH 9, no presentaron inhibición contra ninguna de las bacterias empleadas.

La solución amortiguadora pH 4 presentó inhibición dentro del penicilindro contra *E. coli* y *S. aureus* y halos de 9 y 10 mm contra *A. rhizogenes*. (Ver tabla 7)

Tabla 7 Actividad antimicrobiana de las soluciones empleadas en la preparación de los extractos.

Reactivo Bacterias	mm de inhibición.			
	S.S. 0.9%	Ác. Sulfúrico 1.55%	Reguladores	
			pH4	pH9
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
	0	0	*	0
<i>E. coli</i>	*	0	*	0
	0	0	*	0
<i>A. rhizogenes</i>	0	0	9mm	0
	0	0	10mm	0

* Inhibición solo dentro del penicilindro.

Debido a los resultados obtenidos al probar las soluciones se decidió repetir las pruebas contra *A. rhizogenes* con las soluciones y medios de cultivo que se utilizaron para tratar de encontrar la causa de la inhibición.

Primeramente se probaron el medio MS y MS con cada uno los reguladores de crecimiento utilizados para la micropropagación *in vitro* de las especies utilizadas, los cuales no presentaron inhibición en ninguno de los casos. (Ver tabla 8)

También se probó el medio MS y MS con cada una de los reguladores de crecimiento que se utilizaron pero con la adición de un volumen igual de amortiguador pH 4 con los cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

MS+KIN+B4 formó un halo de inhibición de 13mm

MS+ANA+B4 formó un halo de inhibición de 13mm

MS+24-D+B4 formó un halo de inhibición de 13mm

MS+B4 formó un halo de inhibición de 12mm. (Ver tabla 8).

Tabla 8 Actividad antimicrobiana del Medio MS y MS con cada una de los reguladores de crecimiento presentes en el medio 322 contra *A. rhizogenes*.

Reactivos Bacteria	MS+2mg/1 deKIN	MS+2mg/1 deANA	MS+3mg/1 de24-D	MS
sin amortiguador	0	0	0	0
con amortiguador	13mm	13mm	13mm	12mm

Tomando en cuenta éstos resultados se pensó que muy posiblemente la causa de la inhibición fuera el pH, entonces se prepararon amortiguadores desde pH 3.6 hasta 5.8, éste último correspondiente al pH de los medios. Estos amortiguadores formaron halos de inhibición de 16mm para pH 3.6, 16mm para pH 3.8, 15mm para pH 4, 15mm para pH 4.2, 15mm para pH 4.4, 10mm para pH 4.6, 7mm para pH 5, 5mm para pH 5.6 y para pH 5.8 una inhibición irregular y difusa de 5mm. (Ver tabla 9)

Tabla 9 Actividad antimicrobiana de los amortiguadores de pH contra *A. rhizogenes*.

Amortiguador Bacteria	pH								Medio 5.8
	3.6	3.8	4.0	4.2	4.4	4.6	5.0	5.6	
<i>A. rhizogenes</i>	16 mm	16 mm	15 mm	15 mm	15 mm	10 mm	7 mm	5 mm	5 mm

~ Inhibición con crecimiento irregular y difuso.

Finalmente, se probaron el medio 322 y 322 con cada uno de los amortiguadores que se emplearon en la preparación de los extractos. El medio 322 con un pH de 5.8 formó un halo de inhibición irregular y difusa de 5mm, el medio 322+Amortiguador pH 4 formó un halo de inhibición de 11mm y el medio 322+Amortiguador pH 9 formó un halo de inhibición irregular y difusa de 4mm. (Ver tabla 10).

Tabla 10 Actividad antimicrobiana del medio 322 y 322 con los dos Amortiguadores de pH empleados para las extracciones contra *A. rhizogenes*.

Medio Bacteria	322	322 +	322 +
		Amortiguador	
		pH 4	pH 9
<i>A. rhizogenes</i>	5mm	11mm	4mm

~ inhibición con crecimiento irregular y difuso.

V DISCUSION

En el presente trabajo se detectó la presencia de sustancias con actividad antimicrobiana mediante extracciones con diferentes soluciones a partir de brotes y células de las especies *S. queretaroensis* y *L. principis* producidas *in vitro*, las cuales inhibieron el crecimiento de las bacterias *A. rhizogenes*, *E. coli* y *S. aureus*; de igual manera Carlson y colaboradores (1947), señalaron que en un exámen preliminar de 550 especies de plantas (utilizando la misma técnica de extracción que se emplearon en éste trabajo) con las que prepararon y probaron extractos con solución salina, ácido sulfúrico al 1.55%, amortiguador pH 4, amortiguador pH 9 y eter, detectaron sustancias antibioticamente activas contra *E. coli* y *S. aureus*. Por otra parte, Veliky y Genest. (1972) detectaron una significativa actividad antimicrobiana en extractos de células en suspensión de *Cannabis sativa* contra *Bacillus megaterium*, *E. coli* y *S. aureus*.

Por lo que al estrés se refiere, se encontró como se puede observar en las tablas (1 - 6) que el agente estresante (salinidad) modifica la producción de sustancias que inhiben el crecimiento bacteriano, presentando un incremento en los halos de inhibición y disminución del crecimiento bacteriano en toda la placa cuando se compararon con las placas a las que se les aplicaron los extractos de células y brotes sin estrés, lo anterior concuerda con el trabajo de Buitelaar y cols. (1992) quienes propusieron el uso de elicitores (compuestos de origen biológico o no biológico como pueden ser agentes físicos y/o químicos de estrés que causan un incremento en la producción de compuestos acumulados por las plantas) como una alternativa viable para incrementar la producción de éstos compuestos, referidos más comunmente como metabolitos secundarios. Los cultivos celulares representan una interesante alternativa biotecnológica para obtener compuestos secundarios (Carew y Staba, 1965).

Los resultados obtenidos mostraron en general halos muy pequeños, con diferencias solo numéricas entre extractos estresados y no estresados, sin embargo, con halos más grandes muy posiblemente se podría detectar diferencia estadística significativa.

Una manera sugerida para incrementar el tamaño de los halos de inhibición podría ser concentrar el extracto de modo tal que se tenga mayor cantidad de material vegetal en un volumen menor, ideando un mecanismo de eliminación de agua, con lo cual posiblemente se lograría éste objetivo.

La propuesta antes mencionada, no se llevó a cabo en virtud de que no se tenía material vegetal disponible suficiente para la elaboración de concentrados.

Los brotes y células de *S. queretaroensis* fueron antibióticamente más activos que los brotes de *L. principis* lo cual puede ser debido principalmente a las características constitutivos de la especie.

Los resultados con *L. principis* fueron relativamente pobres, sin embargo, se logró detectar la diferencia numérica en la producción de sustancias con actividad antimicrobiana por parte de los extractos de brotes estresados, principalmente contra *A. rhizogenes* (Ver tabla 5, Figura 3) donde se observó un incremento de 3mm por parte de los brotes estresados con los extractos de solución amortiguadora pH 4; de la misma manera, Buitelaar y cols. (1992), con el uso de elicitores bióticos, específicamente extracto crudo de *Aspergillus niger*, lograron un incremento de 35% en la producción de "thiofeno" comparado con el control.

Los resultados con las células y brotes de *S. queretaroensis* mostraron un compartamiento similar en cuanto a las pruebas de estrés, pues tanto en células como en brotes se observó un incremento en la producción de sustancias con actividad antimicrobiana por parte de aquellos a los que se les aplicó el estrés, sin embargo, los brotes presentaron mayor actividad que las células. En éste trabajo se esperaba que las células presentarían mayor actividad por el hecho de estar bajo un estrés extra, pues el

estar en forma indiferenciada es ya un factor estresante para las células, sin embargo, no fué así, pero existe la posibilidad de que los compuestos con actividad antimicrobiana se liberaran al medio de cultivo como ya ha sido reportado anteriormente por Mathes (1983), Campbell y cols. (1964) y Khanna y Stobo (1968).

La bacteria más susceptible a los diferentes tipos de extractos como se puede observar en las tablas 1 y 4 de la sección de resultados, fué *E. coli*. Khanna y cols. en 1971 reportaron actividad antimicrobiana en medios de cultivo y extractos de collo de 10 diferentes especies y señalan también que *E. coli* fué la bacteria más susceptible de 4 bacterias probadas. *S. aureus* presentó susceptibilidad baja contra todos los extractos, haciendo referencia a la susceptibilidad presentada por *S. aureus*, Salinas (1993) señaló que ésta bacteria presentaba mayor susceptibilidad específicamente con el extracto de ácido sulfúrico de 4 especies de cactáceas probadas, entre ellas las especies usadas en el presente trabajo, una explicación de tal diferencia, es que muy posiblemente, hubo errores de manipulación durante la extracción, pues precisamente cuando se estaban realizando las extracciones en uno de los ensayos del presente trabajo se tuvo el error de no neutralizar el extracto de ácido sulfúrico antes de aplicarlo a las placas, lo cual provocó halos muy grandes comparables con los reportados por Salinas (1993). Por otra parte, *A. rhizogenes* presentó una inhibición espectacular con el extractos de solución amortiguadora pH 4 tanto para extractos estresados como para no estresados de las 2 especies, sin dejar de señalar el incremento en el tamaño de los halos provocados por los extractos estresados (Figura 2), esto dió lugar a que se realizaran las pruebas con las soluciones utilizadas para la elaboración de los extractos (controles) en donde se encontró que el amortiguador pH 4 por sí solo provocaba halos iguales y en ocasiones mayores a los provocados con los extractos al igual que el medio líquido 322 que provocaba una inhibición irregular y difusa de 5mm contra *A. rhizogenes*, lo cual propició la realización de nuevas pruebas, éstas con medio líquido MS con cada una de los reguladores de crecimiento utilizados para la elaboración de los medios pues en el principio se pensó que

éstos eran la causa de la inhibición. En la Tabla 8 se muestra como ni el medio ni los reguladores de crecimiento provocaban tal inhibición, descartando ésta posibilidad, se pensó entonces en la solución amortiguadora como nueva alternativa, por lo que se realizó la prueba con el medio MS con cada uno de los reguladores de crecimiento y a cada uno de éstos se les agregó un volumen igual de solución amortiguadora pH 4. En la tabla 8 de la sección de resultados se muestran nuevamente los halos espectaculares los cuales hasta entonces se sabía provocados por la solución amortiguadora.

Tomando como base éste resultado la única alternativa para encontrar la causa da la inhibición era el pH, por lo que se prepararon los amortiguadores desde pH 3.6 hasta 5.8, (éste último correspondiente al pH de los medios de cultivo) con lo que entonces se pudo asegurar que el causante de la inhibición contra *A. rhizogenes* fué el pH y que a menor pH era mayor la inhibición y conforme aumenta el pH hasta el rango aproximado a pH 6 la inhibición tendía a ser más constante, pues en los resultados de la tabla 10 en las cuales se probó el medio con amortiguador pH 4 y el amortiguador pH 9 no se observó una variación tan grande en la inhibición, lo cual concuerda con la descripción hecha por Buchanan y Gibbons (1974) quienes reportaron para ésta bacteria un pH óptimo de crecimiento entre 6 y 9 lo cual confirma los resultados obtenidos.

Es importante también señalar que los extractos de solución amortiguadora pH 4 provocaba halos de inhibición menores a los que provocaba la solución amortiguadora por si sola contra *A. rhizogenes*, posiblemente porque el material vegetal incrementaba el pH, lo cual provocaba una disminución en el tamaño de los halos de inhibición. (Ver tablas 3, 5, 6 y 7) , sin embargo, con los extractos de brotes estresados con NaCl el cual muy posiblemente juega un papel como elicitador, el tamaño de los halos se vía favorecido. De igual forma Eiler y cols. (1987). cuando ensayaron la respuesta de cultivos celulares de *Papaver somniferum* y *Catharanthus roseus* utilizando una preparación de *Botrytis* como elicitador, obtuvieron una acumulación de 6.6mg/g peso seco del compuesto llamado "Sanguinarina" con *P. somniferum* y con *C. roseus* y el elicitador *P.*

aphanidermatum reportaron que 4 líneas celulares respondieron a la acumulación de "triptamina" y una línea celular respondió a la acumulación de varios alcaloides.

Los problemas a los que se enfrenta éste tipo de investigaciones son de orden genético, fisiológico y bioquímico, por lo que se recomienda realizar pruebas confirmativas como pueden ser la identificación de los componentes constitutivos de la planta, para posteriormente detectar los compuestos responsables de la acción antimicrobiana por parte de la planta [la acción antiséptica de éstos compuestos está presente en etapas determinadas del crecimiento de las plantas y a veces como mecanismo de defensa contra el medio ambiente. (Harborne 1985)], y entonces si probar elicitores para poder así obtener cantidades mayores de éstos compuestos.

VI CONCLUSIONES

1. Los brotes y células de *S. queretaroensis*, producidos *in vitro* contienen sustancias que inhiben el crecimiento de las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *A. rhizogenes*.
2. Los brotes de *L. principis* contienen sustancias que inhiben el crecimiento de *E. coli*.
3. La producción de sustancias con actividad antimicrobiana por parte de las cactáceas se ve favorecida en los extractos de brotes y células estresadas.
4. La solución amortiguadora pH 4 y en general las variaciones de pH afectan directamente el crecimiento de la bacteria *A. rhizogenes*.
5. Los extractos con solución amortiguadora pH 4 fueron los más efectivos contra las 3 bacterias empleadas, principalmente contra *A. rhizogenes*.
6. Los brotes y células de las cactáceas producidas *in vitro* representan una alternativa viable para la obtención de sustancias con actividad antimicrobiana.
7. En extractos crudos es frecuente encontrar variaciones en la actividad antimicrobiana, por lo tanto es necesario detectar y purificar de las sustancias responsables de la inhibición.

VII APENDICE

Medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con las vitaminas L-2 (Phillips y Collins, 1979) para la producción de brotes múltiples .

Sol. Stock	1lt
MS Mayores	10ml
MS Menores	5ml
CaCl ₂	22ml
FeSO ₄	10ml
Vitaminas L-2	10ml
Sacarosa	30gr
Acido naftalenacético	0.02mg
6-furfuril aminopurina	5.00mg
Agar	8gr
pH	5.8 +/- 0.5

*Esterilizar en autoclave.

Solución Stock de elementos Mayores MS

Compuesto	gr/l
NH ₄ NO ₃	175.0
KNO ₃	190.0
MgSO ₄ *7H ₂ O	37.0
KH ₂ PO ₄	17.0

*Esterilizar en autoclave.

Solución Stock de elementos menores MS

H ₃ B ₃ O ₃	1.24 gr/l
MnSO ₄ *H ₂ O	3.38 gr/l
ZnSO ₄ *7H ₂ O	2.12 gr/l
KI	166 mg/l
No ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	50 mg/l
CuSO ₄ *5H ₂ O	5 mg/l
CoCl ₂ *6H ₂ O	5 mg/l

* Esterilizar en autoclave.

Solución Stock Vitaminas L-2

Thiamina	200 mg/l
pyridoxina	50 mg/l
Inositol	25 gr/l

*No se esteriliza. Se guarda en refrigeración para uso inmediato, o se congela para conservar por más tiempo.

Solución Stock de Cloruro de Calcio

CaCl ₂	20 gr/l
-------------------	---------

*Esterilizar en autoclave

Solución Stock de Fe+EDTA

FeSO ₄ •7H ₂ O	2.784 gr/l
Na ₂ EDTA	2.724 gr/l

*Esterilizar en autoclave.

Medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con las vitaminas L-2 (Phillips y Collins, 1979), modificado por Clayton y cols., 1990.

MS Mayores	10 ml/l
MS Menores	5 ml/l
CaCl ₂	22 ml/l
Fe+EDTA	10 ml/l
Vitaminas	10 ml/l
Sacarosa	30 gr/l
Acido 2,4-dicloro- fenoxiacético (2,4-D)	3 mg/l
Acido naftalenacético (ANA)	2 mg/l
6-furfuril aminopurino (KIN)	2 mg/l
Agar	8 gr/l
pH	5.8 +/- 0.5

*Esterilizar en autoclave.

Medio de cultivo Tripticaseina Soya Agar (TSA Marca Bioxón)

YMB

Wild type hypervirulent strain LBA 9402 grows on YMB medium at 25–28°C

K ₂ HPO ₄	0.5gr/l
MgSO ₄	0.2gr/l
NaCl	0.1gr/l
Mannitol	10.0gr/l
Extracto de levadura	0.4gr/l
Rifampicina	50mg/l
pH	7
Agar	15gr/l

Para las soluciones así como para todos los medios se utilizó agua destilada como solvente.

Solución de Cloruro de Sodio al 0.9%

Solución de hidróxido de sodio 0.1N

Ácido sulfúrico al 1.5%

Solución amortiguadora pH 4.0

preparación :

Se preparan dos soluciones stock:

A: [0.2M solución de ácido acético (11.55 ml. en 1000ml.)]

B: [0.2M solución de acetato de sodio (16.4 gr. en 1000ml)]

se midieron de manera exacta y mezclaron 41 ml de A y 9ml de B (González y Peñaloza, 1981).

Solución amortiguadora pH 9.0

preparación:

Se prepararon dos soluciones stock

A: [0.2M solución de carbonato de sodio anhidro (21.2 gr. en 1000ml)]

B: [0.2M solución de bicarbonato de sodio (16.8 gr. en 1000ml)]

se midieron de manera exacta y se mezclaron 4ml. de A y 46ml de B. (González y Peñaloza, 1981).

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Arias-Mantes, S. 1990. Colecta de cactáceas. Resúmenes de la reunión " Programa nacional para el rescate de cactáceas ". CIATEJ. Guadalajara, Jalisco. (Documento inédito). México.
- Akgul, A. 1989. Antimicrobial Activity of Black Cumin (*Niger sativa L.*) essential oil. *Gazi Ecz. Fak. Der.* 6 (1), 63-68. Turkey.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. UNAM. Vol. 1. México.
- Bravo-Hollis, H., Sánchez-Mejorada H. 1991. Las cactáceas de México. UNAM. México. Vol. 2
- Becker, H. 1987. Regulation of metabolism in plant cell cultures. *En Plant Tissue and Cell Culture.* Green C.E., D.A. Somers, W.P. Hackett and D.D. Biesboer (Eds.). 199-212. Alan R. Liss, Inc. Heidelberg.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1984. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 8a. edición. Ed. The Williams & Wilkins Co., U.S.A.
- Buitelaar, R.M., M. T. Cesario and J. Tramper. 1992. Elicitation of thiophenes production by hairy roots of *Tagetes patula*. *Enzyme Microb. Technol.* 14 :2-7.
- Campbell, G.E., S. Chan and W.G. Baker. 1965. Growth of lettuce and cauliflower tissue *in vitro* and their production of antimicrobial metabolites. *Can. J. Microbiol.* 11:785-789.
- Carlson, H.J. and H.G. Douglas. 1947. Screening methods for determining antibiotic activity of higher plants. *J. Bact.*, 55: 235-240.
- Carlson, H.J., H.G. Douglas and J. Robertson. 1947. Antibacterial substances separated from plants. *J. Bact.* 55:241-248.
- Clayton, W.P. 1987. Micropropagation as a means of conservation and commercialization of members of the subtribe cactinae (cactaceae). Tesis Maestría. Las Cruces, New México.
- Clayton, W.P., Hubstenberger F.J. and G.C. Phillips. 1990. Micropropagation of members of the cactaceae subtribe cactinae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 337-343.
- Davis, B.R., Dulbecco. H. Eisen, A. Ginsberg, B. Wood and M. Mc. Carty. 1979. *Tratado de Microbiología.* Editorial SALVAT. España.

- Davidsohn, I. and J.B. Henry 1977. Diagnóstico por el laboratorio. Microbiología médica. Todd-Sanford. 6a. edición. SALVAT.
- Eilert, U., G.W. Wolfgang and F. Constabel 1987. En Plant Tissue and Cell Culture. Green C.E., D.A. Somers, W.P. Hackett, D.D. Biesboer (Eds.). 213-219. Alan R. Liss, Inc. Canada.
- Fujita, Y. and Tabata M. 1987. Secondary metabolites from cells - Pharmaceutical application and progress in commercial production. En Plant Tissue and Cell Culture. Green C.E., D.A. Somers, W.P. Hackett, D.D. Biesboer (Eds.). 169-185. Alan R. Liss, Inc. Japan
- González, S. y Peñalosa I. 1981. Métodos de biomoléculas. UNAM. México.
- Greenberg, E.A., J.J. Connors, D.Jenkins, 1980. Standard methods for examination of water and waste water 15th. Edition. American Public Health Assoc. (APHA). An Water Work Assoc. (AWWA). Water Pollution Control Federation (WPCF). Washington D.C. 628.
- Harborne, J.B. 1985. Introducción a la bioquímica ecológica. España. Ed. Alhambra.
- Herlich, K. 1990 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th, edition, Vol 1. Tomo1. Editorial Association of Official Analytical Chemists, Inc Arlington, Virginia. U.S.A. 115-117.
- Johnson, J.L. and E.R. Emiro. 1979. Tissue culture propagation in the cactaceae. Cact. Succ. J. (U.S.) 51 : 275-277.
- Khanna, P.E. and J. Staba. 1968. Antimicrobial from plant tissue cultures. Lloydia 31 : 180-189.
- Khanna, P.E., S. Mohan and T. N. Nag. 1971. Antimicrobial from plant tissue cultures. Lloydia 34 : 168-169.
- López, G. y Lozoya, E. Las Cactáceas. Fuente potencial de metabolitos secundarios en desaparición? (en prensa).
- Luna, S. Rosales. 1988 Cultivo de células en suspensión. En Cultivo de Tejidos Vegetales. Hurtado D., M.E. Merino (Eds.). Ed. Trillas. 123. México.
- Mathes, M.C. 1963. The secretion of antimicrobial materials by various isolated plant tissues. Lloydia 30: 177-181.
- Mauseth, D.J. 1977. Cactus Tissue Culture : A potencial method of propagation. Cact. Succ. J. (U.S.) 49 : 80-81.
- Mauseth, D. J. 1979 . A New method for the propagation of cacti sterile culture of axillary buds. Cact. Succ. J. (U.S.) 51 : 186-187.

- Mc Cleary, P.S., Sypherd and D.L. Walkington. 1960. Antibiotics activity of an extract of Peyote *Lophophora williamsii* (Lemaire coulter). Econ. Bot. 14 : 247-249.
- Murashige, T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth in culture of single cells. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Navarro, S. U. y E.R. Vero , 1988. Historia del cultivo de tejidos vegetales. En Cultivo de Tejidos vegetales. Hurlado D., M.E.Merino (Eds.). Ed trillos. 15-18. México.
- Ochoa, N. A. 1985. Establecimiento de cultivo *in vitro*. En Fundamentos teórico prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Víctor M. Villalobos (Ed.) 64-66.
- Phillips, C.G. and G.B. Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus. *Cultures of red clover. Crop. Sci.* 19 : 59-64.
- Panda, A.K. , Mishra sajour, and V.S. Bisaria. 1992. Alkaloid production by plant cell suspension cultures of *Holarrhena anti dysenterica*. I.Effect of major Nutrients. *Biotech. Bioeng.* 39-10 : 1043-1051.
- Park Chang-Ho, Martínez C. Blanca. 1992. Enhanced release of rosmorinic acid from *Coleus blumei* permeabilized by dimethyl sulfoxide (DMSO) while preserving cell viability and growth. *Biotech. Bioeng.* 40-4 :459-464.
- Quintero, R.R. 1985. *Prospectivas de la biotecnología en México.* Ed. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México.
- Reyes, L. Jorge y Loyola M. Víctor (1985). El cultivo de tejidos vegetales para la producción de sustancias naturales. Ed. Centro de Investigación científica de Yucatán A.C. (CICY). 125.
- Robert, M. y Loyola V. (Edits). 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. Ed. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY). 21-22.
- Rodriguez-Garay B. (1990). Aplicaciones biotecnológicas de la producción de cactáceas de interés comercial. Resúmenes de la reunión " Programa para el rescate de cactáceas 1990". CIATEJ. Guadalajara, Jalisco
- Rodriguez-Garay B. and A. Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedker). *Cact. Succ. J. (U.S.)* 64 : 116-119.
- Solinas, B. Ma. Lorenzo. 1993. Evaluación de la actividad boctericida *in vitro* de las cactáceas *Leuchtenbergia principis*, *Escobaria missouriensis*, *Coryphanta sp.* y *Stenocereus queretaroensis*. Tesis profesional. U.A.G. Facultad de Ciencias Químicas. 46-50.

- Sánchez, R. Sergio A. 1985 El desarrollo biotecnológico en México. En Prospectivas de la biotecnología en México. Rodolfo Quintero (Ed.). CONACYT. México.
- Soltero, R. 1990. Importancia ornamental de las cactáceas. Resúmenes de la reunión "Programa para el Rescate de Cactáceas 1990". CIATEJ. Guadalajara, Jalisco.
- Starling, R. 1985 *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cact. Succ. J. (U.S.)* 57 : 114-115.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. McGraw Hill, New York.
- Street, H.E. 1977. Plant cell cultures. Academic press., U.S.A.
- Trease, G. and Charlet, E. 1982. Formacognosia. Ed. Continental. México.
- Villalobos, A.M. Victor, H.A. Escobar. 1985. Micropropagación de nopal (*Opuntia spp.*). En Fundamentos teóricos prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Victor M. Villalobos (Ed.) 169-172.
- Viramontes, M. 1991. Actividad antimicrobiana del Peyote (*Lophophora williamsii*). Tesis profesional, Facultad de Medicina. U. de G. México.
- Veliky, I. A. and K. Genest. 1972. Growth and metabolites of *Cannabis sativa* cell suspension cultures. *Lloydia* 35 : 450-456.
- Veliky, I.A. and I. Latta. 1974. Antimicrobial activity of cultured plant cell and tissues. *Lloydia* 37 : 611-620.