

RESEÑA ANALÍTICA

Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas

Yelenys Alvarado Capó.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Recibido: 7 de octubre de 1997. Aceptado: 20 de octubre de 1998.

Palabras clave: contaminación, control, micropropagación, bacterias, hongos.

Key words: contamination, control, micropropagation, bacteria, fungi.

RESUMEN. La contaminación por microorganismos es uno de los principales problemas para los micropropagadores de plantas en el mundo, ya que provoca cuantiosas pérdidas. Generalmente, se reportan como contaminantes a bacterias, levaduras y hongos filamentosos y se refieren como principales fuentes de contaminación al hombre, los tejidos vegetales, los equipos y el ambiente. La contaminación por microorganismos es un problema multicausal, pueden introducirse al proceso tanto con el explante inicial como en el laboratorio y diseminarse en las habitaciones por ácaros, trips y hormigas. El efecto negativo de los microorganismos contaminantes sobre las vitroplantas puede ser considerable, si se tiene en cuenta que compiten con ellas por los elementos nutritivos y les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de cultivo de metabolitos tóxicos. Existen vías para prever y controlar la contaminación, pero es necesario conocer los microorganismos y las fuentes que los introducen. Cada laboratorio de cultivo de tejidos posee características particulares que lo diferencian del resto. Es necesario que se verifiquen y controlen sistemáticamente todas las operaciones y áreas donde pueden introducirse microorganismos. A partir de esto, la aplicación de métodos rápidos y seguros para detectarlos y el empleo de diferentes alternativas para su control tales como: el incremento de las medidas de asepsia, tratamiento de las plantas donantes, el subcultivo de las plántulas en medio de cultivo con productos antimicrobianos de origen sintético o natural, etc. conducirá a condiciones de productividad más eficientes y disminuirá las consecuencias negativas de este fenómeno.

ABSTRACT. Microbial contamination is one of the major problems for plant micropropagators in the world because it causes big losses. Bacteria, yeast and filamentous fungi are generally reported as contaminants and man, environment, equipment and explants are indicated as the principal source of these contaminants. Microbial contamination is a multicausal problem since the microorganism can be introduced both with the initial explant and in the laboratory and mites, trips and ants can spread it. The negative effects of microbial contaminants on plantlets may be considerable if it is taking in consideration that microorganism compete with plants for the nutrient and cause direct or indirect damage by tissue colonization or secretion into the medium of toxic metabolites. There are ways to prevent and control contamination, but it is necessary to know which microorganism is involved and its source. For control of microbial contamination plant propagators use different ways such as increase of aseptic techniques, stock plant treatment, subculture of plantlets in media with antimicrobial compounds of natural or synthetic origin, etc. Each plant tissue culture laboratory has particular characteristics that differentiate it from the rest. It is necessary that all operation and the areas where microorganism can be introduced are systematically verified and controlled. After this the application of rapid and sure methods for the detection of contamination and the use of different alternatives for its control will lead to more efficient conditions of productivity and will reduce the negative consequences of these phenomena.

INTRODUCCION

La contaminación por microorganismos continúa siendo hoy día, uno de los principales problemas para los micropropagadores de plantas en el mundo. Por esta razón, las pérdidas en el cultivo de tejidos de numerosas especies son cuantiosas, lo cual hace económicamente ineficientes muchos procesos.^{1,2}

Entre los microorganismos frecuentemente aislados como contaminantes, se menciona a los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras.

El efecto negativo de los microorganismos contaminantes sobre las vitroplantas puede ser considerable si se tiene en cuenta que compiten con ellas por los elementos nutritivos del medio y les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de cultivo de metabolitos tóxicos. De esta forma, pueden reducir los coeficientes de multiplicación, inhibir el enraizamiento y ocasionar la muerte de la planta.^{2,4}

Muchos microorganismos no son conocidos por provocar daños a las plantas en campo y sin embargo, se convierten en patógenos *in vitro*. Herman en 1987 sugirió el término "vitropatógeno" para designarlos.⁵

MICROORGANISMOS CONTAMINANTES Y FUENTES DE CONTAMINACIÓN

Además de los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras algunos organismos fastidiosos como los virus, viroides, micoplasmas y rickettsias, así como bacterias fitopatógenas, se refieren a me-

nudo como contaminantes en procesos de micropropagación de plantas carentes de un sistema de diagnóstico para patógenos. Se considera que la contaminación por microorganismos es un problema multicausal y que estos pueden introducirse al proceso tanto con el explante inicial como en el laboratorio. De esta forma, se reportan contaminantes endógenos o latentes cuando aparecen asociados al explante en las diferentes fases de la micropropagación (principalmente en las fases de multiplicación y enraizamiento) y por otra parte, se mencionan a aquellos microorganismos que se introducen en el laboratorio por técnicas inadecuadas de trabajo.

Contaminación endógena o latente

Cuando se reporta contaminación endógena se hace referencia generalmente a bacterias patógenas o no y a organismos fastidiosos, ya que aparte de ciertos patógenos obligados, los contaminantes fungos no deben encontrarse latentes en los cultivos *in vitro*. Las bacterias son consideradas por muchos autores como los contaminantes más comunes y las que ocasionan los problemas más serios, después de los virus, porque pueden ser sistémicas y su detección es más difícil.^{1,2}

Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma, se introducen en el cultivo de tejidos, se propagan con el material vegetal y pueden permanecer sin expresarse en los medios de cultivo por largos períodos de tiempo. Debido a la inhibición ocasionada por elevadas concentraciones de sales, sacarosa o el pH, sólo se manifiestan en condiciones de estrés.⁴

Se han aislado especies de bacterias pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, entre otros.^{1,2,6,7}

Contaminantes microbianos introducidos en el laboratorio

Los microorganismos pueden entrar al proceso productivo, prin-

cipalmente, por ineficiente desinfección de los explantes primarios utilizados en la fase de establecimiento, por inadecuada manipulación del material vegetal, deficientes técnicas de asepsia, incompleta esterilización del medio de cultivo, por fallos en el funcionamiento de las cabinas de flujo laminar, o a través del ambiente de los locales (Tabla 1). Además, pueden diseminarse en las habitaciones por ácaros, trips y hormigas.^{1,2,8}

El hombre interviene directamente en todas las operaciones que se realizan en la micropropagación de plantas y es una fuente primaria de contaminantes a través del estornudo, la tos, la conversación, etc. La presencia de microorganismos contaminantes que son habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano como *Staphylococcus epidermidis* o *Candida albicans*, generalmente indica ineficientes técnicas de asepsia por parte de los operarios.²

Determinados microorganismos son particularmente introducidos en el cultivo de tejidos como resultado de prácticas deficientes en el laboratorio. Ejemplo de ello son las especies del género *Bacillus* que pueden contaminar los medios de cultivo por insuficiente esterilización o mal funcionamiento de las autoclaves y puede ser diseminado durante las operaciones con el material vegetal.^{1,2}

Una rápida aparición de contaminantes fúngicos en muchos frascos a la vez dentro de una cámara de cultivo puede ser evidencia de la presencia de ácaros, trips u hormigas que aunque no provocan graves daños a las plantas sirven como vectores para esparcir la contaminación en las cámaras de crecimiento.²

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

En Cuba, el 90 % de los géneros fúngicos aislados del ambiente de los locales de trabajo del área aséptica en dos laboratorios de cultivo de tejidos (con capacidad de producción de dos y cinco millones de vitroplantas anuales, respectivamente) se han reportado como habitantes del suelo y muchas especies de los géneros bacterianos de mayor frecuencia de aparición (*Micrococcus* y *Bacillus*) tienen también como hábitat natural este sustrato. Además, se ha establecido correlación entre los microorganismos aislados como contaminantes de las vitroplantas y los reportados en el ambiente.

Tabla 1. Microorganismos introducidos en el laboratorio y fuentes de contaminación.

Fuentes de contaminación	Microorganismos	Referencias
Hombre		
Inadecuadas técnicas de asepsia. Incumplimiento de la disciplina tecnológica.	<i>Staphylococcus</i> , <i>Candida albicans</i> , hongos filamentosos.	1, 2, 9
Equipos		
Mal funcionamiento de las autoclaves, estufas, cabinas de flujo laminar, etc.	<i>Bacillus</i> sp.	1, 3
Ambiente		
Condiciones higiénico-sanitarias deficientes. Intercambio con el ambiente exterior.	<i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Candida</i> , <i>Chryptococcus</i> .	10-12
Instrumental		
Inadecuada esterilización.	<i>Bacillus</i> sp.	1
Ácaros, trips, hormigas	Hongos filamentosos, bacterias.	1-3
Explante		
Inadecuada desinfección.	Hongos filamentosos, bacterias, levaduras.	13

Si se tiene en cuenta que además de la contaminación introducida por el operario, las vitroplantas pueden contaminarse en las habitaciones destinadas a su crecimiento donde ocurre intercambio entre el interior del frasco de cultivo y el ambiente exterior y que el período de permanencia de las plantas en estos locales es prolongado, se debe conceder atención permanente al estricto mantenimiento de la limpieza para disminuir la carga microbiana ambiental.¹²

CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN

La determinación exacta de la fuente de contaminación retrospectivamente a menudo se dificulta, ya que los microorganismos pueden ser introducidos en varios puntos del proceso productivo.^{1,12} Hay vías para controlar y manejar la contaminación pero es necesario determinar el tipo de contaminante y la fuente para poder seleccionar los mejores métodos.

En la lucha por prevenir o eliminar la contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas, se han ensayado y puesto en práctica diferentes alternativas que van desde el incremento de las medidas de asepsia, tratamiento de las plantas donantes, etc., hasta el subcultivo de las plántulas en medio de cultivo con productos antimicrobianos de origen sintético o natural.

Selección y tratamiento de la planta donante

El control de las condiciones asépticas de los cultivos primarios en los trópicos requiere de protección de las plantas madres o donantes con respecto al ambiente. Los explantes se deben seleccionar teniendo en cuenta la edad de la planta y la posición en que se encuentran en ella. Es necesario también considerar el tamaño del explante y luego, someterlo a una progresiva e intensiva desinfección.^{1,13}

El banco de plantas donantes debe mantenerse libre de enfermedades y plagas con estrictos métodos de control químico y biológico. Es conveniente realizar aplicaciones de fungicidas, antibióticos e insecticidas a estas plantas. Además, el número de bacterias y hongos en los tejidos aéreos puede ser reducido por su mantenimiento en condiciones de baja humedad tanto como sea posible en casas de cristal, invernaderos etcétera.¹

Desinfección de los explantes

Los contaminantes microbianos de la superficie de los explantes se eliminan comúnmente por inmersión de estos en disoluciones desinfectantes tales como: etanol, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, cloro comercial y cloruro de mercurio (II) entre otros. No obstante, se debe apuntar que este último compuesto es muy tóxico y que no es fácilmente removible de los explantes.

El alcohol ha sido utilizado como pretratamiento para la desinfección con hipoclorito porque se ha demostrado que facilita su penetración en las plantas. Además, se considera beneficioso adicionar algún agente tensoactivo como tween 20. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por las características de los explantes.^{1,3,8}

Por otra parte, algunos antibióticos, fungicidas e insecticidas se han usado en la desinfección de los explantes. No obstante, las poblaciones de microorganismos endofíticos generalmente no se eliminan con procedimientos de desinfección superficial y requieren de medidas adicionales como el empleo de métodos para su detección.

Detección de microorganismos contaminantes

La detección temprana de la contaminación es esencial para prevenir las pérdidas. Para ello, se requiere de métodos rápidos y seguros.

Los contaminantes fungosos no son difíciles de detectar en el medio de cultivo, pues su crecimiento es visible en forma de colonias aisladas o alrededor de los explantes. Sin embargo, para el caso de las bacterias, la afirmación de que los cultivos están libres de contaminantes por apreciación visual de la ausencia de crecimiento en el medio de cultivo puede conducir a certificaciones erróneas. Ciertas bacterias entran al cultivo de tejidos con los explantes, pero otras son claramente introducidas en el laboratorio en los diferentes subcultivos. A diferencia de los hongos filamentosos y las levaduras, las bacterias a menudo no producen crecimiento visible sobre el medio o síntomas en las plantas hasta mucho tiempo después de que fueron introducidas.¹

En todas las fases los explantes deben ser muestreados para detectar la presencia de contaminantes bacterianos. Hay que tener presen-

te que estos pueden ser introducidos permanentemente en el laboratorio.^{1,4}

Uno de los métodos más utilizados es la transferencia de fragmentos de material vegetal a medios de cultivo bacteriológicos que permiten el crecimiento de un gran número de representantes bacterianos y aunque algunas especies requieren de medios específicos, se obtienen buenos resultados utilizando dos o tres medios de cultivo.^{1,7,14} Además, se reporta la utilización de componentes de medios de cultivo bacteriológicos en el medio de cultivo de las plantas¹⁵ y el empleo de métodos turbidimétricos.¹⁸ Un ejemplo de estos últimos es el desarrollado por Hernández *et al.* que permite procesar un número elevado de muestras en 24 h con un gasto mínimo de recursos.¹⁷

Control de las fuentes que introducen contaminación durante el proceso de micropropagación

Como se ha expresado, los microorganismos pueden ser introducidos en el laboratorio, sin embargo, en muchos casos es difícil distinguir entre microorganismos asociados a las plantas e introducidos en el laboratorio y determinar la fuente exacta de contaminación.¹

Cada laboratorio de cultivo de tejidos posee características particulares que lo diferencian del resto, aún cuando hayan sido construidos con similar diseño. Es necesario que se verifiquen y controlen sistemáticamente todas las operaciones y áreas a través de las cuales pueden introducirse microorganismos.

La toma de muestras, regularmente, del aire de los locales, la verificación del funcionamiento de los equipos, el chequeo periódico de la eficiencia del lavado de las manos, del empleo de las técnicas de asepsia y el registro riguroso de todos los índices de pérdidas por contaminación, etc., así como de las incidencias durante el proceso productivo, permiten conformar una base de datos primarios que analizados convenientemente ayudan a tomar decisiones y a establecer pronósticos.¹²

Leifert y Waites enfatizan que todos los puntos de introducción de contaminación en el proceso productivo deben vigilarse a través de un sistema de control¹⁶ y Suárez y Alvarado por su parte, proponen medidas para su detección y chequeo a través de un sistema de control de la calidad que incluye el pro-

cesamiento de los datos por un programa de computación creado para ello.¹⁹

Con el empleo de medios protectores para el cabello, nariz, boca y manos, se reducen los riesgos de contaminación por el factor humano, así como con el perfeccionamiento de las medidas de asepsia.^{7,8} Leifert et al. reportan la disminución de las pérdidas por contaminación bacteriana en un laboratorio comercial con capacidad de producción anual de cuatro millones de vitropiantas de 5 a 3,5 % por medio del lavado de las manos y antebrazos, siguiendo protocolos establecidos para procedimientos quirúrgicos. Además, lograron disminuir las pérdidas por debajo del 1 %, sometiendo a los trabajadores a rigurosos entrenamientos en métodos microbiológicos.¹

Para los muestreos ambientales resulta de gran utilidad establecer puntos fijos de muestreo y repetir los ensayos manteniendo ciertas regularidades (tipo de medio de cultivo, tamaño de las placas de Petri, tiempo de exposición, etc.) que permitan determinar los patrones del número de microorganismos permisibles en el ambiente de cada local. Para el aislamiento de los microorganismos pueden ser utilizados medios de cultivo generales que permitan su desarrollo. Es conveniente emplear microorganismos indicadores para señalar específicamente la fuente de contaminación (los microorganismos indicadores son aquellos que se detectan en estados específicos, son los contaminantes primarios bajo condiciones determinadas).¹

El mantenimiento de regímenes de limpieza adecuados y de la higiene en todos los locales de trabajo contribuye notablemente a disminuir la carga microbiana ambiental.¹² Es muy importante tener en cuenta que todos aquellos frascos contaminados que permanecen en los locales de los laboratorios de cultivo de tejidos constituyen focos de contaminación, por tal razón, es imprescindible eliminarlos del proceso productivo rápidamente.

El empleo de la luz solar en los laboratorios de cultivo de tejidos (Cuba es un ejemplo de aprovechamiento de esta fuente de energía) implica el empleo de cristales en paredes y techos que permitan el paso de la luz. Por esta razón, se recomienda revisar periódicamente el estado técnico de los techos, cristales y equipos de clima de los locales

de trabajo para localizar fisuras o aberturas por donde puedan penetrar los insectos y el polvo. De existir, deben sellarse inmediatamente.¹² De igual forma, debe vigilarse la presencia de insectos en los frascos, si se detectan, deben destruirse por tratamiento en autoclave.²

Empleo de sustancias antimicrobianas para el control de la contaminación

Si se tienen en cuenta aspectos tales como: que la contaminación en la población de plantas cultivadas *in vitro* esté causada por un mismo microorganismo, que este se caracterice, que se realicen las pruebas de susceptibilidad de los contaminantes frente a los productos antimicrobianos y se determine la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI), la Mínima Concentración Bactericida o la Mínima Concentración Fungicida de estos, así como que se verifique su no fitotoxicidad, pueden ser una alternativa para solucionar este problema.

Entre los antibióticos y fungicidas más empleados se encuentran: cefotaxima (clafórán), rifampicina, gentamicina, anfotericin B, benomil, carbendazim, etcétera.^{2,20,21}

No obstante, muchos autores coinciden en que su empleo solamente se justifica en casos excepcionales y en cultivos de corta duración, ya que su elevada especificidad implica que no previenen la proliferación de todos los microorganismos, además, tales productos modifican la composición de los medios de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes, así como muchos son fitotóxicos para las plantas.^{1,8}

En todas las ocasiones que se utilicen antibióticos para eliminar los microorganismos contaminantes deben realizarse pruebas de sensibilidad antes de aplicarlos en el medio de cultivo o directamente a los explantes. Entre las que más se emplean están los antibiogramas por la técnica de difusión en agar y la determinación de la MCI de los antibióticos por dilución en agar o en caldo.^{7,22,23} Dichas pruebas deben realizarse además, en el medio de cultivo de las plantas donde se aplicará posteriormente, pues una de las dificultades para el empleo de antibióticos en el cultivo de tejidos es que su sensibilidad puede ser reducida en los medios de cultivo de las plantas y que algunos son alterados por la luz o por el pH.^{3,6}

Duhem et al. sugieren que para reducir la fitotoxicidad de los anti-

bióticos *in vitro* deben ser tratadas mejor las plantas donantes que los explantes. No obstante, se reportan resultados positivos en cultivos tales como: papa, menta, manzana, *Pelargonium*, *Hemerocallis*, *Choysa* y *Delphinium*, entre otros.^{8,23,25}

En el caso de los fungicidas, entre los que se han empleado con mejores resultados se encuentran el benomil y el carbendazim.^{23,26} Para determinar la susceptibilidad de los hongos a diferentes sustancias con acción fungicida se refiere el método de dilución en agar con discos de micelio como inóculo.^{21,27}

Tales fungicidas reducen la contaminación fungosa, pero al igual que los antibióticos, pueden resultar fitotóxicos a muchas especies de plantas por lo cual es necesario realizar pruebas preliminares antes de aplicarlos en el cultivo *in vitro* de plantas.

Por todo ello, el énfasis mayor debe ponerse en la detección temprana y la prevención de la introducción de contaminantes²⁸ por las fuentes ya citadas.

CONCLUSIONES

El conocimiento de los microorganismos contaminantes, de las fuentes que los introducen al proceso de micropropagación, de los factores de riesgo, así como la aplicación de métodos para prevenir, detectar y controlar la contaminación, conducirá en el futuro a garantizar condiciones de productividad cada vez más eficientes y logrará disminuir las consecuencias negativas de este fenómeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leifert C., Morris C.E. and Waites W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13, 139, 1994.
2. George E.F. Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part 1, 2nd Ed., Exergetics Ltd., 130-143, 1993.
3. Leifert C., Ritchie J., Waites W.M. Contaminants of plant tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, 452, 1991.
4. Cassells A.C. Problem in tissue culture: culture contamination. En: Debergh P., Zimmerman R.H. (Ed.). *Micropropagation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 31-45, 1991.
5. Herman E.B. Toward control of micropropagation contamination. *Agricell Report*, 9, 33, 1987.
6. Barrett C. and Cassells A. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown) from *pelargonium x domesticum* av. "Grand Slam" explants

- plants *in vitro*. **Plant. Cell Tissue and Organ Culture**, 36, 169, 1994.
7. Reed B.M., Buckley P.M., De Wilde T.N. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated Mint plant. **In vitro Cell. Dev. Biol.**, 31, 53, 1995.
8. Roca W.M., Mrogrinski L. A. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Ed. Técnicos, CIAT, 1993.
9. Kneifel W., Leonhardt W., Fassler M. Identification and antibiotic sensitivity of bacterial contaminants isolated from *in vitro* cultures of some tropical aquatic plants. Second International Symposium on bacteria and bacteria-like contaminants of tissue cultures, University College, Cork, Ireland, 1996.
10. Danby S., Epton H.A.S., Sigee D.C., Leifert C. Fungal contaminants of *Primula*, *Coffea*, *Musa* and *Iris* tissue cultures. En: Lumsden P.J., Nicholas J.R., Davie B.J. (Ed.). *Physiology, Growth and Development of Plants in culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 379-385, 1994.
11. Leifert C., Waites W.M., Nicholas J.R., Keetley J.W. Yeast contaminants of micropropagated plant culture. **Journal of Applied Bacteriology**, 69, 471, 1990.
12. Alvarado Y., Herrera L., Suárez M., Rivero O., García L., Acosta M. Control de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. Tercer Seminario Internacional de Sanidad Vegetal, Palacio de las Convenciones, Ciudad de La Habana, Cuba, 1997.
13. Enjahric I., Carron M.P., Lardet L. Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of *Hevea brasiliensis*. **Acta Horticulturae**, 255, 57, 1988.
14. Borrás O., González R., Concepción O., Cid M., Nápoles L., Recio M.I., Escalante D., Escalona M., Trujillo R., Borroto C. Metodología Para el control de las contaminaciones en el cultivo *in vitro* de plantas ornamentales. **Cuadernos de Fitopatología**, 4, 138, 1996.
15. Boxus Ph., Terzi J. Control of accidental contamination during mass propagation. **Acta Horticulturae**, 225, 189, 1988.
16. Leifert C., Waires W., Nicholas J.R. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. **Journal of Applied Bacteriology**, 67, 353, 1989.
17. Hernández R., Alvarado Y., Sarria Z. Micrométodo para la detección de contaminantes bacterianos latentes en el cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. Cuarto Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba, 1996.
18. Leifert C., Waites W.N. Contaminants of plant tissue cultures. **Int. Assoc. Pl. Tissue Cult. Newslett.**, 60, 2, 1990.
19. Suárez M., Alvarado Y. Sistema de Control de la Calidad para biofábricas de múltiples cultivos. Técnicas de Avanzada Aplicadas a la Propagación Masiva de Plantas. BIOVEG '97, Ciego de Avila, Cuba, 1997.
20. Deberg P.C. et al. Citado por Herman E. Carbendazim: A fungicide that promotes micropropagation. **Agri-cell Report**, 21, 1993.
21. Silva S.D.V., Pereira T.N.S., Luz E.D.M.N. Propagacao do guarana *in vitro*. I. Selecao de fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, 13, 183, 1988.
22. Kneifel W., Leonhardt, W. Testing of different antibiotic against Gram positive and Gram negative bacterias isolates from plant tissue culture. **Plant Cell. Tissue and Organ Culture**, 29, 139, 1992.
23. Leifert C., Camotta H., Wright S.M., Waites B., Chayne V., Waites W.M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **J. Appl. Bacteriol.**, 71, 307, 1991.
24. Duhem K., Le Mercier N., Boxus Ph. Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germplasm. **Acta Horticulturae**, 225, 87, 1988.
25. Gilbert J., Shohet S., Caligari P.D.S. The use of antibiotics to eliminate latent bacterial contamination in potato tissue cultures. **Annals of Applied Biology**, 119, 113, 1991.
26. Vilariño S., Agramonte D., Herrera L., Alvarado Y., Pérez M., Acosta M. Efecto de tratamientos con fungicidas en la protección de yemas axilares de papa (*Solanum tuberosum* L.) encapsuladas. **Centro Agrícola**, 2, 77, 1995.
27. Alvarado Y., Herrera L., Sarduy Y., Acosta M., Pérez B., Carrazana D. Actividad antimicrobiana del G-1 frente a bacterias y hongos contaminantes en la micropropagación de *Solanum tuberosum* L. Tercer Seminario Internacional de Sanidad Vegetal, Palacio de las Convenciones, Ciudad de La Habana, Cuba, 1997.
28. Leifert C., Woodward S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 52, 83, 1998.



ozoney

OZONIZADOR DOMESTICO
Diseñando y construido en Cuba.

ozoney ha sido concebido y diseñado para el tratamiento de las aguas para uso doméstico, en las que se incluyen, el agua para beber, así como la destinada al lavado de los alimentos que se ingieren crudos, al fregado de la vajilla y otros utensilios de cocina y a la higiene personal. Contribuye además, a eliminar los malos olores que pudieran existir en el local donde sea instalado.

Efectividad

Se ha demostrado la gran efectividad del ozono en la destrucción de microorganismos tales como *E-coli*, quistes de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, *Pseudomona*, etc., los cuales pueden encontrarse con alguna frecuencia en el agua.

Características técnicas

- Alimentación: 110 V CA $\pm$ 10 %, 50 a 60 Hz .
- Concentración de O₃ en agua: 0,3 ppm (mínimo).
- Flujo de agua recomendado: 1,5 a 2 L/min .
- Potencia de consumo: 10 VA (máximo).
- Dimensiones: (195x285x185) mm .
- Peso: 1,8 kg .

Ahorro en la purificación de 10 L de agua.

Consumo de electricidad
(kW/h)

Con electricidad	1,02
Con ozoney	0,001

ozoney puede convertirse en un inseparable aliado de su salud al posibilitarle obtener agua potable de elevada calidad, sin necesidad de hervir el agua o consumir agua embotellada. Su capacidad de desinfección basada en el gran poder germicida, bactericida y fungicida del ozono, es mucho mayor que la de otros desinfectantes que se emplean actualmente, por lo que su uso asegura la total desinfección del agua.

Contáctenos:



CENTRO DE INVESTIGACIONES DEL OZONO

Calle 230 y Avenida 15, Siboney, Playa, Apartado Postal 6880, Ciudad de La Habana, Código Postal 10600, Cuba.