

## EVALUACIÓN DEL EFECTO NEMATICIDA DE CEPAS DE BACILLUS SPP.

María E. Márquez Gutiérrez, Luis Arístides Torres Sánchez y Mercedes Escobar Hernández

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11300

### RESUMEN

Se evaluó la actividad nematocida de diferentes aislados de *Bacillus* spp. Los mejores resultados sobre la reducción de la eclosión de los huevos de *Meloidogyne incognita* se obtuvieron con las cepas R175-1 (82,9%) de *Bacillus licheniformis* y LBT-25 (88%) de *Bacillus thuringiensis*. Se determinó la actividad biológica de las fracciones tóxicas de cada una de las cepas y resultó que en el caso de *Bacillus licheniformis* (R175-1), el efecto nematocida se encontró en el sobrenadante filtrado. Esto puede relacionarse con la presencia de enzimas exocelulares responsables de dicha actividad. La acción inhibitoria de *Bacillus thuringiensis* estuvo presente en las tres fracciones, lo que explica que hay un efecto combinado a causa de la acción de las diferentes toxinas.

Palabras clave: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *Meloidogyne incognita*, beta exotoxina, delta endotoxina, enzimas exocelulares

### ABSTRACT

Nematicidal activity of several isolates of *Bacillus* spp. was evaluated. Best results about reduction of *Meloidogyne incognita* egg supernatant were obtained with strain R175-1 (82,9%) of *Bacillus licheniformis* and strain LBT-25 (88%) of *Bacillus thuringiensis*. Biological activity of toxically fractions from each strain was determined. For *Bacillus licheniformis* (R175-1), nematicidal effect was found in filtrated supernatant; that can be related with presence of exocellular enzymes responsible of this activity. Inhibitory action of *Bacillus thuringiensis* was present in three fractions. That means there is a combined effect, because of action of several toxins.

Key words: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *Meloidogyne incognita*, beta exotoxin, delta endotoxin, exocellular enzymes

### INTRODUCCIÓN

Los nemátodos constituyen una de las plagas más importantes para los cultivos tropicales y subtropicales. Ocupan el segundo lugar después de los insectos, como las plagas de invertebrados limitantes dentro de la producción agrícola en todo el mundo [Sharma, 1994], y se estima que constituyen entre 10-30% de la biomasa de los organismos multicelulares y alrededor del 1% del total de la biomasa del suelo [Sohlenius, 1980].

Durante varios años la aplicación de nematocidas químicos fue una tendencia generalizada en muchos países para disminuir los daños ocasionados por nemátodos, aunque su uso se ha visto limitado por el incremento de sus costos y provocar selección de microflora en el suelo degradante de las sustancias activas, destrucción de enemigos naturales, un rápido resurgimiento de las poblaciones tratadas, aparición de especies secundarias, así como peligros directos e indirectos para el hombre y el medio ambiente. Esto ha dado lugar a la búsqueda de alternati-

vas biológicas, como parte de los programas de manejo integrado de plagas.

Se han realizado estudios de forma exitosa con diferentes antagonistas naturales de nemátodos, que han podido ser aislados para su utilización como productos nematocidas. Entre estos se encuentran los hongos *Arthrobotrys irregularis* (Drechsler), *Paecilomyces lilacinus* (Thom y Samson) y *Verticillium chlamydosporium* (Ness), así como la bacteria *Pasteuria penetrans* (Sayre y Starr) [Jonathan *et al.*, 2000; Siddiqui y Ehteshamul-Haque, 2000; Somasekhar y Mehto, 2000].

La mayoría de los estudios realizados con cepas del género *Bacillus* para el control de nemátodos han sido realizados con especies de nemátodos zooparásitos.

En plantas de tomate y pepino tratadas con el aislado CR-371 de *B. thuringiensis* (Berliner) se observó una disminución significativa de las agallas en las raíces, inducidas por *Meloidogyne incognita* (Kofoid *et White*) en comparación con el control no tratado [Zuckerman *et al.*, 1993].

La efectividad de las toxinas de esta especie bacteriana se ha demostrado en huevos y juveniles de *Meloidogyne javanica* (Treub y Chitwood) y *Tylenchulus semipenetrans* (Cobb) [Leyns *et al.*, 1995]. Existen reportes acerca de formulaciones comerciales que contienen solamente la delta-endotoxina producida por las variedades *israelensis* y *thuringiensis* con resultados exitosos para el control de los fitonemátodos [Meadows *et al.*, 1990; Sharma, 1994].

No menos importantes son los efectos nematostáticos y nematicidas de la beta-exotoxina, la cual es sintetizada por las cepas pertenecientes a los serotipos H1, H4ac, H5, H7 H9 y H10 de *B. thuringiensis* [Leskhova, 1986]. Este metabolito, del que se refiere su control sobre *M. incognita* y *Heterodera glycines* (Ichinoe) [Noel, 1990] es un producto extracelular, soluble en agua y termoestable a 120°C por 15 minutos [Faust y Lee, 1982].

Otra bacteria es *Bacillus licheniformis* (Milezyme), a la cual se le atribuyen efectos estimulantes sobre protozoos y cultivos vegetales, así como efectos nematicidas [Sidquiand y Mahmood, 1992].

Los objetivos del trabajo fueron seleccionar *in vitro* las cepas más efectivas de *B. thuringiensis* y *B. licheniformis* para el control de *Meloidogyne incognita* y determinar sus fracciones con actividad nematicida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon cuatro cepas de *B. licheniformis* BKM-511, N2.1, RI75-1, 5-260 y una de *Bacillus subtilis* pertenecientes a la colección del Centro de Aplicación y Desarrollo de Energía Nuclear (CEADEN), así como dos cepas de *B. thuringiensis* (LBT-3 y LBT-25) del cepario del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) de Cuba. Para el mantenimiento y conservación de las cepas se sembraron en cuñas de agar nutriente a temperatura de 10°C.

### Procedimiento para la reactivación de las cepas

Las cepas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) [Sambrook *et al.*, 1989] hasta esporulación total. Una asada de cada cultivo se sembró en placas con Agar Nutriente (AN) (Oxoid CM3), realizando posteriormente la selección de colonias típicas de cada especie mediante observación de la morfología al microscopio estereó (40X).

Para determinar la presencia de esporas y cristales de *B. thuringiensis* se realizaron tinciones simples con violeta cristal (0,5%).

De acuerdo con las características observadas, las colonias fueron sembradas en tubos con agar nutriente enriquecidos con extracto de levadura, durante 96 horas a temperatura de incubación de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### Reproducción de los aislados

El inóculo inicial consistió en una suspensión de  $10^6$  esporas/mL obtenidas por arrastre del crecimiento con solución salina a 0,85% a partir de cuñas de agar que fueron tratadas con temperatura (60°C por 15 min), para eliminar las células vegetativas. A continuación se inocularon en el medio líquido formado por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl, colocándose en una zaranda termostata BIOZART 2013, con un régimen de agitación de 140 rpm y una temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , hasta la formación de los cristales de *B. thuringiensis*. Para *B. licheniformis* la temperatura se ajustó a 36°C.

La concentración final de los cultivos se determinó a través de conteos en cámara de Neubauer. Las muestras para los bioensayos fueron ajustadas hasta obtener caldos a una concentración en el orden de  $10^7$  esporas/mL.

### Separación de las fracciones tóxicas

Los cultivos se centrifugaron a 5 000 rpm durante 15 minutos. Los pellets fueron lavados dos veces con solución salina fisiológica NaCl (0,85%) pH = 7,2, a fin de eliminar restos del medio de cultivo y concentrar las esporas y cristales.

La biomasa fue resuspendida en solución salina para el ajuste de la concentración ( $10^7$  esporas/mL) por conteo en cámara de Neubauer. El sobrenadante se trató en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se filtró con filtro milipore de 0,2  $\mu\text{m}$ , verificándose la ausencia de esporas por siembra de las muestras en agar nutriente. Las fracciones tóxicas obtenidas fueron: 1-formada por la biomasa celular. 2- sobrenadante filtrado con filtro milipore de 0,2  $\mu\text{m}$ ; 3-fracción no. 2 tratada a una temperatura de 121°C durante 15 minutos.

### Evaluación del bioensayo

Todos los cultivos obtenidos, así como cada una de las fracciones separadas, se probaron en el bioensayo con la finalidad de seleccionar las cepas más eficientes y a su vez obtener las fracciones activas contra los huevos *M. incognita*.

Para esto se seleccionaron ootecas de tamaño similar, procedentes de cultivos puros de nemátodos, las cuales fueron primeramente desinfectadas superficialmente para eliminar contaminantes, sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio (2%), durante 15 segundos, después se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron en vidrios reloj a una proporción de cuatro por cada cepa, con una ooteca per cápita. En el testigo las ootecas se colocaron en agua destilada, la evaluación de la eclosión de las larvas se hizo cada 48 h, durante 10 días, y el porcentaje de ejemplares emergidos se calculó en relación con el testigo sin tratamiento.

En el procesamiento estadístico de los datos se empleó el modelo análisis de varianza y la prueba de Neuman-Keuls con transformación de los datos de porcentaje con un 0,95% de niveles de significancia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los huevos de *M. incognita* expuestos a los cultivos de las cepas BKM-511, RI75-1 y N2.1 de *B. licheniformis* mostraron diferentes comportamientos. De ellas, la RI75-1 con un 82,9% y BKM-1 con 80,10% de reducción de la eclosión, fueron las que tuvieron mayor actividad nematocida, aunque difirieron significativamente entre ellas (Tabla 1).

**Tabla 1. Control *in vitro* de diferentes cepas de *Bacillus* sp. sobre huevos de *Meloidogyne incognita*.**

Cepas	Reducción de la eclosion (%)
LBT-25	88,0 a
RI75-1	82,90 a
BKM-511	80,10 ab
N2-1	77,9 bc
LBT-3	75 bc
5-260	69,14 c
<i>B. subtilis</i>	38,89 d

E = 0,41

CV = 15,2(%)

Las bacterias pertenecientes a la especie de *B. licheniformis* se caracterizan por producir algunos metabolitos importantes, como son el antibiótico bacitracina, que es un polipéptido efectivo contra bacterias Gram + [Hockenbell, 1963], proteínas alcalinas que se forman durante la etapa estacionaria del crecimiento bacteriano, usadas en la industria como biodetergente [Keckey, 1964] y una alfa amilasa termoestable muy resistente a cambios bruscos de pH [Joyet *et al.*, 1992].

Con respecto al control biológico por esta bacteria, se ha señalado que un aislado de *B. licheniformis* redujo el nivel de infestación de poblaciones de *M. incognita* en plántulas de guisantes bajo condiciones controladas [Sidquiand y Mahmood, 1992]. Asimismo, al aplicar volúmenes de cultivos esporulados entre 15 y 75 mL en plántulas de pepinos, infectadas con *M. incognita*, el grado de infestación alcanzado en las raíces, según la escala de Zeck [Zeck, 1971] después de 45 días se redujo a 0, mientras que en el testigo se obtuvo grado 3 [Márquez *et al.*, 1997].

En relación con los cultivos de las cepas de *B. thuringiensis*, se demostró la efectividad de los dos aislados, aunque la LBT-25 fue la más eficiente con un 88% de reducción de la eclosión (Tabla 1). Con esta cepa siempre se ha alcanzado altas concentraciones de esporas y cristales en los estudios de medios de cultivo realizados para su reproducción a nivel de laboratorio.

Al analizar la acción de las fracciones sobre la reducción total de la eclosión de *M. incognita* se observó que en todas las cepas de *B. licheniformis* hubo un componente en

común, responsable de estos resultados el cual estuvo presente en el sobrenadante filtrado, ya que la biomasa siempre provocó efectos por debajo del 70% (Tabla 2).

**Tabla 2. Acción de las fracciones sobre la eclosión de los huevos de *M. incognita*\***

Cepas	F1	F2	F3
LBT-25	66,25 a	66,25 b	68,12 a
5-260	59,27 ab	100 a	**
RI75-1	55,92 b	100 a	**
LBT-3	45,0 c	0 c	0
BKM-511	26,44 c	100 a	**
N2.1	0 d	100 a	**

E = 0,45

CV = 17,1%

\*Datos expresados en porcentaje de reducción.

(F1) Biomasa celular, (F2) Sobrenadante filtrado, (F3) Sobrenadante tratado con 121°C durante 15 minutos.

\*\*Estas variantes no se realizaron.

En las cepas de *B. licheniformis* existió un efecto combinado de naturaleza enzimática que está ejerciendo su acción sobre la pared de los huevos y que inhibe el proceso de eclosión. Incluso, cuando a las masas de huevos se les retiraron los tratamientos y se volvieron a colocar en agua destilada, se observó que el efecto se mantuvo hasta cinco días. Por estudios histoquímicos realizados a la estructura de los huevos de los nemátodos, se conoce que de forma general está formada por una fina membrana interna compuesta de lípidos, a continuación otra cubierta de quitina y por fuera una cubierta de naturaleza proteica [Lee, 1965].

En el caso de la cepa LBT-3 de *Bacillus thuringiensis*, solamente la fracción formada por la combinación de esporas y cristales tóxicos fueron los responsables de la actividad ovicida. También, el uso de esta cepa ha sido informado por la capacidad de mantener su actividad contra altas poblaciones de *M. incognita* y *Radopholus similis* en períodos de tres meses bajo condiciones de campo [Mena *et al.*, 1996].

Sin embargo, cuando observamos los datos obtenidos con la cepa LBT-25, a diferencia de la cepa LBT-3, tanto la fracción formada por la mezcla de esporas y cristales tóxicos, así como las fracciones del sobrenadante donde se incluyen las toxinas termoestables, resultaron la causa principal en el efecto obtenido.

Se ha encontrado que la beta-exotoxina (o *thuringiensina*) puede tener efectos nematostáticos o nematocidas sobre *M. incognita* y *Heterodera glycines* [Noel, 1990], y aunque el rol de la delta-endotoxina no ha sido confirmado aún [Narva *et al.*, 1991], en

la mayoría de los estudios se considera que es la fracción más importante de la actividad nematocida [Leyns *et al.*, 1995].

## CONCLUSIONES

- De las cepas de *B. licheniformis*, la RI75-1 resultó la mejor, y su acción nematocida se relacionó con la presencia de enzimas exocelulares.
- La cepa LBT-25 de *B. thuringiensis* tuvo un efecto mayor en comparación con la LBT-3, lo cual se atribuyó a la acción conjunta de las tres fracciones obtenidas.
- De acuerdo con los resultados, existe la posibilidad de elaborar un biopreparado empleando las cepas LBT-25 de *B. thuringiensis* y RI75-1 de *B. licheniformis* para evaluar su efecto nematocida *in vitro* y en condiciones de campo, debido a las posibilidades de control que ofrecen estas cepas.

## REFERENCIAS

- Atkinson, H. J.: «Oportunities for Plant Molecular Biology in Crop Production», *Parasitology* 98: 479-487, 1993.
- Cayrol, J. C.: «Biological Control of *Meloidogyne* with *Arthobotrys irregularis*», *Revue de Nematologie* 6: 265-273, 1983.
- Hockenbell, L.: «Bacitracin», *Progress in Industrial Microb.* P. 4, Ed. Pergaman Press, Nueva York, pp. 214-230, 1963.
- Faust, R. M.; A. B. Lee: «Bacterial and Their Toxins As Insecticides in Microbial and Viral Pesticides», New York: Marcel Dekker. 3: 75-206, 1982.
- Joyet, P. N.; N. Declerck; C. Gaillardin: «Hyperthermostable Variants of a Highly Thermostable Alpha Amylase», *Bio\_technology*, E.U., 10 (12):1579-1583, 1992.
- Keckey, R. G.: «Bacitracin», *Progress in Microbiology* 5:93-150, 1964.
- Lee, D. L.: «The Organization of the Nematode Body», *The Physiology of Nematodes*, Oliver and Boyd. Edinburgh and London, Inglaterra, 1965, p. 1148.
- Leskhova, A.: «Condiciones para la formación de la beta exotoxina por cepas de *B. thuringiensis*», *Pat. Tr.* 83:422, 1986.
- Leyns, F.; G. Borgonie; G. Arnaut; D. de Waele: «Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates», *Fundam. Appl. Nematol.* 18(3):211-218, 1995.
- Márquez, María Elena; V. García; O. Fernández; M. Escobar: «Efecto nematocida de *B. licheniformis*. Estudio preliminar», *Protección Vegetal* 12 (2):95:98, 1997.
- Meadows, J. S.; S. S. Gill; L.W. Bone: «*Bacillus thuringiensis* Affects Population Growth of the Free Living Nematode *Torbatrrix aceti*», *Invert. Reprod. and Devel.*, 17:73-76, 1990.
- Mena, J.; G. de la Riva; R. Vázquez; M. Fernández: «Empleo de *B. thuringiensis* para el control de *Radopholus similis*», *Centro Agrícola* 123:1-3, 31-38, 1996.
- Narva, K. E.; J. Payne; J. Schwab; G. E. Hickie; L. A. Galison; A. J. Sick: «Novel *Bacillus thuringiensis* Microbes Active Toxins Cloned from *Bacillus thuringiensis*», European Patent Application 91305047.2, 1991.
- Noel, G. R.: «Evaluation of *thuringiensin* of *H. glycines* on Soybean», *Suppl. J. Nematology*. 22(4s):763-766, 1990.
- Oduor-Owino, P.; S. W. Wauds: «Effect of Delay in Planting After Application of Chicken Manure on *Meloidogyne javanica* and *P. lilacinus*», *Nematología Mediterránea* 24:7-11, 1996.
- Sharma, R. V.: «*Bacillus thuringiensis*: A Biocontrol Agent of *Meloidogyne incognita* on Barley», *Nematologia Brasileira* 18:79-84, 1994.
- Sidquiand, Z. A.; I. Mahmood: «Biological Control Root Rot Disease Complex of Chickpea Caused by *Meloidogyne incognita* Race 3 and *Macrophomina phaseolina*», *Nematol. Mediterránea* 20:199-202, 1992.
- Weibelzalhl-Feilton, E.; D. W. Dickson: «*Meloidogyne arenaria* and *Pausteria penetrans* Population Density Development As Affected by on Intercropping System», Third International Nematology Congress Gosier, Guadeloupe Antillas, French West Indies, 1996.
- Zeck, W.: «A Rooting Scheme for Field Evaluation of Root-Knot Nematode Infestation», *Planzenschutz Nachrichten Bayer* 24:141-144, 1971.
- Zuckerman, B. M.; M. B. Dicklow; N. Acosta: «A Strain of *Bacillus thuringiensis* for the Control of Plant Parasitic Nematodes», *Biocontrol of Science and Technology* 3(1):41-46, 1993.