

SELECCIÓN DE *BACILLUS* SPP. CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* CONTRA *MACROPHOMINA PHASEOLINA* (TASSI) GOID. EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Arturo Reyes Ramírez, Esaú Ruiz Sánchez, Carmen Yam Chimal y Mirza Dzul Chan

División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Conkal. Km 16.3 Antigua Carretera Mérida-Motul, Conkal, Yucatán, México, C.P. 97345, arte_rey@hotmail.com

RESUMEN

Se aislaron bacterias del suelo pertenecientes al del género *Bacillus* y se evaluó la actividad antagónica *in vitro* contra el hongo *Macrophomina phaseolina* en diferentes medios de cultivo. Se emplearon los medios papa-dextrosa-agar (PDA), agar nutritivo (AN), agar-soya-tripticasa (TSA) y la mezcla de AN-PDA (2:1). El crecimiento radial de *M. phaseolina* fue de $34,7 \pm 2,5$ mm en PDA, $29,00 \pm 1,0$ mm en AN:PDA, $27,3 \pm 3,1$ mm en AN y $20,00 \pm 3,0$ mm en TSA. Se observó un crecimiento óptimo solo en el medio y mezcla que contenían PDA. Todas las cepas inhibieron el crecimiento micelial de *M. phaseolina* en los medios AN y TSA entre el 38 y el 65 %. Solo la cepa CBCK08 inhibió el crecimiento en todos los medios y mezcla utilizados. El empleo de medio AN y TSA en pruebas de antagonismo permite obtener mayores inhibiciones en el crecimiento de *M. phaseolina* en contraste con el uso de PDA que limitaba el crecimiento de las bacterias antagonistas.

Palabras claves: inhibición de crecimiento, biocontrol, antagonismo

ABSTRACT

Bacteria of genus *Bacillus* were isolated from soil and their antagonistic activity *in vitro* against the fungus *Macrophomina phaseolina* was evaluated in different culture media. The culture media tested were Potato-Dextrose-Agar (PDA), Nutrient Agar (NA), Trypticase-Soy-Agar (TSA) and the mixture NA-PDA (2:1). *M. phaseolina* radial growth was 34.7 ± 2.5 mm in PDA, 29.0 ± 1.0 mm in AN:PDA, 27.3 ± 3.1 mm in NA and 20.0 ± 3.0 mm in TSA. The fungus showed optimal growth in media or mixture containing PDA. All *Bacillus* isolates inhibited *M. phaseolina* micelial growth in media NA and TSA, with percentages in the range of 38 % to 65 %, respectively. Only the isolate CBCK08 inhibited the fungal growth in all media and mixture evaluated. The use of the media NA and TSA in the assays produces higher inhibitory effects on *M. phaseolina* growth, in contrast to the use of PDA where the growth of the antagonistic bacteria is limited.

Key words: growth inhibition, biocontrol, antagonism

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Bacillus* son bacterias Gram positivas, aerobias estrictas o aerobias facultativas. Una de las características importantes del género es la formación de endosporas. El género *Bacillus* contiene especies antagonistas de hongos fitopatógenos. Dentro de las especies de *Bacillus* que han mostrado actividad antifúngica *in vitro* sobresalen *Bacillus thuringiensis* contra *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia grisea*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani* [Knaak et al., 2007]; *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Colletotrichum* [Kim y Chung, 2004]; *Bacillus subtilis* contra un amplio rango de hongos anamorfos, donde destacan *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. y *Macrophomina phaseolina* [Melentev et al., 2006; Singh et al., 2008; Sun et al., 2011; Sosa et al., 2011] y *Bacillus licheniformis* contra *Curvularia lunata* y *Pyricularia grisea* [Tendulkar et al., 2007].

El hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid causa pudrición de raíz, tizón foliar y del tallo y *damping off* en cultivos como frijol, soya, sorgo y maíz [Su et al., 2001; Hernández et al., 2009].

En la selección *in vitro* de cepas antagonistas contra hongos fitopatógenos se realizan ensayos que permitan identificar los antagonistas potenciales. Para esto es necesario realizar pruebas rápidas, reproducibles y simples, que permitan evaluar cantidades elevadas de cepas aisladas. Por ejemplo, los ensayos duales entre *Bacillus* spp. y hongos fitopatógenos se han usado ampliamente con diferentes medios de cultivo de microorganismos, entre los que destacan medio Luria-Bertani (LB) [Huang *et al.*, 2005], agar nutritivo (AN) [Rodas *et al.*, 2009], agar papa dextrosa (PDA) [Kim y Chung, 2004] y mezcla de medios [Souto *et al.*, 2004]. El éxito del ensayo es que ambos microorganismos puedan crecer en el medio utilizado. El objetivo del trabajo fue evaluar tres medios de cultivos PDA, AN, TSA, y la mezcla de AN-PDA para determinar la actividad antifúngica *in vitro* de cepas nativas de *Bacillus* spp. contra el fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Para el aislamiento de cepas se colectaron aproximadamente 200 g de suelo en los primeros 10 cm de profundidad de diferentes cultivos en el municipio de Conkal, Yucatán, México. El material se colocó en bolsas de plástico y se almacenó inmediatamente a 4 °C hasta su procesamiento.

Aislamiento y caracterización de cepas

El aislamiento de cepas se realizó de acuerdo con el método informado por Ohba y Aizawa (1986). Se pesó 1 g de cada muestra de suelo y se suspendió en 9 mL de agua destilada estéril en un tubo de centrifuga de fondo cónico de 15 mL y se homogenizó vigorosamente en un vórtex durante 3-5 min. Posteriormente los tubos se colocaron a 80 °C por 15 min y se sembró 200 µL de una dilución final de 1:200 en una placa Petri de 100 x 15 mm con medio agar nutritivo (AN), y se incubó a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. Se seleccionaron colonias aisladas blanquecinas, opacas y aplanadas de bordes irregulares que se sembraron en forma individual en AN para determinar forma bacilar, la formación de endosporas, tinción de Gram positiva y prueba de catalasa positiva, características del género [Sneath, 1986]. Se seleccionaron cepas por sus características antes descritas y fueron catalogadas como integrantes del género *Bacillus*.

Evaluación de medios de cultivo en el crecimiento de *M. phaseolina*

Para determinar el efecto de la composición del medio en el crecimiento radial de *M. phaseolina* se sembró un disco de 5 mm de diámetro de un cultivo fúngico de diez días de incubación en el centro de una placa Petri de 100 x 15 mm con diferentes medios como agar nutritivo (AN) pH 7.0, agar-papa-dextrosa (PDA) pH 5,8, mezcla de AN:PDA (relación 2:1) pH 6,0 y agar-soya-tripticosa (TSA) pH 7,0. Se midió el crecimiento radial de la colonia fúngica a través del tiempo.

Actividad antifúngica *in vitro* de cepas de *Bacillus* spp.

Para los bioensayos de confrontación tipo dual se utilizaron los mismos medios y mezcla antes mencionados. Se inoculó cada cepa de *Bacillus* spp. a una distancia de 1,5 cm del borde de la placa Petri y el hongo fitopatógeno en el centro. Se colocaron de dos a cuatro cepas bacterianas por caja y se incubaron a 30 °C. La inhibición del crecimiento de *M. phaseolina* se determinó por el crecimiento radial de la colonia fúngica por tres días en comparación con el testigo, que consistió en el crecimiento del hongo sin la presencia de antagonistas.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias de Tukey, con una confiabilidad de 0,05. Se usó un diseño completamente al azar. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico se calculó de acuerdo con la fórmula reportada por Lokesh y Benagi (2007).

$$I = \frac{C - T}{C} 100$$

donde:

I: Porcentaje de inhibición

C: Crecimiento en el testigo

T: Crecimientos en los tratamientos

Para su análisis los datos de porcentajes de inhibición se transformaron con la fórmula $\arcsin \sqrt{x}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de *M. phaseolina* en diferentes medios

El crecimiento radial de *Macrophomina phaseolina* en los diferentes medios fue entre 20 y 34,7 mm a las 48 h

de incubación (Tabla 1). No se observó diferencia significativa en el crecimiento de *M. phaseolina* en los dos medios que contienen PDA. Se observó diferencia significativa únicamente al utilizar solo PDA y AN. El crecimiento radial en medio TSA fue significativamente menor comparado con los otros medios utilizados. En todos los medios el crecimiento de *M. phaseolina* cubrió la superficie

del medio en la placa Petri a las 72 h, con excepción del crecimiento en TSA, donde no cubrió la totalidad de la superficie aun después de 144 h. Los resultados muestran que el crecimiento de *M. phaseolina* se observa en todos los medios de cultivos, pero solo en los que contienen PDA existió un desarrollo óptimo por la rapidez de crecimiento y coloración característica del hongo esporulado.

Tabla 1. Crecimiento radial de *M. phaseolina* a las 48 h de incubación a 30 °C en diferentes medios de cultivos

Medio de cultivo	pH del medio	Crecimiento radial (mm)
PDA	5,8	34,7 ± 2,5 a
AN:PDA	6,0	29,0 ± 1,0 ab
AN	7,0	2,3 ± 3,1 b
TSA	7,0	20,0 ± 3,0 c

PDA: Agar-papa-dextrosa.

AN: Agar nutritivo.

TSA: Agar-soya-tripticasa.

Medias con literales iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

Inhibición del crecimiento de *M. phaseolina* en diferentes medios de cultivos por cepas de *Bacillus* spp.

La confrontación tipo dual se realizó en los medios PDA, AN, TSA y mezcla de AN: PDA. En el caso del medio PDA, solo la cepa CBCK08 inhibió el crecimiento micelial de *M. phaseolina*, y fue esta la única cepa que mostró inhibición del crecimiento en todas los medios y mezcla utilizados (Tabla 2). En el caso de las demás cepas evaluadas no se observó inhibición del crecimiento o formación de halo de inhibición en el medio PDA. El crecimiento de *M. phaseolina* alcanzó la totalidad de la placa a las 72 h. Debido a la velocidad de crecimiento del hongo y a la falta de actividad de los antagonistas, el hongo sobrecreció a las cepas bacterianas; sin embargo, en la mezcla AN:PDA (2:1) se observó que las cepas CBCK03, CBCK05, CBCK12, CBCK16, y CBCK19 inhibieron el crecimiento de *M. phaseolina*, debido probablemente a que la mezcla contenía una relación mayor de AN, lo que favoreció el crecimiento bacteriano.

En el medio TSA todas las cepas inhibieron el crecimiento de *M. phaseolina* entre el 38,7 y el 59,9%. No hubo diferencia significativa en el porcentaje de inhibición causado por las cepas bacterianas. Este medio presenta una composición y pH óptimos para el crecimiento bacteriano, y en menor medida para el crecimiento de *M. phaseolina*. En las evaluaciones del medio AN, to-

das las cepas bacterianas inhibieron el crecimiento micelial del hongo entre el 47,3 y el 65,9 %, y las cepas CBCK12, CBCK16 y CBK19 mostraron una inhibición del crecimiento significativamente igual a la cepa CBKC08. Se observó contacto entre las cepas bacterianas y el hongo entre las 48 y 72 h. En todas las cepas bacterianas de los ensayos en AN se observó crecimiento de la bacteria sobre *M. phaseolina* en diferentes medidas.

El efecto de la composición del medio en el crecimiento de *M. phaseolina* fue observado por Afouda *et al.* (2001), quienes al evaluar 21 bacterias antagónicas observaron actividad antagónica de todas ellas cuando utilizaron medio TSA; pero solo tres cepas mostraron actividad en cuanto usaron los medios TSA, PDA y King B. Por otra parte, cuando se evaluó la capacidad antagónica de *B. cereus* y *B. subtilis* en medio AN, El-Hamshary *et al.* (2008) encontraron que las cepas no inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum*; sin embargo, las mismas cepas mostraron efecto significativo en el crecimiento del hongo cuando se utilizó medio agar King completo.

Un mecanismo de antibiosis en la inhibición del crecimiento puede deberse a la producción de metabolitos difusibles en el medio, El ensayo dual permite observar la producción de compuestos difusibles, ya que se observa una inhibición del crecimiento radial del hongo sin un contacto entre las cepas. Esto puede deberse a la

producción de enzimas hidrolíticas, como quitinasas y β -1-3-glucanasas [Prapagdee *et al.*, 2008], y de compuestos antibióticos que pueden difundirse por el medio que favorece la inhibición del crecimiento radial del hongo [Leifert *et al.*, 1994]. La composición del medio puede afectar la producción de metabolitos. Kumar *et al.* (2009) observaron una máxima producción de compuestos antifúngicos de *B. subtilis* en medio de caldo de soya tripticasa y una pobre producción en caldo nutritivo. La cepa CBCK08 produce metabolitos en medio de PDA,

lo que permite la inhibición del crecimiento de *M. phaseolina* en este medio de cultivo. Adicionalmente la cepa CBCK08 mostró tener actividad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Colletotrichum* sp. en porcentajes similares a los mostrados contra *M. phaseolina* en medio PDA (Tabla 3). La cepa inhibió a los fitopatógenos por competencia de espacio, así como por la producción de metabolitos difusibles en el medio, debido a la observación de halos de inhibición que no permitieron el contacto entre los microorganismos.

Tabla 2. Efecto de la composición del medio en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Macrophomina phaseolina* por cepas de *Bacillus* spp.

Cepa	Porcentaje de inhibición (%)			
	PDA	AN:PDA	TSA	AN
CBCK03	–	47,6 $\pm$ 10,9 ab	45,6 $\pm$ 9,1 a	52,6 $\pm$ 2,4 b
CBCK04	–	–	38,7 $\pm$ 9,5 a	47,3 $\pm$ 3,4 b
CBCK05	–	40,9 $\pm$ 3,7 bc	57,6 $\pm$ 10,7 a	51,4 $\pm$ 1,3 b
CBCK08	41,1 $\pm$ 7,3	60,5 $\pm$ 4,3 a	59,9 $\pm$ 4,8 a	65,5 $\pm$ 10,1 a
CBCK09	–	–	44,8 $\pm$ 4,4 a	48,9 $\pm$ 1,9 b
CBCK12	–	25,8 $\pm$ 9,4 c	48,5 $\pm$ 8,0 a	57,9 $\pm$ 5,0 ab
CBCK16	–	45,9 $\pm$ 8,2 ab	58,3 $\pm$ 5,9a	64,6 $\pm$ 4,4 a
CBCK19	–	55,6 $\pm$ 6,0 ab	53,3 $\pm$ 4,6 a	65,9 $\pm$ 4,3 a

–: No existió inhibición. El crecimiento del hongo fue superior al crecimiento bacteriano. Medias que comparten literales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

Tabla 3. Inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por la cepa *Bacillus* sp. CBCK 08 en medio PDA

Hongo	Días de incubación	Porcentaje de inhibición (%)	Medias de halo de inhibición (mm)
<i>M. phaseolina</i>	3	35,1 $\pm$ 1,8 a	4,3 $\pm$ 0,58 b
<i>Fusarium</i> sp.	8	33,6 $\pm$ 6,3 a	4,7 $\pm$ 0,58 ab
<i>Alternaria</i> sp.	11	32,4 $\pm$ 4,9 a	ND
<i>Colletotrichum</i> sp.	13	40,5 $\pm$ 3,5 a	6,5 $\pm$ 0,70 a

ND: No determinado. Medias con literales iguales dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

CONCLUSIONES

- Se aislaron ocho cepas de *Bacillus* spp. con actividad antagonica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* en medio AN.
- Las cepas CBCK03, CBCK05, CBCK12, CBCK16, y CBCK19 muestran antagonismo en mezcla de medio de AN-PDA.

- Se seleccionó a la cepa CBCK08 con potencial antagonista por su actividad antagónica mostrada en todos los medios utilizados.

REFERENCIAS

- Afouda, L.; K. Wydra; D. Schulz; G. Wolf: «Studies on Biological Control of Charcoal Rot of Cowpea (*Vigna unguiculata*), Caused by *Macrophomina phaseolina*, with Bacterial Antagonists. Tri-Trophic Interactions in the Rhizosphere», *IOBC/wprs Bulletin* 24 (1): 1-4, Francia, 2001.
- El-Hamshary, O. I. M.; S. EM. Abo-Aba; N. Awad; A. M. Gomaa: «Genetic Profile of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* Indigenous Isolates and Their Performance As Bio-Control Agent Against the Plant Pathogen *Fusarium oxysporum*», *Research Journal of Cell and Molecular Biology* 2 (2): 30-38, Turquía, 2008.
- Hernández, S.; M. H. Reyes; R. Rosales; N. Mayek: «Molecular Markers Associated with Resistenceto *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in Common Bean», *Journal of Plant Pathology* 91 (1): 163-170, Italia, 2009.
- Huang, C. J.; T. K. Wang; S. C. Chung; C. Y. Chen: «Identification of An Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9», *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38 (1): 82-88, Corea, 2005.
- Kim, P. I.; K. C. Chung: «Production of an Antifungal Protein for Control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908», *FEMS Microbiology Letters* 234: 177-183, Inglaterra, 2004.
- Knaak, N.; A. A. Rohr; L. M. Fiuza: «*In vitro* Effect of *Bacillus thuringiensis* Strains and Cry Proteins in Phytopathogenic Fungi of Paddy Rice-Field», *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 526-530, Brasil, 2007.
- Kumar, A.; P. Saini; J. N. Shrivastava: «Production of Peptide Antifungal Antibiotic and Biocontrol Activity of *Bacillus subtilis*», *Indian Journal of Experimental Biology* 47: 57-62, India, 2009.
- Leifert, C.; E. C. Morris; M. Waites Will: «Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue and Field Grown Plant: Reasons for Contaminations Problems *in vitro*», *Critical Reviews in Plant Sciences* 13 (2): 139-183, EE. UU., 1994.
- Lokesha, N. M.; V. L. Benagi: «Biocontrol Management of Pigeonpea Dry Root Caused by *Macrophomina phaseolina*. Karnataka», *Journal of Agricultural Sciences* 20: (1): 54-56, Inglaterra, 2007.
- Melentev, A. I.; P. Helisto; L. Y. Kuzmina; N. F. Galimzyanova; G. E. Aktuganov; T. Korpela: «Use of Antagonistic Bacilli for Biocontrol of Fungi Degrading Fresh Wood», *Applied Biochemistry and Microbiology* 42 (1): 70-75, EE. UU., 2006.
- Ohba, M.; K. Aizawa: «Insect Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Soils in Japan», *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 12-20, Holanda, 1986.
- Prapagdee, B.; C. Kuekulvong; S. Mongkolsuk: «Antifungal Potential of Extracellular Metabolite Produced by *Streptomyces hygroscopicus* Against Phytopathogenic Fungi», *International Journal of Biological Sciences* 4 (5): 330-337, Canadá, 2008.
- Rodas, B. A.; H. F. Magana; J. M. Tun; A. Reyes: «Antifungal Activity *in vitro* of Native *Bacillus* sp. Strains Against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid», *Research Journal of biological Sciences* 4 (9): 985-989, Pakistán, 2009.
- Singh, N.; P. Pandey; R. C. Dubey; D. K. Maheswari: «Biological Control of Root Rot Fungus *Macrophomina phaseolina* and Growth Enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by Rhizosphere Competent *Bacillus subtilis* BN1», *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (9): 1669-1679, EE. UU., 2008.
- Sneath, P. H. A.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, EE. UU., 1986, pp. 1104-1207.
- Sosa, L. A. I.; R. V. P. Álvarez; G. B. Borges; G. M. González; G. E. Ponce: «Evaluación del método de conservación en papel de filtro en dos cepas de *Bacillus subtilis* Cohn, mediante la actividad antagónica frente a *Rhizoctonia solani* Kühn», *Fitosanidad* 15 (1): 45-49, La Habana, 2011.
- Souto, G. I.; O. S. Correa; M. S. Montecchia; N. L. Kerber; N. L. Pucheu; M. Bachur; A. F. García: Genetic and Functional Characterization of a *Bacillus* sp. Strain Excreting Surfactin and Antifungal Metabolites Partially Identified As Iturin-Like Compounds», *Journal of Applied Microbiology* 97: 1247-1256, Inglaterra, 2004.
- Su, G.; S. O. Suh; R. W. Schneider; J. S. Russin: «Host Specialization in the Charcoal Rot Fungus *Macrophomina phaseolina*», *Phytopathology* 91: 120-126, EE. UU., 2001.
- Sun, J. B.; M. Peng; Y. G. Wang; P. J. Zhao; Q. Y. Xia: «Isolation and Characterization of Antagonistic Bacteria Against *Fusarium* Wilt and Induction of Defense Related Enzymes in Banana 0187», *African Journal of Microbiology Research* 5 (5): 509-515, Nigeria, 2011.
- Tendulkar, S. R.; Y. K. Saikumari; V. Patel; S. Raghotama; T. K. Munshi; P. Balaram; B. B. Chattoo: «Isolation, Purification and Characterization of an Antifungal Molecule Produced by *Bacillus licheniformis* BC98 and Its Effect on Phytopathogen *Magnaporthe grisea*», *Journal of applied microbiology* 103: 2331-2339, Inglaterra, 2007.