Diagnóstico

AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO *BACILLUS* ANTAGONISTAS DE *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

Yaritza Reinoso Pozo,[1] Luis Casadesús Romero,[1] Armando García Suárez,[2] Jorge Gutiérrez Pérez[1] y Victoria Pazos Álvarez-Rivera[1]

[1] *Facultad de Biología, Departamento de Microbiología y Virología. Calle 25 no. 455 e/ I y J, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, CP 10400, yreinoso@fbio.uh.cu*

[2] *Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Ayuntamiento 231 e/ Lombillo y San Pedro, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, CP 10400*

RESUMEN

Se aislaron bacterias de suelo pertenecientes al género Bacillus *y se determinó, por el método de difusión en agar, el efecto inhibitorio que ellas pudieran tener* in vitro *sobre el crecimiento de* Pectobacterium carotovorum*, agente causal de la pudrición blanda de la papa. Las cepas aisladas que mostraron efecto antagónico se identificaron hasta especie mediante pruebas bioquímicas convencionales. Se obtuvo un total de 98 cepas bacterianas, de las cuales solamente siete inhibieron el crecimiento de al menos una de las cepas de* P. carotovorum *analizadas. Las cepas B1 y B9 se identificaron como* Bacillus licheniformis*, las B4 y B10 como* Paenibacillus polymyxa*, y la B2 como* Brevibacillus laterosporus*, mientras que las cepas B6 y B8 se reportan en este estudio como* Bacillus *sp. La cepa B2 resultó la mejor candidata como agente de control biológico por la actividad antagónica mostrada frente a todas las cepas de* P. carotovorum *utilizadas en este estudio.*

Palabras clave: *Pectobacterium carotovorum, Bacillus, control biológico, papa*

ABSTRACT

Soil bacterias belonging to the genera Bacillus *were isolated and screened for antagonism* in vitro *against* Pectobacterium carotovorum*, causal agent of potato soft rot, using the diffusion in agar method. The isolated strains that showed antagonistic effect were identified until species by means of conventional biochemical tests. A total of 98 bacterial strains were obtained, so only seven of them inhibited growth of at least one of the* P. carotovorum *strains analyzed. B1 and B9 strains were identified as* Bacillus licheniformis*, B4 and B10 as* Paenibacillus polymyxa *and B2 as* Brevibacillus laterosporus*; while B6 and B8 strains were reported in this study as* Bacillus *sp. Strain B2 was the best aspirant for biological control agent due to the antagonistic activity shown against all the* P. carotovorum *strains used in this study.*

Key words: *Pectobacterium carotovorum, Bacillus, biological control, potato*

INTRODUCCIÓN

P*ectobacterium carotovorum*, antiguamente *Erwinia carotovora* sub. *carotovora,* es una bacteria fitopatógena que causa la pudrición blanda. Esta enfermedad se presenta en regiones subtropicales y templadas en una amplia variedad de cultivos tales como zanahoria (*Daucus carota* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), chicoria (*Cichorium intybus* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.). En este último caso es una de las enfermedades poscosecha más severas en el mundo [Toth *et al.*, 2003].

La pudrición blanda puede ocurrir durante el almacenamiento de los tubérculos de papa, así como en el suelo antes de la cosecha, y por la utilización de tubérculos-semillas contaminados que se deterioran después de la siembra [Kucharek y Bartz, 2000].

El control de este patógeno se dificulta mucho debido a que se disemina a través del agua de riego, sobrevive en la maquinaria agrícola y en los restos de cosechas infestadas. Otra opción adoptada por los agricultores, en aras de prevenir la enfermedad, es la desinfección del material de trabajo con sustancias químicas, el tratamiento de las aguas de riego con luz UV, y el de los cultivos con antibióticos y otras sustancias químicas [Pérombelon y Salmond, 1995].

La aplicación sistemática de productos químicos en la agricultura implica algunas dificultades como el resurgimiento de plagas primarias y secundarias, el desarrollo de resistencia genética, la contaminación del medio ambiente y afectaciones a la salud humana. Muchos de estos productos provocan daños irreparables sobre

el sistema nervioso central, y otros están clasificados como *carcinogénicos* [Pérez, 2004].

La utilización de microorganismos en el control biológico de enfermedades de las plantas constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos. Entre los agentes de control biológico más estudiados se encuentran los microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* [Whipps, 2001].

Las especies del género *Bacillus* poseen características especiales que los hacen buenos candidatos como agentes de control biológico. Su utilización para el biocontrol de las enfermedades de las plantas es de gran interés, debido a la capacidad que presentan estas bacterias para producir antibióticos y otras sustancias con capacidad antibacteriana y antifúngica que impiden el establecimiento de patógenos vegetales. Entre las especies más utilizadas con este propósito se encuentran *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumillas* y *B. polymyxa*. El rápido crecimiento que muestran estas bacterias en cultivo líquido, la formación de endosporas resistentes al calor y la desecación, y la producción de metabolitos secundarios son características que permiten considerar a estos microorganismos como potenciales agentes de control biológico [Shoda, 2000].

El presente trabajo tuvo como objetivos aislar del suelo bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, determinar el efecto antagónico *in vitro* de los aislados frente a diferentes cepas de *Pectobacterium carotovorum* e identificar hasta especie las cepas antagonistas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material biológico se utilizó la cepa *Pectobacterium carotovorum* 2046, perteneciente a la colección de bacterias fitopatógenas de la Facultad de Biología, además de las cepas 2a1, 2a2, 3b y 10c, aisladas en el Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal a partir de tubérculos-semillas de la variedad Spunta, procedentes de Holanda, las que se mantuvieron en medio GYCA (glucosa, extracto de levadura, carbonato de calcio, agar).

Se colectaron muestras de suelo con un peso aproximado de 100 g procedentes de regiones paperas del municipio de Güines, de la provincia de La Habana, las que se colocaron en bolsas de plástico para trasladarlas al laboratorio y conservaron en un lugar fresco hasta su utilización.

El aislamiento de bacterias del género *Bacillus* se llevó a cabo por medio de la resuspensión aséptica de 1 g de tierra en 100 mL de agua destilada estéril, con agitación vigorosa por 30 s, después de realizarles diluciones seriadas hasta 10^3 y someterlas a un tratamiento térmico de 85ºC durante 10 min en baño de agua; se tomó 0,1 mL de la dilución tratada que se sembró con espátula de Drigalsky en placas con medio de agar nutriente e incubadas durante 72 h a 28ºC para después realizarles el conteo de las colonias de distinta apariencia. Se tomó una muestra representativa de cada colonia para realizarle una tinción simple con violeta cristal y observar al microscopio (Motic), con un aumento de 1000X. Aquellas colonias que mostraron presencia de endospora bacteriana pasaron a una subcultivación en agar nutriente durante 24 h a 28ºC para efectuar la prueba de la catalasa a fin de ubicarlas en el género *Bacillus*. Los aislamientos que resultaron positivos a la catalasa se conservaron en frascos de agar nutriente a 4ºC hasta su posterior uso.

El efecto antagónico *in vitro* se determinó por el método de difusión en agar, a partir de la inoculación de 25 mL de medio agar nutriente fundido a 45ºC, con una suspensión de *P. carotovorum* correspondiente a un valor de 0,5 en la escala de Mac Farland. El medio se vertió en placas y, una vez solidificado, se le colocaron ponches de agar de 7 mm de diámetro, con las cepas de *Bacillus* crecidas durante 72 h. Las placas se incubaron a 28ºC para medir, a las 24 h, el halo de inhibición alrededor de los ponches. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Las cepas antagonistas se identificaron según las pruebas fisiológicas y bioquímicas descritas para las especies del género *Bacillus* por Sneath (1986). Las pruebas y metodologías empleadas fueron crecimiento en los medios 1, 2 y 3 para observar el metabolismo de la glucosa, utilización de D-xilosa, L-manitol y maltosa, hidrólisis del almidón y la gelatina, crecimiento en agar nutriente suplementado con NaCl (7%), agar citrato y agar anaerobio. Las pruebas se realizaron dos veces por duplicado, con la cepa *Bacillus subtilis* S231P utilizada como control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del método de aislamiento descrito se obtuvieron 112 diferentes colonias de las distintas muestras de suelo, de las cuales solamente 98 cepas presentaron endospora bacteriana al realizar observaciones al

microscopio óptico, y resultaron ser catalasas positivas, por lo que se ubicaron presuntamente en el género *Bacillus.*

Las especies de *Bacillus* son ubicuas en la naturaleza y se encuentran en mayor proporción en los suelos, por lo que resulta de gran utilidad usar muestras de este tipo como fuente de inóculo para aislar cepas de este género. De forma semejante Földes *et al.* (2000) consideran muy apropiadas las técnicas donde se considere la termorresistencia de las endosporas bacterianas en los aislamientos de *Bacillus* del suelo, con fines de control biológico de patógenos del suelo que afectan las raíces y la germinación de las semillas, similares a las utilizadas en este trabajo.

Los resultados de las pruebas de antagonismo *in vitro* de las cepas de *Bacillus* aisladas frente a las cepas de referencia mostraron que solo siete tuvieron actividad antagónica, al menos frente a una de las cepas de *Pcarotovorum*, las cuales se clasificaron como B1, B2, B4, B6, B8, B9 y B10 hasta su posterior identificación (*Tabla 1*).

Tabla 1. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Bacillus* frente a cepas de *P. carotovorum*. Halo de inhibición alrededor de los ponches (mm)

Cepas	B1	B2	B4	B6	B8	B9	B10
2a1	<10 mm	>15mm	<10 mm	No Inh	No Inh	No Inh	<10 mm
2a2	<10 mm	>15mm	<10 mm	<10 mm	>15mm	No Inh	10-15 mm
2046	<10 mm	>15mm	<10 mm	<10 mm	<10 mm	<10 mm	<10 mm
3b	<10 mm	>15mm	<10 mm	10-15 mm	10-15 mm	<10 mm	<10 mm
10c	<10 mm	>15mm	10-15 mm	No inh	<10 mm	<10 mm	10-15 mm

No inh: No inhibición del crecimiento.

Las cepas B1, B2, B4 y B10 inhibieron el crecimiento de todas las cepas de *P. carotovorum* utilizadas. Las B6, B8 y B9 no mostraron efecto antagónico frente a la cepa 2a1, así como tampoco B6 y B9 afectaron el crecimiento de las cepas 10c y 2a2, respectivamente. La cepa antagonista B2 presentó una potente actividad antagónica frente a todas las cepas fitopatógenas, y logró, en todos los casos, los mayores halos de inhibición.

La diferente sensibilidad que muestran las cepas de *P. carotovorum* ante los aislados antagonistas de *Bacillus* se puede explicar por el hecho de que existe, sorprendentemente, una gran diversidad fenotípica, bioquímica, serológica y genética entre los miembros de una misma especie, lo cual se ha reportado con anterioridad por Yap *et al.* (2004). A su vez esta gran diversidad pudiera tener relación con el amplio rango hospedero que presenta esta bacteria fitopatógena.

Los resultados de este estudio son similares a otros obtenidos anteriormente. Sharga y Lyon (1998) lograron inhibir *in vitro* el crecimiento de *P. carotovorum* y *P. atrosepticum* mediante la utilización de una cepa de *Bacillus subtilis* productora de antibiótico, mientras que Abdel-Alim *et al.* (2001) tuvieron resultados semejantes al utilizar una cepa de la misma especie que inhibió el crecimiento de *P. carotovorum.*

En las pruebas de identificación (*Tabla 2*) las cepas B1 y B9 se corresponden con la especie *Bacillus licheniformis*. Esta bacteria se reporta como productora de antibióticos de naturaleza polipeptídica, del tipo bacteriocinas, que afectan generalmente a bacterias gram positivas [Marahiel *et al.*, 1993; Huck *et al.*, 1991] y hongos fitopatógenos [Montealegre *et al.*, 2003] y que pudieran ser responsables del efecto inhibitorio que presenta esta cepa frente a *P. carotovorum in vitro*; sin embargo, la literatura consultada no refiere publicación alguna donde se reflejen resultados similares a los de este estudio. Por otra parte, se han evaluado las potencialidades de *B. licheniformis* como biofertilizante debido a la capacidad de colonizar las raíces e incorporarse a la comunidad microbiana de la planta que presentan algunas cepas [Lucas, 2004], lo cual sugiere que las cepas B1 y B9 podrían emplearse en la preparación de un bioproducto aplicable en el suelo.

Las características morfológicas de la cepa B2 se corresponden con *Bacillus laterosporus*, bacteria reubicada taxonómicamente como *Brevibacillus laterosporus*. Esta bacteria se caracteriza por formar inclusiones parasporales en forma de canoa, adyacentes a la endospora bacteriana. Se ha utilizado como agente de control biológico de insectos con un amplio espectro de

actividades biológicas en comparación con *B. thuringiensis* y *B. sphaericus*. Presenta toxicidad frente a larvas de mosquito *Aedes ageypti* y *Culex quinquifasciatus*, y algunas cepas producen sustancias de interés clínico [De Oliveira *et al.*, 2004]. Produce laterosporina, antibiótico que pudiera ser responsable del efecto antagónico de la cepa B2 [Todar, 2003]; sin embargo, no existen registros acerca del uso de esta especie como biocontrolador de microorganismos fitopatógenos, lo que pudiera deberse a que es muy poco frecuente en el suelo en las diferentes regiones de las plantas.

Tabla 2. Resultados de la identificación de los aislados antagonistas

Pruebas	B1	B2	B4	B6	B8	B9	B10
Medio-1	+	+	+	+	+	+	+
Medio-2	–	–	+	–	–	–	+
Medio-3	+	–	+	–	–	+	+
Xilosa	+	–	+	–	–	+	+
Manitol	+	–	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	–	+	+
Utilización de citrato	+	–	–	–	+	+	–
Crecimiento NaCl 7%	+	–	–	+	–	+	–
Hidrólisis almidón	+	–	+	+	–	+	+
Hidrólisis gelatina	d	d	d	+	+	+	+
Crecimiento agar anaerobio	+	+	+	+	+	+	+

+: Positivo –: Negativo *d*: Dudoso.

Los resultados en la identificación de las cepas B4 y B10 se corresponden con las características de la especie *B. polymyxa*, reclasificada como *Paenibacillus polymyxa*. Esta bacteria es muy común en el suelo y se reporta como productora de péptidos antifúngicos con potencialidades para el biocontrol de algunos hongos [Kharbanda, 2003]. Pertenece al grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, y se ha demostrado que algunas cepas participan en la solubilización del fósforo, la fijación del nitrógeno, la producción de antibióticos como la polymixina y la producción de enzimas hidrolíticas. Se demostró además que en un sistema gnotobiótico con la planta *Arabidopsis thaliana*, la inoculación de *B. polymyxa* protege contra *P. carotovorum* mediante la inducción de resistencia sistémica [Timmusk, 2003].

Los resultados de la identificación de las cepas B6 y B8 no son concluyentes, y es necesario en estos casos el uso de otras pruebas para lograr una identificación definitiva, por lo que se clasifican como *Bacillus* sp.

CONCLUSIONES

- Se aislaron siete cepas pertenecientes al género *Bacillus* con actividad antagónica frente a *Pectobacterium carotovorum*, agente causal de la pudrición blanda.
- Las cepas B1 y B9 se identificaron como *Bacillus licheniformis*, las B4 y B10 como *Paenibacillus polymyxa*, y la cepa B2 como *Brevibacillus laterosporus*, mientras que las B6 y B8 se reportan en este estudio como *Bacillus* sp.
- La cepa B2 resultó la más promisoria como futuro agente de control.

REFERENCIAS

Abdel-Alim, A.; M. Mikhail; P. Laux; W. Zeller: «Biological Control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on Potatoes by Fluorescent Pseudomonads and *Bacillus subtilis*», *IOBC Wprs Bulletin* 25:139-144, 2001.

Földes, T.; I. Banhegyi; Z. Varga; J. Szageti: «Isolation of Bacillus Strains from the Rhizosphere of Cereals and in Vitro Screening for Antagonism Against Phytopathogenic, Food-Borne Pathogenic and Spoilage Microorganisms», *Journal of Applied Microbiology* 89:840-845, 2000.

Huck, T.; N. Porter; M. Bushell: «Positive Selection of Antibiotic Producing Soil Isolates», *Journal of General Microbiology* 137:2321-2329, 1991.

Justo de Oliveira, E.; L. Ravinivitch; R. Gomes; L. Konovaloff; J. Passos; V. Zahner: «Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and Its Potential Use in Biological Control», *Applied and Environmental Microbiology* 70:6657-6664, 2004.

Kharbanda, D.: «*Paenibacillus polymyxa* Strain ATCC 202127 for Biocontrol of Bacteria and Fungi», Patent 6602500, Estados Unidos, 2003.

Kucharek, T.; J. Bartz: «Bacterial Soft Rot of Vegetables and Agronomic Crops», *Plant Pathology Fact Sheet* 2:12-18, 2000.

Lucas, A.:«Effect of Inoculation of *Bacillus licheniformis* on Tomato and Pepper», *Agronomie* 24:169-176, 2004.

Marahiel, M.; M. Nakano; P. Zabar: «Regulation of Peptide Antibiotic Production in Bacillus», *Molecular Microbiology* 7:631-636, 1993.

Montealegre, J.; R. Reyes; L. Pérez; R. Herrera; P. Silva; X. Besoain: «Selection of Bioantagonistic Bacteria to Be Used in Biological Control of *Rhizoctonia solani* in Tomato», *Electronic Jounal of Biotechnology* 6(2), 2003.

Pérez, N.: «Control biológico de patógenos vegetales», *Manejo ecológico de plagas*, cap. 7, Ed. Agustín García, 231-247, 2004.

Pérombelon, M.; G. Salmond: «Bacterial Soft Rots», *Pathogenesis and Host Specificity in Planta Diseases*, vol. 1, Prokariotes, Oxford, Pergamon, Inglaterra, 1995, pp. 1-20.

Sharga, B.; G. Lyon: «*Bacillus subtilis* BS 107 As an Antagonist of Potato Blackleg and Soft Rot Bacteria», *Canadian Journal of Microbiology* 44:777-783, 1998.

Shoda, M.: «Bacterial Control of Plant Diseases», *Journal of Bioscience and Bioingeniery* 89:515-521, 2000.

Sneath, P. H. A.: «Section 13: Endospore-Forming Gram-Positive Rods and Cocci», *Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams & Wilkins, 1986, pp.1104-1207.

Timmusk, S.: «Mechanism of Action of the Plant Growth Promoting Bacterium *Paenibacillus polymyxa*», Commprehensive Summaries of Uppsala Disertations from the Faculty of Science and Technology, 2003.

Todar, K.: *The Genus Bacillus*, Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, 2003.

Toth, I.; K. Bell; M. Choleva; P. Birch: «Soft Rot Erwiniae: from Genes to Genomes», *Molecular Plant Pathology* 4:17-30, 2003.

Whipps, J.: «Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere», *Journal of Experimental Botany* 52:487-511, 2001.

Yap, M.; J. Barak; A. Charkowsk: «Genimic Diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and Its Correlation with Virulence», *Applied and Environmental Microbiology* 70:3013-3023, 2004.