# ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE *BACILLUS* SPP. SOBRE EL DESARROLLO DE LA PUDRICIÓN BLANDA DE LA PAPA (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)

Yaritza Reinoso Pozo,[1] Luis Casadesús Romero,[1] Armando García Suárez,[2] Ernesto García 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

*La pudrición blanda bacteriana, causada por* Pectobacterium carotovorum*, ocurre en una amplia variedad de cultivos y es una de las más severas enfermedades poscosecha de la papa (*Solanum tuberosum *L.) en el mundo entero. El control de esta enfermedad se basa fundamentalmente en la aplicación de químicos que contaminan el medio ambiente y deterioran la salud humana. Una de las alternativas ecológicas adoptadas es el uso de microorganismos como agentes de control biológico, entre los que se encuentran los miembros del género* Bacillus*. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto protector de 23 cepas de* Bacillus *sp. sobre el desarrollo de la pudrición blanda de la papa. Para ello se trataron rodajas de papa con cultivos bacterianos de 24 h y posteriormente se inocularon con una cepa de* P. carotovorum *a dos concentraciones diferentes. Las rodajas se mantuvieron durante 24 h en condiciones de temperatura y humedad favorables para el desarrollo de la pudrición. Transcurrido este tiempo se evaluó la efectividad de los tratamientos respecto a los controles no tratados, y se tuvo en cuenta la aparición o no de los síntomas característicos de la enfermedad. Las cepas G15, G19 y G25 solamente tuvieron efecto protector en las rodajas tratadas con la menor concentración de* P. carotovorum*, mientras que B1, G10, Q7 y Q18 inhibieron el desarrollo de la pudrición en las dos variantes analizadas. El resto de las cepas estudiadas no mostró protección, y en algunos casos se observó un incremento en la severidad de las lesiones.*

Palabras claves: *Bacillus, control biológico, Pectobacterium carotovorum, Solanum tuberosum*

## ABSTRACT

*Bacterial soft rot, caused by* Pectobacterium carotovorum*, happens in a wide variety of cultivations and it is one of the most severe postharvest diseases of potato (*Solanum tuberosum *L.) in the world. The control is based fundamentally on the application of chemical products that contaminate the environment and deteriorate human health. One of the ecological alternatives adopted in this sense is the use of microorganisms as biological control agents, the members of genera* Bacillus *are among them. The objective of the present work was to determine the protective effect of 23* Bacillus *sp. strains on the development of the potato soft rot. Potato slices were treated with 24 h growth bacterial cultures and were inoculated with a strain of* P. carotovorum*, using two different concentrations. The slices stayed during 24 h in conditions of temperature and favourable humidity for the development of the soft rot. Lapsed this time the effectiveness of the treatments was evaluated in comparison with non treated controls observing the appearance or not of disease characteristic symptoms. G15, G19 and G25 strains only had protective effect in the slices tried with the smallest concentration of* P. carotovorum*. While B1, G10, Q7 and Q18 inhibited soft rot development in two analyzed variants. The rest of the studied strains did not show protection, so an increment in lesions severity was observed in some cases.*

Key words: *Bacillus, biological control, Pectobacterium carotovorum, Solanum tuberosum*

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) ocupa el cuarto lugar entre los diez cultivos de mayor importancia en el mundo, superada únicamente por el trigo, el arroz y el maíz. Su producción anual asciende a más de doscientos millones de toneladas que repercuten en la alimentación de gran parte de la población mundial [Estévez *et al.*, 2001]. En la producción de papa el cultivo puede afectarse por una serie de factores bióticos y abióticos que disminuyen el rendimiento y calidad de las cosechas, en especial por la presencia de daños en los tubérculos. Los factores bióticos de mayor importancia son la presencia de plagas y enfermedades que generan elevados costos de manejo y control [Gregory y Andrade, 1996].

Las condiciones tropicales y húmedas resultan poco favorables para el cultivo de la papa debido a que es propenso a infectarse con numerosos microorganismos patógenos fúngicos y bacterianos, además de las dificultades que se presentan para conservar los tubércu-

los. Las enfermedades bacterianas de la papa provocan generalmente pudriciones húmedas y pueden ser originadas por microorganismos pertenecientes a variados géneros [MINAGRI, 2000]. En Cuba la pudrición blanda, causada por *Pectobacterium carotovorum*, *Dickeya chrysanthemi* y *Pectobacterium atrosepticum*, es una de las enfermedades bacterianas que se presenta con mayor incidencia en el campo, y las pérdidas durante el almacenamiento de los tubérculos son considerables [Galán, 2004].

El control de estos patógenos se dificulta mucho debido a que la enfermedad se puede presentar en diferentes etapas del desarrollo de la planta. Estas bacterias además pueden sobrevivir en el suelo, el agua de riego y la maquinaria agrícola. Por el momento el control de la calidad fitosanitaria de los tubérculos-semilla y la aplicación de productos químicos son medidas que contribuyen a disminuir los daños [Galán, 2004].

Actualmente se aboga por el uso de prácticas agrícolas ecológicas como el control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas, los cuales pueden limitar la iniciación y propagación de las enfermedades causadas por patógenos vegetales mediante mecanismos de competencia, antibiosis, inducción de resistencia, entre otros [Fernández-Larrea, 2001].

Varias especies de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Brevibacillus* producen sustancias antimicrobianas, de las cuales se han descrito más de de setenta antibióticos de bajo peso molecular y naturaleza polipeptídica, entre las cuales *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. cereus*, *Brevibacillus laterosporus* y *Paenibacillus polymyxa* son los mayores productores. Los metabolitos secundarios producidos por algunas de estas especies inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, por lo que se ha sugerido su uso como un método suplementario para la protección de las plantas contra microorganismos fitopatógenos [Földes *et al*., 2000].

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto protector de diferentes cepas del género *Bacillus* sobre el desarrollo de la pudrición blanda de la papa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron como material biológico 23 cepas del género *Bacillus* conservadas en agar nutriente (Biocen) y aisladas de suelos procedentes de regiones paperas de diferentes municipios de la provincia de La Habana (*Tabla 1*). Estas cepas se seleccionaron en consideración a su actividad antagónica *in vitro* frente a cepas de *Pectobacterium carotovorum*, *Dickeya chrysanthemi* y *Pectobacterium atrosepticum* (datos no publicados). Se empleó además la cepa *P. carotovorum* 2046 conservada en medio GYCA (glucosa, extracto de levadura, carbonato de calcio, agar).

**Tabla 1. Procedencia de las cepas del género *Bacillus* utilizadas**

| Cepas | Procedencia | Cepas | Procedencia |
|---|---|---|---|
| G1 | Municipio de Güines | G29 | Municipio de Güines |
| G2 | Municipio de Güines | G30 | Municipio de Güines |
| G10 | Municipio de Güines | Q6 | Municipio de Quivicán |
| G11 | Municipio de Güines | Q7 | Municipio de Quivicán |
| G12 | Municipio de Güines | Q12 | Municipio de Quivicán |
| G14 | Municipio de Güines | Q13 | Municipio de Quivicán |
| G15 | Municipio de Güines | Q18 | Municipio de Quivicán |
| G17 | Municipio de Güines | S1 | Municipio de San José |
| G18 | Municipio de Güines | B1 | Municipio de Güines |
| G29 | Municipio de Güines | B2 | Municipio de Güines |
| G23 | Municipio de Güines | B4 | Municipio de Güines |
| G25 | Municipio de Güines | | |

Para el crecimiento de las especies del género *Bacillus* se utilizaron frascos erlenmeyers de 1 L de capacidad con 100 mL de medio caldo nutriente (Biocen). Los frascos se inocularon con una suspensión bacteriana correspondiente a un valor de 0,5 en la escala de Mac Farland ($1 \times 10^8$ ufc/mL) preparada a partir de cultivos de 24 h de crecimiento en agar nutriente. Los cultivos se colocaron en zaranda orbital termostatada durante 24 h a 30°C y 120 rpm.

El inóculo de *P. carotovorum* se obtuvo a partir de cultivos de 24 h de la bacteria fitopatógena en medio GYCA. Con agua destilada estéril se prepararon suspensiones ajustadas a un valor de densidad óptica de 0,05 y 0,1 respectivamente, a una longitud de onda de 580 nm.

Tubérculos-semilla certificados de la variedad Spunta procedentes de Holanda se desinfectaron superficialmente con alcohol 70%, luego se sumergieron en hipoclorito de sodio a 3% durante 3 min, se lavaron con abundante agua destilada estéril y se colocaron en un flujo laminar durante 1 h. Rodajas de papa de 1 cm de grosor se sumergieron durante 1 min en los cultivos de *Bacillus* spp. Las rodajas tratadas se colocaron en el flujo laminar durante 30 min para eliminar la humedad superficial. Posteriormente se inocularon con 10 µL de las suspensiones preparadas de la cepa *Pectobacterium carotovorum* 2046. Cada rodaja se inoculó en tres puntos diferentes, y se emplearon como controles rodajas sin tratar inoculadas con la bacteria fitopatógena y previamente sumergidas en agua destilada estéril y rodajas tratadas con cultivos de *Bacillus* spp. sin inocular. Se utilizaron seis rodajas por tratamiento y se colocaron en placas Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril y se incubaron a 30°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se determinó la efectividad de los tratamientos mediante inspección visual y observación de la aparición o no de síntomas característicos de la enfermedad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El control biológico de *P. carotovorum* mediante especies de microorganismos antagonistas se ha estudiado por varios grupos de investigación debido al amplio rango hospedero y a la gran importancia económica que poseen los cultivos que esta bacteria puede afectar. Se han utilizado como alternativas el empleo de *Erwinia herbicola* [Vanneste *et al*., 1995], *Pseudomonas fluorescens* [Abdel-Alim *et al*., 2001] y *Trichoderma hamatum* [Blom, 2001]; sin embargo, los resultados más promisorios han sido *in vitro* e *in vivo*, con especies del género *Bacillus* productores de sustancias con actividad antibacteriana [Bernal *et al*., 2002] [Sharga y Lyon, 1998] [Abdel-Alim *et al*., 2001].

En el estudio realizado el tratamiento de las rodajas de papa con las cepas B1, G10, Q7 y Q18 previno totalmente el desarrollo de la pudrición blanda en todas las variantes del experimento (*Fig. 1*).

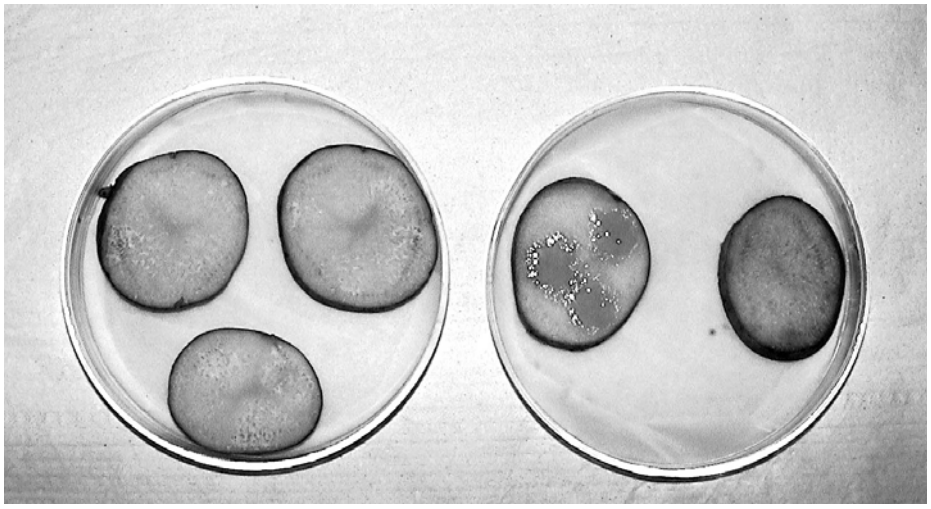

*Figura 1.* Efecto protector de la cepa G10 en rodajas de papa inoculadas con la mayor concentración de la cepa *P. carotovorum* 2046. A la derecha se muestran los controles de *P. carotovorum* 2046 y G10.

En experimentos realizados por otros autores se han producido resultados similares. Tal es el caso de Sharga y Lyon (1998), quienes emplearon una cepa de *Bacillus subtilis* productora de antibióticos para tratar rodajas de papa y raíces de la planta, con el objetivo de inhibir el desarrollo de la pudrición blanda ocasionada por *P. carotovorum* y *P. atrosepticum*. Estos autores solamente emplearon en los tratamientos suspensiones de la cepa

antagonista preparadas con agua y no los cultivos líquidos como en este trabajo. Es por esto quizás que solamente hubo resultados positivos, que se traducen en la disminución de la severidad de las lesiones cuando emplearon una alta concentración de *Bacillus subtilis*, mientras que en este estudio se pudo evitar completamente la aparición de lesiones características de la pudrición blanda con las cepas antes mencionadas, lo cual pudiera deberse a la acción antibacteriana de los metabolitos producidos por estos aislados bacterianos que son excretados al medio de cultivo.

Las cepas B2, G15 y G25 solamente mostraron efecto protector en aquellas rodajas inoculadas con la menor concentración de *P. carotovorum* (*Fig. 2*). Esta diferencia respecto a los resultados con las cepas B1, G10, Q7 y Q18 puede estar relacionada con la producción de metabolitos antibacterianos de menor actividad biológica inhibitoria, cuya acción se ve limitada por la densidad de bacterias fitopatógenas presentes en el medio al que son vertidos. También es posible que la producción de estos compuestos en las cepas antes mencionadas comience en etapas más tardías del crecimiento, por lo que en el momento de tratar las rodajas sus concentraciones en el medio de cultivo no son suficientes como para lograr un efecto igual al obtenido con B1, G10, Q7 y Q18. De hecho se plantea que la producción de sustancias con actividad antimicrobiana por parte de especies del género *Bacillus* está muy relacionada con la fase estacionaria del crecimiento microbiano y en particular con la etapa de esporulación [Schallmey *et al.*, 2004].

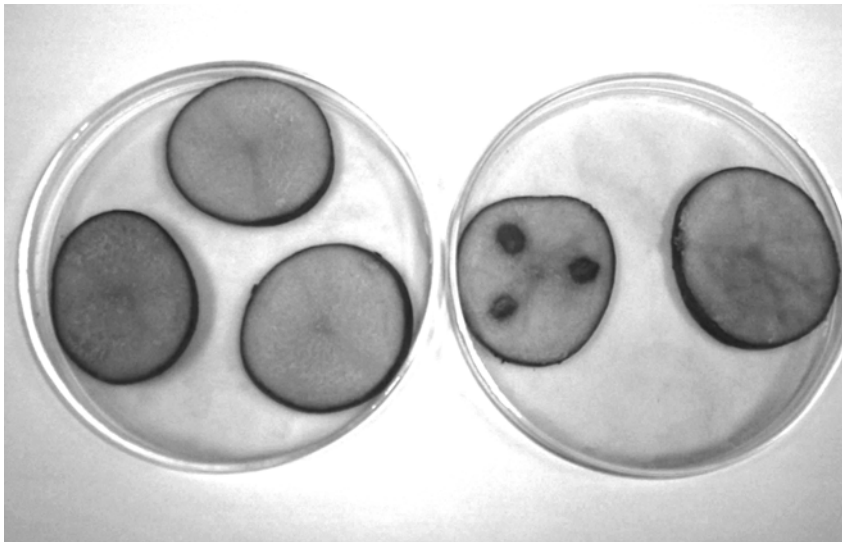

*Figura 2*. Efecto protector de la cepa B2 en rodajas de papa inoculadas con la menor concentración de la cepa *P. carotovorum* 2046. A la derecha se muestran los controles de *P. carotovorum* 2046 y B2.

El resto de las cepas de *Bacillus* spp. estudiadas no inhibieron el desarrollo de la pudrición blanda. Algunas como G11, G12 y G14 provocaron cambios de coloración de color beis a pardo oscuro en las rodajas tratadas, aunque no se observaron síntomas de pudrición blanda. La cepa B4 produjo modificaciones drásticas en las rodajas tratadas y el control; se observaron cambios de color de beis a marrón con presencia de fetidez y una gran maceración del tejido del tubérculo. Con anterioridad otros autores han aislado algunas especies del género *Bacillus*, productoras de enzimas pectinolíticas y proteolíticas, causantes de la pudrición blanda en algunos cultivos [US EPA, 1997] [Kararah *et al.*, 1985].

## CONCLUSIONES

- Las cepas B1, G10, Q7 y Q18 inhibieron el desarrollo de la pudrición blanda en las rodajas inoculadas con ambas concentraciones de *P. carotovorum* utilizadas.
- Las cepas B2, G15 y G25 solamente tuvieron efecto protector en las rodajas inoculadas con la menor concentración de *P. carotovorum*.
- La cepa B4 produjo un incremento en la severidad de los síntomas de la enfermedad.

## 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.

Bernal, G.; A. Illanes; L. Campi: «Isolation and Partial Purification of a Metabolite from a Mutant Strain of *Bacillus* sp. with Antibiotic Activity Against Plant Pathogenic Agents», *Electronic Journal of Biotechnology* (online), vol. 5, no. 1, 2002. Disponible en http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue1/full/4/index.html#12

Blom, T. J.: «Studies on the Epidemiology of *Erwinia* Soft-Rot and Their Control in Ornamental Crops», Special Research Program, Canada Ministry of Agriculture and Food, 2003, pp. 24-27.

Estévez, A.; M. González; M. Hernández; J. Castillo; O. Moré; M. Cordero: «Estrategia para el desarrollo del mejoramiento de la papa», *Granma Ciencia* 5:21-30, 2001.

Fernández-Larrea, O.: «Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario», *Manejo Integrado de plagas* 62:96-100, 2001.

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

Galán, I.: «*Bacillus* spp., antagonistas de las bacterias de podredumbre blanda de la papa». Tesis de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2004.

Gregory, P.; H. Andrade: «Principales enfermedades, nematodos e insectos de la papa», CIP, 1996.

Kararah, M.; F. Barakat; M. Mikhail; H. Fouly: «Pathophysiology in Garlic Cloves Inoculated with *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumillus* and *Erwinia carotovora*», *Egyptian Journal of Phyopathology* 17:131-140, 1985.

Ministerio de la Agricultura: «Guía técnica para la producción de papa en Cuba» Instituto de Investigación Hortícolas Liliana Dimitrova, 2000, pp. 1-37.

Schallmey, M.; A. Singh; O. Ward: «Development in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production», *Canadian Journal of Microbiology* 50:1-17, 2004.

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.

US EPA: «Final Risk Assessment of *Bacillus subtilis*», www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/pdf/fra009.pdf, 1997.

Vanneste, J.; J. Perry; L. Perry-Meyer; R. Bedford: «*Erwinia herbicola* Eh252 as a Biological Control Agent of Bacterial Soft Rot on Potatoes», *NZPPS Paper* 12:13-16, 1995.