

ARTÍCULO ORIGINAL

Actividad antagonica *in vitro* de *Bacillus* spp. frente a *Macrophomina phaseolina* y *Bipolaris* sp.***In vitro* antagonistic activity of *Bacillus* spp. against *Macrophomina phaseolina* and *Bipolaris* sp.**

✉ Bertha Carreras Solis*, ✉ Yaremis Ulloa Martin, ✉ Dianelis de la Caridad Hernández Pérez

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal Calle 110, No. 514 e/5taB y 5taF. Playa, La Habana, Cuba

*Autor para correspondencia: Bertha Carreras Solis, E-mail: berthacarreras2014@gmail.com**Resumen**

La búsqueda de alternativas sostenibles al control químico de enfermedades vegetales es crucial para una agricultura resiliente. Este trabajo evaluó la actividad antagonica *in vitro* de cepas de *Bacillus* spp. frente a los hongos fitopatógenos *Macrophomina phaseolina* y *Bipolaris* sp. Se empleó el método de cultivo dual en agar Sabouraud Dextrose y se inocularon los hongos frente a diferentes cepas bacterianas. Tras la incubación a 28 °C, se midió el diámetro de las colonias fúngicas para calcular el porcentaje de inhibición, y los datos se analizaron mediante ANOVA y prueba de Tukey. Los resultados mostraron que todas las cepas de *Bacillus* evaluadas inhibieron significativamente el crecimiento de ambos patógenos, observándose halos de inhibición atribuidos a la producción de metabolitos secundarios durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano. *Bacillus subtilis* (Bs-21) demostró la mayor efectividad contra ambos hongos. Se concluyó que *Bacillus* spp. posee un notable potencial como agente de control biológico, aunque su efecto antagonico puede ser transitorio, en dependencia de la disponibilidad de nutrientes y la fase de crecimiento bacteriano, lo que resalta la importancia de optimizar su formulación y aplicación en campo.

Palabras clave: control biológico, cultivo dual, inhibición, metabolitos, sostenibilidad

Summary

The search for sustainable alternatives to the chemical control of plant diseases is crucial for resilient agriculture. This study evaluated the *in vitro* antagonistic activity of *Bacillus* spp. strains against the phytopathogenic fungi *Macrophomina phaseolina* and *Bipolaris* sp. The dual culture method was used on Sabouraud Dextrose agar, inoculating the fungi against different bacterial strains. After incubation at 28 °C, the diameter of the fungal colonies was measured to calculate the percentage of inhibition, and the data were analyzed using ANOVA and Tukey's test. The results showed that all the *Bacillus* strains evaluated significantly inhibited the growth of both pathogens, with inhibition halos attributed to the production of secondary metabolites during the exponential phase of bacterial growth. *Bacillus subtilis* (Bs-21) demonstrated the greatest effectiveness against both fungi. It was concluded that *Bacillus* spp. possesses remarkable potential as a biocontrol agent, although its antagonistic effect may be transient, depending on nutrient availability and the bacterial growth phase, highlighting the importance of optimizing its formulation and application in the field.

Keywords: biocontrol, dual culture, inhibition, metabolites, sustainability

Introducción

La sostenibilidad de los sistemas agrícolas se enfrenta a una amenaza constante por una diversidad de hongos fitopatógenos que afectan tanto a la parte aérea como al sistema radical de los cultivos. Entre los patógenos foliares más devastadores se

encuentra *Bipolaris* spp., agente causal de tizones y manchas foliares en cereales. Otro ejemplo relevante es *Botrytis cinerea*, conocido por causar el moho gris en una amplia gama de hortalizas y frutales. Una lista actualizada de hongos causantes de enfermedades en cultivos de importancia económica en Sinaloa fue publicada por Tovar-Pedraza y García-León (2025).

Recibido: 15 de octubre de 2025

Aceptado: 08 de diciembre de 2025

Conflicto de intereses: Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Conceptualización, análisis formal, adquisición de fondos, investigación, metodología, administración del proyecto, validación, redacción (borrador y original), redacción (revisión y edición): Bertha Carreras Solis. Investigación: Yaremis Ulloa Martin, Dianelis de la Caridad Hernández Pérez.



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



Paralelamente, a nivel del suelo, *Macrophomina phaseolina* representa una amenaza creciente. Este hongo, responsable de la podredumbre carbonosa del tallo, se desarrolla especialmente en condiciones de estrés hídrico y altas temperaturas. Su impacto es considerable, ya que afecta a más de 500 especies de plantas (Ramos et al., 2025). El manejo convencional de estas enfermedades mediante fungicidas químicos presenta problemas de eficacia debido a la generación de resistencias. Además, este enfoque conlleva impactos ambientales negativos y riesgos para la salud pública.

Frente a este escenario, el control biológico con bacterias del género *Bacillus* se posiciona como una alternativa robusta y ecológica. Especies como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* y *B. thuringiensis* han demostrado una notable capacidad antagonista contra un amplio espectro de fitopatógenos. Su éxito radica en la posesión de un arsenal de mecanismos de acción múltiples y sinérgicos (Tejera-Hernández et al., 2011).

Estos mecanismos incluyen, en primer lugar, la antibiosis mediante la síntesis de metabolitos antifúngicos como lipopéptidos (surfactina, iturina, fengicina), policétidos y enzimas hidrolíticas (quitinasas, glucanasas). Un segundo mecanismo es la competencia por espacio y nutrientes esenciales como el hierro, la cual se logra a través de la producción de sideróforos. Otros modos de acción son el parasitismo directo a las hifas fúngicas y la Inducción de Resistencia Sistémica (IRS) en la planta. Este último proceso prepara a la planta para una respuesta de defensa más rápida y eficaz (Rabbee et al., 2020; Shafi et al., 2017).

La literatura científica reciente proporciona evidencia contundente de la eficacia de los bacilos contra los patógenos mencionados. Por ejemplo, Valenzuela et al. (2022) demostraron los mecanismos potenciales de biocontrol de *Bacillus* spp. TSO₂ contra *Bipolaris sorokiniana*, mancha borrosa del trigo.

De manera similar, Luan et al. (2023) informaron que *B. amyloliquefaciens* DB2 resultó un potencial agente de control para *Bipolaris sorokiniana* en trigo. La eficacia de esta cepa rivaliza con los tratamientos químicos estándar. Al mismo tiempo, la bacteria promueve el crecimiento de las plantas.

En consecuencia, la exploración y caracterización de cepas de *Bacillus* con actividad polivalente contra patógenos tanto foliares como del suelo es fundamental. Este trabajo es esencial para el desarrollo de estrategias de manejo integrado que sean resilientes. La presente introducción sienta las bases para una discusión sobre los avances más significativos en la comprensión de los mecanismos antagonistas de los bacilos. Finalmente, se busca analizar su aplicación como agentes de control biológico de amplio espectro en la agricultura moderna.

Materiales y Métodos

Se evaluó la actividad antagonista de las cepas de *Bacillus* spp. mediante el método de cultivo dual, según la metodología descrita por Cazorla et al. (2007) con algunas modificaciones (se utilizaron placas de Petri con agar Sabouraud Dextrose (SDA) en sustitución del agar Papa Dextrosa (PDA), no disponible. En un extremo de la placa se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro del hongo fitopatógeno (*M. phaseolina* o *Bipolaris* sp.). En el extremo opuesto se inoculó una línea de la bacteria (*Bacillus*). Las placas se incubaron a 28 °C y el ensayo finalizó cuando el crecimiento del hongo en las placas control, que carecían de bacteria, cubrió toda la superficie.

El porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo se calculó por la fórmula:

$$DT - DC \times 100 / DT$$

donde:

DT: Diámetro de la colonia del hongo en el testigo

DC: Diámetro de la colonia del hongo en el enfrentamiento

Se analizaron las diferencias entre los grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Luego se realizó una comparación múltiple con una prueba de Tukey. Se consideró que una diferencia era estadísticamente significativa con un valor de $p \leq 0,001$.

Resultados y Discusión

Se observó un halo de inhibición en todos los tratamientos (Figuras 1 y 2). La cepa de bacilo se sembró en su fase exponencial de crecimiento, una etapa en la cual las células presentan una alta actividad metabólica. Esta condición corresponde a una estría bacteriana joven y activa. La concentración de compuestos antimicrobianos alrededor de la estría alcanzó un nivel suficiente para inhibir o eliminar las esporas del hongo, lo que generó el halo de inhibición observado.

Este fenómeno pudo deberse a que la bacteria produjo y secretó metabolitos secundarios para atacar al hongo fitopatógeno. Hoy existe una fuerte evidencia que muestra que *Bacillus* spp. ejerce un control multifactorial sobre hongos fitopatógenos: sus lipopeptidos actúan sinérgicamente dañando membranas fúngicas e induciendo apoptosis celular; la producción combinada de iturina, fengicina y surfactina es esencial para el control antifúngico (Sarwar et al., 2018). Mientras que las enzimas hidrolíticas refuerzan este efecto al degradar barreras estructurales del hongo; las enzimas hidrolíticas contribuyen significativamente a la inhibición fúngica (Morales-Barrón et al., 2019; Hong et al., 2022; Malik et al., 2023). Estas sustancias son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos, efectos, que *in vitro*, se corresponden con la presencia de un halo de inhibición.

Sin embargo, se registró que cuando la población bacteriana creció en exceso (figura 1, placas 6 y 31; figura 2, placas 3, 6, 34, 35 y 37) la zona de inhibición fue menor y el hongo mostró una coloración blanca. Esta observación se explica por el probable agotamiento de los recursos disponibles en el medio de cultivo, en particular las fuentes de carbono y nitrógeno de fácil acceso. Ante esta escasez, es posible que la bacteria entrara en una fase estacionaria o de declive, detuviera la producción de metabolitos secundarios y cambiara su metabolismo hacia la simple supervivencia, y entonces el hongo fitopatógeno como posee una alta competencia como organismo saprófito, pudo haber secretado enzimas que digirieron las bacterias muertas o moribundas y utilizara sus componentes como fuente de alimento. Esto coincide con lo informado por Castañeda y Sánchez (2016) quienes evaluaron el crecimiento de cuatro especies de *Bacillus* spp. como primer paso para entender su efecto de control sobre *Fusarium* sp.



Figura 1. 3. *B. subtilis* (Bs-4), 6. *B. subtilis* (Bs-21), 31. Aislado 14 *Bacillus* spp. 33. Aislado E1 *Bacillus* spp. 34. Aislado E5 *Bacillus* spp. 34. Aislado E6 *Bacillus* spp. 37. *B. subtilis* (98,2) vs *M. phaseolina*

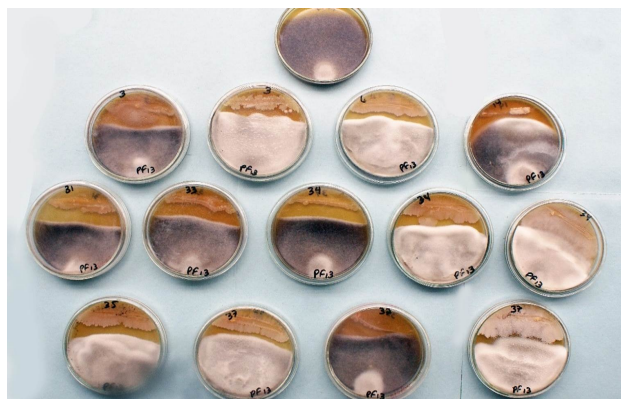


Figura 2. 3. *B. subtilis* (Bs-4), 6. *B. subtilis* (Bs-21), 14. *B. licheniformis* (5-260), 31. Aislado 14 *Bacillus* spp. 33. Aislado E1 *Bacillus* spp. 34. Aislado E5 *Bacillus* spp. 34. Aislado E6 *Bacillus* sp. 37. *B. subtilis* (98,2) vs *Bipolaris* sp.

Los hongos presentan una coloración negra debido a la producción de conidios pigmentados en sus estructuras reproductivas. Sin embargo, al colonizar un sustrato rico en nutrientes como la estría bacteriana, el hongo prioriza el crecimiento de su micelio, de color blanco, sobre la

reproducción. En esas condiciones favorables, el hongo no requirió esporular de forma inmediata, lo que explicó su apariencia blanca.

La investigación consideró esta observación como muy relevante. El estudio se encuentra en una etapa orientada a definir bacilos antagonistas de hongos fitopatógenos foliares y de suelo, como *M. phaseolina* y *Bipolaris* sp., para la elaboración de un consorcio. Posteriormente, se incluirán también hongos de los géneros *Alternaria* y *Stemphylium*. Por lo tanto, es crucial determinar si se dispondrá de un agente de control biológico preventivo a largo plazo o si su efecto será fuerte pero temporal. Esta definición es fundamental para planificar su aplicación en campo, ya que se debe evaluar la necesidad de estrategias que mantengan una población bacteriana activa y productora de metabolitos, o bien identificar la ventana de tiempo crítica en la que su actividad de control es máxima para proteger la planta.

En este contexto, Köhl et al. (2023) analizaron la importancia de comprender el "modo de acción" y la "persistencia" de los agentes de control biológico. Estos autores destacaron cómo el efecto de estos organismos puede ser transitorio y subrayaron la necesidad de diseñar estrategias que mantengan poblaciones activas. Además, discutieron los desafíos inherentes a la traslación de los resultados obtenidos en laboratorio hacia las condiciones de campo.

En este mismo sentido Pedraza et al. (2020) resaltaron la necesidad de determinar los mecanismos de acción de *Bacillus* spp. contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas (*in vivo*). Los ensayos de enfrentamientos permitieron llegar a los resultados reflejados en la tabla 1.

La tabla 1 muestra que *B. subtilis* (98,2) fue el tratamiento más efectivo contra *M. phaseolina*. No obstante, los otros cinco bacilos que obtuvieron una significancia estadística "b" también presentaron una acción efectiva contra este patógeno.

Para el caso de *Bipolaris* sp., los seis bacilos que alcanzaron una significancia "a" resultaron ser efectivos. Entre ellos, *B. subtilis* (98,2) mostró el nivel de efectividad más bajo del grupo.

B. subtilis (Bs-21) fue la cepa que demostró la mayor efectividad contra ambos hongos fitopatógenos. Este resultado destaca su potencial como agente de control de amplio espectro en las condiciones evaluadas.

Los resultados obtenidos evidencian una vez más lo informado por Méndez-Úbeda et al. (2017), sobre el elevado potencial que presentan las bacterias del género *Bacillus* para el control biológico en condiciones *in vitro*, ya que está demostrado por numerosos autores que los microorganismos pertenecientes a este género se caracterizan por tener la capacidad de producir sustancias, tales como, metabolitos, antibióticos, enzimas líticas, entre otras que aisladas, purificadas y producidas a gran escala son una valiosa alternativa al control químico, del cual existe una tendencia cada vez más generalizada a disminuir su uso, debido precisamente a los daños que ha causado a la salud humana, animal y ambiental.

Tabla 1. Inhibición del crecimiento de *Macrophomina phaseolina* y *Bipolaris* sp. por los bacilos en cultivo dual. Medias con letras distintas, en una misma columna, indican diferencias significativas (ANOVA ***p < 0,001 y prueba de Tukey, p ≤ 0,05).

Tratamiento	Porcentaje de inhibición (%) de <i>M. phaseolina</i>	Tratamiento	Porcentaje de inhibición (%) de <i>Bipolaris</i> sp.
TESTIGO	o ^d	TESTIGO	o ^e
Aislado E6	28,8 ^a	<i>B. subtilis</i> (98,2)	29,1 ^b
Aislado E1	30,0 ^b	Aislado 14	34,2 ^a
Aislado 14	31,1 ^b	Aislado E1	35,4 ^a
Aislado E5	33,3 ^b	Aislado E6	36,7 ^a
<i>B. subtilis</i> (Bs-4)	33,3 ^b	Aislado E5	36,7 ^a
<i>B. subtilis</i> (Bs-21)	34,4 ^b	<i>B. subtilis</i> (Bs-4)	37,9 ^a
<i>B. subtilis</i> (98.2)	42,2^a	<i>B. subtilis</i> (Bs-21)	38,6^a

Conclusiones

La bacteria *Bacillus* produce metabolitos secundarios antifúngicos que generan un halo de inhibición, esta producción es máxima durante su fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, el agotamiento de nutrientes en el medio detiene la síntesis de estos compuestos, lo que permite la posterior germinación fúngica y evidencia que el efecto de control es transitorio y dependiente de condiciones ambientales específicas.

Los ensayos de antagonismo confirman que distintas cepas de *Bacillus* inhiben efectivamente a los hongos *Macrophomina phaseolina* y *Bipolaris* sp. *B. subtilis* (Bs-21) se destaca por su alta efectividad contra ambos patógenos, lo que constituye un promisorio control de amplio espectro para su posible inclusión en un consorcio microbiano.

Bibliografía

Castañeda, E. y Sánchez, L. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 14(26), 53-62.

Cazorla, F. M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B. J. J., Vicente, A. de, & Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1950-1959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x>

Hong, S., Kim, T. Y., Won, S.-J., Moon, J.-H., Ajuna, H. B., Kim, K. Y., Ahn, & Y. S. (2022) Control of Fungal Diseases and Fruit Yield Improvement of Strawberry Using *Bacillus velezensis* CE 100. *Microorganisms*, 10, 365. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020365>

Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2023). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1162886. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1162886>

Luan, P., Yi, Y., Huang, Y., Cui, L., Hou, Z., Zhu, L., Ren, X., Jia, S., & Liu, Y. (2023). Biocontrol potential

and action mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DB2 on *Bipolaris sorokiniana*. *Frontiers in Microbiology*, 14:1149363. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1149363>

Malik, M. S., Rehman, A., Khan, I. U., Khan, T. A., Jamil, M., Rha, E. S., & Muhammad, A. (2023). Thermo-neutrophilic cellulases and chitinases characterized from a novel putative antifungal biocontrol agent: *Bacillus subtilis* TD11. *PLoS ONE*, 18(1), e0281102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281102>

Morales-Barrón, B. M., González-Fernández, R., Vázquez-González, F. J., De La Mora-Covarrubias, A., Quiñonez-Martínez, M., Muñoz-Rojas, J. (2019). Importancia del Secretoma de *Bacillus* spp. en el control biológico de hongos fitopatógenos. *Alianzas y Tendencias BUAP*. 4(15), 36-48. <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.9j1e5lid2awk>

Méndez-Úbeda, J. M., Flores Hernández, M. S., Páramo-Aguilera, L. A. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo *in vitro* frente a hongos fitopatógenos. *Nexo*, 30(02), 96-110. <http://doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>

Pedraza, L. A., López, C. A. y Uribe-Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1). <http://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>

Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K.-H. (2019). *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*, 24, 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>

Ramos García, B., Hernández Fundora, Y. y Gil Vidal, J. F. (2025). Aislamiento y caracterización de hongos fitopatógenos de cultivares de leguminosas en la provincia La Habana, Cuba. *Agrotecnia de Cuba*, 49. <https://cu-id.com/2120/v49e12>. <https://www.agrotecnia.edicionescervantes.com/index.php/agrotecnia/article/view/1096>

Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Abaidullah, M., Sessitsch, A., & Hafeez, F. Y. (2018) Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLoS ONE*, 13(6), e0198107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198107>

- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M. y Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>
- Tovar-Pedraza, J. M. y García León, E. (2025). Hongos causantes de enfermedades en cultivos de importancia económica en Sinaloa: Una lista actualizada. *Bioc Scientia*, 1(1). <https://doi.org/10.63622/RBS.2505>
- Valenzuela-Ruiz, V., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., & de los Santos-Villalobos, S. (2022). Potential biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp. TSO₂ against *Bipolaris sorokiniana*, spot blotch in wheat. *Mexican Journal of Phytopathology*, 40(2), 230-239. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2201-1>