

Actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *Mycosphaerella fijiensis* mediada por metabolitos difundidos y volátiles

Mileidy Cruz-Martín^{1*}, Mayra Acosta-Suárez¹, Ivian Poveda², Michel Leiva-Mora¹, Berkis Roque¹, Yelensy Alvarado-Capó¹. *Autor por correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: mileidy@ibp.co.cu

²Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

RESUMEN

Los microorganismos antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. La Sigatoka negra se considera la enfermedad foliar de mayor impacto económico para la industria de banano en el mundo y para su control se requieren de nuevas estrategias que permitan disminuir el uso de fungicidas. Esto ha propiciado un aumento en el interés de encontrar alternativas biológicas como el empleo de bacterias antagonistas. En este trabajo se realizaron ensayos con el objetivo de determinar si la actividad antifúngica *in vitro* de 20 cepas bacterianas contra *Mycosphaerella fijiensis* era ocasionada por metabolitos difundidos al medio de cultivo o volátiles. Como resultado se constató que el 80.0% de las cepas bacterianas evaluadas mostraron actividad antifúngica *in vitro* por metabolitos difundidos al medio de cultivo así como el 60.0% mediante la producción de metabolitos volátiles. El 55.0% de las cepas mostraron ambos mecanismos. Esta característica, hace de estas bacterias, mejores candidatos para su selección como agentes de control biológico.

Palabras clave: antagonistas, biocontrol, compuestos volátiles, metabolitos difundidos.

In vitro antifungal activity of bacteria against *Mycosphaerella fijiensis* mediated by diffused and volatile metabolites

ABSTRACT

Antagonistic microorganisms do not have a unique mode of action. Multiplicity of these is an important feature for selection as biological control agents. Black Sigatoka is considered the foliar disease with most economic impact for the banana industry worldwide. New strategies to control it are required to reduce the use of fungicides. That is why an increasing interest to find biological alternatives, such as the use of antagonistic bacteria, has risen. Assays were carried out to determine whether *in vitro* antifungal activity of 20 bacterial strains against *Mycosphaerella fijiensis* was caused by metabolites diffused into the culture medium or volatile. Results demonstrated that 80.0% of bacterial strains tested showed *in vitro* antifungal activity by diffused metabolites in the culture medium and 60.0% by producing volatile metabolites. The 55.0% of strains showed both mechanisms. This feature makes these bacteria the best candidate for its selection as biological control agent.

Keywords: antagonistic, biocontrol, volatile compounds, diffused metabolites.

INTRODUCCIÓN

El control de hongos fitopatógenos mediante el empleo de otros microorganismos con efecto antagonista es una práctica mundial y la búsqueda de aislados más efectivos en el control biológico es un tema que ocupa a muchos investigadores.

En la naturaleza, muchos microorganismos poseen actividad antifúngica en función de su supervivencia, nutrición u ocupación de

un nicho ecológico determinado. Esta puede ser debido a la producción de un variado grupo de sustancias y varios mecanismos pueden operar simultáneamente bajo condiciones ambientales diferentes (Islam *et al.*, 2012).

Los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. El conocer los mecanismos implicados en la

actividad antifúngica es crucial para el éxito en el uso de un agente de control biológico.

La Sigatoka negra, causada por el hongo ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, se considera la enfermedad foliar de mayor impacto económico para la industria de banano en el mundo. Según Churchill (2011) se requieren grandes avances en el desarrollo de nuevos sistemas de manejo integrado de la enfermedad para favorecer el incremento de la calidad y sanidad del cultivo, así como, disminuir el uso de fungicidas. Además, el incremento a nivel mundial de las demandas por las medidas de seguridad ha propiciado un aumento en el interés de encontrar alternativas biológicas para el control de la enfermedad. Los esfuerzos en este sentido se han encaminado fundamentalmente a la identificación de bacterias capaces de contribuir a las estrategias de control (Marín *et al.*, 2003). No obstante, el conocer los mecanismos involucrados en la actividad antifúngica de las bacterias frente a este patógeno es importante para el establecimiento de estrategias efectivas. Es por ello que en este trabajo se realizaron ensayos con el objetivo de determinar si la actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis* de cepas bacterianas aisladas de la filósfera de *Musa* spp. era ocasionada por metabolitos difundidos al medio de cultivo o volátiles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se emplearon 20 cepas bacterianas pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del IBP. Estas fueron aisladas de la filósfera de *Musa* spp. y se seleccionaron previamente por poseer actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis* (Poveda *et al.*, 2010).

El aislado de *M. fijiensis* empleado en todos los ensayos fue el CCIBP-Pf-83 perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del Laboratorio de Microbiología Aplicada del IBP. Para su cultivo el aislado fue inoculado en Enlarmeyers de 100 ml de volumen con 50 ml de medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB) (BioCen) e incubado en agitación a 120 rpm y 28°C, durante 15 días.

Para determinar si la inhibición del crecimiento del patógeno era ocasionada por la producción

de metabolitos difundidos o volátiles por las cepas bacterianas, se siguieron los protocolos propuestos por Montealegre *et al.* (2003) con algunas modificaciones.

Inhibición por metabolitos difundidos

Las suspensiones bacterianas fueron crecidas durante 24 h en Caldo Nutriente (CN) (BioCen) y se ajustaron a $DO_{600}=0.1$ ($\sim 5.0 \times 10^9$ ufcml⁻¹).

En una placa de Petri (150 mm de diámetro) se añadió medio de cultivo PDA mezclado con una suspensión micelial de *M. fijiensis* (5.0×10^5 fragmentos de micelio/ml⁻¹). Las placas se incubaron a 28°C y oscuridad durante 24 h. Pasado este tiempo, se colocó un filtro de acetato de celulosa (Sartorius) de 0.22 μ m encima del medio de cultivo. Sobre su superficie se depositaron las suspensiones bacterianas (3.0 μ l por cepa) separadas por al menos 2.0 cm. Las placas se incubaron durante 48 horas más a 28 °C y oscuridad.

Como control negativo se depositaron 3.0 μ l de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana y como control del crecimiento bacteriano se empleó el mismo método, sin utilizar membrana. Se realizaron dos réplicas con dos repeticiones para cada cepa bacteriana. Se clasificaron como positivas las cepas bacterianas que produjeron halo de inhibición del crecimiento del patógeno.

Inhibición por metabolitos volátiles

En una tapa de una placa de Petri de 50 mm de diámetro se añadió medio de cultivo Agar Nutriente (BioCen), en la tapa de otra placa de Petri se añadió medio de cultivo PDA con una suspensión micelial de *M. fijiensis* (5.0×10^5 fragmentos de micelio/ml⁻¹). Luego se inocularon 50 μ l de suspensión bacteriana sobre el medio de cultivo Agar Nutriente.

Cuando la humedad del inóculo fue absorbida completamente, se colocaron las dos tapas una frente a la otra y se sellaron con Parafilm®. Como control se emplearon 50 μ l de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas.

Pasado el tiempo de incubación se observó el crecimiento de *M. fijiensis* y se comparó con

el control en ausencia de la suspensión bacteriana. Se dieron como positivas aquellas cepas en las que se inhibió el crecimiento del patógeno o su crecimiento fue menor que el control y como negativas en las que no se observó inhibición del crecimiento fúngico. Además, se realizaron observaciones microscópicas de las hifas del patógeno en los casos que se observó inhibición del crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inhibición por metabolitos difundidos

Como resultado de este experimento, se logró determinar que la inhibición del crecimiento del patógeno era ocasionada por la producción de metabolitos antifúngicos difundidos en el 80.0% las cepas. El método empleado resultó efectivo para caracterizar la actividad antifúngica de las 20 cepas evaluadas frente a *M. fijiensis*.

Mediante este método no existió contacto físico entre las cepas bacterianas analizadas y el micelio fúngico, por lo que en los casos en que se observaron halos de inhibición se sugiere la presencia y excreción de metabolitos antimicrobianos por la bacteria. Estos resultados coinciden con los informados por Montealegre *et al.* (2003) al evaluar cepas de *Bacillus subtilis* y *B. lentimorbus* frente a *Rhizoctonia solani* 618.

Además, Rhaman *et al.* (2007) con este método, demostraron que el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporoides* fue completamente inhibido por sustancias difundidas por *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* después de siete días de incubación.

El daño causado por los metabolitos bacterianos en el micelio fue comprobado microscópicamente. Estos estudios revelaron la presencia de hifas de aspecto anormal con deformaciones en sus extremos. Deformaciones similares se han referido en observaciones microscópicas de antagonismo de cepas de *Bacillus subtilis* frente a *Fusarium graminearum*. Estos cambios se atribuyeron a que probablemente los metabolitos antifúngicos actuaron en la membrana celular del hongo y alteraron su permeabilidad (Chan *et al.*, 2003).

En este mismo patosistema, Riveros *et al.* (2003) demostraron claras alteraciones de las estructuras de *Mycosphaerella fijiensis* por tratamiento con los filtrados de los cultivos líquidos de cepas de *Bacillus* sp. y *Serratia* sp. aisladas de la filósfera de *Lycopersicon esculentum* (tomate) y banano.

De igual forma, Senthilkumar *et al.* (2007) como resultado del tratamiento de *Rhizoctonia bataticola* con *Paenibacillus* sp. cepa HKA-15, observaron deformaciones del micelio del patógeno y atribuyeron los daños observados a metabolitos de naturaleza peptídica.

Inhibición por metabolitos volátiles

Se comprobó que la inhibición del crecimiento del patógeno fue ocasionada también por la producción de metabolitos volátiles en el 60.0% de las cepas. El método empleado resultó efectivo para evaluar la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* por la producción de metabolitos volátiles (Figura 1).



Figura 1. Actividad antifúngica de cepas bacterianas frente a *Mycosphaerella fijiensis* (CCIBP-Pf-83) por producción de metabolitos volátiles a las 48 horas de incubación.

El estudio de metabolitos volátiles para el control de patógenos fúngicos ha sido referido por varios autores (Chen *et al.*, 2008, El-Hasan *et al.*, 2009) aunque su aplicación práctica se ha visto relegada por lo complejo de la caracterización y purificación de este tipo de metabolito. Además, se requieren estudios relacionados con la formulación de productos a partir de cepas que tengan este mecanismo (Ting *et al.*, 2010).

En el estudio microscópico se observaron deformaciones de las hifas y encrespamientos. Similares resultados fueron informados por Fiddaman y Rossal (1993) que observaron deformación y además vacuolización de las hifas en *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* como consecuencia del tratamiento con *B. subtilis*. Esta cepa secretó un metabolito volátil con propiedades fungicidas.

De las 20 cepas evaluadas, 11 presentaron los dos mecanismos de acción (55.0%) y dos ninguno de ellos. Esto coincide con resultados referidos por diferentes autores como Islam *et al.* (2012) quienes han determinado que varios mecanismos de acción pueden operar simultáneamente o la manifestación de un mecanismo u otro puede estar en correspondencia con las condiciones ambientales.

Estos resultados pudieran constituir un criterio importante a tener en cuenta para la selección de estas bacterias como agentes de control biológico, ya que, la multiplicidad de estos mecanismos es importante para el reforzamiento de las propiedades antifúngicas y una mejor eficiencia en el control.

REFERENCIAS

- Chan, YK, McCormick WA, Seifert KA (2003) Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. *Can. J. Microbiol.* 49: 253-262
- Chen, H, Xiao X, Wang J, Wu L, Zheng Z, Yu Z (2008) Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnol. Lett.* 30: 919-923
- Churchill, A (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology* 14(2): 307-328
- El-Hasan, A, Walker F, Schöne J, Buchenauer H (2009) Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 124: 457-470
- Fiddaman, PJ, Rossal S (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 119-126
- Islam Md, Jeong Y, Lee Y, Song C (2012) Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40(1): 59-66
- Marín, D, Romero R, Guzmán M, Sutton T (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant disease* 87(3): 208-222
- Montealegre, J, Reyes R, Pérez LM, Herrera R, Silva P, Besoain X (2003) Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology* 6(2): 115-126
- Poveda, I, M Cruz-Martín, C Sánchez-García, M Acosta-Suárez, M Leiva-Mora, B Roque, Y Alvarado-Capó (2010) Caracterización de cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología Vegetal* 10 (1): 57-61
- Rahman, M, Kadir J, Mahmud T, Rahman R, Begum M (2007) Screening of antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporoides* in papaya. *Asian Journal of Plant Science* 6(1): 12-20
- Riveros, A, Giraldo, C, Gamboa, A (2003) Microbial control of Black leaf streak disease. En: Jacome, L, Lepoivre, P, Marín, D, Ortiz, R, Romero, R, Escalant, V (eds.) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and Outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica, pp. 287-298. INIBAP, Montpellier
- Senthilkumar M, Govindasamy V, Annapurna K (2007) Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. *Curr Microbiol.* 55(1): 25-9
- Ting, A, Mah SW, Tee CS (2010) Identification of volatile metabolites from fungal endophytes with biocontrol potential towards *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Race 4. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 5 (2): 177-182

Recibido: 24-4-2012
Aceptado: 26-6-2012