

Control *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* con bacterias aisladas de la filosfera de banano

Mileidy Cruz-Martín*, Yelenys Alvarado-Capó, Cynthia Sánchez-García, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque, Michel Leiva-Mora. *Autor para correspondencia

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

RESUMEN

En el estudio de comunidades microbianas asociadas a los cultivos han sido encontrados microorganismos con efectos beneficiosos para suprimir enfermedades. En la interacción *Musa-M. fijiensis* poco se conoce sobre el efecto de factores bióticos. El presente trabajo tuvo como objetivo: aislar, identificar y caracterizar cepas bacterianas con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis*. Se realizaron los aislamientos bacterianos de la filosfera de bananos y se identificaron morfológica y bioquímicamente. Para la caracterización de la actividad antifúngica se determinó la producción de compuestos difusibles. De los aislados bacterianos fue seleccionado el CCIBP-B.1, ya que exhibió un marcado efecto inhibitorio del crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* y se identificó como perteneciente al género *Bacillus*. Los compuestos exudados al medio de cultivo mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *M. fijiensis* y produjeron deformaciones en las hifas. Estos resultados sugieren una excreción por parte de CCIBP-B.1 de metabolitos antifúngicos. Los resultados pudieran contribuir a profundizar en el conocimiento de la interacción planta microorganismo con el fin de trazar estrategias más eficientes de mejoramiento de *Musa*.

Palabras clave: bacteria, metabolitos antifúngicos, Sigatoka negra, biocontrol

ABSTRACT

Microorganisms with profitable effects to eliminate diseases have been found in the study of microbial communities associated with plants. Little is known about biotic factors in the interaction of *Musa-M. fijiensis*. This paper was aimed to isolate, identify and characterize bacterial strains with antifungal activity against *Mycosphaerella fijiensis*. Bacterial strains from phyllosphere were isolated and, morphologically and biochemically identify. The antifungal activity of bacteria were determined by the production of diffusible compounds in culture media. The isolate CCIBP-B.1 was selected because it showed a marked inhibitory effect in the micelial growth of *Mycosphaerella fijiensis* and it was identified as *Bacillus*. spp. The compounds exudated in culture media by CCIBP-B.1, showed an inhibitory effect on the micelial growth and produced malformation in hyphae of *Mycosphaerella fijiensis*. Results contribute with new approaches and perspectives in the biological control and management of *M. fijiensis* using the data known about *Musa-M. fijiensis* interactions to design more efficient *Musa* breeding strategies.

Key words: bacteria, antifungal metabolite, Black sigatoka, biocontrol

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades fúngicas que afectan a los plátanos y bananos, en particular la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), tiene un gran impacto económico, social y ambiental. Los costos de manejo de esta enfermedad en plantaciones comerciales son muy altos, así como el daño al medio ambiente que conlleva el uso excesivo de productos químicos. La aparición de cepas de *Mycosphaerella fijiensis* menos sensibles o resistentes a los fungicidas usados tradicionalmente así como el incremento mundial de las demandas por las medidas de bioseguridad ha propiciado un aumento en el interés de encontrar alternativas biológicas para el control de la Sigatoka negra (Marín *et al.*, 2003).

Muchos son los microorganismos que se encuentran naturalmente asociados a las plantas, ya sean

endófitas o saprofiticamente, sin producir enfermedades, y a los cuales se le han demostrado efectos beneficiosos (Beattie, 2007). La resistencia a patógenos y la promoción del crecimiento han sido los más estudiados. Varias son las especies de bacteria que han sido seleccionadas, como posibles controles biológicos, por promover el crecimiento y la sanidad de los cultivos. En el patosistema *Musa-M. fijiensis*, poco se conoce sobre el efecto de factores bióticos en dicha interacción. El conocimiento de la biología de la interacción planta-microorganismo y microorganismo-microorganismo pudiera brindar nuevas estrategias para el mejoramiento genético (Collinge *et al.*, 2008).

Especies de bacterias tales como *Pseudomonas* spp. (González *et al.*, 1996), *Serratia entomophyla*, *Serratia marcescens* y *Bacillus cereus* (Rivero *et al.*, 2003) han sido estudiadas para el control de *M. fijiensis*. En particular, las especies del género

Bacillus poseen características especiales, tales como: la formación de endosporas termorresistentes a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos grasos y los desinfectantes químicos (Setlow, 2006), así como una amplia gama de compuestos químicos que excretan al medio de cultivo con actividad antimicrobiana que les posibilita ocupar un lugar importante como agentes de control biológico (Chan *et al.*, 2009; Ongena *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta la necesidad de estudiar nuevas vías de control frente a *M. fijiensis* se realizó este trabajo con el objetivo de aislar, identificar y caracterizar cepas bacterianas de la filosfera de banano con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El aislado de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-39 perteneciente a la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) fue empleado para todos los ensayos donde se utilizaron suspensiones miceliales ($5 \cdot 10^4$ fragmentos de micelio. ml^{-1}) como inóculo inicial.

Las bacterias fueron aisladas de la filosfera de plantas de banano (Grande naine, *Musa* AAA) mediante el método de lavado de las hojas (González *et al.*, 1996) y empleando diluciones seriadas. Los aislados obtenidos fueron subcultivados y mantenidos en medio de cultivo Agar Nutriente (AN) a 4 °C

Los ensayos de actividad antifúngica fueron llevados a cabo según el método de cultivo dual. Para ello, se distribuyó un mililitro de una suspensión micelial de *M. fijiensis* (CCIBP-Pf-39) en placas de Petri (90mm) con medio de cultivo Agar Papa dextrosa (PDA) y fueron incubadas por dos días, pasado este tiempo se aplicó en uno de los extremos de la placa una alícuota de 7 l de suspensión bacteriana ($5 \cdot 10^9$ ufc. ml^{-1}) y se incubaron a 28 °C durante 5 días. Se seleccionó una cepa y se evaluó su crecimiento y la producción de metabolitos secundarios. Esta cepa fue caracterizada morfológica y bioquímicamente siguiendo los criterios del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Las cepas bacterianas sin actividad antifúngica fueron eliminadas.

Se realizaron estudios de crecimiento en dos medios de cultivo, Caldo nutriente (CN) y M9 (NH_4C ($1\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($11\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), KH_2PO_4 ($3\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), NaCl ($5\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), glucosa ($4\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), MgSO_4 ($120\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$), CaCl_2 ($10\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)), medio de cultivo salino empleado por Hou *et al.* (2006) para la obtención de metabolitos antifúngicos a partir de *Bacillus subtilis*. Para dicho experimento se utilizó, como inóculo inicial, una suspensión bacteriana con una $\text{D.O}_{600\text{nm}} = 1$. De esta suspensión se inoculó 1 ml en enlermeyer de 100ml de capacidad con 50 ml de medio de cultivo. Los frascos se incubaron en agitación durante cinco días, a 120 rpm y 26 °C. Se incluyeron tres réplicas por

medio de cultivo. Las evaluaciones se realizaron a las 0, 6, 24, 48, 72, 96 h en las cuales se midió $\text{D.O}_{600\text{nm}}$. Como blanco se empleó medio de cultivo sin inocular. Además, se determinó actividad antifúngica con los filtrados de cultivos a las 96h de incubación mediante el método de dilución en agar.

Para la caracterización de la actividad antifúngica de la cepa bacteriana se determinó la producción de compuestos antifúngicos difusibles y se empleó el método descrito por Montealegre *et al.* (2003) con pequeñas modificaciones que se describen a continuación. En el centro de las placas de Petri de 70 mm de diámetro con medio de cultivo PDA, se colocó una membrana de filtro de 0.2- μm (Millipore). En la membrana se aplicó la suspensión bacteriana ($5 \cdot 10^9$ ufc. ml^{-1}). Las placas se incubaron por 72 horas a 30°C pasado este tiempo se retiró la membrana y se inoculó la suspensión micelial de *M. fijiensis*. Posteriormente se incubaron a 28°C durante 7 días y observó la presencia de crecimiento fúngico (presencia o no de crecimiento visible del micelio). Se incluyó un control con agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana. Se emplearon tres réplicas y se repitió al menos tres veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los aislados bacterianos obtenidos fue seleccionado el aislado CCIBP-B.1, ya que exhibió un marcado efecto inhibitorio del crecimiento del aislado de *Mycosphaerella fijiensis*. Se identificó como perteneciente al género *Bacillus*. Este género ha sido descrito en la literatura científica como productor de una amplia gama de compuestos con actividad antifúngica tales como subtilina, bacitracina, bacilina y bacilomicina, los cuales se encuentran dentro de la familia de las iturinas (Alippi y Mónaco, 1994) así como otro lipopéptido como fengicina, los cuales constituyen surfactantes y antibióticos con cierta especificidad (Chang *et al.*, 2009). Además algunas proteínas con actividad antifúngica (glucanasas y quitinasas) han sido aisladas en este género bacteriano (Huang *et al.*, 2005).

Se encontraron diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento en los medios de cultivo evaluados (Figura 1).

Al evaluar el efecto de los filtrados de cultivos de ambos medios de cultivo frente a *M. fijiensis* no se observó actividad antifúngica en el filtrado obtenido con el medio de cultivo M9. En la literatura científica se ha documentado ampliamente el efecto de las condiciones de cultivo y en particular la composición del medio de cultivo en el crecimiento y la producción de compuestos por parte de las células bacteriana. Por ejemplo, Leifert *et al.* (1995) evaluaron ocho medios de cultivo para la producción de antibióticos a partir de cepas de *Bacillus pumillus* y *B. subtilis*, y encontraron diferencias tanto a la velocidad como a la producción o no de los compuestos antifúngicos.

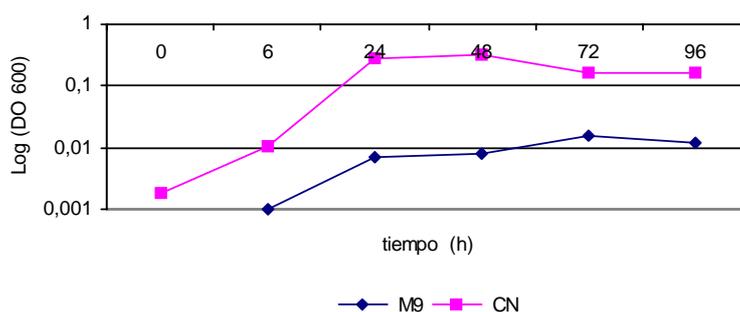


Figura 1. Curva de crecimiento del *Bacillus* sp. (CCIBP-B.1) en dos medios de cultivo (Caldo nutriente y M9).

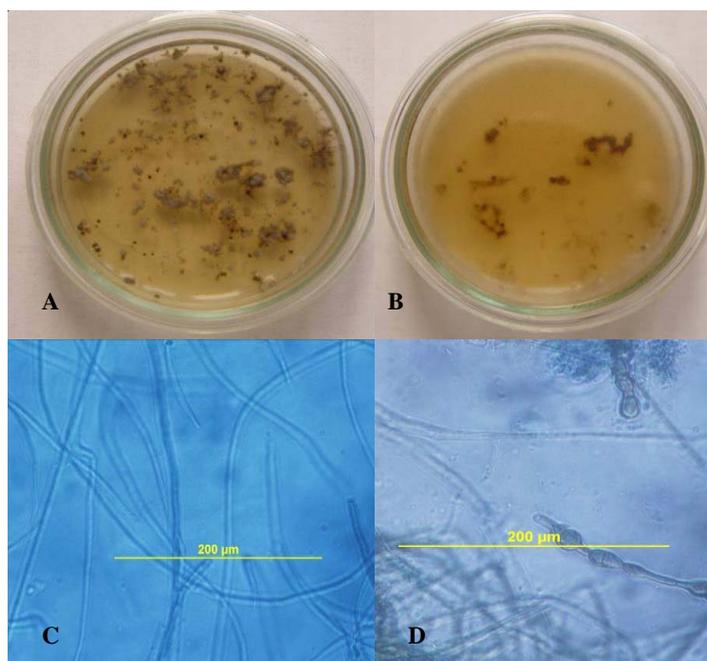


Figura 2. Antagonismo de *Bacillus* sp. (cepa CCIBP B.1) frente a *Mycosphaerella fijiensis* A) cepa de *M. fijiensis* crecida en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (control). B) Inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* en presencia de los metabolitos bacterianos C) Micelio de *M. fijiensis* en el control D) Deformaciones de las hifas de *M. fijiensis* en presencia de exudados de CCIBP B.1.

Los compuestos difundidos al medio de cultivo por la cepa CCIBP-B.1 mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *M.fijiensis*. No se apreció crecimiento micelial en las placas con presencia de metabolitos bacterianos excretados y el micelio añadido como inóculo se observó con consistencia acuosa. El daño causado por los metabolitos bacterianos en el crecimiento micelial fue observado microscópicamente. Estos estudios revelaron la presencia de hifas de aspecto anormal con deformación e hinchamiento en sus extremos (Figura 2).

Las transformaciones observadas en las hifas pueden corresponderse a una afectación en la pared celular, debido al efecto tóxico de los metabolitos que interfieren con los procesos normales de crecimiento. Según Huber *et al.* (1966) la apariencia vacuolar del micelio puede ser probablemente causada por la

acción de los metabolitos bacterianos los cuales penetran a la célula y causan disolución protoplasmática y desintegración.

Podile y Prakash (1996) refirieron la lisis y disolución del micelio de *Aspergillus niger* por la acción de la cepa AF1 de *Bacillus subtilis* así como Daami-Ramada *et al.* (2006) lo refiere en *Fusarium* spp. También fue observado por Silva *et al.* (2001) como resultado del tratamiento de *Rhizoctonia solani* con *B. subtilis* y *B. lentimorbus*, tales deformaciones fueron achacadas a la secreción de antibióticos por estas bacterias ya que no fue detectada la presencia de enzimas involucradas en el biocontrol tales como glucanasas, proteasas y quitinasas.

Similares deformaciones fueron observadas por Basha y Kandasany (2002) en hifas de *Curvularia*

lunata en presencia de la fracción proteica de exudados de *Bacillus* sp. cepa (BC 121) aislada de la rizosfera. Igualmente, observaciones de este tipo han sido realizadas en el antagonismo de cepas de *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a *Colletotrichum gloeosporioides* (Rahman *et al.*, 2007).

Al transferir el micelio de *M. fijiensis* tratado con los metabolitos bacterianos a placas de Petri con medio de cultivo PDA libre de estos se observó al cabo de los 7 días que no hubo crecimiento visible del micelio y no cambió su aspecto. Este resultado demuestra el efecto fungicida de los metabolitos difundidos al medio de cultivo, traducido en un daño irreversible al micelio.

CONCLUSIONES

Este estudio básico condujo a que la cepa CCIBP-B.1 perteneciente al género *Bacillus* mostró propiedades antagonistas frente a *M. fijiensis* probablemente mediante la excreción de sustancias antifúngicas que inhiben el crecimiento micelial. Estas observaciones y estudios posteriores pueden contribuir al conocimiento de la interacción microorganismo-microorganismo con el fin de diseñar nuevas y más efectivas estrategias de mejoramiento genético de *Musa* y a la formulación de productos biológicos para el control de la Sigatoka negra.

REFERENCIAS

- Basha, S, Kandasamy U (2002) Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Current science 82(12) 1457-1465
- Beattie, G (2007) Plant-associated bacteria: Survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. En: Gnanamanickan, SS (Ed) Plant-Associated bacteria, pp 1-56. Springer. Dordrecht
- Daami-Remadi, M, Ayed F, Jabnoun-Khiareddine H, Hibar K, El Mahioub M (2006) Effects of some *Bacillus* sp. Isolates on *Fusarium* spp. *in vitro* and Potato tuber dry rot development *in vivo*. Plant Pathology Journal 5(3): 283-290
- Chan, YK, Savard ME, Reid LM, McCormick WA, Segui C (2009) Identification of lipopeptide antibiotics of a *Bacillus subtilis* isolate and their control of *Fusarium graminearum* diseases in maize and wheat. BioControl 54:567-574
- Collinge, D, Lund O, Thordad-Christensen H (2008) What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants? Eur J Plant Pathol 121: 217-231
- Hou, X, Boyetchko S, Brkic M, Olson D, Ross A, Hegedus D (2006) Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. Appl Microbiol Biotechnol 72: 644-653
- González, R, Bustamante E, Shannon Ph, Okumoto S, Leandro G (1996) Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en bananos. Manejo Integrado de plagas 40: 6-11
- Huber, D, Andersen A, Finley A (1966) Mechanisms of biological control in bean root rot soil. Phytopathology 56: 953-956
- Leifert, C, Li H, Chidburee S, Hamson S, Workman S, Sigeo D, Epton H, Harbour A (1995) Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. Journal of applied bacteriology 78: 97-108
- 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 L, 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): 115-127
- Ongena, M, Jacques P, Touré Y, Destain J, Jabrane A, Thonart P (2005) Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. Appl Microbiol Biotechnol 69: 29-38
- Podile, AR, Prakash A (1996) Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF 1. Can. J. Microbiol. 42(6): 533-538
- Rahman, M, Kadir J, Mahmud T, Rahman R, Begum M (2007) Screening of Antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporioides* 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, Leovire P, Marín D, Ortiz R, Romero R, Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. pp. 287-298. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica
- Huang, CJ, Wang TK, Chung SC, Chen CY (2005). Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. J Biochem Mol Biol 38(1):82-88
- Setlow P. (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. Journal of Applied Microbiology 101(3): 514-525
- Silva, P, Montealegre J, Besoain X, Perez L (2001) Efecto de bacterias biocontroladoras sobre germinación y desarrollo de tomate y sobre expresión de proteínas de defensa. En: Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología. pp 129. Santa Cruz, Chile