

Efecto de la temperatura, pH y detergentes sobre la actividad antifúngica de filtrados de cultivo bacterianos frente a *Mycosphaerella fijiensis*

Eilyn Mena*, Mileidy Cruz-Martín, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque, Michel Leiva-Mora, Yelenys Alvarado-Capó. *Autora para correspondencia

Instituto 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: eilyn@ibp.co.cu

RESUMEN

Las bacterias asociadas a cultivos han sido estudiadas como potenciales agentes de biocontrol. Sin embargo, se han desarrollado pocas investigaciones sobre la interacción *Musa* spp.- *Mycosphaerella fijiensis*-bacterias asociadas a *Musa*. En consecuencia, se desconocen los metabolitos bacterianos involucrados y el efecto sobre ellos de factores físicos y químicos. Por ello, este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la temperatura, el pH y la acción de detergentes sobre filtrados de cultivo con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*. La inhibición del crecimiento del patógeno se evaluó mediante lectura de absorbancia a DO 565 nm. Se comprobó que la actividad antifúngica de los filtrados de cultivo bacterianos frente a *M. fijiensis*, varió en presencia de diferentes valores de temperatura, pH y tipos de detergentes y esto se relacionó con la cepa bacteriana. Los resultados sugirieron la posible naturaleza proteica de los metabolitos con actividad antifúngica.

Palabras clave: bacteria, control biológico, metabolitos antifúngicos

Effect of temperature, pH and detergents on the antifungal activity of bacterial culture filtrates against *Mycosphaerella fijiensis*

ABSTRACT

The bacteria associated to crops have been studied as potential biocontrol agents. However, few investigations on the interaction *Musa* spp. - *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* associated bacteria have been developed. Consequently, bacterial metabolites involved and the effect on them of physical and chemical factors remain unknown. Therefore, this study aimed to determine the effect of temperature, pH and detergents on bacterial culture filtrates with antifungal activity *in vitro* against *Mycosphaerella fijiensis*. The pathogen growth inhibition was assessed by absorbance reading at OD 565nm. It was found that the antifungal activity of the bacterial culture filtrates against *M. fijiensis*, varied in the presence of different values of temperature, pH, and types of detergents and this was related to the bacterial strain. The results suggested the possible protein nature of the metabolites with antifungal activity.

Keywords: bacteria, biological control, antifungal metabolites

Los plátanos y bananos se encuentran entre los cultivos más importantes a nivel mundial. Constituyen una fuente natural de fibra y minerales como el potasio. Las plantaciones de este cultivo son afectadas por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra. Esta enfermedad es considerada la más perjudicial, ya que provoca una necrosis severa en la hoja y es difícil de combatir (Churchill, 2010). Su control está dado principalmente por el manejo cultural y la aplicación de fungicidas. El empleo de fungicidas químicos no es sustentable, debido a su alto costo para pequeños productores, la

contaminación ambiental y la resistencia que ha generado en el patógeno (Fu *et al.*, 2010). En este contexto, el control biológico surge como una alternativa que podría permitir a los productores combatir la enfermedad y continuar dentro de la actividad agrícola sin afectar la sostenibilidad del medio ambiente en los sistemas de producción de plátanos y bananos. En esta área se incluye el uso de microorganismos antagonistas, la adición de sustratos foliares que permitan incrementar las poblaciones bacterianas y la inducción de resistencia a patógenos (Patiño *et al.*, 2007). En correspondencia con ello se han realizado

investigaciones en géneros bacterianos tales como: *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Rao-Podile y Neeraja, 2010). No obstante, pocas son las investigaciones en la interacción *Musa* spp.- *Mycosphaerella fijiensis*-bacterias asociadas a *Musa*. Ceballos *et al.* (2012) realizaron investigaciones a partir de bacterias de la filosfera de *Musa* sp. contra *Mycosphaerella fijiensis* pero es limitado el conocimiento de las características de los metabolitos producidos por estas y su efecto sobre el patógeno.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la temperatura, el pH y la presencia de detergentes sobre filtrados de cultivo bacterianos con actividad antifúngica *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis*.

Se emplearon cinco cepas bacterianas cuyos cultivos filtrados inhibían el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis* (Poveda *et al.*, 2010), pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas: CCIBP-M27, CCIBP-B3, CCIBP-A4, CCIBP-C5 y CCIBP-B.1. Las bacterias se cultivaron en medio de cultivo Caldo Nutriente (CN), durante 48 horas en agitación y 28°C. Posteriormente, se centrifugaron por 15 minutos a 4°C y 10 000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Para eliminar las células bacterianas, el sobrenadante fue filtrado (0.22 µm) y se conservó a 4°C.

Para determinar el efecto de la temperatura, el pH y detergentes sobre los filtrados de cultivo bacterianos, estos se sometieron a los diferentes tratamientos que se explican más adelante. Posteriormente, en todos los casos, se evaluó la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* mediante el método de microdilución en placas de 96 pocillos (Cruz-Martín *et al.*, 2013). Para ello, se utilizó una dilución (1:10); 25 µl de filtrado de cultivo sometido a diferentes tratamientos y 225 µl de una suspensión micelial de *M. fijiensis* (aprox. 5.0×10^5 fragmentos de micelio/ml) en medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB). Las placas se incubaron durante 48 horas y 28°C. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia a DO 595 nm en espectrofotómetro (Thermo Labsystems Opsy MR). Se utilizaron ocho réplicas por tratamiento. Como control de crecimiento se colocaron en cada placa ocho repeticiones con

250 µl de una suspensión micelial de *M. fijiensis* en PDB.

Para comprobar el efecto de la temperatura se conformaron cinco tratamientos que incluyeron las siguientes: -80, 4, 28, 60 y 121°C. En cada una se incubaron 300 µl del filtrado de cultivo de las cepas bacterianas durante 20 minutos. Pasado ese tiempo, se evaluó la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* como se describió anteriormente.

Con el objetivo de determinar el efecto del pH se siguió el protocolo propuesto por Munimbazi y Bullerman (1998). Para cada tratamiento (pH 2, 4, 6, 7 y 8) se tomaron 300 µl de los filtrados de cultivo que se diluyeron en agua destilada estéril (1:1) y se ajustó el pH. Se mantuvieron en estas condiciones durante 20 minutos. Pasado ese tiempo, se evaluó la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* como se mencionó más arriba.

El efecto de los detergentes se constató a través de cuatro tratamientos. Los detergentes utilizados fueron: el aniónico SDS (del inglés: *Sodium Dodecyl Sulphate*), el catiónico CTAB (del inglés: *Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide*), además de los no iónicos Triton x 100 y Tween-80. Cada detergente se añadió a 100 µl de filtrado de cultivo de cada cepa para una concentración final de 1%, se incubaron a 28°C y oscuridad, durante cuatro horas. Pasado ese tiempo se evaluó la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis*.

Se comprobó que los filtrados de cultivo bacterianos obtenidos eran termoestables, excepto el de CCIBP-M27; que solo inhibió el crecimiento de *M. fijiensis* a 28°C. Por otra parte, CCIBP-A4 mostró una disminución de la actividad antifúngica a 121°C (Tabla 1).

Además, se determinó que la actividad antifúngica de los filtrados de cultivo bacterianos, varió a diferentes valores de pH en dependencia de la cepa. En los filtrados de cultivos de CCIBP-A4 y CCIBP-C5 se evidenció inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* en todos los valores de pH evaluados. Sin embargo, los filtrados de cultivo de las cepas bacterianas CCIBP-M27, CCIBP-B3 solo mostraron actividad antifúngica a pH=2, pH=6 respectivamente; y pH=2 y 4 en el caso de CCIBP-B.1 (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la temperatura, el pH y la presencia de detergentes sobre la actividad antifúngica de filtrados de cultivo (fc) bacterianos.

Factores			Cepas				
			CCIBP- M27	CCIBP- B3	CCIBP- A4	CCIBP- C5	CCIBP- B.1
Temperatura (°C)		-80	-	+	+	+	+
		4	-	+	+	+	+
		28	+	+	+	+	+
		60	-	+	+	+	+
		121	-	+	+/-	+	+
pH		2	+	=	+	+	+
		4	=	=	+	+	+
		6	=	+	+	+	=
		7	=	=	+	+	=
		8	=	=	+	+	=
Detergentes	Aniónico	SDS	+	+	+	+	-
	Catiónico	CTAB	=	=	-	-	-
	No iónico	TritonX- 100	-	=	+	-	=
		Tween-80	=	+	=	-	=

Leyenda: (+) indicador de estabilidad de la actividad antifúngica, (-) indicador de disminución de la actividad antifúngica, (=) No efecto. El crecimiento de *M. fijiensis* fue igual al control.

El filtrado de cultivo de CCIBP-B3 mantuvo su actividad inhibitoria del crecimiento fúngico al ser expuesto a la acción de todos los detergentes empleados en el estudio. Sin embargo, en el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-B.1 se limitó ante la presencia de los detergentes iónicos evaluados. Por otra parte, los filtrados de cultivo de las cepas CCIBP-A4 y CCIBP-C5 en presencia del detergente catiónico CTAB afectaron el crecimiento del patógeno.

Analizar el efecto de factores físicos y químicos sobre la actividad antifúngica de bioproductos que puedan ser empleados para el combate de enfermedades en plantas tiene gran importancia. Ello contribuye a su caracterización y a garantizar la estabilidad sin perder la actividad biológica.

En este sentido, Munimbazi y Bullerman (1998) determinaron la estabilidad de metabolitos bacterianos a diferentes valores de pH y comprobaron que los producidos por *Bacillus pumilus* eran estables en el rango de 2 a 10.

La mayor inhibición (99%) del crecimiento del patógeno *Aspergillus parasiticus* se produjo a pH=2 y para pH con valores entre 4 y 6 fue de 92%. De igual forma, la mayor actividad inhibitoria para las cepas CCIBP-M27, CCIBP-B3 y CCIBP-B.1 se produjo entre estos valores de pH.

Por otra parte, el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-B3 mantuvo su actividad antifúngica en presencia de todos los detergentes ensayados. Ello sugiere que si en su composición hay presencia de péptidos el grupo funcional no está expuesto a la desnaturalización por los agentes químicos empleados. Al contrario, según los resultados para el filtrado de cultivo de CCIBP-B.1, su grupo funcional tiene una posible composición no iónica y está expuesto a la acción de compuestos desnaturalizantes. Munimbazi y Bullerman (1998) emplearon también detergentes (TritonX-100, Tween-20, Tween-80, Nonidet P-40, SDS, CTAB y Deoxycholic acid). De ellos, solo Tween-80 redujo la actividad antifúngica de los metabolitos producidos por *B. pumilus* y Nonidet P-40 la

inhibió completamente y concluyeron que la actividad inhibitoria estaba dada por un péptido de estructura cíclica.

Similares resultados han sido encontrados por Lee *et al.* (2008). Estos autores plantearon que la actividad de los metabolitos antifúngicos, purificados de *Paenibacillus lentimorbus* WJ5 no fue afectada por la exposición de estos a diferentes temperaturas (-80, 60 y 121), solo a 121°C por cinco horas se redujo la actividad antifúngica. En base a estos resultados concluyeron que presentaban alta termoestabilidad y la actividad antifúngica estaba dada por la presencia de pequeños péptidos. Además, en su estudio los metabolitos antifúngicos producidos por *P. lentimorbus* WJ5, eran activos en un amplio rango de pH (2 y 13). Estos autores determinaron que la exposición de los compuestos antifúngicos a los detergentes (SDS y Tween-80 al 1%) no afectó su actividad antifúngica. Sin embargo, la inhibió en presencia del detergente catiónico CTAB (1%), al igual que lo obtenido en el presente estudio para el filtrado de cultivo de las cepas CCIBP-A4 y CCIBP-C5. A partir de estos resultados infirieron que era indicativo de la naturaleza aniónica del grupo funcional involucrado en el mecanismo antifúngico.

De igual forma, Hu *et al.* (2008) plantearon que los compuestos con actividad antifúngica presentes en el sobrenadante del medio de cultivo de la cepa *Bacillus subtilis* QM3, eran termoestables; ya que al ser sometidos a diferentes tratamientos térmicos, a 100°C se redujo la actividad inhibitoria pero se vio disminuida a temperaturas superiores (121°C, durante 20 minutos). Ellos sugirieron que quizás la actividad antifúngica estaba dada por un antibiótico perteneciente a la familia de las iturinas.

Los filtrados de cultivo bacterianos empleados en este trabajo mostraron actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* ante la variación de diferentes factores físicos y químicos. La composición de los filtrados de cultivo parece estar relacionada con compuestos de naturaleza proteica. En este sentido, los metabolitos presentes en el filtrado de cultivo de la cepa CCIBP-M27 pudieran ser pequeñas proteínas no estables, sin embargo en el caso de los presentes en CCIBP-B.1 pudieran ser

péptidos pequeños estables, no iónicos. En el caso de los metabolitos presentes en el filtrado de cultivo de CCIBP-B3 pudieran ser péptidos con estructura cíclica y los péptidos presentes en CCIBP-A4 CCIBP-C5 podrían tener grupos funcionales aniónicos expuestos.

Atendiendo a estos resultados se requieren nuevos estudios que permitan corroborar la naturaleza de los metabolitos responsables de la actividad antifúngica de los filtrados de cultivo de las cepas en estudio.

CONCLUSIONES

La actividad antifúngica de los filtrados de cultivo bacterianos frente a *M. fijiensis*, varió en presencia de diferentes valores de temperatura, pH y tipos de detergentes y esto se relacionó con la cepa bacteriana.

REFERENCIAS

- Ceballos, I, Mosquera S, Angulo M, Mira J, Argel L, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S y Villegas V (2012) Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microb Ecol.*64: 641-653
- Cruz-Martín, M, Acosta-Suárez, M, Mena E, Roque B, Leiva-Mora M, Pichardo T, Alvarado-Capó Y (2013) Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. *Biotecnología Vegetal* 13 (4): 219-224
- Churchill, ACL (2010) *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* 1-22
- Fu, G, Huang S, Ye Y, Wu Y, Cen Z, Lin S (2010) Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacy in controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. *Biological Control* 55: 1-10
- Hu, QP, Xu JG, Song P, Song JN, Chen WL (2008) Isolation and identification of a potential biocontrol agent *Bacillus subtilis* QM3 from Qinghai yak dung in China. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 2451-2458
- Lee, YK, Senthilkumar M, Kim JH, Swarnalakshmik K, Annapurna K (2008) Purification and partial characterization of antifungal metabolite from *Paenibacillus lentimorbus* WJ5. *Microbiol Biotechnol* 24: 3057-3062

Munimbazi, C, Bullerman LB (1998) Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. Journal of Applied Microbiology 84 (6): 959–968

Patiño, LF, Bustamante E, Salazar LM (2007) Efecto de sustratos foliares sobre la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (*Musa x paradisiaca* L) y plátano (*Musa acuminata* Colla). Agricultura Técnica (Chile) 67(4): 437-445

Poveda, I, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Acosta-Suárez M, Leiva-Mora M, Roque B, Alvarado-Capó Y (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

Rao-Podile, A, Neeraja Ch (2010) Microbial chitinases as potential biopesticides. Pest and Pathogens: Management Strategies 275-300

Recibido: 25-9-2013

Aceptado: 31-10-2013