

## **AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEL GÉNERO *Bacillus* CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y/O PROMOTORA DEL CRECIMIENTO**

**Maccarrone Anabella<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Grupo de Procesos Biológicos en Ingeniería Ambiental. Departamento de Medio Ambiente. Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, UNL.

Maria Teresita Benzzo (directora); Lisandro Gabriel Seluy (co-director)

Área: Ciencias Biológicas

### **INTRODUCCIÓN**

En la actualidad, la principal estrategia para controlar las plagas y enfermedades de los cultivos es el empleo de plaguicidas químicos. Un manejo incorrecto puede causar una liberación innecesaria de productos tóxicos al medio ambiente contaminando los recursos naturales. Asimismo, la sobredosificación y aplicación inadecuada por parte de los productores puede ocasionar la presencia de residuos en frutas, verduras y hortalizas en cantidades superiores a las permitidas, ocasionando riesgos para la salud de los consumidores (Guerrero, 2003).

La estrategia del control biológico contra plagas y enfermedades de las plantas, frente a la aplicación de sustancias químicas, presenta múltiples ventajas pues no se acumulan, son biodegradables y los microorganismos empleados se multiplican en el ambiente estableciendo una interacción negativa con los microorganismos patógenos y/o alterantes (Droby et al., 2016).

Entre los grupos bacterianos más estudiados como agentes biocontrol y actividad promotora del crecimiento en plantas (PGPR) se encuentra el Género *Bacillus*. Varias especies de este género se han reportado como productoras de metabolitos con marcada actividad antifúngica (Reddy et al., 2014; Kumar & Singh, 2015), capaces de colonizar la superficie de las raíces produciendo compuestos como sideróforos y fitohormonas (Cawoy et al., 2011).

### **OBJETIVOS**

- a. Aislar e identificar hongos del deterioro en diferentes puntos de la cadena frutihortícola del cinturón verde santafesino.
- b. Evaluar la actividad biocontrol in-vitro e in-vivo de cepas de *Bacillus* aisladas de diversos sustratos alimenticios frente a los principales hongos seleccionados en función del deterioro y/o producción de micotoxinas de interés sanitario.

---

Título del proyecto: "Desarrollo de una formulación a base de microorganismos con capacidad antagónica frente a hongos del deterioro de hortalizas frescas de producción local".

Instrumento: Investigación Orientada.

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: Min. de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Gob. Provincia de Santa Fe.

Director: Dr. Isla, Miguel Angel

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el aislamiento de hongos se partió de hortalizas y frutas con evidencias de lesiones fúngicas. Se tomaron las zonas lesionadas y se colocaron de forma espaciada en cajas de Petri con medio de cultivo específico para hongos (agar YPG; agar HyL y agar PDA). Se incubaron a 30°C en aerobiosis. Se repicó cada morfología hasta obtener cultivos axénicos. Se estudiaron macroscópicamente (características de la colonia gigante) y microscópicamente (fragmento de colonia, cinta engomada y microcultivo). Posteriormente, se conservaron en tubos con agar HyL en refrigeración (cultivos en rampa) para su disponibilidad inmediata, y por congelación a -70°C en caldo YPG suplementado al 15 % m/v con glicerol (crio-conservación de la cepa).

El aislamiento de bacterias esporuladas se realizó a partir de hortalizas, verduras y frutas sanas. Se colocó 1 g de hortaliza finamente picada en condiciones asépticas en un tubo conteniendo 5 mL de Caldo Nutritivo (CN) estéril. Se incubó a 30°C durante 24 horas en aerobiosis. Se repicó hasta la obtención de cultivos axénicos (método de las 5 estrías), en Agar Nutritivo (AN), bajo las mismas condiciones de incubación. Los cultivos axénicos se conservaron a -70°C en CN suplementado al 15 % m/v con glicerol (stock permanente). Se dispuso de un stock de trabajo en condiciones de refrigeración (AN, cultivo en rampa).

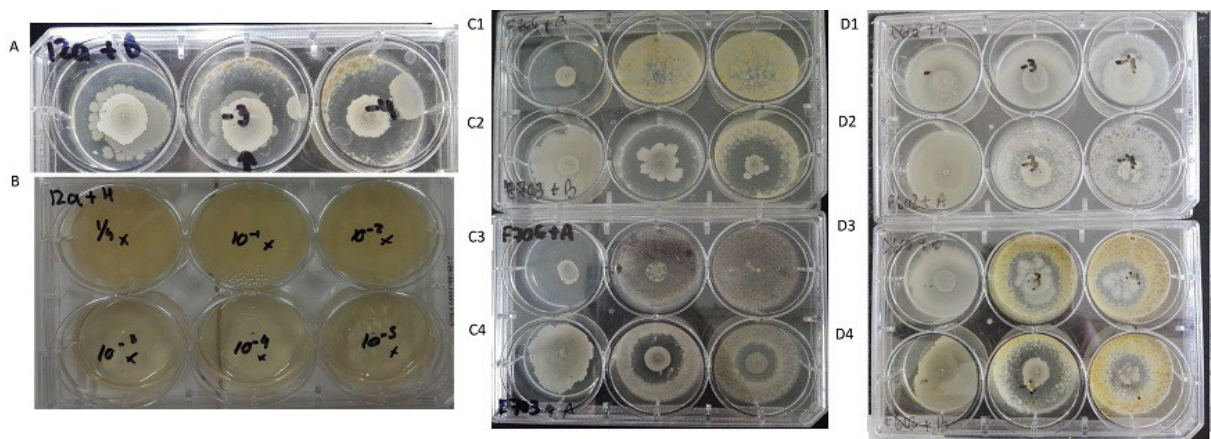
La actividad antagónica in-vitro se evaluó en microplacas de 6 pocillos utilizando agar PDA inoculado previamente con  $10^4$  esporos/mL (estandarizado por recuento en cámara de NB) del hongo a ensayar. Una vez solidificado, se sembraron 10 ul (de forma puntual) de la cepa bacteriana a partir de un cultivo en fase exponencial. Uno de los pocillos se tomó como Control (+), es decir, sin el hongo; los demás pocillos se sembraron con diluciones decimales sucesivas de la misma bacteria. Las microplacas se incubaron a 30°C en aerobiosis, 24 horas (Sathe y col., 2007; Balouiri y col., 2015).

Para los ensayos in-vivo se seleccionó una de las cepas con mejor performance in-vitro. Como unidad experimental se utilizó una bandeja con 200 plantines de lechuga bajo condiciones de invernáculo, realizándose 6 tratamientos por triplicado. La formulación aplicada (al suelo y/o foliar, según tratamiento) consistió de un inóculo de  $10^7$  UFC/mL de la cepa bacteriana preparada a partir de un cultivo de 48-72 horas en un Medio Óptimo para Producción de Lipopéptidos (MOLP). A los 15, 25, 35 y 55 días, posterior a la siembra, se tomaron muestras representativas de plantas de cada tratamiento y se determinaron la masa foliar y radicular (seca y húmeda), y la longitud radicular y foliar. Los datos se procesaron estadísticamente con el software Statgraphics con un intervalo de confianza del 95% (ANOVA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayos de antagonismo in-vitro

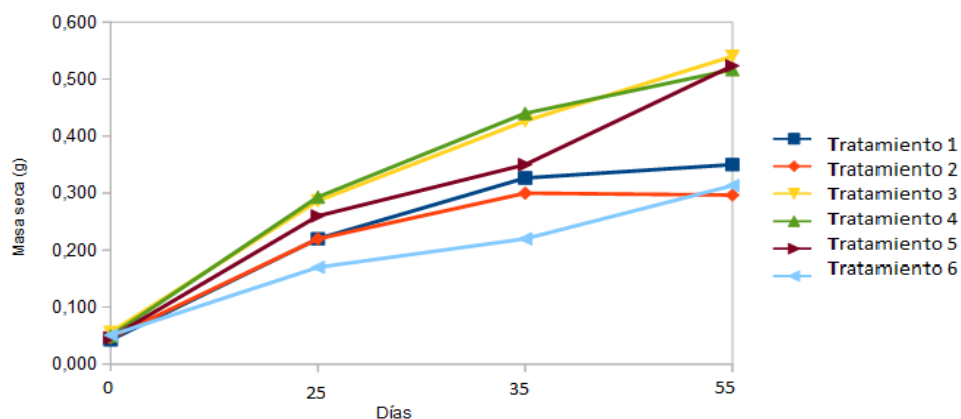
Se ensayaron un total de 27 aislamientos de *Bacillus* frente a *Botrytis* spp. y *Aspergillus* spp. Un total de 7 cepas (>+++)) inhibieron totalmente el desarrollo fúngico abarcando todo el diámetro del pocillo de la microplaca; en 3 cepas (+++) se observó desarrollo del micelio vegetativo sólo en la periferia; en 7 cepas (++) se evidenció un halo de inhibición menor, con coloración del micelio (aéreo); 6 cepas (+) mostraron un fino halo de inhibición en torno a la colonia bacteriana; 4 cepas (-) no mostraron halos de inhibición siendo completamente invadidas por el crecimiento fúngico (figura 1).



**Figura 1.** Antagonismo in-vitro en microplacas, medio PDA. **A**, pocillo 1: cepa A803 (control); pocillos 2 y 3: diluciones decimales cepa A803 se observa desarrollo preferencial del micelio vegetativo en la periferia del pocillo frente a *Botrytis* spp. (+++). **B**, diluciones decimales cepa A803 que inhibe completamente a *Aspergillus* spp. (>+++). **C1 y C3**, pocillo 1: cepa F706 (control); pocillos 2 y 3: diluciones decimales cepa F706 que no inhibe a *Botrytis* spp. y a *Aspergillus* spp. (-). **C2 y C4**, pocillo 1: cepa E703 (control); pocillos 2 y 3 diluciones decimales cepa E703 se observa desarrollo preferencial del micelio vegetativo en la periferia del pocillo frente a *Botrytis* spp. (+++) y halo de inhibición que cubre un área menor que en C2 frente a *Aspergillus* spp. (++)). **D1 y D3**, pocillo 1: cepa D608 (control); **D1**, pocillo 2 con dil.  $10^{-3}$  se observa desarrollo preferencial del micelio vegetativo de *Aspergillus* spp. en la periferia del pocillo (+++); pocillo 3 dil.  $10^{-4}$  mayor desarrollo de *Aspergillus* spp. (++)). **D3**, pocillos 2 y 3 presentan un fino halo de inhibición frente a *Botrytis* spp. (+). **D2 y D4**, pocillo 1: cepa F602 (control); pocillo 2 y 3: diluciones decimales cepa F602 se observa halo de inhibición y coloración del micelio aéreo (mayor en dil.  $10^{-4}$ ) frente a *Aspergillus* spp. y *Botrytis* spp. (++)).

### Ensayos in-vivo en invernadero

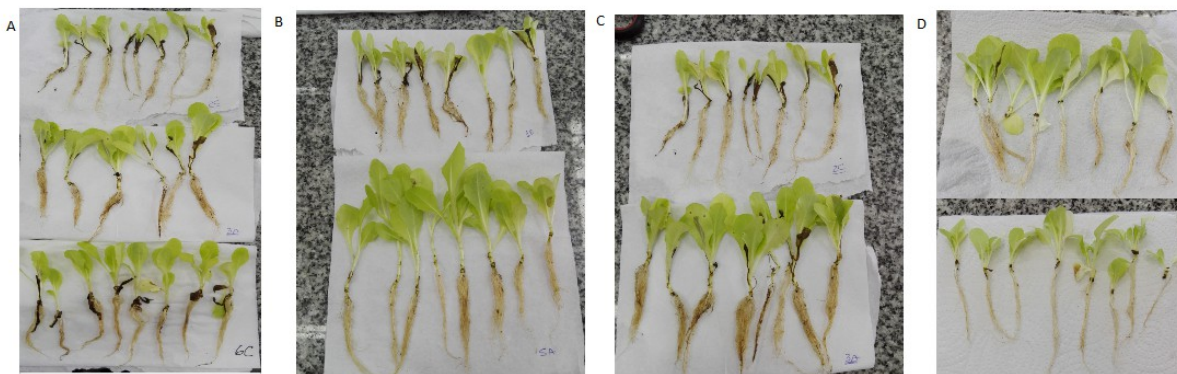
Los tratamientos 1 y 2, considerados como Controles (sin aplicación de la cepa de *Bacillus*) mostraron un comportamiento similar, deteniendo su crecimiento aproximadamente a los 35 días pos-siembra. Por el contrario, los tratamientos 3 y 4 (aplicación de la suspensión bacteriana directamente al suelo) crecieron hasta finalizar el ensayo (55 días). El tratamiento 6 (aplicación foliar) mostró un crecimiento acelerado hacia el final del ensayo. Asimismo, el tratamiento 5 (aplicación suelo+foliar) también evidenció un crecimiento acelerado hacia el final del ensayo logrando el mayor rendimiento en masa seca respecto de los tratamientos restantes. En la figura 2 se muestra la evolución de la masa seca de plantas de lechuga para cada uno de los tratamientos realizados.



**Figura 2.** Evolución de la masa seca promedio en plantines de lechuga para cada tratamiento (6 tratamientos por triplicado) bajo condiciones de invernadero durante 55 días.

La figura 3 evidencia las diferencias macroscópicas entre los plantines de cada tratamiento

Los correspondientes a los controles (1 y 2) se observaron más pequeños y con menor desarrollo radicular. Los tratados con la suspensión bacteriana (3 y 4) presentaron un considerable crecimiento de la raíz cuando se inocularon desde la siembra. Este resultado demostraría un efecto PGPR de la cepa seleccionada a través de la producción de fitohormonas, en especial el ácido indolacético (IAA) que induce el desarrollo radicular en plantas.



**Figura 3.** Longitud foliar y radicular en plantines de lechuga para diferentes tratamientos. (A) tratamientos: 2 (superior), 3 (medio) y 4 (inferior) a los 55 días; (B) tratamientos: 1 (superior) y 5 (inferior) a los 55 días; (C) tratamientos: 2 (superior) y 3 (inferior) a los 55 días; (D) tratamientos: 4 (superior) y 2 (inferior) a los 25 días.

### CONCLUSIONES

Diferentes aislamientos de bacterias esporuladas que forman parte de la ecología microbiana de frutas y hortalizas son capaces de inhibir el crecimiento de *Aspergillus* spp. y *Botrytis* spp. desarrollando halos de inhibición en ensayos de antagonismo in-vitro.

La aplicación a campo de un inóculo de una cepa con marcada actividad antifúngica in-vitro (A803) en plantas de lechuga bajo condiciones de invernáculo, desde el momento de la siembra y/o su aplicación foliar, demostró su capacidad PGPR por aumento de la longitud radicular y foliar así como de la masa seca en comparación con las plantas sin aplicación.

### BIBLIOGRAFÍA

- **Balouri M; Sadiki M & Ibsouda SK., 2015.** “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review”. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Vol 6, 2:71-9.
- **Cawoy H; Bettiol W; Fickers P; Ongena M., 2011.** “Bacillus based biological control of plant disease”. In: Stoytcheva M, editor. *Pesticides in the Modern World Pesticides Use and Management*. Rijeka, Croatia. In Tech Open. pp. 274-302.
- **Droby S; Wisniewski M; Teixidó N; Spadaro D & Haissam JM., 2016.** “The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products”. *Postharvest Biology and Technology*. 122:22-9.
- **Reddy MS; Ila RO; Faylon PS; Dar WD; Batchelor WD; Sayyed R; Sudini HK; Kumar KV; Armanda AB & Gopalakrishnan S., 2014.** “Recent Advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) for Sustainable Agriculture”. Edited by Cambridge Scholars Publishing 12 Back Chapman Street, Newcastle upon Tyne, NE6 2XX. UK.
- **Sathe SJ; Nawani NN; Dhakephalkar PK & Kapadnis BP., 2007.** “Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables”. *Journ. of Applied Microbiology*. 103:2622-8.