

## Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas

### Antagonism of *Bacillus* against fungi of the genus *Fusarium*, pathogens of vegetables

Marcia M. Rojas Badía✉, Daymara Sánchez Castro, Katia Rosales Perdomo, Daysi Lugo Moya

Laboratorio de Ecología Microbiana, Dpto. de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 # 455 e/ J e I Vedado, La Habana, Cuba.

**RESUMEN:** El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto antagonista de aislados de *Bacillus* frente a dos hongos fitopatógenos que afectan cultivos hortícolas, *Fusarium oxysporum* (Schltdll.) y *Fusarium moniliforme* (Sheld). Se enfrentaron 14 cepas de *Bacillus* a dos especies de *Fusarium* durante siete y quince días de cultivo para evaluar la actividad antagonista de las cepas bacterianas. En el ensayo de antagonismo de los 14 aislados de *Bacillus* frente a *F. oxysporum*, nueve (64 %) mantuvieron la inhibición del hongo por encima del 80 %, a los siete y 15 días de incubación. En el experimento frente a *F. moniliforme*, solo dos aislados superaron el 50 % de inhibición del crecimiento a los siete días y seis lo hicieron después de los 15 días de incubación en la interacción. Se demuestra el elevado potencial de nuevas cepas de *Bacillus* como antagonistas de *Fusarium*, fitopatógeno de cultivos hortícolas. Se seleccionaron los aislados RCGr32, RCQ7 y RCGr33 como promisorios para el control biológico de estos hongos.

**Palabras clave:** *Bacillus*, control biológico, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, hortalizas.

**ABSTRACT:** The objective of the present work was to determine the effect of *Bacillus* isolates against the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *Fusarium moniliforme*. The antagonistic at seven and fifteen days effect of 14 stains of *Bacillus* against two *Fusarium* species was determine. In the antagonistic assay against *F. oxysporum*, nine bacterial isolates kept the fungal inhibition over 80 % for seven and fifteen days. In the experiment against *F. moniliforme*, only six isolates showed inhibition percent of over 50 % after 15 days of incubation. In this work the high potential of new isolates of *Bacillus* as antagonists of *Fusarium*, phytopathogens of vegetables crops, was demonstrated. RCGr32, RCQ7, and RCGr33 were selected as the best promising isolates for the biological control of these fungi.

**Key words:** biological control, *Bacillus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, vegetables.

✉ Autor para correspondencia: Marcia M. Rojas-Badía. E-mail: [marcia@fbio.uh.cu](mailto:marcia@fbio.uh.cu)

Recibido: 5/10/2016

Aceptado: 6/7/2017

## INTRODUCCIÓN

Las hortalizas representan una parte importante dentro de la dieta alimenticia de la población cubana y constituyen el quinto lugar en la producción agrícola en nuestro país (1); aportan muchos beneficios desde el punto de vista nutricional y previenen enfermedades.

En los últimos años han disminuido las áreas cultivadas con hortalizas; en 2015 llegaron a las 183 035 ha (de 236 569 en 2010), para una producción de 2 424 163 t (2) que no abastece los mercados nacionales, debido a que los rendimientos de los cultivos hortícolas se ven afectados por factores bióticos y abióticos. Es por ello que se busca la forma de aumentar los rendimientos de su producción con el uso de métodos efectivos de la agricultura sostenible, en las que se utilicen tecnologías amigables con el medio ambiente.

Los hongos fitopatógenos son los principales causantes de enfermedades en las plantas, pues provocan, aproximadamente, el 25 % de las pérdidas en los cultivos (3).

*Fusarium* es un género fúngico ampliamente distribuido que puede afectar plantas, animales y al ser humano (4). Los miembros de este género producen toxinas, fumonisinas y otras sustancias que producen numerosas enfermedades en las plantas, como las hortalizas, el pepino, el tomate, el melón de agua, los frijoles de jardín, la pimienta, la remolacha, zanahoria y otras (5,6). Los representantes del género *Fusarium* provocan enfermedades severas en todos estos cultivos, ya que están asociados a síntomas como la marchitez vascular y pertenecen al complejo de hongos causantes del *damping-off* (4).

Una de las alternativas más utilizadas para enfrentar este ataque fúngico es el uso de biocontroladores obtenidos a partir de microorganismos, con el objetivo de disminuir el uso de agroquímicos debido a su impacto negativo sobre el medio ambiente (7), por lo

que contantemente se buscan nuevas cepas con estas potencialidades.

Entre los microorganismos que se usan con este objetivo se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB según sus siglas en inglés), las cuales aportan beneficios a las plantas y al ecosistema. Estos microorganismos tienen la capacidad de ejercer un efecto positivo sobre el crecimiento y la salud de las plantas, mediante diversos mecanismos que incluyen la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno y el control biológico de patógenos. Estos se clasifican de acuerdo a su actividad funcional en 1) biofertilizantes (incrementan la disponibilidad de nutrientes a la planta), 2) fitoestimuladores (promoción del crecimiento a través de la producción de fitohormonas), 3) rizo-remediadores (degradación de compuestos contaminantes) y 4) biopesticidas (control de enfermedades) (8). La combinación de dos o más de estos mecanismos es deseable para la formulación de bioproductos para la agricultura.

Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en diversos hábitats que incluyen ecosistemas de agua dulce, marinos y en suelo; sus especies están asociadas muchas veces a plantas, incluyen más de 100 especies y sus miembros se consideran ubicuos (9). Estas bacterias tienen la capacidad de colonizar la rizosfera y el interior de la planta, así como desarrollar su acción beneficiosa hacia el crecimiento y la salud de esta (10). Además, la característica de formación de endospora le ofrece resistencia a los cambios ambientales, lo que resulta sumamente interesante para la producción de inoculantes (11). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antagonista de aislados de *Bacillus* frente a dos hongos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* (Schldtll) y *Fusarium moniliforme* (Sheld), que afectan cultivos hortícolas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Medios de cultivo y microorganismos utilizados

Se utilizó el medio Agar Nutriente (AN) para la verificación de la pureza y conservación de las cepas bacterianas y Papa Dextrosa Agar (PDA) en los ensayos de antagonismo. Ambos medios se prepararon según las indicaciones del fabricante, añadiendo agua destilada a la cantidad recomendada del polvo del medio deshidratado y se esterilizaron (121 °C y 1 atm, 20 min).

Se emplearon 14 aislados de bacterias del género *Bacillus* provenientes de la rizosfera de plantas de café que crecían en dos sitios en Cuba: siete se aislaron en zonas del municipio Quivicán (RCQ1, RCQ2, RCQ3, RCQ4, RCQ5, RCQ7 y RCQ8) y siete procedentes de la provincia Granma (RCGr20, RCGr23, RCGr26, RCGr29, RCGr32, RCGr33 y RCGr34).

Se utilizaron los hongos fitopatógenos de cultivos de hortalizas *Fusarium oxysporum* cepa 2675 y *Fusarium moniliforme* cepa 2660, provenientes de la Colección de Cultivos Fúngicos del Instituto de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical “Alejandro Humboldt” (INIFAT) (colección WDCM 853), donados frescos por esa institución para la realización del trabajo.

### Ensayo de antagonismo

Se utilizó el método descrito por Bashan *et al.* (12); para esto, los hongos fitopatógenos se sembraron previamente en medio PDA (OXOID) y se incubaron durante siete días a 30°C. Los aislados bacterianos se sembraron en Caldo Nutriente durante 24 horas, en condiciones de agitación en zaranda orbital a 150 rpm y temperatura de 30°C. La concentración celular se ajustó a  $10^8$  cel.ml<sup>-1</sup>, tomando como referencia el tubo 0,5 de la escala Mc Farland (13).

Se sembraron 100 µl del cultivo líquido de la bacteria mediante diseminación con espátula

de Drigalsky y se dejó secar durante 15 min. Posteriormente, se depositó un bloque de 4 mm, de cada hongo previamente crecido, en el centro de la placa con medio de cultivo PDA. Las placas se incubaron a 30°C y como control negativo se empleó el hongo sembrado sin la bacteria. Las evaluaciones se realizaron transcurridos siete y 15 días. El experimento se realizó por triplicado.

Se midió el diámetro de crecimiento del hongo creciendo en presencia de la bacteria y del hongo sin la bacteria (control), para lo que se empleó un pie de rey. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento mediante la siguiente fórmula:

$$P.I. = ((D.C.C - D.C.P) / D.C.C) * 100$$

donde:

P.I - Porcentaje de inhibición.

D.C.C - diámetro de la colonia control.

D.C.P - diámetro de la colonia problema (con bacteria).

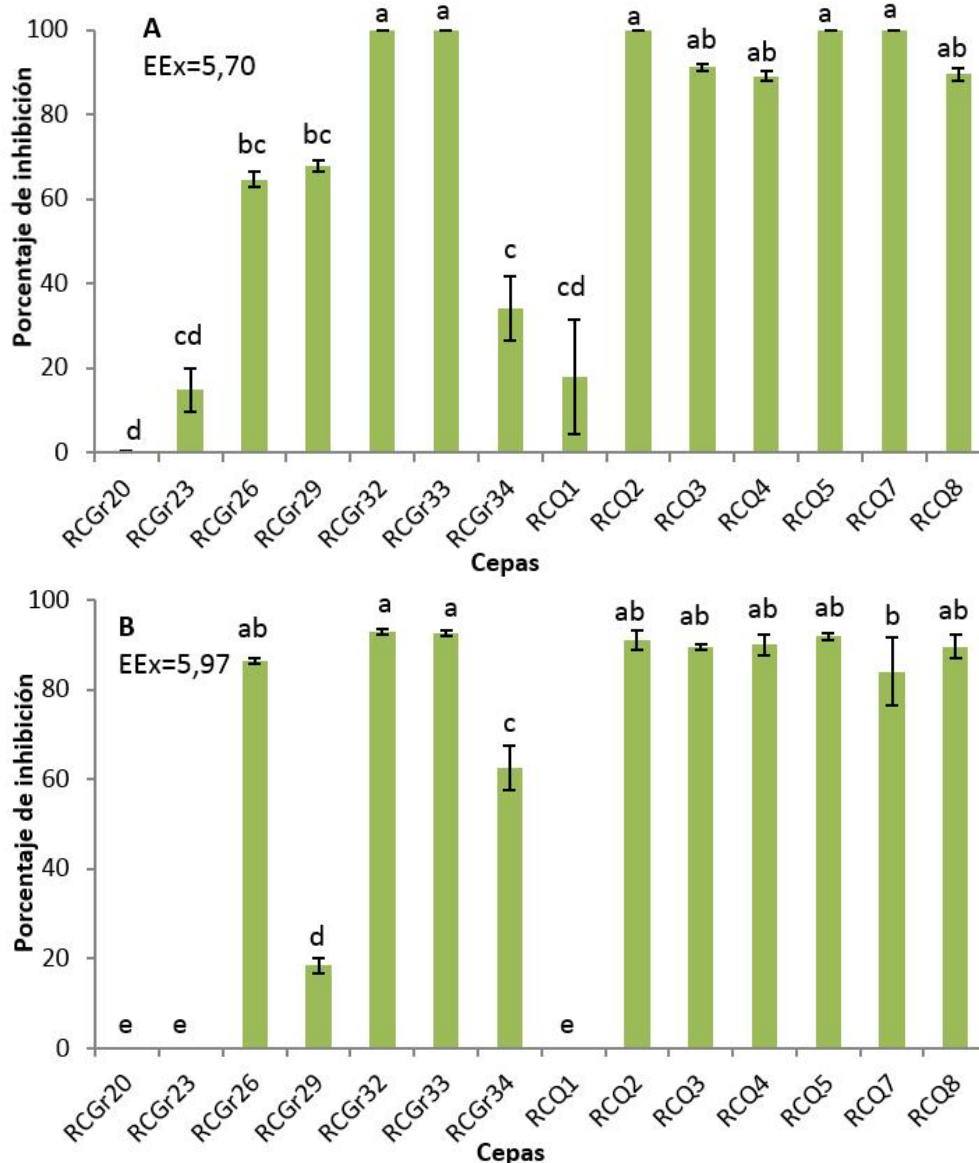
### Análisis estadísticos

Se empleó un diseño de bloques al azar. Se realizó la prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas. Posteriormente, se realizó el análisis de varianzas seguido de prueba de comparación de medias de Tukey. El agrupamiento de los aislados se realizó mediante un análisis de conglomerado, aplicando la distancia Euclidiana y el método UPGMA. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Statistica versión 8.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La utilización de bacterias del género *Bacillus* en el control biológico de microorganismos fitopatógenos es una excelente alternativa, debido a la capacidad que presentan para producir una amplia gama de metabolitos secundarios (10).

Las cepas mostraron altos niveles de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* (Fig. 1). Nueve cepas (64 %) mantuvieron la inhibición del hongo por encima del 80 % en ambos tiempos de incubación, lo que indica el



**FIGURA 1.** Efecto antagonístico de las cepas de *Bacillus* frente a *F. oxysporum* a los siete (A) y 15 días (B). Medias de tres réplicas. En cada tratamiento se indica la desviación estándar. Letras no comunes indican diferencias significativas para la prueba Tukey ( $p < 0,05$ ). A: EEx=5,70, B: EEx=5,97./ *Antagonistic effect of Bacillus strains against F. oxysporum after 7 (A) and 15 days (B). Data represent the means of three replicates with the standard deviations. Means with different letter are significantly different according to Tukey test ( $P < 0.05$ , A: EEx=5.70, B: EEx=5.97).*

elevado potencial de estas cepas como antagonistas de este patógeno. Esto puede deberse a la amplia gama de metabolitos producida por las bacterias del género *Bacillus*, que pueden actuar frente a hongos, entre los que se encuentran los antibióticos, los lipopéptidos, las enzimas líticas y los

sideróforos (14).

Se realizaron estudios que demostraron específicamente los metabolitos involucrados en el control de este hongo por *Bacillus*. Por ejemplo, se describió la producción de Subtilina por cepas de *B. subtilis*, responsable de la actividad antagonista contra *F.*

*oxysporum*, que produce el marchitamiento (15) y la producción de bacilomicina y fengicina por *Bacillus amyloliquefaciens* cepa FZB42 (16).

En estudios previos, cepas de *Bacillus* inhibieron el crecimiento de otras especies de *Fusarium* en porcentajes entre 55 y 65 % (17,18). Además, Heidarzadeh y Baghaee-Ravari (19) demostraron que se produjo el 73 % de reducción de incidencia de la enfermedad *in vivo* en tomate, debido al efecto de *B. pumilus*-ToIrMA.

En el ensayo de antagonismo de las 14 cepas de *Bacillus* frente a *F. moniliforme*, solo seis cepas superaron el 50% de inhibición del crecimiento del hongo después de los 15 días de incubación (Fig. 2). Se debe destacar que todas las cepas, excepto RCQ4, aumentaron la inhibición del hongo cuando se dejaron interactuar durante 15 días, lo que indica el mantenimiento de su actividad antagonista en el tiempo, aspecto favorable para su posible utilización en el control biológico de estos fitopatógenos. Este hecho ya se había observado para algunas cepas de este mismo género frente a otros hongos fitopatógenos (20).

En sentido general, la actividad frente a *F. oxysporum* fue mayor que frente a *F. moniliforme* (Fig. 3). Esto ocurre tanto a los siete como a los 15 días de incubación, aunque en este último momento de evaluación aumentó la cantidad de aislados que evidenciaron porcentaje de inhibición mayor del 50 %. Igualmente ocurre al realizar el análisis para las cepas que inhiben a la vez a ambos hongos, que aumentan del 7 al 42 % entre ambos tiempos del experimento. El mantenimiento o aumento de los porcentajes de inhibición en el tiempo es importante para la futura aplicación de estos resultados, ya que de esta manera se lograría mayor efecto en el control del fitopatógeno. Se debe señalar que, en sentido general, es mejor frente a uno de los hongos.

En estudios realizados por Rodríguez *et al.* (21) con cepas de *Bacillus*, los resultados

sugieren cierta especificidad de los metabolitos involucrados de acuerdo al hongo fitopatógeno al que se desea controlar. En este estudio se destacaron diferentes cepas frente a los hongos *Cladosporium oxysporum* (Berk. & MA.), *Fusarium chlamydosporum* (Wollenw. &

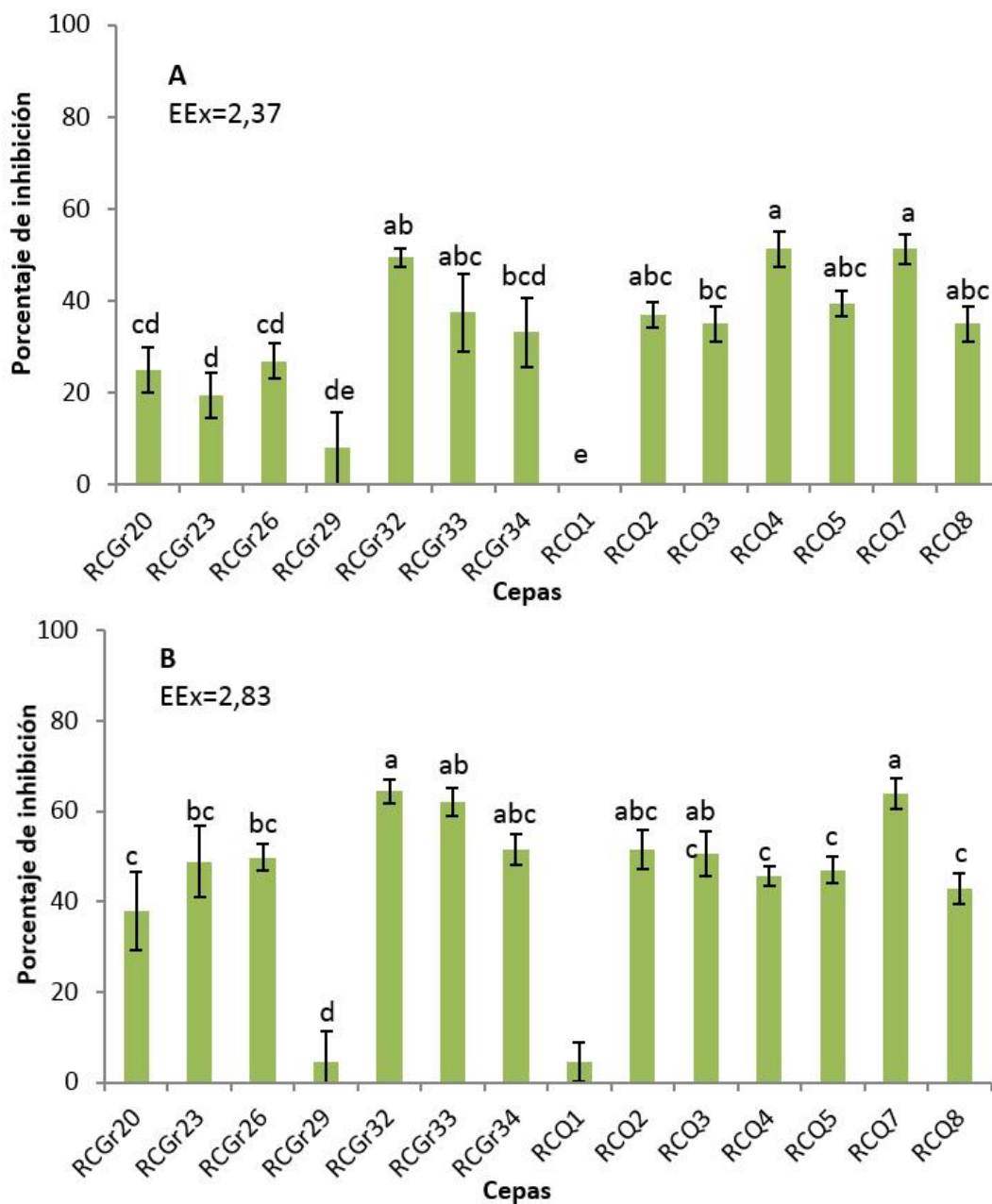
Reirking) y *Corynespora cassiicola* (Berk. & MA.). Sin embargo, en el presente estudio se demostró que los aislados RCGr32, RCGr33, RCGr34, RCQ2, RCQ3 y RCQ7 evidenciaron actividad antagonista frente a los dos patógenos evaluados (Fig. 3), lo que amplía las potencialidades de su utilización en el control biológico.

El agrupamiento de los aislados, de acuerdo con su capacidad antagonista frente a los dos fitopatógenos evaluados y en ambos tiempos de incubación, reveló la formación de varios grupos al realizar un corte a 20 % empleando la distancia euclidiana (Fig. 4). Uno de los grupos está formado por ocho cepas aisladas y el control positivo, en el cual se distinguen dos ramas: una formada por las cepas RCGr32, RCQ7 y RCGr 33 junto al control positivo, lo que indica que son las mejores cepas, y otra rama cercana a los mejores aislados, formada por RCQ2, RCQ5, RCQ3, RCQ8 y RCQ4. Junto al control negativo se agrupa la cepa RCQ1. El resto de las cepas se agrupan por pares o quedan individuales.

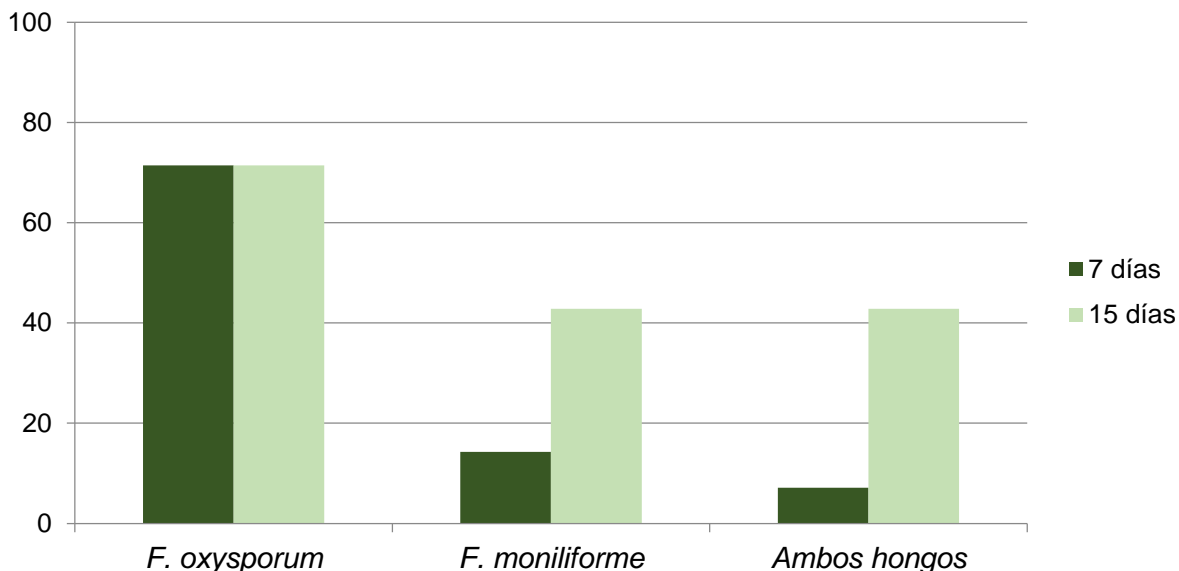
En el mejor grupo se encuentran ubicadas cepas provenientes de las plantas de Granma y de Quivicán, lo que demuestra que no existe una presión selectiva previa para el antagonismo frente a estos hongos en su medio natural.

En el presente trabajo se demuestra la actividad antagonista de nuevos aislados de *Bacillus*, frente a dos especies de hongos del género *Fusarium*, fitopatógenos que afectan varios cultivos hortícolas. Se seleccionaron los aislados RCGr32, RCQ7 y RCGr 33 como promisorios para el control biológico de estos hongos, aunque este trabajo constituye el primer paso hacia la selección de cepas eficientes en el control biológico de *Fusarium*,

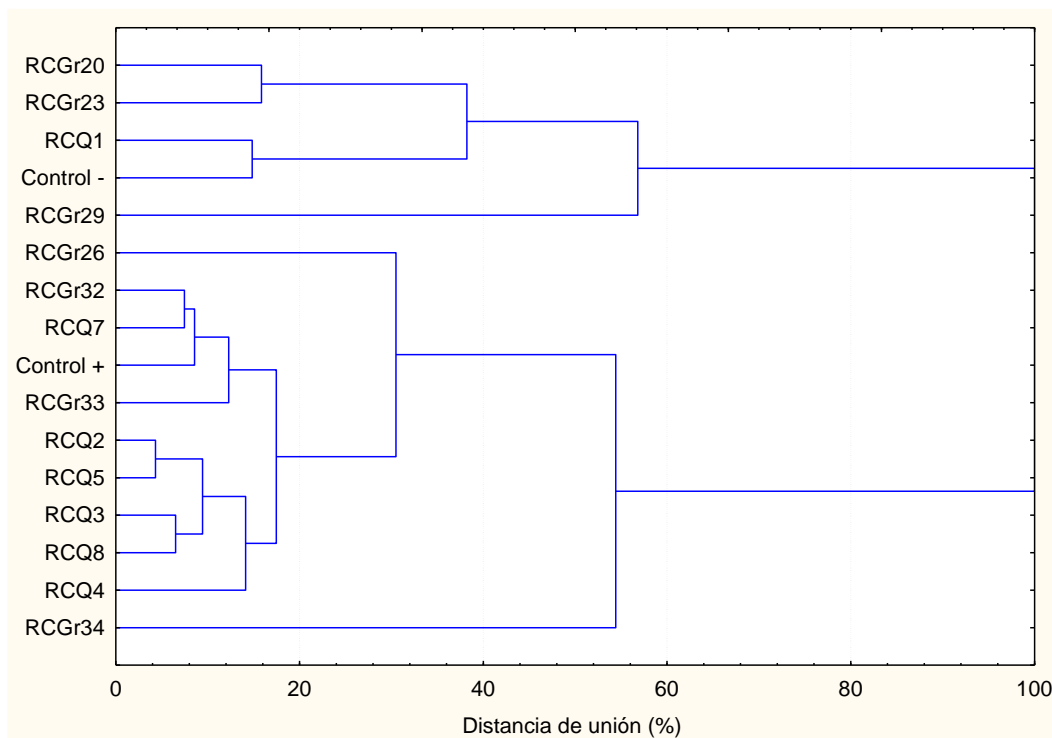
por lo que se deben continuar los estudios para esclarecer los mecanismos responsables del antagonismo, así como su comportamiento en la interacción con la planta.



**FIGURA 2.** Efecto antagónico de los aislados de *Bacillus* frente a *F. moniliforme* a los siete (A) y 15 días (B). Medias de tres réplicas. En cada tratamiento se indica la desviación estándar. Letras no comunes indican diferencias significativas para la prueba Tukey ( $p < 0,05$ ) A: EEx=2,37, B: EEx=2,83./ *Antagonistic effect of Bacillus strains against F. moniliforme after 7 (A) and 15 days (B). Data represent the means of three replicates with the standard deviations. Means with different letter are significantly different according to Tukey test ( $P < 0.05$ , A: EEx=2.37, B: EEx=2.83).*



**FIGURA 3.** Porcentaje de aislados de *Bacillus* que produjeron porcentajes de inhibición mayor del 50 % para cada hongo fitopatógeno evaluado y ambos a la vez, medidos a los siete y 15 días. / Percentage of *Bacillus* isolates with percentages of inhibition over 50 % against each fungi and both together, measured at seven and 15 days.



**FIGURA 4.** Agrupamiento de los aislados de *Bacillus* spp. de acuerdo a la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos a los siete y 15 días. El dendrograma se calculó a partir de los valores obtenidos en cada experimento. / Grouping of *Bacillus* spp. strains according to their capacity for inhibiting the phytopathogenic fungi growth at seven and 15 days. The dendrogram was calculated from the values obtained in each experiment.

## REFERENCIAS

1. García A, Anaya B. Dinamismo del sector agropecuario: condición necesaria para el desarrollo cubano. *Economía y Desarrollo*. 2015; 153 (Número Especial): 159-177.
2. AEC. Anuario Estadístico de Cuba, Capítulo 9. 2016, 32pp.
3. Lugtenberg B. "Introduction to plant-microbe-interactions," in *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture*, ed. B. Lugtenberg (Berlin: Springer). 2015; 1-2.
4. Agrios G. *Plant Pathology*. 7a ed., edit. Elsevier Academic Press, London. 2013; 929 pp., ISBN0-12-044565-4.
5. Naik G, Saifulla N, Basavaraja M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*, the casual agent of stem rots of vanilla *in vitro*. *Int J Sec and Netw*. 2010; 1(2):259-261.
6. Nikam P, Jagtap G, Sontakke P. Survey, surveillance and cultural characteristics of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *African J Agric Res*. 2011; 6(7):1913-1917.
7. Qiao J, Wu H, Huo R, Gao X, Borriss R. Stimulation and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action. *Chem. Biol. Technol. Agric*. 2014;1(12): 2-14.
8. Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective *Journal of King Saud University – Science*. 2014; 26: 1-20.
9. Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas JD. Ecology of Bacillaceae. *Microbiol Spectrum*. 2015; 3(1): 1-24.
10. Borriss R. "Bacillus, a plant beneficial bacterium" in *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture*, ed. B. Lugtenberg (Berlin: Springer) .2015; 379-391.
11. Ajilogba CF, Babalola OO. Integrated Management Strategies for Tomato *Fusarium* Wilt. *Biocontrol Science*, 2013; 18(3): 117-127.
12. Bashan Y, Holguín G, Ferrera-Cerrato R. Interacciones entre las plantas y los microorganismos benéficos. *Terra*. 1996; 14(2): 159-92.
13. Natural Committee for Clinical laboratory standards for antimicrobial Disk NCCSL. "Susceptibility Test". Approved standard. M2-A5. 1993; 13(24).
14. Ali G, Norman D, Ashraf S. El-Sayed Soluble and Volatile Metabolites of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPRs): Role and practical applications in inhibiting pathogens and activating Induced Systemic Resistance (ISR). *Adv Bot Res*. 2015;75: 241-284.
15. Karimi K, Amini J, Harighi B, Bahramnejad B. Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. *Aust. J. Crop Sci*. 2012; 6: 695-703.
16. Koumoutsis A, Chen X, Henne A, Liesegang H, Gabriele H, Franke P, Vater J, Borriss R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bact*. 2004; 186: 1084-1096.
17. Majaw S, Khonglah D, Kayang H, Rao M. Isolation and identification of indigenous microbial bioagents strains from Meghalaya and *in vitro* evaluation of the antagonistic properties against common fungal phytopathogens. *J Agric Technol*. 2016;12(4):743-752.
18. Muhammad A, Fatema T, Shamima N, Sanzida M, Anwar H, Rashed N. Isolation of a potential antifungal *Bacillus subtilis* 37-JM07 strain from straw and its biocontrol efficacy to combat green mold disease of commercial mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Environm Sci Indian J*. 2016; 12(1): 1-14.



19. Heidarzadeh N, Baghaee-Ravari S. Application of *Bacillus pumilus* as a potential biocontrol agent of *Fusarium* wilt of tomato. Arch Phytopathol and Plant Prot. 2015; 48(13-16): 841-849.
20. Tejera Hernández B, Heydrich Pérez M, Rojas Badía M M. Antagonismo de *Bacillus* spp. contra hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Rev Protección Vegetal. 2012; 27 (2): 117-122.
21. Rodríguez J, Ríos Y, Baró Y. Efectividad de cepas de *Azotobacter* sp. y *Bacillus* sp. para el control de especies fúngicas asociadas a hortalizas. Cult Trop. 2016; 37: 13-19.