

**Actividad antagónica de *Bacillus subtilis* LEM1 contra *Colletotrichum falcatum*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Rhizoctonia sp* y *Phytophthora sp*, patógenos aislados de plantas de *Saccharum officinarum*.**

**René Basaves Martínez<sup>1</sup>, Ramón Cruz Camarillo<sup>1</sup>, Isaac Juan Luna Romero<sup>1</sup>, Francisco Hernández Rosas<sup>2</sup>, Katia Angélica Figueroa Rodríguez<sup>2</sup> y Luz Irene Rojas Avelizapa<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. México, D.F. <sup>2</sup>. Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba, Km 348 carretera Federal Córdoba – Veracruz, Amatlán de los Reyes, Ver. CP 94946. ([luzirenemx@hotmail.com](mailto:luzirenemx@hotmail.com)).

## **Introducción**

Actualmente la agricultura está basada en un sistema intensivo de producción que requiere un alto consumo de combustibles fósiles, así como el empleo masivo de fertilizantes y productos fitosanitarios (agroquímicos). La búsqueda de sistemas de control biológico que contribuyan a aliviar problemas fitopatológicos, para eliminar o disminuir la utilización de productos químicos que tanto dañan al medio ambiente, ha sido una preocupación constante de los investigadores en los últimos años. Sin embargo, han sido pocos los sistemas biológicos de control de enfermedades vegetales que han tenido éxito y que se han llegado a comercializarse. El éxito de estos sistemas depende de su eficiencia para controlar al patógeno, de interés, así como de la facilidad de manipulación del microorganismo antagónico para su producción a escala industrial. También importa que su costo de producción sea bajo.

La necesidad de propiciar un ambiente menos contaminado, obliga a los investigadores interesados en estas áreas, a buscar preferentemente sistemas biológicos de control, para reducir los efectos negativos sobre el hombre, y en general sobre el medio ambiente, evitando así el uso indiscriminado de plaguicidas.

## **Objetivos**

1. A partir de muestras de suelo de cañaveral, realizar el aislamiento y selección de microorganismos antagonistas contra hongos y bacterias fitopatógenas ya conocidas.
2. Evaluar la capacidad antagonista de uno o más aislados promisorios contra hongos fitopatógenos de plantas de caña enfermas, procedentes de Veracruz, tales como *Colletotrichum falcatum*, *Rhizoctonia solanii* y *Phytophthora sp.*, los cuales fueron aislados también de muestras de hojas, tallo y raíces de plantas de caña enfermas..
3. Identificar Bioquímica y molecularmente al o a los microorganismos seleccionados.

## **Metodología**

### *Preparación de una suspensión de suelo para la obtención de colonias bacterianas*

Se mezclaron en un matraz 10 g de suelo de cañaveral y 90 ml de agua destilada estéril. Después de homogeneizar, cuidadosamente se prepararon diluciones  $10^{-4}$  hasta  $10^{-7}$ , a partir de la suspensión del suelo, y se inocularon alícuotas de 0.1 ml de dichas diluciones en agar nutritivo, distribuyendo homogéneamente sobre la superficie con una varilla acodada estéril. Después se incubó a 28°C hasta la aparición de colonias bacterianas.

### *Selección de cepas bacterianas con capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos*

En el centro de una placa de PDA, se sembró una porción del hongo blanco obtenido con ayuda de un sacabocados de 0.3 cm de diámetro. Enseguida se inocularon alrededor del hongo las diferentes bacterias, posibles productoras de sustancias antifúngicas mediante la técnica del punto, que consiste en inocular puntualmente cada una de las bacterias a ensayar, a una distancia de 2.5 cm del hongo blanco. Posteriormente las placas se incubaron a 28°C, hasta la observación de una zona de inhibición en torno a las bacterias con actividad antagonista. Se seleccionaron y purificaron las bacterias que presentaron un halo de inhibición.

### *Capacidad antagónica de la bacteria(s) seleccionada(s)*

Nuevamente se sembró al hongo como ya fue indicado, en el centro de las placas de PDA, y a su alrededor, a una distancia de 2.5 cm, se inocularon por picadura 4 ó 8 puntos de las bacterias que mostraron previamente capacidad antagónica. Como testigo se dejó una placa de PDA inoculada únicamente con el hongo, midiendo el diámetro de su colonia cada 24 h, hasta que el testigo cubrió la totalidad de la placa. Finalmente se determinó cual o cuales bacterias presentaron la mayor actividad antagónica.

### **Resultados**

Se obtuvieron 62 aislados bacterianos provenientes de suelos de cultivos de caña del Estado de Veracruz, los cuales fueron colectados y clasificados en base a su tamaño, forma, color y consistencia de su colonia (Figura 1).



**Figura 1. Diversidad de colonias bacterianas presentes en una muestra de suelo de cañaveral.**

Del total de bacterias ensayadas se seleccionaron 10, por presentar actividad antagónica contra *Colletotrichum falcatum* ó *Rhizoctonia solanii* ó *Phytium sp.* Sólo uno de ellos, identificado

preliminarmente como un bacilo Gram positivo, fue capaz de presentar antagonismo contra los tres hongos mencionados.

Con base en estudios bioquímicos y moleculares, se pudo determinar que la bacteria con mayor actividad antagónica correspondía a *Bacillus subtilis*, y fue denominado *B. subtilis LEM1* (Bs LEM1).

Como ya se mencionó en materiales y métodos, la inhibición del crecimiento de los diferentes hongos se evaluó por medición del crecimiento radial de la colonia fúngica en comparación con el testigo, durante 5 días. El testigo se dejó crecer en ausencia del antagonista. Los resultados mostraron que BsLEM1 fue capaz de inhibir *in vitro* el 72 % del crecimiento de *C. falcatum* (Figura 2); en un 70% a *C. gloesporoides* (Figura 3); en un 90 % el de *Rhizoctonia sp.* (Figura 4) y un 70% del crecimiento de *Phytium sp* (Figura 5).



Testigo *C. falcatum*

Actividad antagónica  
*B. thuringiensis*/*C. falcatum*

Actividad antagónica  
*Bs LEM1*/*C.falcatum*

**Figura 2. Actividad antagónica de *B. thuringiensis* y *BSLEM1* contra *C. falcatum*.**

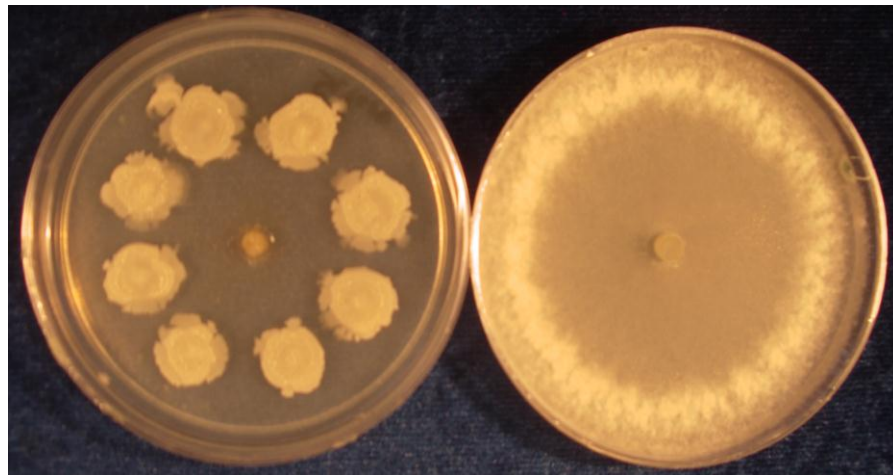


Testigo *C. gloesporoides*

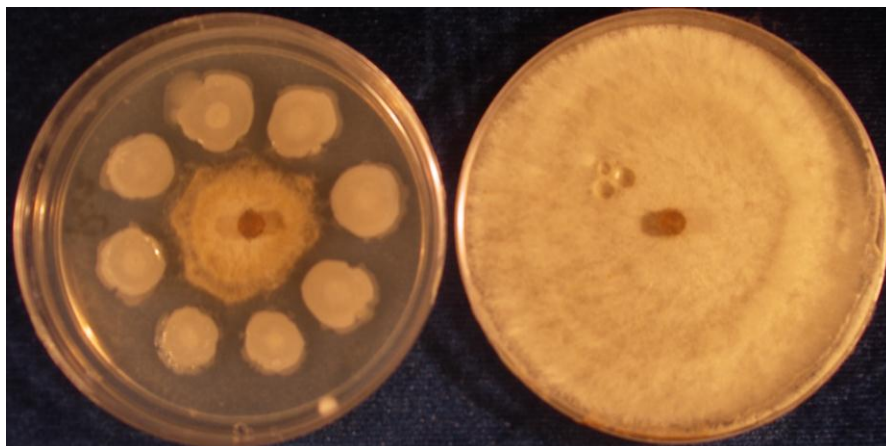
Actividad antagónica  
*B. thuringiensis*/*C. gloesporoides*

Actividad antagónica  
*Bs LEM1*/*C. gloesporoides*

**Figura 3. Actividad antagónica de *B. thuringiensis* y *BSLEM1* contra *C. gloesporoides*.**



**Figura 4. Actividad antagónica de *BsLEM1* contra *Rhizoctonia sp.***



**Figura 5. Actividad antagonica de BsLEM1 contra *Phytium sp.***

Además BsLEM1 presentó actividad antagonica contra otros hongos fitopatogénos de importancia agrícola como *Sclerotinia* en un 77.5%; *Fusarium* en un 61%, y también sobre otros hongos como *Bipolaris*, *Botritis*, *Helminthosporium*, *Alternaria*, *Curvularia* y *Microciclus hulei*.

Aunado a esto fue posible demostrar 85-90% de actividad antagonica de BsLEM1 contra bacterias de importancia fitopatológica como *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas phaseolícola*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas phaseoli*, *Xanthomonas translucens* y *Clavibacter michiganensis*.

### **Conclusiones**

Aunque ya se ha reportado en *Bacillus subtilis* su capacidad antagonica, llama la atención que la cepa Bs LEM1 posea una muy extensa capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatogénos y también de bacterias fitopatogénas. Cabe mencionar que también se ha ensayado contra bacterias y levaduras de interés médico con excelentes resultados. De tal forma que puede asegurarse que se trata de un microorganismo con un potencial biotecnológico promisorio y

muchas perspectivas de uso, si se considera que *B. subtilis* es un microorganismo GRAS, es decir cuyo uso no ofrece riesgo para la salud humana o animal.

### **Agradecimientos**

Al Proyecto Nacional SNITT – COFUPRO – FPV “DISEÑO DE UN PROGRAMA COMTEMPORÁNEO DE MANEJO INTEGRADO DE MOSCA PINTA EN CAÑA DE AZÚCAR”. Al Colegio de Postgraduados mediante la LPI 13: Comunidades Rurales Agrarias, Ejidos y Conocimiento Local. A los Proyectos SIP-IPN 20121524 y 20121549.