

# Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco\*

Acenet I. Sosa López (1), Victoria Pazos (2) y Dania Torres (2).

(1) Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, C. Habana, Cuba.

(2) Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, C. Habana.

---

**RESUMEN.** El control de microorganismos patógenos mediante el empleo de otros microorganismos con efecto antagonista es una práctica mundial, y la búsqueda constante de nuevos aislados promisorios más efectivos en el control biológico es una actividad que ocupa en la actualidad a muchos investigadores. Se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida, que son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos. A partir del procesamiento de suelos, rizosferas y otros hábitats, se obtuvo un total de 323 aislados pertenecientes al género *Bacillus*, los cuales fueron enfrentados contra tres especies de los principales hongos fitopatógenos que afectan el cultivo del tabaco en Cuba en la época de establecimiento de los semilleros, siendo éstos *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermatum*. De ellos, un total de 17 aislados causaron inhibición del crecimiento micelial de los hongos *S. rolfsii* y *R. solani* (Rz10) y *P. aphanidermatum*.

Palabras clave: bacterias, *Bacillus*, control biológico, semilleros de tabaco

**ABSTRACT.** The control of pathogenic microorganisms with other microorganisms having antagonistic effect is a worldwide practice where the routine search for more promising isolates plays a crucial role. It has been demonstrated that bacteria belonging to Genus *Bacillus* have a tremendous potential as antagonists due in great part to the production of lytic enzymes, antibiotics and other substances with biocide activity which are capable of controlling several phytopathogenic species. The processing of soil samples, rhizospheres and material from other habitats yielded a total of 323 isolates which belonged to Genus *Bacillus* which were dually cultured with three critical fungal pathogens appearing in seedlings of tobacco in Cuba. They were *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium aphanidermatum*. The inhibition of the mycelial growth of *S. rolfsii* and *R. solani* pathogenic species (Rz10) was exhibited by 17 isolates of *Bacillus*.

Keywords: bacterias, *Bacillus*, biological control, tobacco nursery.

## INTRODUCCIÓN

En Cuba, el cultivo del tabaco ocupa un renglón importante en la agricultura, debido a los beneficios que reporta cada año a la economía la exportación del producto que de él se obtiene. Es por ello, que requiere una atención priorizada, ya que anualmente se ve afectado por numerosas enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos del suelo, siendo las especies pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotium* y *Rhizoctonia* las más frecuentemente encontradas debido en muchas ocasiones a las condiciones climáticas que se registran anualmente en nuestro país; estas enfermedades

pueden provocar el colapso total de las plantas en la fase temprana del cultivo (Brada *et al.*, 1995).

Debido a la necesidad que existe de proteger las especies agrícolas los bioplaguicidas elaborados a partir de microorganismos y productos naturales, se insertan como un todo dentro del esquema del manejo integrado de plagas (Estrada, 1995).

Las especies del género *Bacillus* poseen características especiales, tales como, la formación de endosporas termorresistentes a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación,

\* Agrocentro (IX Simposio de Sanidad Vegetal en la Agricultura Tropical)

los ácidos grasos y los desinfectantes químicos, que les posibilita ocupar un lugar importante como agentes de control biológico (Bergey, 1986). Generalmente, se encuentran en el suelo formando parte de la rizosfera de las plantas, comportándose como colonizadores eficaces, debido a que son productoras de sustancias, tales como: hormonas, antibióticos y metabolitos termoestables que le proporcionan la capacidad de conquistar determinados ambientes agrícolas y, por ende, impiden el establecimiento de microorganismos patógenos (Todar, 2003).

En este trabajo nos propusimos aislar y seleccionar microorganismos nativos del género *Bacillus*, y evaluar la actividad antagonista *in vitro* frente a los patógenos *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* (Rs10) y *Pythium aphanidermatum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta del material se realizó por los especialistas del laboratorio de Bacterias Entomopatógenas del INISAV. Se tomaron muestras de suelos, rizosferas, raíces, semillas y hojas de diferentes provincias del país tales como: Pinar del Río, La Habana, Cienfuegos, Santiago de Cuba, Sancti Spíritus, etc., y fueron transportadas en bolsas de nylon hasta el laboratorio donde se procesaron.

### Aislamiento de bacterias del género *Bacillus*

Esta prueba se realizó empleando el medio de cultivo Agar Nutriente.

Primeramente se realizó el proceso de Pasteurización de las muestras (suelo y rizosfera). Se procedió con el método de las diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  y finalmente se incubaron las placas a  $28 \pm 2$  °C hasta visualizar colonias individuales. Se realizaron tres réplicas por cada dilución. En el caso de las semillas se colocaron en forma de espiral en las placas con medio y se incubaron a igual temperatura que el caso anterior por un período de 72 horas.

Las hojas se trituraron en un mortero, se lavaron y se enjuagaron previamente con solución salina al 0,5 % y posteriormente con agua destilada estéril, luego se preparó la solución madre y se procedió con el método de las diluciones seriadas. Se realizó la observación con el microscopio Estereoscopio 100X de las colonias individuales y se seleccionaron las que presentaban características culturales similares a las pertenecientes al género *Bacillus*, según lo descrito en el Manual de Bergey (1986). Estas se sembraron por agotamiento en las placas con medio de cultivo hasta visualizar colonias aisladas y un cultivo puro.

Mediante una observación al microscopio óptico 1000X con una tinción simple de solución Violeta Cristal al 0,5 % se determinó la presencia de esporas bacterianas, característico del género *Bacillus*, además se realizó la prueba de Gram y la catalasa. Las que presentaron formación de esporas bacterianas se conservaron en tubos con Agar Nutriente los cuales se incubaron durante 5 días a 30 °C y posteriormente se conservaron a 4 °C.

### Acción antimicrobiana *in vitro*

Esta prueba se realizó empleando los hongos fitopatógenos *R. solani*, *S. rolfsii* y *P. aphanidermatum* provenientes de la colección del INISAV.

Para evaluar la acción antagonista de los aislados bacterianos sobre el crecimiento de estos tres hongos, se empleó el medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Se realizó una suspensión de esporas bacterianas la cual fue mezclada en erlenmeyers de 250 mL que contenían 100 mL de PDA previamente esterilizados a 121 °C durante 20 minutos, inmediatamente se vertieron en placas de Petri. Una vez solidificado el agar se sembró el disco de micelio de 5 mm de diámetro, con siete días de crecido, en el centro de la placa. Se realizaron cinco réplicas de cada variante y se efectuaron 3 repeticiones de cada una de las combinaciones. En las placas testigos no se sembraron las cepas bacterianas. Todas las placas se incubaron a  $28 \pm 2$  °C, y durante veintidós días se observó el crecimiento de los patógenos y cualquier posible manifestación de antagonismo. Se hicieron

observaciones diarias y las evaluaciones se realizaron a los cinco, quince y veintiún días.

En los casos donde hubo inhibición del crecimiento micelial de los hongos se seleccionó la bacteria como antagonista, y se procedió a conservar dicha bacteria en discos de papel de filtro a 4 °C, para posteriores estudios.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 61 muestras, de ellas siete fueron de hojas, a partir de las cuales se obtuvieron 12 baciláceas, cuatro pertenecen a semillas de arroz de diferentes variedades, obteniéndose un total de 16 baciláceas. El resto de las baciláceas obtenidas pertenecen a las muestras de suelo y rizosfera, alcanzándose un total de 323 aislados con características que los ubican dentro del género *Bacillus*. La observación al microscopio óptico de la tinción con Violeta Cristal mostró la presencia de células vegetativas con forma bacilar, alargadas en forma de varilla, formación de esporas bacterianas en cultivos de 24 horas o más (3-5 días), todas manifestaron ser centrales, elípticas y no distienden el esporangio. Las colonias se mostraron lisas y rugosas, con bordes irregulares, convexas, de colores crema claro, blanco, blanco grisáceo, de pequeñas a mediano tamaño. Todas resultaron ser catalasa positiva y la respuesta a la tinción de Gram demostró que eran Gram positivas.

De forma general estos resultados concuerdan con los referidos por otros autores, quienes plantean que las especies de *Bacillus* son ubicuas en la naturaleza, encontrándose en mayor proporción en los suelos como microorganismos saprófitos, por lo que resulta de gran utilidad usar muestras de suelo como fuente de inóculo para aislar cepas de este género, además, en este ambiente estas bacterias se vuelven metabólicamente activas cuando los sustratos para su crecimiento están disponibles (Travers *et al.*, 1987).

De los 323 aislados obtenidos, 17 mostraron actividad antagonica frente a los tres patógenos probados, estos aislados provienen de las muestras de suelo y rizosfera, lo que demuestra

la potencialidad que alcanzan estos microorganismos en dichos ambientes ecológicos. Según Bettiol *et al.* (1989) en la naturaleza existen un gran número de microorganismos antagonistas productores de sustancias inhibidoras de diferentes patógenos, pero en condiciones *in vitro* es necesario tener en cuenta el medio de cultivo en que se va a realizar el enfrentamiento y trazarse un esquema de selección de los aislados.

Al quinto día de montado el experimento se seleccionaron como cepas antagonistas, aquellas que presentaron una manifestación diferente en el crecimiento micelial del patógeno con respecto al testigo; las que presentaron un halo de inhibición de tamaño considerable, que impidió el crecimiento y desarrollo del hongo; en las que el crecimiento micelial de dicho patógeno fue nulo (Fig.1) y aquellas en las que el hongo creció y no se detectó a simple vista, sino mediante el empleo del microscopio estereoscópico 100x, ya que el micelio resultó ser escaso y con una coloración más clara que la del testigo. Resultaron negativas aquellas en las que el crecimiento fúngico cubría la placa completa.

En los casos de *S. rolsii* y *P. aphanidermatum* al tercer día de montado el experimento el testigo había cubierto la placa completa, no siendo así en *R. solani* (Rs10) quien demoró cinco días. En las evaluaciones a los 15 y 21 días los resultados se mantuvieron idénticos.

En la Tabla 1, se muestra la procedencia de los diferentes aislados antagonistas y el efecto de cada uno de ellos sobre los ya mencionados patógenos; se hace evidente que *R. solani* y *S. rolsii* manifestaron una mayor sensibilidad, bastante semejante entre ambas frente a cada uno de los aislados, a diferencia de *P. aphanidermatum* el cual demostró ser menos sensible. Sin embargo, en los tres casos coincide que hay cuatro aislados altamente efectivos para el control *in vitro* de estos microorganismos patógenos, nombrándose ASRP-4, ASRP-5, ASRP-6 y ASRP-16.



**Figura 1.** Inhibición del crecimiento micelial del hongo *S. rolfsii* por la acción del aislado AS-3, AS-5 y AS-1, respectivamente, al quinto día de montado el experimento.

**Tabla 1.** Procedencia y evaluación de la actividad antagonista de los *Bacillus* spp.

Aislados		Tipo de muestra	Antagonistas		
Código	Procedencia		<i>S. rolfsii</i>	<i>R. solani</i> (Rs10)	<i>P. aphanidermatum</i>
ASRP-1	Habana	Suelo	+++	++	+
ASRP-2	Habana	Suelo	++	++	+
ASRP-3	Habana	Suelo	++	+++	+++
ASRP-4,5,6	Stgo. de Cuba	Rizosfera	++++	++++	++++
ASRP-7,8,9	Stgo. de Cuba	Rizosfera	+	+	+
ASRP-10	Stgo. de Cuba	Rizosfera	+++	+++	++
ASRP-11-13	Stgo. de Cuba	Rizosfera	+++	+++	+
ASRP-14,15	S. Spiritus	Suelo	+++	+++	+
ASRP-16	Stgo. de Cuba	Suelo	++++	++++	++++
ASRP-17	Stgo. de Cuba	Suelo	+	+	+

++++ 0 crecimiento del patógeno;  
 +++ halo de inhibición;  
 ++ crecimiento diferente al del patógeno;  
 + crecimiento no visible a simple vista.

Aunque estos estudios son simplemente preliminares, los resultados obtenidos evidencian una vez más el elevado potencial que presentan las bacterias del género *Bacillus* para el control biológico en condiciones *in vitro*, pero está demostrado por numerosos autores que los microorganismos pertenecientes a este género se caracterizan por tener la capacidad de producir sustancias, tales como, metabolitos, antibióticos, enzimas líticas, entre otras que aisladas, purificadas y producidas a gran escala son una valiosa alternativa del control químico, que tanto se ha encarecido a nivel Internacional y del cual existe una tendencia cada vez más generalizada a disminuir su uso, debido precisamente a los daños que ha causado al hombre y al medio ambiente.

Estos resultados corroboran lo obtenido por otros autores como Dos Santos y De Melo quienes han reportado el carácter antagonista de las bacterias del género *Bacillus* sobre diferentes

hongos fitopatógenos, cuando aislaron *Bacillus* spp. antagonista a *R. solani*.

## CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un total de 323 aislados nativos pertenecientes al género *Bacillus*, de los cuales 17 mostraron actividad antagonista frente a los hongos *S. rolfsii*, *R. solani* y *P. aphanidermatum*.
2. Los aislados más efectivos, los cuales inhibieron al ciento por ciento el crecimiento micelial del patógeno fueron los nombrados como ASRP-4, ASRP-5, ASRP-6, ASRP-16 identificados como *Bacillus* spp.

## BIBLIOGRAFÍA

Bergey's Manual Editorial Board (1986): *Genus Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

9<sup>th</sup> edition, vol. 2, Williams & Wilkins Company, pp. 1105-1139.

Bettiol W. y H. Kimati (1989): “Selecao de microorganismos antagonicos a *Pyricularia Oryzae* para o controle da Brusone do arroz”. *Summa Phytopathologica* Vol. 15, 257-266 (30 ref.)

Brada I. E.; E. Quintana; E. Pelaya y T. Araujo (1995): Efecto de *Bacillus* sp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicum esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporium* Schl. var. *cubensis* Smith: Resúmenes Bioplág 95. INIFAT, del 26-28 de abril, Ciudad de la Habana.

Dos Santos T., and I. De Melo (1993): “Influence of antagonist microoganisms on pre-and post-emergence damping-off in Eucaliptus caused by *Rhizoctonia solani* and *Cylindrocarpon scoparium*”, *Suma Phytopathologica*. 19 (2): 127-129; 17 ref.

Estrada J. (1995): Introducción. Resumen en Bioplaguicida 95. INIFAT 26-28 de abril, Ciudad de La Habana.

Lazzaretti E.; J. Menten and W. Bettiol (1995): “Tratamento de Semente de Trigo com *Bacillus subtilis* o Controle de *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris sorokiniana* e *Alternaria tenuis*.” *Grupo Paulista de Fitopatología* vol. 21 (2): 163-167.

Todar K. (2003): The genus *Bacillus*. University of Wisconsin–Madison, Department of Bacteriology.

Travers R.; P. Martin and C. Reicheldy (1987): “Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp.” *Appied and environmental Microbiolgy* 55: 1263-1266.