

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES METABÓLICAS PRODUCIDAS POR LA CEPA INIFAT-101 DE *Bacillus subtilis* MEDIANTE FERMENTACIÓN SUMERGIDA.

Grisel Tejeda¹, Janet Rodríguez¹, Rafael Martínez Viera¹, Rosa García¹, Juan J. Castellanos¹, Wilder Rodríguez¹, Liuba Plana¹, José País Chanfrau², Yoania Ríos¹, Lissett Gutiérrez¹, María E. Simanca¹, Maricel Ortega¹, Elena González¹, Grisel Croche¹ y Luis Fey¹.

¹Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

RESUMEN

El control biológico emerge como una estrategia promisorio en el manejo de las enfermedades de las plantas. Bacterias del género *Bacillus* están consideradas como muy efectivas para controlar enfermedades foliares y de las raíces. Esta investigación tuvo como principal objetivo caracterizar microbiológicamente la cepa INIFAT- 101 de *Bacillus subtilis* y demostrar su capacidad para producir, mediante fermentación sumergida, metabolitos extra e intra celulares con actividad bactericida y fungicida, lo cual se evidenció al controlar el crecimiento "in vitro" de diferentes microorganismos fitopatógenos, como *Alternaria solani*, *Alternaria porri* y *Xanthomonas vecicatoria*. La electroforesis SDS-PAGE evidenció que existe mayor diversidad proteica en la biomasa que en el sobrenadante libre de células. El bioproducto integral viable, resultante del proceso fermentativo, mostró la mayor actividad fungicida y bactericida. Todas las fracciones del bioproducto demostraron actividad estimuladora del crecimiento vegetal en plántulas de tomate, destacándose el Integral Viable y el Sobrenadante Autoclaveado, ya que se logró incrementar el área foliar y el número de hojas en estas plántulas. Todos los resultados confirman la potencialidad de esta cepa y sus metabolitos para lograr un efecto estimulador del crecimiento vegetal.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE PRODUCED METABOLIC FRACTIONS FOR THE STUMP INIFAT-101 DE BACILLUS SUBTILIS BY MEANS OF SUBMERGED FERMENTATION.

ABSTRACT

The biological control emerges like a promissory strategy in the handling of the illnesses of the plants. Bacterias of the gender *Bacillus* is considered as very effective to control illnesses foliares and of the roots. This investigation had as main objective to characterize microbiológicamente the stump INIFAT - 101 of *Bacillus subtilis* and to demonstrate its capacity to take place, by means of fermentation sumergida, extra metabolitos and cellular intra with activity germicide and fungicide, that which was evidenced when controlling the growth "in vitro" of different microorganismos fitopatógenos, like it would Alternate *solani*, it would Alternate *porri* and *Xanthomonas vecicatoria*. The electroforesis SDS-PAGE evidenced that bigger diversity proteica exists in the biomass that in the sobrenadante free of cells. The viable integral bioproducto, resultant of the process fermentativo, showed the biggest fungicidal activity and germicide. All the fractions of the bioproducto demonstrated stimulative activity of the vegetable growth in tomato plántulas, standing out the Viable

Integral and the Sobrenadante Autoclaveado, since it was possible to increase the area foliar and the number of leaves in these plántulas. All the results confirm the potentiality of this stump and their metabolitos to achieve a stimulative effect of the vegetable growth.

INTRODUCCIÓN

Como consecuencia de la aplicación de los conceptos que dieron lugar a la Revolución Verde, se produjeron graves daños a los ecosistemas, con perjuicios que serán difíciles de reparar a corto y mediano plazo; en respuesta a tal situación ha tenido lugar a escala internacional el surgimiento de modernas concepciones de agricultura sostenible (Altieri, 1995)

Una importante función de algunas rizobacterias es su habilidad para colonizar de forma efectiva la rizosfera y mantener una relación estable con la superficie de las raíces de las plantas (Luttenberg and Dekkers, 1999). Las rizobacterias pueden interactuar con una variedad de microorganismos del suelo que están normalmente presentes en la rizosfera, en algunos casos actúan como agentes biocontrol contra bacterias fitopatógenas (Pintonet *et al.*, 2001).

Los bioplaguicidas elaborados a partir de microorganismos, se insertan como un todo dentro del esquema del manejo integrado de plagas y enfermedades para dar respuesta eficaz a la necesidad de proteger las especies agrícolas (Powell, 1993)

El *Bacillus subtilis* es una bacteria que ha sido reportada desde tiempos muy remotos por su capacidad de excretar diferentes antibióticos y enzimas que pueden tener efecto antagonista en el control de plagas y enfermedades de las plantas. Además se reconoce como potenciador de la germinación y el vigor de las plántulas, favoreciendo el desarrollo del sistema radical en diversos cultivos (Fall *et al.*, 2004; Pal *et al.*, 2004)

Cepas comerciales de *Bacillus subtilis* han sido reconocidas como agente biocontrol para enfermedades fúngicas de los cultivos (Emmert and Handelsman, 1999; Warrior *et al.*, 2002).

Teniendo en consideración la potencialidad de este género bacteriano y la posibilidad real de introducir biopreparados en la Agricultura cubana, como alternativas biológicas para el control de enfermedades, que afectan los rendimientos en cultivos de importancia económica; esta investigación responde a la necesidad de conocer la actividad biológica las diferentes fracciones activas del biopreparado líquido obtenido por la fermentación sumergida de la cepa cubana INIFAT-101 de *Bacillus subtilis*, capaz de controlar diferentes enfermedades provocadas por bacterias y hongos fitopatógenos, así como estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas.

MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con la cepa INIFAT-101 de *Bacillus subtilis*, la cual se fermentó en zaranda mediante cultivo sumergido durante 96 horas a 200 rpm de agitación y 30 °C de temperatura, en erlenmeyers de 500 mL, con 50 mL de volumen efectivo y 10 % de razón de inoculación.

Las diferentes fracciones del biopreparado se obtuvieron mediante centrifugación a 10000 rpm a 4° C, obteniéndose sobrenadantes libres de células y biomasa, en algunos casos los sobrenadantes fueron autoclaveados a 121 °C durante 10 minutos y en otros casos filtrados mediante membrana 0.2 µm. La biomasa obtenida fue lavada y resuspendida en H₂O estéril a pH 7 y luego autoclaveada igualmente que el sobrenadante.

La evaluación de la actividad biológica de cada fracción fue determinada mediante las siguientes técnicas:

- a) Actividad antifúngica: Se utilizaron discos de 7 mm de los hongos fitopatógenos *Alternaria porri* y *Alternaria solani*, provenientes de medio Agar Czapek a pH 6.5, los cuales fueron colocados en el mismo medio envenenado con las diferentes fracciones del biopreparado de *Bacillus subtilis*. Se determinó el % de control, teniendo en cuenta el crecimiento del micelio (mm) del hongo en cada caso comparado con el testigo.
- b) Actividad antibacteriana: La bacteria patógena evaluada fue *Xanthomonas vesicatoria*. Se midió el halo de inhibición provocado por el efecto antibiótico de los metabolitos obtenidos durante la fermentación, utilizando el método de difusión en placas (Kavanagh, 1974).
- c) Actividad bioestimuladora del crecimiento vegetal: Se utilizaron 3 bandejas/tratamiento y 30 semillas de tomate/bandeja, se aplicó 25 mL de biopreparado/bandeja. Al cabo de los 21 días se midió, según las plantas germinadas: la altura, el diámetro del tallo, el largo de la raíz, el área foliar, el largo del tallo y el número de hojas.
- d) Determinación de las proteínas totales y el análisis de electroforesis: Las muestras de sobrenadante y pellet se aplicaron a un gel de 15 % de poliacrilamida de electroforesis (SDS-PAGE). Al sobrenadante se le realizó previamente la determinación de la concentración de proteínas totales por la técnica de COMASSIE. Luego se precipitó con TFA (Ácido Trifluoracético) y se lavó con acetona a -20 °C, aplicándose en los pocillos 20, 25 y 30 µg para el sobrenadante. El pellet (biomasa) fue resuspendido en buffer sample y aplicado en el mismo gel 5, 10, 15, 20 y 25 µL por pocillo, con una concentración proteica de 5; 10; 20 y 0.25 µg respectivamente. Se aplicaron 5 proteínas patrones (A, B, C, D y E), A: Albúmina bovina 66 KDa, B: Albúmina de huevo 45 KDa, C: Tripsinógeno 24 KDa, D: µ-Lactoglobulina 18.4 KDa, E: Lisosima 14.3 KDa. Los reactivos utilizados fueron todos de calidad purísima.

Para el procesamiento estadístico de los resultados se realizaron análisis de varianza con la utilización del programa estadístico STATGRAPH.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferentes fracciones del biopreparado bacteriano, obtenido después del proceso fermentativo batch a escala de zaranda, fueron evaluadas en cuanto a su actividad bactericida y fungicida. En las figuras 1 y 2 puede apreciarse la superioridad del biopreparado integral viable (IV), lo cual es lógico teniendo en cuenta que la acción antagonista de este bioproducto encierra la actividad del microorganismo viable y todos

los metabolitos antimicrobianos producidos durante el proceso fermentativo, los cuales no fueron inactivados por calor.

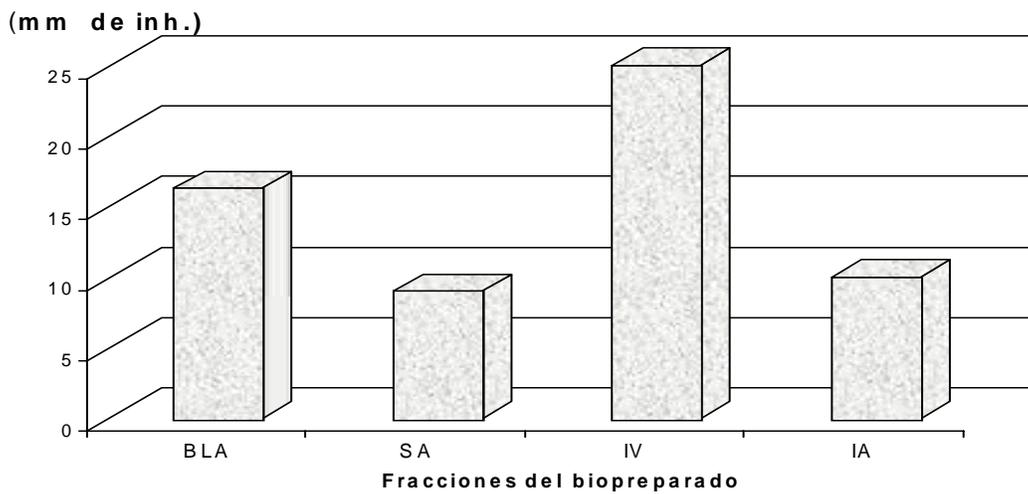


Figura 1: Actividad bactericida de las fracciones del biopreparado. BLA: Biomasa Lavada Autoclaveada; SA: Sobrenadante Autoclaveado; IV: Integral Viable; Integral Auoclaveado.

En el caso de la actividad fungicida (fig 2) el mejor comportamiento lo mostró el Biopreparado Integral Viable (IV), lo cual concuerda con lo reportado por Castellanos en el 2004, en cuanto a la capacidad de esta cepa como antagonista frente a diferentes hongos fitopatógenos; se destaca además la efectividad del Sobrenadante Filtrado (SF), lo que evidencia que existen algunos metabolitos que pueden ser sensibles a la temperatura, aunque algunos de los producidos por esta cepa presentan estabilidad frente a la temperatura de esterilización. La biomasa mostró mejor comportamiento antagonista que el Sobrenadante Autoclaveado (SA) e incluso frente al bioproducto Integral Autoclaveado (IA), lo que evidencia que al centrifugar y separar la biomasa se concentraron los metabolitos intracelulares producidos por la bacteria.

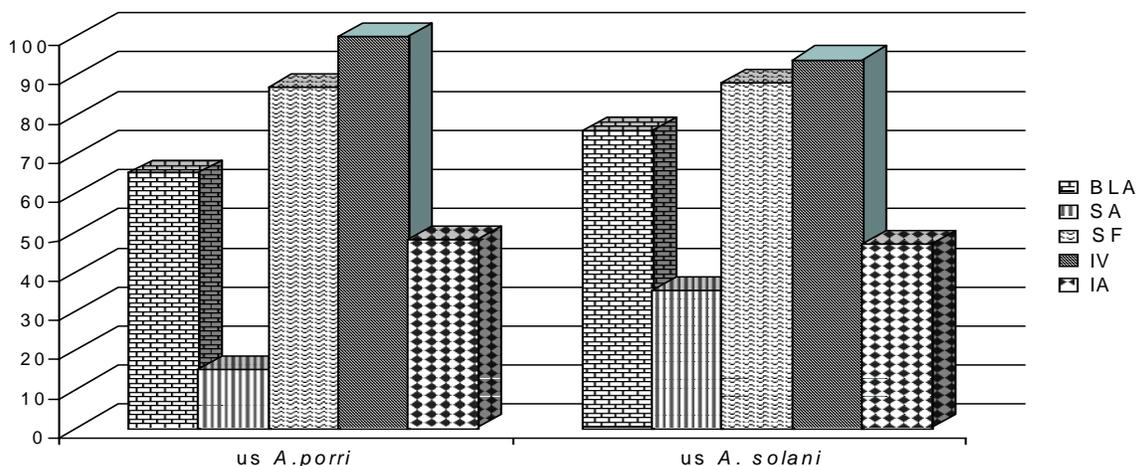


Figura 2: Actividad fungicida de las fracciones del biopreparado. BLA: Biomasa Lavada Autoclaveada; SA: Sobrenadante Autoclaveado; SF: Sobrenadante Filtrado, IV: Integral Viable; IA: Integral Auoclaveado.

La concentración de proteínas totales, determinada por la técnica de COMASSIE, fue de 0.067 mg/mL.

En las corridas de electroforesis SDS-PAGE (fig. 3) se evidencia, para el sobrenadante, la presencia de 4 bandas proteicas de 60, 40, 33 y 18.4 KDa aproximadamente, destacándose por su grosor e intensidad del resto la banda que aparece alrededor de los 33 KDa. En el caso del pellet se evidenció la presencia de estas mismas bandas con la adición de otras 6 bandas proteicas entre los 66 y 40 KDa, por lo que se puede decir que hay mayor diversidad proteica en el pellet que en el sobrenadante y que las mismas proteínas en la biomasa como cuerpos de inclusión (Razafindralambo, 1993).

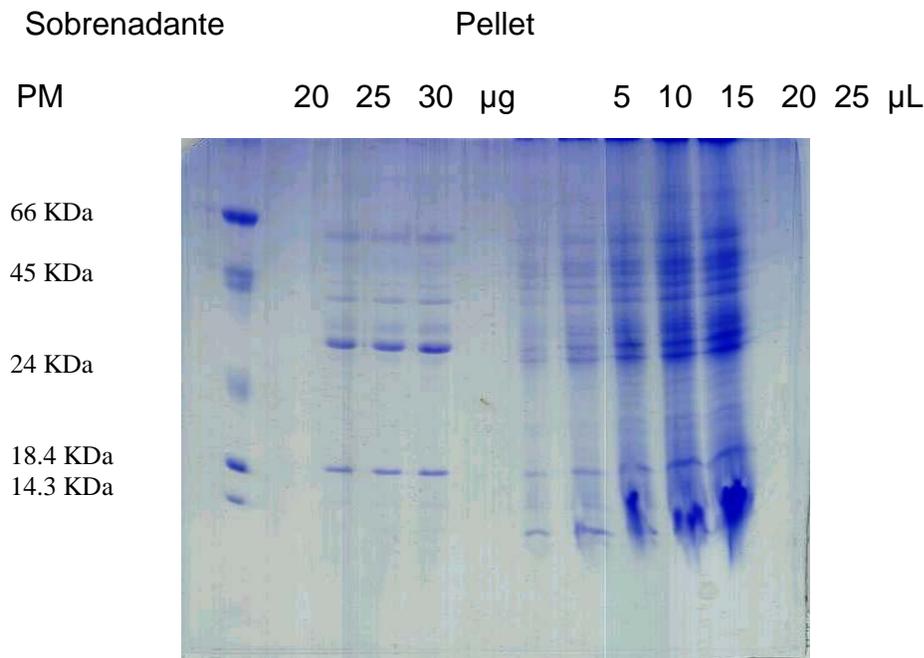


Figura 3: Electroforesis del sobrenadante y de la biomasa (pellet) del biopreparado.

La actividad estimuladora de las fracciones del biopreparado fue evaluada en el cultivo de tomate en condiciones controladas, aquí se evidenció que todas las variantes mostraron diferencias significativas con respecto al control, con incrementos del Número de Hojas y el Area Foliar, las variantes Integral Viable (IV) y Sobrenadante Autoclaveado (SA) resultaron las de mejor comportamiento, lo cual corrobora la potencialidad de esta bacteria en el desarrollo y protección fitosanitaria de las plantas, reconocida por diferentes autores (Lazzarete *et al.*, 1994, Korstens *et al.*, 1997, Kiliam *et al.*, 2002 y Tejeda, *et al.*, 2004). Las variantes donde estuvo presente la biomasa inactivada por calor (IA y BLA) no resultaron superiores al resto de los tratamientos, lo cual pudiera deberse a la presencia de algún metabolito que al ser inactivado por calor pudiera convertirse en inhibitorio para el desarrollo de las plántulas.

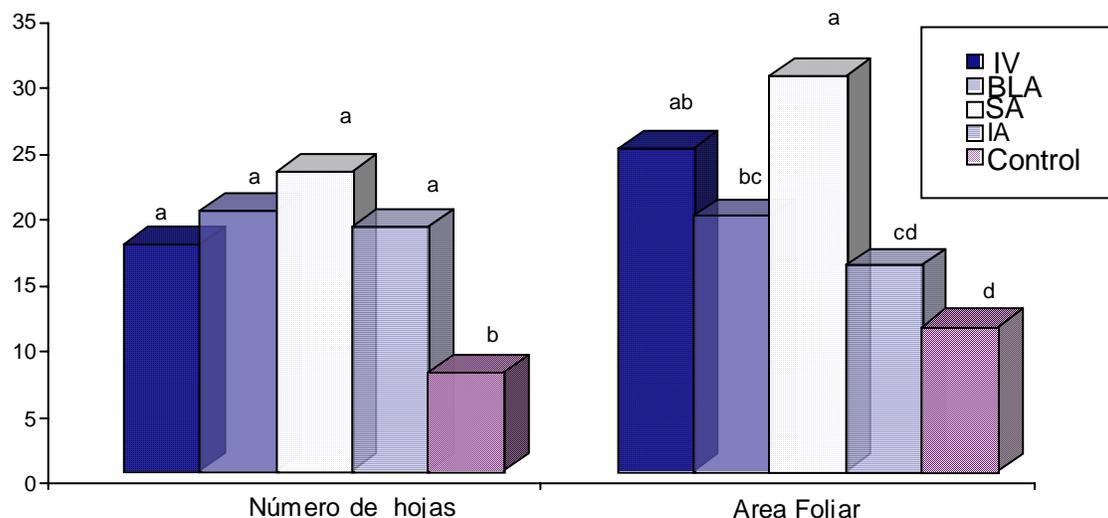


Figura 4: Actividad estimuladora de las distintas fracciones del biopreparado en el cultivo de tomate. IV Integral Viable; BLA Biomasa Lavada Autoclaveada; SA Sobrenadante Autoclaveado; IA Integral Autoclaveado.

CONCLUSIONES

- El Bioproducto Viable (IV) mostró la mayor actividad fungicida y bactericida.
- La biomasa bacteriana presenta metabolitos intracelulares con marcada actividad antibiótica “*in vitro*” frente a los dos hongos y a una bacteria fitopatógena,
- La electroforesis SDS-PAGE evidenció que existe mayor diversidad proteica en la biomasa que en el sobrenadante.
- Todas las fracciones del bioproducto demostraron actividad estimuladora del crecimiento vegetal en plántulas de tomate, destacándose el Integral Viable y Sobrenadante Autoclaveado.

REFERENCIAS

- Altieri, M.A. 1995.** Agroecology: “the science of sustainable agriculture”. Boulder . CO: Westview Press
- Castellanos Linares, J. J.; 2004.** “Estudios relacionados con el uso de *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos. Convención Internacional TROPICO´2004. II Congreso de Agricultura Tropical. La Habana. Cuba.ISBN-959-7167-02-6.
- Emmert, E. A. and Handelsman, J. 1999** “Biocontrol of plant disease a Gram positive perspectives”. FEMS Microbiol Lett 171: 1 – 9.
- Fall, R.; Kinsinger, R. Wheeler, K. 2004.** “A simple Method to Isolated Biofilm- forming *Bacillus subtilis* and Related Species from plant Roots”. Systematic and Applied Microbiology 27:3 : 372-379.
- Kavanagh, F. W. 1974** “Métodos para evitar errores en el ensayo microbiológico de antibióticos”. *J. Pharm. Sci.* 63 (9): 1459.
- Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G. y Hain, R. 2002.** “FZB24 *Bacillus subtilis*- mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality”. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 1/00,1: 72-93.

- Korstens, L.; De Villiers, E.E.; Wehner, R.C. and Kotzet, J.M. 1997.** "Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit disease of avocado in South Africa". *Plant Disease* 81, 455-459.
- Larkin R.P. and Franel, D.R. 1998.** "Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organism for control of *Fusarium* wilt of tomato". *Plant Disease* 82 :1022-1028.
- Lazzarete, E., Menten, J.O. e Bettio, W. I.; 1994.** "*Bacillus subtilis* antagonistas aos principais patógenos associados a sementes de Feijão e trigo". "Fitopatología Venezolana" (7) 42-46.
- Lutenberg, J J.; Dekkers, L. C. 1999.** "What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent" *Environ Microbiol* 1: 9 -13.
- Pal, H.; Fall, R. and Vivanco, J. 2004.** "Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production". *Plant Physiology* 134:1 307-319.
- Pinton, R.; Varanini, Z.; Nannipieri, P. 2001.** "The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil competent, plants and microorganisms In the rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances in the Soil - Plant Interface". New York. 1 - 17.
- Powell, K.A. 1993** "The commercial exploitation of microorganisms in agriculture". In *Exploitation of microorganisms*, D.g. Jones, Chapman y Hall, Londres. (Ed.).
- Tejeda, G.; Rodríguez, J.; Martínez, R.; García, R.; Castellanos, J.J.; Gutiérrez, L.; Rodríguez, W.; Plana, L.; País J., Ríos, Y.; Simanca, M.E., Ortega, M.; González E. y Croche, G. 2004.** "Producción y efectividad de un biopreparado a partir de *Bacillus subtilis* con actividad antagonista y estimuladora del crecimiento vegetal". Convención Internacional TROPICO'2004. II Congreso de Agricultura Tropical. Memorias CD-ROM ISBN-959-7167-02-6.
- Warrior, P., Konduru, B., Vasudevan, P. 2002.** "Formulation of biological control agents for pest and disease management". In: S. S. Gnanamanickam, ed. *Biological Control of Crop Diseases*. Marcel Dekker, New York 421-442.