

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS SUBTILIS* CON POTENCIAL PARA LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS

Yoania Ríos Rocafull, Marisel Ortega García, Grisel Tejeda González y Janet Rodríguez Sánchez

RESUMEN

El género *Bacillus*, y dentro de éste la especie *B. subtilis*, se reconoce mundialmente por sintetizar sustancias antagonistas. Es por ello que la identificación de cepas con potencial para ser utilizadas en la elaboración de bioproductos es de gran importancia para la agricultura. En este artículo 5 cepas mantenidas sobre medio agarizado en la colección del INIFAT fueron identificadas como *B. subtilis*, después de realizar 14 pruebas fisiológico-bioquímicas, la descripción morfológica de las colonias crecidas en el medio sólido Agar Nutriente, la tinción de Gram y de spora. La curva de crecimiento de estos microorganismos demostró su posibilidad de reproducción en un medio de miel optimizado, donde lideran metabolitos con actividad bactericida frente a *Xanthomonas campestris*. Las cepas A9 e INIFAT-101 mantienen este comportamiento aunque se utilice el producto autoclaveado. Teniendo en cuenta que además son compatibles con *Azotobacter chroococcum*, las mismas son consideradas promisorias en la búsqueda de estrategias integrales de manejo de los cultivos que combinen el control biológico y la biofertilización.

Palabras claves: *Bacillus subtilis*, caracterización, potencial agrobiológico

Characterization of *Bacillus subtilis*'s strains with potential for biological products elaboration

ABSTRACT

The *Bacillus* genus and among it the *B. subtilis* species are known worldwide by its ability to produce antagonist substances. Therefore, the identification of strains potentially useful for bioproduct elaboration is of great importance for agriculture. In this paper 5 strains maintained over Agar medium on the INIFAT collection were identified as *B. subtilis* after 14 physiological-biochemical tests, the macromorphological description of colony growth over Nutrient Agar and Gram and spore tintion. The growth curve show the possibility of reproducing them in optimized honey medium on which they can produce metabolites with bactericide activity against *Xanthomonas campestris*. Strains identified as A9 and INIFAT-101 maintained this behaviour despite the use of sterile products. Since these strains are also compatible with *Azotobacter chroococcum* bacteria they are consider promissory strains to search integral strategies of crop management combining biological control and biofertilizer.

Key words: *Bacillus subtilis*, characterization, agrobiological potential

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical «Alejandro de Humboldt» (INIFAT)
✉ dpagrobiotec@inifat.co.cu

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Bacillus* son capaces de sintetizar, dentro de sus metabolitos, antibióticos polipeptídicos que actúan sobre la pared celular de los hongos, así como sustancias biocidas que presentan gran efectividad frente al control de algunas plagas y enfermedades que atacan a los cultivos (Wu *et al.*, 2009, Guohong, 2007). Es por ello que este género microbiano se considera dentro de los más efectivos en el control de enfermedades (Reinoso *et al.*, 2006).

Bacillus subtilis ha sido una de las especies más estudiadas por su potencial antagonista (Reinoso *et al.*, 2007; Bach y Díaz, 2008). En el INIFAT, desde 1988 se trabaja en el aislamiento de cepas de este microorganismo, desarrollándose diferentes tecnologías de fermentación. El perfeccionamiento de éstos y su combinación con otros microorganismos con características biofertilizantes ha arrojado excelentes resultados, abriendo un nuevo campo en la investigación de las fermentaciones mixtas y el desarrollo agrícola integral (Tejeda *et al.*, 2008).

No obstante, el aislamiento, selección y caracterización de cepas pertenecientes a este género es un trabajo permanente, que tiene como objetivo contar con aislados más agresivos y, por lo tanto, más efectivos, que puedan ser combinados con otros microorganismos con propiedades biofertilizantes como *Azotobacter chroococcum*.

En la presente investigación se caracterizaron morfológica, fisiológica y bioquímicamente a cinco cepas pertenecientes al género *Bacillus*. Se determinó además su comportamiento «in vitro» frente a *Xanthomonas campestris*, así como su compatibilidad con *Azotobacter chroococcum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio se utilizaron cuatro cepas pertenecientes al género *Bacillus* conservados sobre medio agarizado en el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical «Alejandro de Humboldt», INIFAT.

Para su caracterización se realizaron 14 pruebas fisiológico-bioquímicas (Harrigan y McCance, 1968), además de la caracterización morfológica de las colonias en el medio sólido Agar Nutriente (Martínez *et al.*, 1985) y de las células por medio de la tinción de Gram y de esporas (Harrigan y McCance, 1968). Los resultados obtenidos se compararon con las referencias del Manual de Sistemática para Bacterias en sus ediciones de 1994 y 2004 (Holt *et al.*, 1994 y 2004).

La curva de crecimiento de cada una de las cepas se realizó en el medio de miel optimizado (Tejeda *et al.*, 2008) inoculado a razón del 5% (v:v). El proceso fermentativo se llevó a cabo en condiciones de zaranda rotatoria a 32°C de temperatura, 200 r.p.m de agitación, durante 24 horas. Se completó con estadio estacionario hasta consumir las 96 horas. Los conteos microbiológicos para conocer la concentración alcanzada se efectuaron según las normas ISO 4833: 1991 (1991) e ISO 6887: 1993 (1993) referidas por Martínez *et al.*, (2007), a las 24, 48 y 96 horas de iniciado el proceso.

Para medir la actividad «in vitro» frente a *Xanthomonas campestris* se utilizó el procedimiento descrito por Kavanagh en 1974, citado por Ríos (2007) a partir de la medición del halo de inhibición en el medio agarizado Müller Hinton envenenado con el patógeno. Para el experimento se utilizaron tanto los productos integrales viables como los autoclaveados (10 minutos en autoclave a 1.5 atmósferas). El halo (cm) fue medido a las 24 y 48 horas de incubación a 30°C de temperatura.

La compatibilidad frente *Azotobacter chroococcum* se determinó mediante el mismo método sobre medio de cultivo LPGA envenenado con *A.chroococcum*. En los pocillos de 7 mm se colocaron las muestras de los productos obtenidos mediante el proceso fermentativo descrito. El halo de inhibición (cm) se midió a las 48 horas de incubación a igual temperatura que el experimento anterior.

Los resultados obtenidos en las pruebas de compatibilidad y antagonismo fueron procesados estadísticamente según un Análisis de Varianza y Prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas en estudio presentaron características similares (Tabla 1), las que coinciden con la descripción realizada para el género *Bacillus* (Holt *et al.*, 1994 y 2004). El procedimiento utilizado para el aislamiento (shock térmico) ratifica esta ubicación.

La caracterización fisiológico-bioquímica (Tabla 2) las incluye dentro de *B. subtilis*, dada la concordancia de la misma con la descripción del Manual de Sistemática para Bacterias (Holt *et al.*, 1994 y 2004).

Todas las cepas evidencian la gran versatilidad metabólica del género (Holt *et al.*, 1994, 2004). Este comportamiento se debe explotar en la búsqueda de

formulaciones en función de incrementar su actividad bactericida y fungicida.

Las curvas de crecimiento de las cepas en el medio de miel optimizado (Figura 1) indican la posibilidad de empleo del mismo con fines agrícolas, al alcanzarse valores de concentración superior a las 10^8 UFCxmL⁻¹ (Martínez *et al.*, 2007). Sería no obstante conveniente valorar su comportamiento en presencia de otras fuentes de carbono y energía, teniendo en cuenta el potencial de utilización de azúcares determinado en este estudio para todas ellas. Podrían aparecer variantes que permitan la obtención de mayores concentraciones del microorganismo y/o un incremento en la producción de metabolitos secundarios asociados al crecimiento.

Tabla 1. Características morfológicas de las cinco cepas del género *Bacillus* conservadas sobre medio agarizado en el INIFAT

| Cepa | Tinción de Gram | Tinción de esporas | Morfología (Agar Nutriente) |
|------------|-------------------|--------------------|--|
| BSN | Bacilos G+ | Espora central | Colonias blancas, bordes irregulares, levantadas en el medio, con presencia de cristales en el interior |
| BSC | Bacilos G+ | Espora central | Colonias blancas, bordes irregulares, levantadas en el medio, con presencia de cristales en el interior |
| BS 2 | Bacilos G+ | Espora central | Colonias blancas, bordes irregulares, levantadas en el medio, con presencia de cristales en el interior |
| A 9 | Bacilos largos G+ | Espora central | Colonias blancas, bordes irregulares, levantadas en el medio, con presencia de cristales en el interior |
| INIFAT-101 | Bacilos Gram+ | Espora central | Colonias blancas, bordes irregulares, sobre lo planas, levantadas en el medio, con presencia de cristales en el interior |

Tabla 2. Resultados de las diferentes pruebas fisiológico-bioquímicas realizadas a los cinco cepas del género *Bacillus* conservadas sobre medio agarizado en el INIFAT

| Cepa | Cat | Ox | HL | Gel | Cit | Ind | Alm | NaCl 2 % | NaCl 5 % | NaCl 7 % | Utilización de azúcares | | | | |
|------------|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|----------|----------|----------|-------------------------|-----|-----|-----|---|
| | | | | | | | | | | | Xil | Glu | Man | Ara | |
| BSN | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| BSC | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| BS 2 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| A 9 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| INIFAT-101 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

HL: Hung Leifson
Alm: almidón

Man: manitol
NaCl: cloruro de sodio

Ind: indol
Glu: glucosa

Gel: gelatina
Cit: citrato

Xil: xilosa Ara: arabinosa
Cat: catalasa

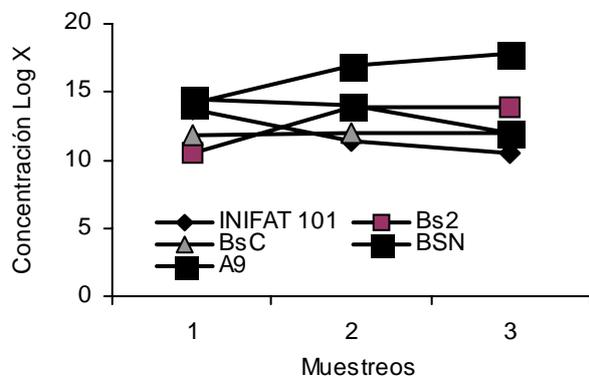
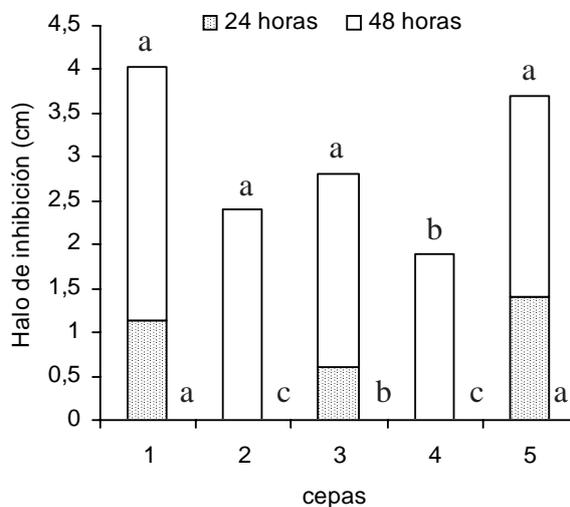


Figura 1. Curvas de crecimiento de cinco cepas de *Bacillus subtilis* en medio de miel optimizado.

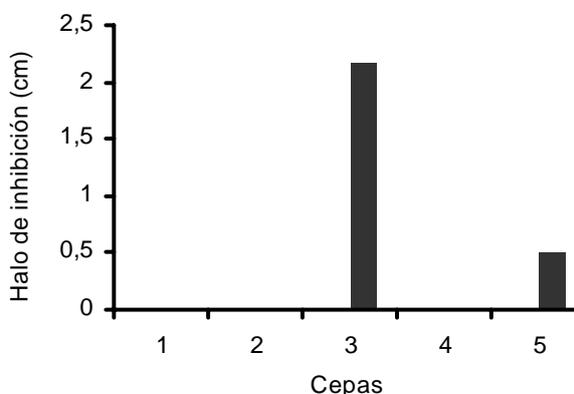
Se evidencia además la producción de metabolitos con actividad bactericida frente al patógeno *Xanthomonas campestris* (Figura 2), lo que indica que las cepas pueden ser válidas para utilizar el producto de su fermentación en el control del mismo. El comportamiento de *Bacillus subtilis* frente a este género bacteriano fue validado en condiciones de campo, en las variedades de tomate Chonto e INIFAT-28, por Tejada *et al.*, (2008), quien logró reducir entre 40 y 65 % la incidencia de la mancha bacteriana causada por otra especie *X. vesicatoria pv vesicatoria*. Se destacan las cepas BSN, A9 e INIFAT-101, quienes muestran control sobre el patógeno desde las 24 horas de iniciado el experimento y lo mantienen aún a las 48, lo que indica que los metabolitos producidos no son volátiles.

Para el caso del producto autoclaveado (metabolitos termoestables) sólo se presenta actividad para las cepas A9 e INIFAT 101 (Figura 3), comportamiento que incrementa el valor de ambas para la elaboración de controles biológicos que resistan altas temperaturas de almacenamiento sin afectación de su potencial. Sería conveniente por esta razón realizar experimentos similares con otros organismos fitopatógenos, pues de esta forma se puede conocer si además tienen amplio espectro de acción, lo que sería muy favorable desde el punto de vista práctico.



1. BSN 2. BS2 3. A9 4. BSC 5. INIFAT-101
 24 horas: Esx: 0.155 CV(%): 7.67
 48 horas: Esx: 0.102 CV(%): 27.03

Figura 2. Actividad viable de las cuatro cepas de *Bacillus subtilis* frente a *Xanthomonas campestris*



1. BSN 2. BS2 3. A9 4. BSC 5. INIFAT-101

Figura 3. Actividad de los productos autoclaveados de las cinco cepas de *Bacillus subtilis* frente a *Xanthomonas campestris*

A estos alentadores resultados se une que las cepas A9 e INIFAT-101 mostraron los menores valores de inhibición del crecimiento de la bacteria *Azotobacter*

chroococcum (Figura 4), lo que ratifica su idoneidad no sólo para elaborar productos capaces de controlar al patógeno *Xanthomonas campestris*, sino para la producción de variantes mixtas que tengan además un efecto estimulador del crecimiento.

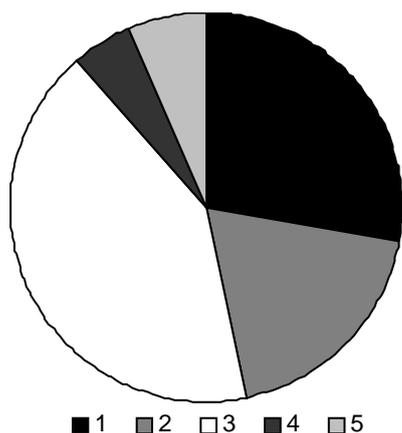


Figura 4. Compatibilidad de las cuatro cepas de *Bacillus subtilis* y *Azotobacter chroococcum*

Se deberían continuar estudios de formulación, determinación de espectro de acción frente a organismos fitopatógenos y validación de efectividad en condiciones controladas y de campo con las cepas A 9 e INIFAT-101, teniendo en cuenta su versatilidad metabólica, posibilidades de producción de metabolitos termoestables con actividad bactericida y su alta compatibilidad para ser combinado con otros microorganismos.

CONCLUSIONES

- Las cuatro cepas conservadas en el INIFAT sobre medio agarizado utilizadas en el estudio pertenecen a la especie *Bacillus subtilis*.
- Todas las cepas pueden reproducirse en un medio de miel optimizado con la producción de sustancias antagonistas frente a *Xanthomonas campestris*.
- Las cepas A 9 e INIFAT-101 constituyen variantes promisorias para la elaboración de bioproductos teniendo en cuenta la producción por parte de las mismas de metabolitos termoestables y la posibilidad

de combinarse con bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter chroococcum*.

RECOMENDACIONES

Utilizar las cepas A 9 e INIFAT-101 para elaborar inoculantes microbianos y determinar el efecto en condiciones controladas y de campo de los mismos, así como su espectro de acción frente a otros patógenos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bach, A. T y Díaz, M. (2008). Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura. *Agricultura Orgánica* (3): 35-38. ISSN: 1028-2130.
- Guohong, L. G. (2007). Preparation method and usage for novel lipopeptide type biosurfactant surfactin. Patente N°: 101041846.
- Harrigan, W.F y M. McCance. (1968). Métodos de Laboratorio en Microbiología. (ed) Academia, España.
- Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; Staley, J and Williams, S. (1994). «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology». Ten Edition. (1nd). 878-925 pp.
- Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; Staley, J and Williams, S. (2004). «The genus *Bacillus*». In: «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology». Ten edition (2nd).751-778 pp.
- Martínez, J., A. Sánchez., M. Quintana., V. Pazos y G.del Barrio. (1985). Microbiología general. Universidad de La Habana. Facultad de Biología. SNLC. CU. 01. 29490.3.
- Martínez, V. R; López, M; Dibut, A. B; Parra, Z. C y Rodríguez, S. J. (2007). «La fijación biológica del nitrógeno atmosférico en condiciones tropicales». Ed. MAT Caracas-Venezuela, 172 p.
- Reinoso, P. Y; Casadesús, L; García, A; Gutiérrez, J y Pazos, V. (2006). Antagonismo «*in vitro*» de *Bacillus* spp frente a bacterias fitopatógenas del cultivo de la papa. *Revista de Protección Vegetal* 21 (2): 119-121. ISSN: 1010-2752.
- Reinoso, P. Y; Vaillant, F. D; Casadesús, R. L; García, P. E. y Pazos, A. R. V. (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad* 11 (1): 35-40. ISSN: 1562-3009.

- Tejeda, G. G; Rodríguez, S. J; García, G. R; Martínez, V. R; Castellanos, J. J; Dibut, A. B; Ríos, R. Y; Gutiérrez, H. L; Arozarena, D. N; Plana, P. L; Izquierdo, D. L; García, H. A; Ortega, G. M; Croche, A. G; Socas, E. U; Mesa, V. E; Simanca, M. M.E; Fraga, R. S y Fey, G. L. (2008). Obtención de biofertilizantes bacterianos a partir de *Bacillus subtilis*. Convención Internacional TROPICO´2008. III Congreso de Agricultura Tropical.
- Wu, H; Tang, Y; Yu, Y; Li, X and Liu, D. (2009). Method for producing feed from detoxified corn residues after producing alcohol by mixed bacterial micro ecological formulation. Patente N°: 101411389.
- Ríos, Y. (2007). Efecto de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el crecimiento y el rendimiento del cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) var. CMC-40. Tesis para optar por el Título Académico de Máster en Ciencias Biológicas. 53 pp.

Recibido: 4 de agosto de 2011

Aceptado: 2 de diciembre de 2011