



CULTIVO DE *Bacillus subtilis* CEPA QST 713 EN REACTOR TIPO AIRLIFT Y SU ACTIVIDAD ANTAGÓNICA CONTRA *Phytophthora capsici*.

De la Cruz-De la Cruz, E.^a, Méndez-Luna, D.^a, Valera-Montero, L. L.^b

^aUniversidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense. Ingeniería en Agrobiotecnología. Huejutla de Reyes, Hidalgo. C. P. 43000. emigdio.delacruz@uthh.edu.mx

^bInstituto Tecnológico El Llano. Ingeniería en Biotecnología. El Llano, Aguascalientes. México. C. P. 20336.

Recibido 6 de noviembre 2016; aceptado 13 de diciembre 2016

Palabras clave:

Control biológico,
fitopatógeno, bacteria

Key words:

Biological control,
phytopathogen, bacteria

RESUMEN. La producción y calidad de chile se ve limitada por diversas enfermedades causadas por hongos como *Phytophthora capsici*. Su control químico implica altos costos económicos y ambientales. Por lo que una alternativa para el manejo del hongo es el control biológico con *Bacillus subtilis*. Derivado de esto, el objetivo de esta investigación fue determinar el porcentaje de inhibición *in vitro* de *B. subtilis* contra el fitopatógeno *P. capsici* en diferentes medios de cultivo líquidos para establecer la factibilidad biológica en un reactor artesanal tipo airlift. El ensayo *in vitro* se hizo en cajas Petri, usando como medio de cultivo PDA, la cepa QST713 de *B. subtilis* y el hongo *P. capsici*. Se evaluaron medios de cultivos líquidos (caldos nutritivos), en matraces Erlenmeyer con 200 mL de agua, en un diseño completamente al azar con 8 tratamientos y 6 repeticiones: T1, almidón de arroz; T2, almidón de maíz; T3, almidón de trigo; T4, Peptona + azúcar morena; T5, glucosa más fructuosa; T6, glucosa + almidón de maíz + almidón de arroz + almidón de trigo; T7, peptona + azúcar morena + almidón de maíz, arroz y trigo; T8, peptona + azúcar morena + glucosa + almidón de maíz, arroz y trigo. Se construyó el reactor air lift y se evaluó la curva de crecimiento de *B. subtilis* durante 24 horas. Los resultados obtenidos mostraron que la bacteria tuvo un 64 % de efectividad en la inhibición del hongo. El medio de cultivo de almidón de trigo mostro efecto significativo (Tukey, $\alpha=0.05$) con respecto al crecimiento de la bacteria, donde después de 5 horas fue $> 1 \times 10^9$ UFCs, considerado como adecuado para la producción de *B. subtilis*.

ABSTRACT. Production and chili quality are limited by diseases of fungal origin as *Phytophthora capsici*. Its chemical control implies a high economic and environmental cost. Biological control with *Bacillus subtilis* is a useful strategy to combat it. The aim of this research was to determine the percentage of inhibition *in vitro* confrontations between *B. subtilis* and the phytopathogen *P. capsici* in different liquid culture media (nutrient broth) for establish the biological viability in the bioreactor airlift. An *in vitro* assay was made in petri dishes, with PDA culture media where *Bacillus subtilis* QST713 strain and *P. capsici* fungi were cultured for antagonism evaluation; other experiment was carried out in Erlenmeyer flasks with 200 mL of water in a completely randomized design with 8 treatments and 6 repetitions: T1; rice starch, T2; corn starch, T3; wheat starch, T4; peptone + brown sugar, T5; fructose and glucose, T6; corn starch + glucose + rice starch + wheat starch, T7; peptone + brown sugar + corn, rice and wheat starch and T8; peptone + brown sugar + glucose + corn, rice and wheat starch for nutrient broth evaluation. The airlift reactor was constructed and the growth curve of *B. subtilis* was evaluated during 24 hours. The results showed that *B. subtilis* inhibited *P. capsici* growth in a 64 %. The culture medium of wheat starch showed significant effect (Tukey $\alpha=0.05$), where after 5 hours the bacteria's growth was $> 1 \times 10^9$ UFCs, considered as optimum for bacteria's production.

INTRODUCCIÓN

El hongo *Phytophthora capsici* causa la enfermedad conocida como pudrición basal del tallo^{1,2} en plantas de chile y jitomate principalmente, se caracteriza por la pudrición de raíces, tallos, marchitez y

muerte de plantas; llegando a ocasionar pérdidas del 60 al 100 % en las regiones productoras de México. La enfermedad se presenta en áreas tropicales y subtropicales e infecta raíces, tallos, hojas y frutos² siendo una de las enfermedades más destructivas a





nivel mundial^{3, 4}. Debido a la naturaleza persistente del inóculo en el suelo, la estrategia para el control de este patógeno requiere un programa de manejo integrado. Las medidas de control químico y cultural no siempre logran disminuir el daño del hongo, formado por zoosporas con alta movilidad en el suelo. Además, los fungicidas y fumigantes presentan un alto costo de aplicación, potencial daño ambiental, toxicidad y resistencia del hongo^{5, 6}.

Una alternativa que se ha desarrollado en los últimos años, para el manejo del hongo es el control biológico dentro del cual destacan bacterias del género *Bacillus*, dadas sus potencialidades en la inhibición de fitopatógenos de suelos y promoción de crecimiento de las plantas⁷, así como los hongos de los géneros *Trichoderma* y *Xylaria*, cuyo uso ha reducido el desarrollo del hongo en más del 40 %⁷.

En el caso particular de las bacterias, *Bacillus subtilis* ha mostrado alta capacidad para inhibir el crecimiento y esporulación de una amplia gama de hongos fitopatógenos, asociado a 1) parasitismo directo; 2) producción de antibióticos extracelulares como bacilomicina, iturina, micosubtilina y zwittermicina; 3) producción de enzimas líticas como quitinasa, proteasa, β -1,3 glucanasa y celulosa; 4) competencia por los nutrientes en el hospedante, que causa estrés por nutrientes e inanición en el hongo en germinación y 5) estimulación de defensas del hospedante a través de la resistencia sistémica inducida por medio de la ruta del ácido jasmónico.

De lo anterior, se planteó el objetivo de determinar el porcentaje de inhibición *in vitro* de *B. subtilis* contra el fitopatógeno *P. capsici* en diferentes medios de cultivo líquidos para establecer la factibilidad biológica de un reactor artesanal tipo airlift.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antagonismo: Para determinar el porcentaje de inhibición de *B. subtilis* contra *P. capsici*, en el laboratorio de biotecnología del Instituto Tecnológico El Llano (ITEL) se obtuvo la bacteria del cepario de este plantel; el hongo

fue donado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Celaya, Guanajuato. Se prepararon 6 cajas Petri con medio de cultivo PDA, se inoculó por punción con *B. subtilis* a una distancia de 1,5 cm del borde de la placa *Petri* y el hongo fitopatógeno en el lado opuesto a la misma distancia, manteniendo entre ambos una distancia de 6 cm⁸. Una vez establecidas las confrontaciones se incubaron en un cepario donde la temperatura fue de 25 ± 2 °C durante tres días y se tomaron los valores r1 y r2 para evaluar la efectividad de la inhibición.

Medios de cultivo: Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño experimental completamente al azar (DCA), conformado por 8 tratamientos (caldos nutritivos) utilizando 6 repeticiones por tratamiento (Tabla 1)⁹. Se evaluó el número de UFCs (Unidades Formadoras de Colonias) 24 horas después de la inoculación, con base en la técnica de conteo en placa con diluciones de 1×10^{-8} ¹⁰. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey con $\alpha = 0.05$. El mejor caldo nutritivo obtenido en esta fase, se utilizó para su evaluación en el biorreactor airlift.

Biorreactor artesanal airlift: Este tipo de biorreactores en términos generales consta de un tubo vertical transparente. El aspersor se encuentra en la parte inferior de la columna y provee al reactor de pequeñas burbujas que tienen por función el mezclado del líquido y la transferencia de masa de CO₂ y la remoción de O₂. Entre las ventajas que presentan son su bajo costo, eficiente liberación de O₂, área superficial mayor en relación al volumen y mezclado relativamente homogéneo¹¹. Para la presente investigación, se construyó con los materiales que se mencionan y de acuerdo a lo señalado en la literatura, con algunas modificaciones, de acuerdo a los objetivos del trabajo.

- 1 tanque con tapa de 60 litros
- ½ metro de tubo de cobre
- ½ metro de tubo PVC





- 1 m de manguera transparente
- 1 burbujeador para pecera de 10 a 40 litros de agua
- 1 segueta para cortar los tubos
- Alambre para amarrar.
- 1 filtro
- Algodón

Una vez construido, el biorreactor fue esterilizado y llenado con el medio de cultivo significativamente diferente, previamente

esterilizado. Durante 24 horas, se realizó el conteo de UFCs, tomando muestras cada hora, desarrollando diluciones decimales hasta llegar a 1×10^{-8} las cuales se inocularon en cajas Petri con medio PDA, sembrando cinco cajas en cada muestreo, se incubaron y contaron las colonias con la ayuda de un estereoscopio. Con los datos obtenidos se hizo un análisis de regresión lineal en el programa estadístico SAS 9.0.

Tabla 1. Composición química de los medios de cultivos líquidos evaluados (tratamientos) para el crecimiento de *B. subtilis* (nutrientes disueltos en agua destilada).

Tratamientos	Peptona (g/200mL)	Azúcar integral (g/200mL)	Glucosa (g/200mL)	Almidón de Maíz (g/200mL)	Almidón de Arroz(g/200mL)	Almidón de Trigo (g/200mL)	Fructuosa (g/200mL)
1	0.5	0.5					2.0
2			2.0				
3				5.85			
4					5.85		
5						5.85	
6	0.2	0.2		1.17	1.17	1.17	
7			0.5	1.46	1.46	1.46	
8	0.16	0.16	0.33	0.96	0.96	0.96	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha establecido que un porcentaje de inhibición mayor o igual al 50 % del antagonista contra el fitopatógeno, es un buen indicador del antagonismo que existe entre ambos organismos ¹¹, los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron un 64 % de inhibición, que indica un buen antagonismo, es decir que *B. subtilis* inhibe la presencia del fitopatógeno, lo cual permitiría bloquear el acceso de éste hacia la planta. Cabe señalar que *B. subtilis*, tiene mucho mayor inhibición que *Bacillus firmus* cuya actividad reduce sólo en 40 % la incidencia de la enfermedad ¹². De tal manera que, la actividad antifúngica de *B. subtilis* difiere entre cepas, la cual puede ir del 32 al 78 % ¹². La actividad antagónica de *Bacillus* se ha atribuido a la producción de enzimas líticas, antibióticos y/o metabolitos que pueden generar cambios en la membrana citoplasmática; otro posible mecanismo es la inhibición de la germinación, por competencia de nutrientes.

Por otra parte, en el experimento de evaluación de los caldos nutritivos se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 0.05$) para el crecimiento de las UFCs. El medio de cultivo con mayor número de colonias fue el que contenía almidón de trigo, asociado a que éste es fuente de nitrógeno y carbono necesarios para el crecimiento y reproducción de la bacteria, por su importancia como elementos esenciales para el crecimiento microbiano ¹¹. Por ello, este caldo nutritivo mostró un buen crecimiento y cantidad de UFCs (Tabla 2).

Los resultados también son acordes a otros experimentos ^{13, 14}, en donde se utilizaron granos de trigo para el crecimiento de bacterias del género *Bacillus* debido a que tienen una gran cantidad de nutrientes para satisfacer el ciclo biológico y un adecuado crecimiento de éstas, en condiciones anaerobias.





El uso de harinas como sustituto de medios de cultivo microbiológico ha mostrado efecto favorable en el crecimiento y esporulación de cepas de *B. subtilis* y hay estudios donde se alcanzaron concentraciones de 1.52×10^{10} UFCs mL⁻¹ y 3×10^9 UFCs mL⁻¹ con el uso de harina de soya^{13, 14, 15}. Además en esos trabajos, se señaló que la adición de peptona al medio de cultivo, desfavoreció de manera significativa la reproducción de la bacteria, comportamiento que también se pudo observar en los resultados del presente trabajo.

Tabla 2. Determinación en cantidades de UFCs en medios de cultivo líquidos

Tratamientos	UFCs (1×10^9 mL ⁻¹)
Almidón de trigo	1347 ^a
Peptona + azúcar integral	759.6 ^b
Glucosa + fructuosa	758.3 ^b
Almidón de arroz	564.3 ^{bc}
Almidón de maíz	209.8 ^c
Pe + Az + Gl + AdM + AdA + AdT	203.3 ^c
Pe + Az + AdM + AdA + AdT	201.1 ^c
Gl + AdM + AdA + AdT	184.5 ^c

Tratamientos con diferente letra presentaron diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$). Pe: Peptona, Az: Azúcar, AdM: Almidón de Maíz, AdA: Almidón de Arroz, AdT: Almidón de Trigo, Gl: Glucosa

Respecto al crecimiento de *B. subtilis* en el caldo nutritivo en el reactor tipo *airlift* se obtuvieron resultados que superaron en cinco horas la concentración UFCs reportadas como idóneas para el crecimiento de *B. subtilis* en otro tipo de biorreactores. En valores mayores a 1×10^9 UFCs, ha sido considerado como buena producción, y en la regresión que se desarrolló (Figura 1) se superó en cinco horas; caso contrario en otro tipo de biorreactores donde ocurre en periodos de ocho a nueve horas. Por

consiguiente, la base de harina de trigo, la temperatura de incubación de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, el pH de 6.5 y el biorreactor airlift, favorecieron el crecimiento de la bacteria.

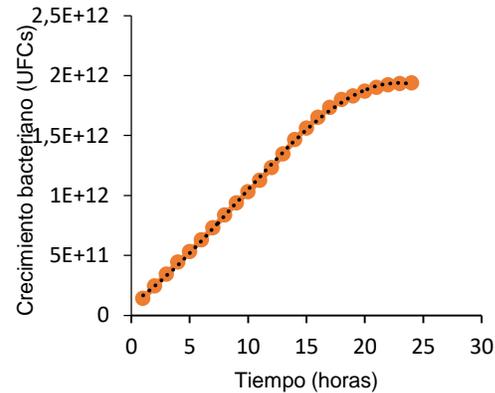


Figura 1. Crecimiento de *B. subtilis* durante 24 horas.

CONCLUSIONES

El porcentaje de inhibición *in vitro* del hongo *P. capsici* fue del 64 % con el uso de *B. subtilis* cepa QST713. Además, el medio de cultivo líquido con el mayor crecimiento de *B. subtilis* fue el preparado con almidón de trigo. Con el biorreactor artesanal airlift, se obtuvieron crecimientos superiores a 1×10^9 UFCs, después de cinco horas de evaluación, lo que lo hace un método viable para el cultivo de *B. subtilis* cepa QST713.

REFERENCIAS

- Corrales, O., E. Vargas y M.A. Moreira. (1990) Efecto de la materia orgánica en el combate de la pudrición basal del chile dulce (*Capsicum annuum*) causada por *Phytophthora capsici*. *Agron. Costarricense* 14 (1): 9-14.
- Kim, K.D., S. Nemeč, y G. Musson. (1997) Control of *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper with composts and soil amendments in the greenhouse. *Appl. Soil Ecol.* 5: 169-179.
- Ristaino, J.B., y S.A. Johnston. (1999) Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell. *Plant Dis.* 83: 1080-1089.
- Hausbeck, M.K., y K.H. Lamour. (2004) *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Dis.* 88: 1292-1303.
- Lamour, K.H. and M.K. Hausbeck. (2000) Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan Cucurbit Fields. *Phytopathology.* 90: 396-400.





6. Cohen, Y., y M.D. Coffey. (1986) Systemic fungicides and the control of oomycetes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 311-338.
7. Ramos, S. R. U.; Gutiérrez, S. J. G.; Rodríguez, G. R.; Salcedo, M. S. M.; Hernández, L. C. E.; Luna, O. H. A.; Jiménez, B. J. F.; Fraire, V. S. y Almeyda, L. I. H. (2010) Antagonismo de dos ascomicetos contra *Phytophthora capsici* Leonian, causante de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.). *Rev. Mex. de Fitopatología.* 28 (2): 75-86.
8. Camacho, A.; Giles, M.; Ortégón, A.; Palao, M.; Serrano, B. y Velázquez, O. (2009) *Análisis microbiológico de alimentos.* 2a edición. Facultad de Química. UNAM. 10 p.
9. Stülke J., Hillen W. (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 849-880.
10. Lizardi J. M. A. (2011) Biorreactores airlift. En: Contribución al estudio de la hidrodinámica y transferencia simultánea de masa en biorreactores airlift de tres fases: producción de un consorcio microbiano degradador de petróleo. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 8-11 pp.
11. Ramos, G. F. (2014) Cultivo de *Bacillus subtilis* cepa 105 en bioreactor y su actividad antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos. 53 p.
12. Lagunas, J., Zavaleta, E., Osada S., Aranda S., Luna I. y Vaquera H. (2001) *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Rev. Mex. de Fitopatología.* 19 (1): 57-65.
13. Krispin O., Allmansberger R. (1998) The *Bacillus subtilis* AraE protein displays a broad substrate specificity for several different sugars. *J. Bacteriol.* 180: 3250-3252.
14. Miranda De S. M. L. (1994) *Bioreactores de Floculacao.* En: Estudio e desenvolvimento de bioreactores de floculacao. Tesis de doctorado. Universidad de Porto. Brasil. 15-25 pp.
15. Ruíz, S. E.; Mejía, B. M. A.; Serrato, D. A.; Reyes, R. A.; Estrada, G. Y.; Valencia, B. A. J. (2016) Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia* 50 (2): 133-148.

