

EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN EN PAPEL DE FILTRO EN DOS CEPAS DE *BACILLUS SUBTILIS* COHN, MEDIANTE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA FRENTE A *RHIZOCTONIA SOLANI* KÜHN

Acenet I. Sosa López,¹ Victoria Pazos Álvarez-Rivera,² Giovanni Borges Marín,¹ Marleny González García¹ y Enrique Ponce Grijuela¹

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, La Habana, C.P. 11600, asosa@inisav.cu.

² Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 no. 455 e/ J e I, La Habana, C.P. 10400

RESUMEN

Se evaluó la actividad antagonista de dos cepas de *Bacillus subtilis* conservadas en discos de papel de filtro a 4°C por un período de tres años. Se escogieron las cepas del género *B. subtilis*: Bs-21 y Bs-42, aisladas del suelo, autóctonas de Cuba, y antagonistas de la cepa Rs-10 de *Rhizoctonia solani*. Se determinó la viabilidad, pureza y actividad antagonista de cinco colonias de Bs-42 y una de Bs-21, escogidas al azar y cultivadas en agar nutriente. Las colonias seleccionadas se evaluaron por el método de enfrentamiento dual en papa dextrosa agar, después de 96 h de incubación a 30°C. Ambas cepas presentaron una viabilidad de 10⁸ UFC/mL. Los cultivos mantuvieron la pureza, las características morfológicas y respuesta positiva a la tinción de Gram, comparadas con la cepa de *B. subtilis* ATCC 6633. Todas las colonias seleccionadas inhibieron el crecimiento micelial de la cepa Rs-10 de *R. solani*, no así la de referencia. El análisis de varianza realizado mostró diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de las colonias ensayadas. La cepa Bs-21 resultó ser la de menor inhibición con el 78%, y Bs-42₁ y Bs-42₂ las de mayor porcentaje con el 98%.

Palabras claves: *Bacillus subtilis*, conservación biológica, antagonismo, *Rhizoctonia solani*

ABSTRACT

Antagonistic activity of two *Bacillus subtilis* strains preserved in filter paper disks at 4°C for a period of three years was evaluated. Strains Bs-21 and Bs-42, isolated from Cuban soil and antagonists to *Rhizoctonia solani* Rs-10 were choiced. Five colonies from Bs-42 and one from Bs-21, randomly selected were growth in nutrient agar. The antagonism was compared by dual culture method in PDA after 96 h at 30°C. Viability of both strains was 10⁸ CFU/mL. Selected colonies kept purity, morphological characteristics and positive response to Gram stain compared with *B. subtilis* ATCC 6633. All selected colonies inhibited mycelial growth of *R. solani* Rs-10, but not the reference strain. Strain Bs-21 had the lower inhibition (78%) while Bs-42, and Bs-42₂ had the higher percent (98%). Variance analysis showed significant differences in the percentage of inhibition exhibited by tested colonies.

Key word: *Bacillus subtilis*, biological conservation, antagonism, *Rhizoctonia solani*

INTRODUCCIÓN

La preservación de cepas microbianas no es tarea fácil, y debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación [Castro *et al.*, 2000]. Para ello se han establecido varios procedimientos, con los cuales se trata de mantener el cultivo lo más cercano posible al aislamiento original [García y Uruburu, 2001].

Todos los métodos de preservación tienen ventajas y desventajas; por tanto, es necesario hacer una selección del método a utilizar a partir de un análisis de las características de cada técnica, factibilidad de su uso y las necesidades del usuario. Generalmente la elección depende de la disponibilidad del equipamiento y de la competencia del personal. Es recomendable utilizar más de un método de preservación y trabajar con réplicas

del microorganismo que se desea conservar como medida de seguridad [Uzunova-Doneva y Donev, 2004-2005].

En el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal se utilizan diferentes métodos de conservación para las bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, como liofilización, subcultivos, cuñas de agar nutriente con parafina líquida y el método de papel de filtro, entre otros. Este último se utiliza como una alternativa a la disponibilidad de recursos.

En el presente trabajo se evalúa el método de conservación de los discos de papel de filtro con las cepas Bs-21 y Bs-42 de *B. subtilis*, aisladas de suelo, autóctonas de Cuba y eficaces en el control del hongo fitopatógeno *R. solani* (Rs-10).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon las cepas de *Bacillus subtilis* (Bs-21 y Bs-42) conservadas durante tres años en papel de filtro y mantenidas a 4°C, y la ATCC 6633 de *B. subtilis* liofilizada. Para los experimentos *in vitro* se empleó la cepa Rs-10 de *R. solani*, cultivada y mantenida en plano inclinado con medio PDA.

La conservación en discos de papel de filtro se realizó según la metodología descrita por García y Uruburu (2001) y modificada por Carreras (2007), basada en la paralización del crecimiento celular por la eliminación del agua disponible para las células. Para ello se utilizó un papel de filtro absorbente y estéril que se impregnó en una suspensión bacteriana de células (10^8 esp/mL), se dejó secar al aire en condiciones estériles y una vez secos los discos se colocaron en tubos Eppendorf estériles a 4°C hasta su nuevo uso.

La viabilidad de las tres cepas bacterianas se determinó a partir de su reactivación en medio caldo nutriente (CN). Se tomó una pequeña cantidad de la cepa liofilizada y se inoculó en ese medio; posteriormente se tomó un disco de papel de filtro de las cepas Bs-21 y Bs-42 y se colocaron por separado en dos tubos de ensayo que contenían 5 mL del medio citado. Las tres cepas se incubaron durante 72 h (entre 28 y 30°C), momento en el cual se les realizó una tinción simple con violeta cristal (VC) al 0,05%, con la finalidad de observar en el microscopio óptico (lente de inmersión 100X), el estadio fisiológico en que se encontraban estas bacterias con relación a la fase de esporulación. El próximo paso fue la siembra por agotamiento en placas con AN, con el objetivo de obtener colonias aisladas, com-

probar la pureza macroscópica de los cultivos por observación al microscopio estereoscopio y describir las características morfológicas de las colonias seleccionadas, según lo descrito por Claus y Berkeley (1986), de acuerdo con forma, tamaño de las colonias, bordes, elevación, color y textura comparada con la cepa de referencia ATCC 6633.

Se seleccionó una colonia de cada cepa, se pasaron a tubos con cuñas de AN y se incubaron durante 72 h a 30°C; se realizó la tinción de Gram al cabo de 18 h para observar parámetros como la pureza microscópica de los cultivos y forma de las células. Se hicieron evaluaciones periódicas mediante una tinción simple con VC para determinar presencia, forma, ubicación y tipo de espora.

La concentración (esporas por mililitro) de cada una de las suspensiones bacterianas se determinó por el conteo de las esporas presentes en cada uno de los cuadrantes a evaluar de la cámara de Neubauer (5 x 5) mediante la observación en el microscopio óptico con contraste de fase 400x.

A partir de los cultivos (cepas Bs-21, Bs-42 y ATCC 6633) sembrados en AN plano inclinado, se realizaron diluciones decimales seriadas con solución salina (NaCl 0,85%) hasta llegar a 10^{-8} . La viabilidad se cuantificó por la producción de colonias. Para ello se tomó 1 mL de las tres últimas diluciones de cada cepa empleada, se añadieron en placas de Petri estériles, luego se realizó la siembra por adición de 15 mL de medio de cultivo AN a una temperatura de 45°C aproximadamente. Cada placa se agitó suavemente con el fin de lograr una mezcla homogénea de la suspensión bacteriana con el medio de cultivo y obtener colonias aisladas. Se hicieron tres réplicas de las tres últimas diluciones. Las placas se incubaron a 30°C y posteriormente se contaron las unidades formadoras de colonias a las 24, 48 y 72 h. La concentración se determinó por la siguiente ecuación:

$$C = XD 100 \text{ (UFC/mL)} \text{ [Pérez, 2000, citado por Ramírez et al., 2005]}$$

donde:

X: Media del conteo de las colonias en las placas

D: Factor de dilución = 1/dilución

100: Para convertir de μL a mL

Para la determinación de la actividad antagónica de las cepas de *Bacillus subtilis* frente a *R. solani* (Rs-10)

se tomaron 100 µL de la cuarta dilución seriada correspondiente a las cepas Bs-21 y Bs-42, se añadieron en el centro de una placa de Petri con medio AN, luego se diseminó por toda la placa con la espátula de Drigalskiy y se incubó durante 72 h a 30°C. Después de este tiempo se examinaron las colonias crecidas y se seleccionaron cinco de Bs-42, y una en el caso de las cepas Bs-21 y ATCC, según las características culturales descritas para *B. subtilis* [Claus y Berkeley, 1986]. Cada colonia se nombró con un número, de ahí se pasaron a tubos con AN en plano inclinado, los que se incubaron a 30°C hasta obtener un cultivo esporulado y homogéneo. Luego se sembró una estría de cada colonia antagonista y se incubaron 96 h a 30°C. Con posterioridad se realizó el enfrentamiento por cultivo dual de cada colonia frente al patógeno *R. solani* de siete días de crecido en placas con PDA y se incubaron durante siete días a 30°C. Se realizaron observaciones y mediciones diarias. El porcentaje de inhibición se calculó por la fórmula de Abbott (1965) [citado por Marín y Fernández, 2003].

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{DT - DC}{DT} \times 100$$

donde:

DT: Diámetro de la colonia en el testigo

DC: Diámetro de la colonia en el enfrentamiento

Los datos de los experimentos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple y test de significación LSD de mínima diferencia-

ción de Fischer con un nivel de significación del 5% ($\alpha = 0,05$). Se utilizó el programa Statgraphics Plus 5.1 Inc. 2001.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas Bs-21 y Bs-42 presentaron una viabilidad de 10^8 UFC/mL que se considera como adecuada para su empleo en experimentos de laboratorio, de igual forma para el caso de la ATCC 6633. La tinción de Gram corroboró que las cepas eran Gram positivas. El método de conservación utilizado se agrupa en la categoría de mediano plazo, pues en este grupo se encuentran las células conservadas que permanecen viables de dos a cinco años. Las características morfológicas y culturales de las colonias no mostraron variaciones respecto a la cepa patrón utilizada (*Fig. 1a*), ni en comparación con descripciones hechas en estudios anteriores [Sosa *et al.*, 2006]. Estos autores plantearon que los aislados presentaron esporas elipsoidales y centrales que no distienden el esporangio, células vegetativas en forma de bastón, colonias rugosas con bordes irregulares, lobulados, entre pequeñas y mediano tamaño, de coloración blanco grisáceo (*Fig. 1b*). La observación microscópica evidenció abundantes células vegetativas en forma de bastón a las 24 h, presencia de endosporas a las 48 h con esporas elipsoidales, y en posición central a las 72 h. En ninguno de los casos se evidenció contaminación, ni colonias con una morfología diferente a la descrita hasta ahora. Por estas razones puede decirse que cada una de las cepas mostró una pureza del 100%.

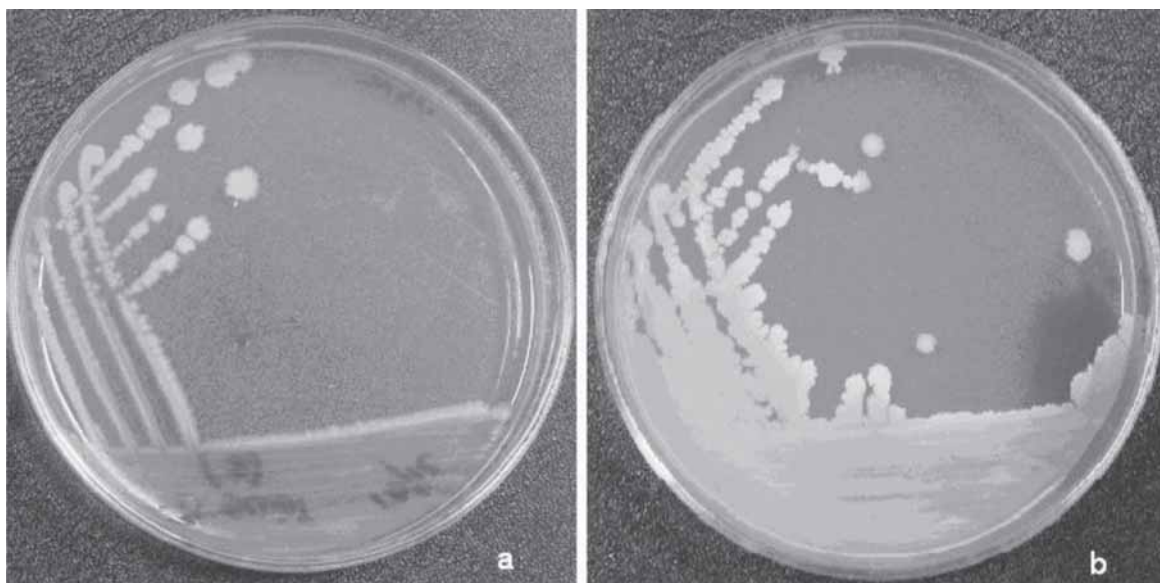


Figura 1. Características morfológicas y culturales de *B. subtilis*: a) cepa de referencia ATCC 6633, b) cepa Bs-21.

La identidad del cultivo puede conocerse basado en sus características de crecimiento en uno o más medios específicos, en consideración a las propiedades macro y microscópicas exhibidas, o en una evaluación más exhaustiva con la utilización de muchos ensayos bioquímicos, biológicos, inmunológicos y genéticos [Uzunova-Doneva y Donev, 2004-2005].

Los enfrentamientos *in vitro* de cada una de las cepas en estudio y a partir de las colonias seleccionadas (Fig. 2a) manifestaron que ambas aún mantienen su capacidad antagonista frente al patógeno empleado (Fig. 2b), a pesar de que existen diferencias significativas entre las colonias seleccionadas y entre las cepas de *B. subtilis* (Bs-21 y Bs-42).

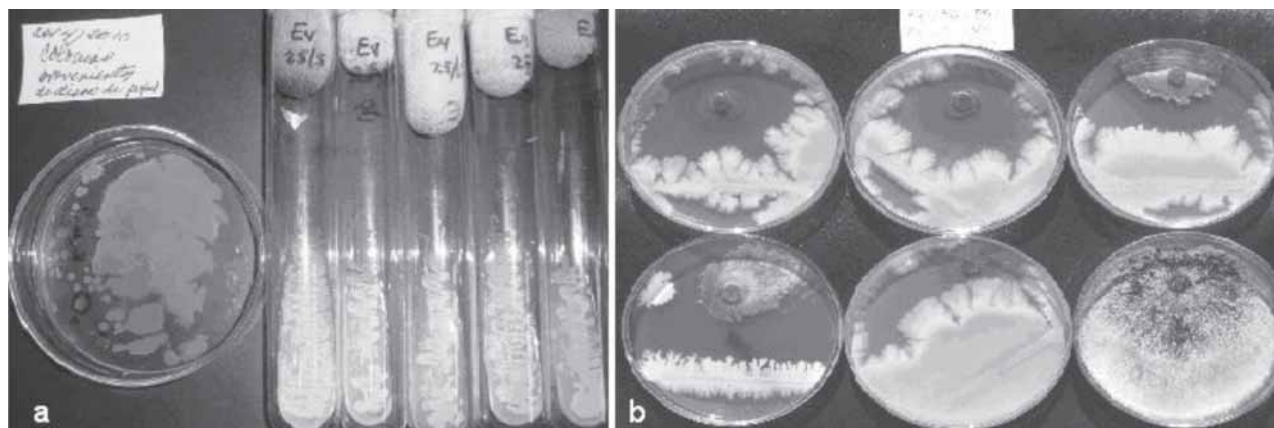


Figura 2. a) Colonias de la cepa *Bacillus subtilis* (Bs-42), b) enfrentamiento dual de cada colonia seleccionada.

Las colonias de la cepa Bs-42 (Bs-42₁ y Bs-42₂) mostraron los valores más altos de inhibición del crecimiento –el 98% aproximadamente en ambos casos– cuando se enfrentaron con la cepa Rs-10 de *R. solani* y al ser comparadas con el testigo, quien al tercer día de iniciado el experimento había cubierto la placa completa. Bs-42₅ manifestó el 95% de inhibición, el 78% de inhibición causó Bs-21 y la cepa patrón utilizada no inhibió el crecimiento micelial del fitopatógeno en estudio (Fig. 3). Existen diferencias significativas entre las colonias seleccionadas (diferentes poblaciones de células) de una misma cepa y entre cepas de una misma especie (Bs-21 y Bs-42) (Fig. 3), lo cual demuestra, una vez más, la alta variabilidad intra e interespecífica que existe en las especies de este género.

Sosa *et al.* (2006) también lograron resultados satisfactorios cuando enfrentaron por cultivo dual las cepas de *B. subtilis* (Bs-21 y Bs-42) con la cepa Rs-10 de *R. solani* de forma simultánea, y demostraron que no habían diferencias significativas entre ambas con un porcentaje de inhibición del 59 y el 57%, respectivamente. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en este trabajo –que son superiores al 75% en todos los casos–, esto puede deberse a que en este método los mecanismos biocontroladores se restringen en el mejor de los casos a la secreción de antibióticos volátiles o difusibles en el medio y a la competencia por espacio [Basurto-Cadena *et al.*, 2010]. En el caso de estas cepas la pro-

ducción de metabolitos es mayor en la fase de esporulación que en la de crecimiento activo cuando fueron enfrentadas al mismo tiempo.

En ninguno de los casos se refleja la pérdida de la actividad antagonista, pues las colonias seleccionadas al azar de las cepas Bs-21 y Bs-42 mostraron elevados porcentajes de inhibición frente al patógeno Rs-10 después de conservadas tres años en papel de filtro, y además que sus células son viables aún (Fig. 3), lo que indica que el método de conservación utilizado fue adecuado para estos microorganismos.

Los microorganismos tienen una tendencia inherente a mutar en cultivos de laboratorio, por lo que es muy importante el uso de procedimientos adecuados para mantenerlos viables y genéticamente estables [García y Uruburu, 2001], resultados que se hicieron notorios en este estudio con las cepas de *B. subtilis* empleadas y con la metodología desarrollada.

En la literatura consultada no se muestran estudios semejantes al descrito en este trabajo que permitan comparar estos resultados; sin embargo, en esta investigación se evidencia que el uso correcto de los microorganismos conlleva al éxito del mantenimiento de las cepas de interés por períodos considerablemente largos. Aunque no siempre se cumpla, se corren menos riesgos de perder las características de las cepas.

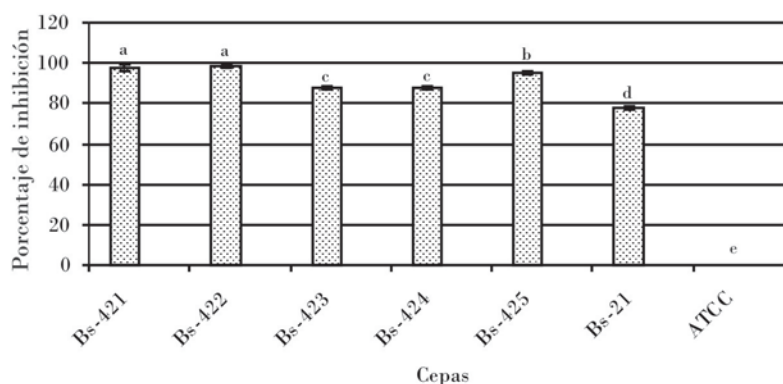


Figura 3. Porcentaje de inhibición de las colonias seleccionadas a partir de tres cepas de *B. subtilis* (Bs-21, Bs-42₁, Bs-42₂, Bs-42₃, Bs-42₄, Bs-42₅ y ATCC 6633) frente a *Rhizoctonia solani* (Rs-10).

CONCLUSIONES

- Las cepas de *Bacillus subtilis* (Bs-21 y Bs-42) se mantuvieron viables por tres años en papel de filtro a 4°C, y además mantuvieron su capacidad antagonica frente a la cepa Rs-10 de *Rhizoctonia solani*.
- Las cepas Bs-21 y Bs-42 inhibieron el crecimiento micelial de *R. solani* por encima del 75%.

REFERENCIAS

- Basurto, M. G.; M. I. Font; J. García; M. Vásquez: «Cambios en la estructura celular durante la actividad antagonica de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*», *Acta Microscópica* 19(2):138-144, España, 2010.
- Carreras, B.: «Aislamiento y determinación de las características morfológicas, moleculares y patogénicas de cepas nativas de la Bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner con potencial para el control de plagas», tesis en opción al grado científico de Doctora en Ciencias Biológicas, Inisav, La Habana, 2007.
- Castro, G.; J. T. Hernández; C. Aquino: «Manual sobre conservación de microorganismos», Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México, 2000.

Claus, D.; R. C. Berkeley: «Genus *Bacillus* Cohn 1872», *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams y Wilkins Edit., Baltimore, EE. UU., 1986, pp. 1105-1139.

García, M. D.; F. Uruburu: «La conservación de cepas microbianas», Colección Microbiana de Cultivos Tipo (CECT) Universidad de Valencia, España, Temas de la actualidad, 2001, <http://www.cect.org/docs/instrseguridad.pdf> (consultado el 20 de diciembre de 2008).

Marín, D.; A. Fernández: «Elementos para el manejo de patógenos fúngicos en semilleros de tabaco en la tecnología de bandejas flotantes», tesis de Maestría en Microbiología, Universidad de La Habana, Inisav, La Habana, 2003.

Ramírez, Y.; V. Pazos; I. Sánchez: «Selección de rizobacterias antagonistas con potencial para el control biológico de las enfermedades producidas por *Acidovorax avenae* subsp. Citrulli, *Xanthomonas cucurbitae* y *Fusarium oxysporum*», tesis de Maestría en Microbiología General, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Cuba, 2005.

Sosa, A., V. Pazos; M. González: «Nuevos aislados de *Bacillus* spp. antagonistas a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermatum*», *Fitosanidad* 10(1):73-74, La Habana, 2006.

Uzunova-Doneva, T.; T. Donev: «Anabiosis and Conservation of Microorganisms», *Journal of Culture Collections* 4:17-28, Bulgaria, 2004-2005, <http://hdl.handle.net/1807/5199> (consultado en enero de 2011).