

ARTÍCULO ORIGINAL

Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)

B. Tejera, Mayra Heydrich, Marcia M. Rojas*

Dpto. de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 # 455 e/ J e I, Vedado, La Habana, Cuba. *Autor para la correspondencia: marcia@fbio.uh.cu

RESUMEN: El arroz es uno de los alimentos con mayor demanda en el mercado actual debido al gran número de personas que lo consumen. Una alternativa para dar solución a la aparición de enfermedades de origen fúngico es la utilización de bacterias como control biológico de hongos fitopatógenos. Dentro de estos microorganismos, los aislamientos del género *Bacillus* han sido uno de los más empleados en el control biológico, debido a que estos tienen la capacidad de producir una amplia diversidad de metabolitos con actividad antifúngica. En el presente trabajo se utilizaron siete aislados pertenecientes al género *Bacillus* para evaluar el efecto antagonístico ejercido por estos microorganismos sobre dos hongos fitopatógenos del cultivo del arroz *Curvularia* sp. (Boed.) y *Pyricularia grisea* (Sacc.), mediante el cultivo dual, evaluando a los siete y once días con el objetivo de determinar el mejor tiempo de incubación para realizar este tipo de estudio. Se obtuvieron altos porcentajes de inhibición del crecimiento de los dos hongos para todos los aislamientos de *Bacillus* estudiados y se determinó que a los siete días se observan los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento para los dos hongos empleados bajo las condiciones de laboratorio utilizadas.

Palabras clave: *Bacillus*, *Curvularia* sp., *Pyricularia grisea*.

Bacillus spp. antagonism against phytopathogenic fungi of rice crop (*Oryza sativa* L.)

ABSTRACT: Rice is one of the main food crops having a higher demand in the market today, due to the large number of peoples who consume it. One alternative to eliminate fungal origin diseases is the use of plant-growth-promoting-rhizobacteria for the biological control. These microorganisms can inhibit phytopathogenic fungi growth due to their ability to produce many metabolites with antifungal activity. *Bacillus* genus isolates are one of the most used because their members produce a wide variety of these metabolites. In the present work, seven isolates identified as *Bacillus* sp. were used. The antagonistic effect against two phytopathogenic fungi of rice *Curvularia* sp. (Boed.) and *Pyricularia grisea* (Sacc.) was determined. Such effect was studied at seven and eleven days of the dual culture incubation. High percentages of inhibition against the two fungi were obtained; and the seven day was the best incubation time under the laboratory conditions tested.

Key words: *Bacillus*, *Curvularia* sp., *Pyricularia grisea*.

INTRODUCCIÓN

Los cereales y en particular el arroz (*Oryza sativa* L.) constituyen parte del alimento básico para gran parte de la población mundial. Además de su importancia como alimento, representa posibilidad de empleo para buena parte de la población de Asia, África y América (1). Dada su importancia económica, se busca la forma de aumentar los rendimientos, utili-

zando las alternativas de la agricultura sostenible, en las que se utilicen tecnologías amigables con el medio ambiente.

En Cuba se cultiva este cereal dada las condiciones climatológicas, sin embargo, las producciones se encuentran afectadas fundamentalmente por el ataque de hongos fitopatógenos como *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. (2) y *Pyricularia grisea* (Sacc.) (3), este

último provoca grandes pérdidas en las cosechas a nivel mundial (4).

Una de las vías más utilizadas es el uso de productos creados a partir de microorganismos que tengan la capacidad de ser utilizados como biofertilizantes y/o bioplaguicidas, con el objetivo de disminuir el uso de productos químicos en la agricultura (5).

Entre los microorganismos que se usan para este fin se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB según sus siglas en inglés), las cuales aportan beneficios a las plantas y al ecosistema. Estos microorganismos tienen la capacidad de ejercer un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas mediante diversos mecanismos que incluyen la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno y el control biológico de patógenos (6).

El género *Bacillus* incluye más de 100 especies (7) y sus miembros se consideran ubicuos, pues se han aislado a partir de una amplia variedad de ambientes acuáticos y terrestres (8,9), aunque también las especies *Bacillus anthracis*, causante del ántrax y *B. cereus*, contaminante de alimentos, son patógenas (10).

Estas bacterias son bacilos gram positivos, aerobios o anaerobios facultativos, catalasa positiva y esporulados. Esta última característica le ofrece resistencia a los cambios ambientales, lo que resulta sumamente interesante para la producción de inoculantes.

Se ha demostrado de forma independiente sus potencialidades como control biológico de patógenos (11). En este sentido se conoce que entre los mecanismos a través de los cuales transcurre este proceso se encuentran las relaciones de competencia, la producción de antibióticos, enzimas y de otras sustancias como sideróforos, que permiten a estos microorganismos ejercer su capacidad biocontroladora (12).

También se han demostrado potencialidades como solubilizador de fosfatos y fijador de nitrógeno atmosférico. Se han realizado diversos estudios para utilizar este género bacteriano como promotor del crecimiento vegetal, entre las principales especies se destacan *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*, entre otras (6). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antagónico de siete aislados de *Bacillus* sp. frente a dos hongos fitopatógenos del cultivo del arroz, *Curvularia* sp. y *Pyricularia grisea* y el mejor tiempo de incubación para la realización de este tipo de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos empleados

Se utilizaron siete aislados de *Bacillus* sp. previamente obtenidos a partir de la rizosfera de plantas de arroz cultivar J-104. Por otra parte se utilizaron dos cepas de hongos fitopatógenos del cultivo del arroz, *Pyricularia grisea* y *Curvularia* sp. provenientes de la colección de cultivos fúngicos del laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Previo al estudio de antagonismo se probó la capacidad de las cepas bacterianas de crecer en el medio Agar Papa dextrosa (PDA), para poder utilizarlo en el cultivo dual.

Determinación del efecto antagónico

Para determinar el efecto antagónico se realizaron dos bioensayos *in vitro* siguiendo la metodología de cultivo dual descrita por Bashan *et al.* (13). Para esto, los hongos fitopatógenos se sembraron previamente en medio PDA (OXOID) y se incubaron durante siete días a 30°C. Los aislados bacterianos se sembraron en Caldo Nutriente durante 24 horas, en condiciones de agitación en zaranda orbital a 150 rpm y temperatura de 30°C. La concentración celular se ajustó a 10^8 cel.mL⁻¹, tomando como referencia el tubo 0,5 de la escala Mc Farland (14), para inocular superficialmente por diseminación de 100µL de esta suspensión bacteriana en placas Petri de 100 mm con medio PDA. Se extrajo un fragmento del hongo previamente crecido utilizando un obturador de 5 mm de diámetro y se colocó en el centro de cada una de las placas inoculadas con los aislados bacterianos. Estas se incubaron a 30°C.

Se realizaron tres réplicas por aislado. La actividad antagónica de los aislados se determinó a través de la medición del diámetro de crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia del antagonista bacteriano a los 7 y 11 días. Como control negativo se utilizaron tres placas donde se encontraban solamente los hongos.

Con las mediciones obtenidas se procedió al cálculo del porcentaje de inhibición (15) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = ((D.C.C - D.C.P)/D.C.C) * 100$$

donde:

D.C.C: diámetro de la colonia control.

D.C.P: diámetro de la colonia del hongo en interacción con las bacterias.

Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza a las variables de los experimentos y se aplicó la prueba T de Student utilizando el programa Statistica para Window versión 6.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del efecto antagónico frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz

Los resultados mostraron que todos los aislados bacterianos ejercen efecto antagónico al enfrentarlos a los dos hongos fitopatógenos, inhibiendo su crecimiento en diferente grado (Figura 1).

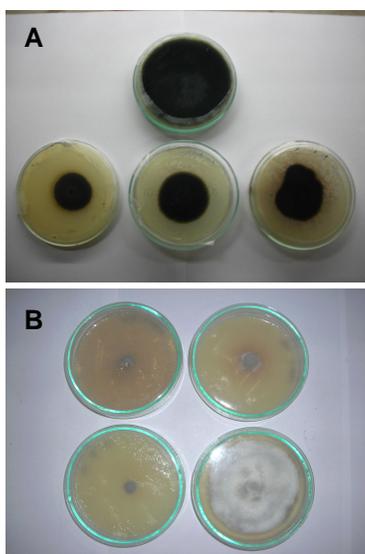


FIGURA 1. Efecto antagónico de las cepas de *Bacillus* frente a diferentes hongos fitopatógenos. A) Aislados JRRB2, JRRB3 y JRRB6 frente a *Curvularia* sp. Arriba control sin inocular. B) Aislados JRRB3, JRRB6 y JRRB7 frente a *Pyricularia grisea*. Abajo a la derecha control sin inocular. / *Antagonistic effect of Bacillus strains against different phytopathogenic fungi.* A) JRRB2, JRRB3 and JRRB6 isolates against *Curvularia* sp. Top control without bacterial inoculation. B) JRRB3, JRRB6 and JRRB7 isolates against *Pyricularia grisea*. Lowest right control without bacterial inoculation.

Los miembros del género *Bacillus* son los microorganismos beneficiosos más utilizados como bioplaguicidas para el control de enfermedades fúngicas. Su efecto protector puede deberse a la presencia de diferentes mecanismos para influir negativamente, de forma directa o indirecta, en el crecimiento de patógenos. Varios autores han informado la activi-

dad antagonista del género *Bacillus* sobre diferentes hongos fitopatógenos lo que se atribuye a la producción de antibióticos (16) y enzimas (17), entre otros.

Dentro de los hongos fitopatógenos que más afectan al cultivo del arroz se encuentran *Curvularia* sp., pues su acción conjunta con otros hongos, provoca la enfermedad conocida como manchado del grano (18), y *Pyricularia grisea*, agente causal de la quemazón o añublo del arroz (19). De ahí que el estudio de la actividad antagónica esté enfocado hacia el manejo de estos hongos fitopatógenos utilizando los aislados del género *Bacillus*.

En la Figura 2 se aprecia que existen diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico medido a los 7 y los 11 días para seis de las siete cepas analizadas. En cinco de ellos los mejores resultados se obtienen a los siete días de crecimiento y solo uno en sentido inverso. Además, se observan altos porcentajes de inhibición del crecimiento fúngico, lo que evidencia las potencialidades de estas cepas en el control biológico de *Curvularia* sp.

Los mayores valores del efecto antagónico de los aislados de *Bacillus* frente a este hongo se obtienen en el menor tiempo probado (siete días), que podrían estar relacionados con la disminución de la producción de metabolitos antifúngicos por parte de estos aislados y/o con la producción de compuestos por parte del hongo que inhiban el crecimiento bacteriano.

La capacidad de inhibición de miembros del género *Bacillus* sobre especies del género *Curvularia* fue demostrada en plantas de soya, donde ejercieron acción protectora (20). Por otra parte, esto ha sido demostrado en la cepa *Bacillus licheniformis* BC98 sobre el hongo fitopatógeno *Curvularia lunata*, donde se encontró que el sobrenadante del cultivo de esta bacteria ejercía un fuerte efecto inhibitorio del hongo (21). Los resultados obtenidos en este trabajo, en que los aislados del género *Bacillus* ejercen efecto antagónico frente a este género fúngico, coinciden con los informados en la literatura.

El crecimiento de *P. grisea* en presencia de tres de los aislados bacterianos muestra un porcentaje de inhibición a los 7 días significativamente superior respecto al porcentaje de inhibición encontrado a los 11 días de incubación (Figura 3).

El efecto obtenido por los aislados en el presente trabajo, coincide con los informados previamente por otros autores. Velusamy y Gnanamanickam (22), demostraron la capacidad de miembros del género *Bacillus* de ejercer efecto biocontrolador sobre *P. grisea*, basado en la producción de metabolitos de tipo anti-

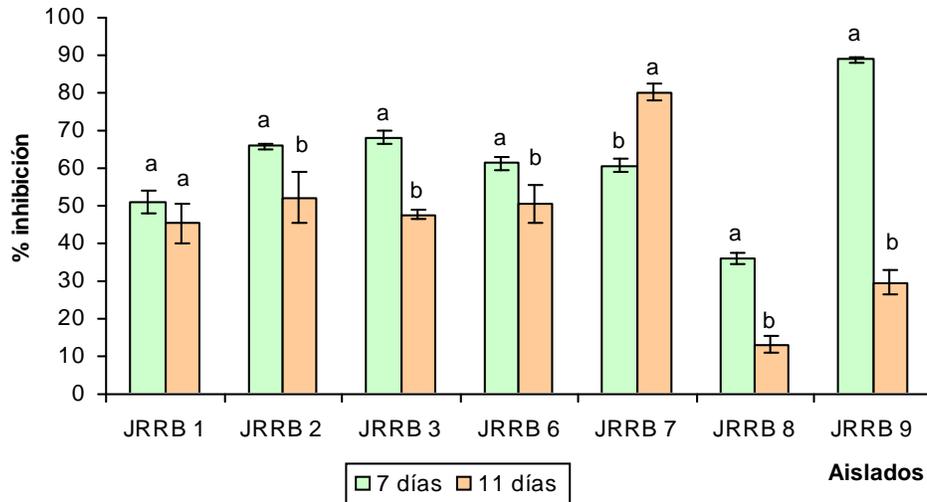


FIGURA 2. Efecto antagonístico de las cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*O. sativa*) frente a *Curvularia* sp. Medias de 3 réplicas. En cada tratamiento se indica la desviación estándar. Letras no comunes indican diferencias significativas para la prueba T de Student ($p < 0,05$) para los tiempos de incubación analizados. / Antagonistic effect of *Bacillus* strains associated to rice crop (*O. sativa*) against *Curvularia* sp. Data represent the means of three replicates with the standard deviations. Means with different letter are significantly different according to T Student test ($P < 0.05$).

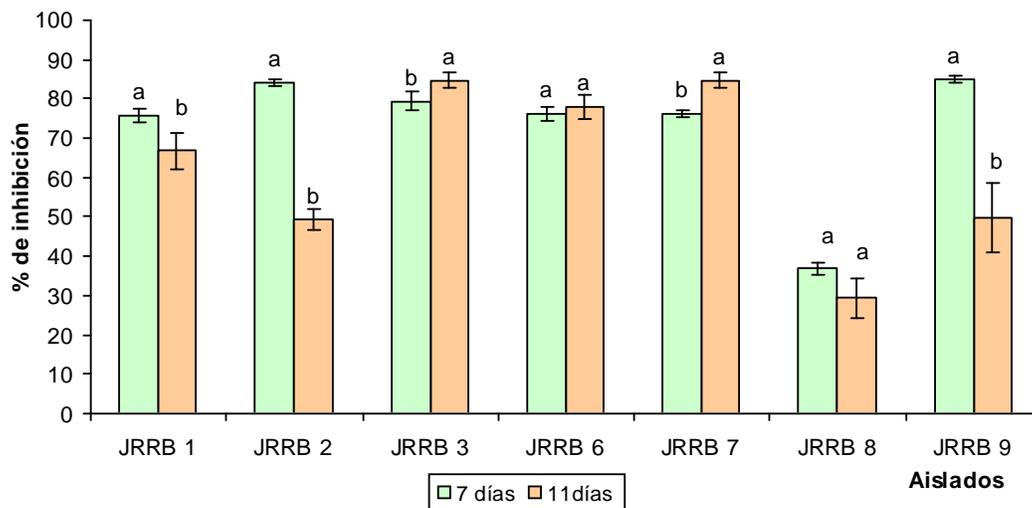


FIGURA 3. Efecto antagonístico de las cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*O. sativa*) frente a *Pyricularia grisea*. Letras no comunes indican diferencias significativas para la prueba T de Student ($p < 0,05$) para los tiempos de incubación analizados. Media de tres réplicas. En cada tratamiento se indica la desviación estándar. / Antagonistic effect of *Bacillus* strains associated to rice crop (*O. sativa*) against *Pyricularia grisea*. Data represent the means of three replicates with the standard deviations. Means with different letter are significantly different according to T Student test ($P < 0.05$).

biótico. Por otra parte, se ha empleado a *Bacillus thuringiensis* para el control biológico de *P. grisea* el cual ejerce su efecto biocontrolador a través de la acción de las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac (23).

En el caso de los aislados enfrentados a este hongo se aprecian altos porcentajes de inhibición, que si bien fueron obtenidos *in vitro* resultan de gran interés

dada las potencialidades como control biológico que presentan.

Los resultados demostraron que, bajo las condiciones empleadas, el mejor tiempo de incubación para la realización de los experimentos de antagonismo *in vitro* de las cepas de *Bacillus* frente a *Curvularia* sp. y *P. grisea* fue de 7 días. Este comportamiento generaliza-

do en el género *Bacillus* frente a diferentes cultivos fúngicos, está relacionado con el hecho de que durante los primeros días del cultivo dual, las bacterias del género *Bacillus* ejercen un fuerte efecto antagónico sobre los hongos fitopatógenos, por su alta velocidad de crecimiento, lo que les permite alcanzar rápidamente el estado estacionario y comenzar a producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica y finalmente colonizar el medio de cultivo (24). Posteriormente los hongos fitopatógenos podrían iniciar la producción de metabolitos que contrarresten el efecto producido por las bacterias antagonistas y/o los metabolitos bacterianos pudieran disminuir su concentración en función del tiempo, lo que explicaría el resultado obtenido.

Los trabajos actuales sobre el efecto antagónico de algunos microorganismos y el desarrollo del «priming y bioprimering» como mecanismos de inducción de respuestas globales de la planta (25) sientan pautas hacia la utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en este sentido. Previamente se demostró que estas cepas de *Bacillus* tienen la capacidad de producir auxinas estimuladoras del crecimiento vegetal y solubilizar fosfatos (26), lo que conjuntamente con los resultados de este trabajo, sustenta una interacción planta-bacteria que permite establecer medidas integrales para el mejoramiento de la salud de la planta, que redundará en mayores rendimientos agrícolas.

REFERENCIAS

1. Food and Agriculture Organization (FAO). Rice Market Monitor. 2007; Vol. X No 3.
2. Cárdenas RM, González L, Parra Y, Rivero D, Cruz A. Influence of rice grain discoloration (*Oryza sativa* L.) on variety J-104. Harmfulness and genera of present fungi. Rev Protección Veg. 2005;18(2): 124-128.
3. Cárdenas R M, Cristo E, Pérez N. Variedades cubanas de arroz (*Oryza sativa* L.) promisorias para la provincia de Pinar de Río tolerantes al tizón de la hoja (*Pyricularia grisea*). Cultivos Tropicales. 2002;23(1): 53-56.
4. Mohd, Shahijahan Dar, Sajad Hussain, GH. Nabi Joo, Masood Majaz. Prevalence and distribution of blast disease (*Magnaporthe grisea*) on different components of rice plants in paddy growing areas of the Kashmir Valley. International J Pharma and Biosciences. 2010;1(3):1-4.
5. Figueiredo MVB, Martinez CR. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). World J Microbiol Biotechnol. 2008;24:1187-1193.
6. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annu Rev Microbiol. 2009;63:541-556.
7. Euzéby JP. List of Prokaryotic Names with standing nomenclature. 2006. Consultado: 20 dic 2010. Disponible en: <http://www.bacterioCict.fr/index.html>.
8. Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. Appl Envir Microbiol. 2007;73(10): 3272-3282.
9. Ruiz-García G, Quesada E, Martínez-Checa F, Llamas I, Urdaci MC, Bejar V. *Bacillus axarqueinsis* sp. nov. and *Bacillus malacitensis* sp. nov., isolated from river mouth sediments in Southern Spain. Int J. Syst Evol Microbiol. 2005;155:1279-1285.
10. Dworzanski JP, Dickinson DN, Deshpande SV, Peter SA, Eckenrode B. A. Discrimination and Phylogenomic Classification of *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* Strains Based on LC-MS/MS Analysis of Whole Cell Protein Digests. Anal Chem. 2010;82:145-155.
11. Hu QP, Xu JG, Song P, Song JN, Chen WL. Isolation and identification of a potential biocontrol agent *Bacillus subtilis* QM3 from Qinghai yak dung in China. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008; 24(11): 2451-2458.
12. Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. Annu Rev Plant Biol. 2006; 57:233-266.
13. Bashan Y, Holguín G, Ferrera-Cerrato, R. Interacciones entre las plantas y los microorganismos benéficos. Terra. 1996;14(2):159-192.
14. Natural Committee for Clinical laboratory standards for antimicrobial Disk NCCSL. «Susceptibility Test». Approved standard. M2-A5. 1993;13(24).

15. Chaiharn M, Chunhaleuchanon S, Lumyong, S. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009; 25:1919-1928.
16. Zhao Z, Wang Q, Wang K, Brian K, Liu C. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology.* 2010;101: 292-297.
17. Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H. et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology.* 2002;148: 2097-2109.
18. Mazzanti de Castañón MA. Gutiérrez SA. Contribución al conocimiento de las enfermedades trasmisibles del arroz en Argentina, En: Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. SGCYT. UNNE. Tomo V. Ciencias Agrarias. 1999:147-150.
19. Álvarez E, Zamora NI, Escalona M. Comportamiento de variedades de arroz frente a *Pyricularia grisea* (Sacc.) en la provincia Granma. *Rev Protección Veg.* 2001;16(1):40-43.
20. Basha S, Ulaganathan K. Antagonism of *Bacillus* species (strains BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Sciences.* 2002;82(12):1457-1463.
21. Tendulkar SR, Saikumari YK, Patel V, Raghotama S, Munshi TK, Balaram P, et al. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *J Applied Microbiology.* 2007;103: 2331-2339.
22. Velusamy P, Gnanamanickan SS. The effect of Bacterial Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens of Rice. *Soil Biology.* 2008; 14:93-106.
23. Knaak N, Rohr AA, Fiuza LM. *In vitro* effect of *Bacillus thuringiensis* strains and cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2007; 38:526-530.
24. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganism.* 10th edition, Prentice Hall, New Jersey. 2003; Chap. 6:138-148.
25. Coto O, Ramos-Leal M, Medina ME, Alvarez A. Biotechnological advances in the improvement of different crops for sustainable agriculture in 21st Century. In: *Stable food production and Sustainable agriculture «A challenge ahead in 21st Century».* Senger RS and Sharma AK (Eds.). Chapter 16. Stadium Press (India) PVT. Ltd; 2010: 301-318.
26. Rojas MM, Tejera B, Larrea JA, Heydrich M. Caracterización de cepas del género *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa*). 4^{to} Encuentro Internacional del Arroz, La Habana, 2008. ISBN 978-959-282-076-0.

Recibido: 14-10-2011.

Aceptado: 30-3-2012.