

Comunicación

Antagonismo "in vitro" de especies de *Bacillus* contra *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium solani*

Adriana M Alippi* y Cecilia I Mónaco**

Area de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. CC 31, 1900 La Plata, Argentina.

Recibido: 5 de Mayo de 1993. Aceptado: 10 de Diciembre de 1993

Palabras claves: Antagonismo, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii*.

El control biológico es el resultado de la reducción de la densidad de inóculo o la actividad de un patógeno, en estado activo o latente, realizado por uno o más microorganismos en forma natural o mediante la introducción masiva de antagonistas (Cook y Baker, 1983).

El biocontrol de enfermedades ocasionadas por hongos en los vegetales mediante bacterias no patógenas, provee una estrategia alternativa potencial de control con relación al empleo de fungicidas.

Las especies del género *Bacillus* Cohn han sido ampliamente utilizadas como antagonistas de diversos microorganismos, entre ellos *Colletotrichum trifolii* Bain et Essary agente causal de la antracnosis de la alfalfa (Douville y Boland, 1992); *Rhizoctonia solani* Kühn que ocasiona el decaimiento radical de la soja (Liu y Sinclair, 1992); *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *dianthi* (Prill. et Del.) productor del marchitamiento del clavel (Filippi et al., 1989); *Pseudomonas solanacearum* (E.F. Smith) E.F. Smith, agente causal de la marchitez bacteriana del tomate (Misaghi et al., 1992); *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. organismo causante de la podredumbre húmeda del pepi-

no (Smith et al., 1993); etc.

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar "in vitro" la acción antagonica de tres especies de *Bacillus*: *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn; *B. licheniformis* (Weigmann) Chester y *B. pumilus* Gottheil sobre el crecimiento de *Fusarium solani* (Mart) Sacc. y *Sclerotium rolfsii* Sacc., responsables del "damping-off" en tomate.

Para las pruebas "in vitro" se empleó una cepa de *S. rolfsii* aislada de suelos cultivados con tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Partido de La Plata, utilizando la técnica de dilución con agua destilada de tierra no lavada (Alippi y Mónaco, 1990). La cepa de *F. solani* se obtuvo a partir de plantas de tomate con síntomas de podredumbre basal (Volcan y Lori, 1991).

Las especies bacterianas se aislaron de muestras de miel utilizando la técnica de Hansen (1984). Se identificó a *B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. licheniformis* mediante los esquemas recomendados por Gordon et al (1973); Logan y Berkeley (1984); Priest et al (1988); Priest y Alexander (1988) y Castro et al (1991).

** Investigadora y Becaria de Perfeccionamiento de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), de la Provincia de Buenos Aires.

Para evaluar la acción antagonica de las especies de *Bacillus* sobre el crecimiento de *S. rolfsii* y *F. solani* se emplearon dos medios de cultivo: agar nutritivo (Britania[®]) (AN) indicado para el desarrollo bacteriano y agar de papa glucosado al 2% (APG) recomendado para el crecimiento fungico. Se cortaron con sacabocado discos de 6 mm de diámetro de cultivos de 7 días de edad de *F. solani* y *S. rolfsii* respectivamente (Chang y Kommedahl, 1968) y se colocaron a 2 cm de la periferia de cajas de Petri de 9 cm de diámetro, con el correspondiente medio de cultivo.

Se sembraron suspensiones bacterianas mediante gotas de 5 µl cada una, con una micropipeta automática (Unipipette[®] 2010), de las especies antagonistas (*B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. licheniformis*) con una concentración de 1×10^8 cel/ml y a una distancia de 5 cm del centro del disco de micelio.

Se efectuaron 14 repeticiones (7 en AN y 7 en APG) de cada una de las siguientes combinaciones: *B. subtilis* vs. *S. rolfsii*; *B. subtilis* vs. *F. solani*; *B. pumilus* vs. *S. rolfsii*; *B. pumilus* vs. *F. solani*; *B. licheniformis* vs. *S. rolfsii* y *B. licheniformis* vs. *F. solani*.

En las cajas testigo (14 por cada medio de cultivo) en lugar de las suspensiones bacterianas se sembraron gotas de 5 µl de agua destilada estéril, y a 5 cm de distancia, discos de 6 mm de diámetro del micelio de cada hongo.

Todas las cajas se incubaron a $25^\circ\text{C} \pm 1$ durante 7 días, al cabo de los cuales, se midió la distancia entre el punto central de la siembra y el borde de la colonia desarrollada a partir de ella hacia el centro de la caja (d_2).

Para determinar la acción inhibitoria de las especies bacterianas de una manera directa, los datos fueron transformados a valores de un índice de inhibición creado para tal efecto.

$$I = d_1 / d_2$$

En la fórmula: I= índice de inhibición; d_2 =

distancia en cm de la colonia fungica desde el punto de siembra y d_1 = distancia en cm de la colonia del hongo desarrollado en ausencia del antagonista.

El diseño experimental utilizado fue un factorial completamente aleatorizado. Se efectuó el análisis de la varianza y las diferencias de los promedios se compararon mediante la prueba de Tukey al nivel de 0,05 de probabilidad.

El análisis de la varianza demostró la existencia de un efecto altamente significativo ($P < 0.01$) de *S. rolfsii* y *F. solani* y de los medios de cultivo sobre el valor del índice de inhibición, pero no se observaron diferencias entre las tres especies de *Bacillus*. Se encontró una interacción altamente significativa entre "hongo X medio" demostrando que el comportamiento de ambas especies fungicas frente a las cepas bacterianas no fue el mismo en los dos medios de cultivo empleados. En este sentido se observó que el crecimiento de *S. rolfsii* fue mucho más inhibido en AN que en APG, mientras que para *F. solani* el medio de cultivo resultó indiferente.

No se encontró un comportamiento estadísticamente significativo de las tres especies de *Bacillus* frente a los dos hongos en los distintos medios (Fig. 1).

Las tres especies antagonistas impidieron la formación de esclerocios por parte de *S. rolfsii* en AN.

Cabe destacar que *B. pumilus* y *B. licheniformis* enfrentados a *S. rolfsii* indujeron la necrosis de su micelio, visualizada en forma macroscópica como una zona de color castaño oscuro (Fig. 2). En el microscopio se observaron las hifas plasmolizadas. Los repiques de este micelio en APG confirmaron la necrosis, dado que no hubo desarrollo alguno luego de 7 días de incubación.

Este comportamiento de *B. licheniformis* y *B. pumilus* en AN podría deberse a la produc-

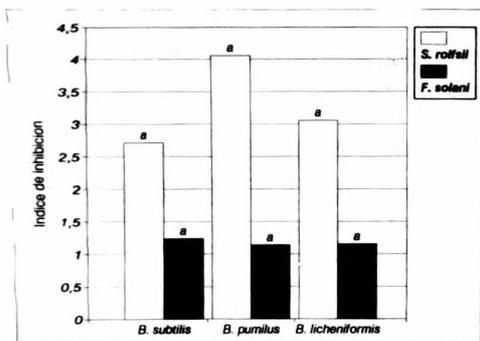


Figura 1: Valores promedio entre agar nutritivo (AN) y agar de papa glucosado (APG) del Índice de inhibición del desarrollo de *Sclerotium rolfsii* (barras blancas) y *Fusarium solani* (barras negras) al enfrentarlos con *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis*. Los valores de las barras del mismo color, seguidos por la misma letra, no difieren entre sí en forma significativa según la prueba de Tukey. ($P < 0,05$).

Mean values of Inhibition Index of the growth of *Sclerotium rolfsii* (white bars) and *Fusarium solani* (black bars) on nutrient agar and potato dextrose agar against *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis*. Bar values of the same color followed by the same letter were not significantly different according to Tukey ($P < 0.05$) using transformed values.

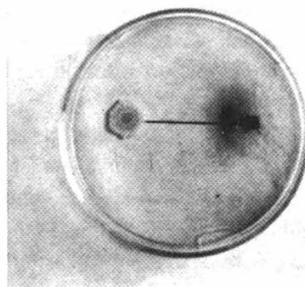


Figura 2: Cultivo doble de *Bacillus licheniformis* (izquierda) y *Sclerotium rolfsii* (derecha) en agar nutritivo luego de 7 días de incubación a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Se observa la necrosis de las hifas del hongo en el centro de la caja de Petri.

Dual cultures of *Bacillus licheniformis* (left) and *Sclerotium rolfsii* (right) on nutrient agar after 7 days of incubation at $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Dead hyphae are observed on the centre of Petri dish.

ción por parte de estas especies de alguna sustancia de tipo antibiótico volátil o difusible en el medio de cultivo. Se ha demostrado que *B. licheniformis* produce metabolitos con actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis* y *Klebsiella* sp. (Ebube *et al.*, 1992); no se encontraron datos sobre *B. pumilus*.

Con respecto a la cepa de *B. subtilis* utilizada, se observó en ambos medios de cultivo la formación de un halo de inhibición contra *S. rolfsii*, que indicaría la presencia de metabolitos fungistáticos. Varios autores han analizado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina (Klein *et al.*, 1992) y otros antibióticos de la familia de las Iturinas: la Iturina A (Klich *et al.*,

1991; Thimon *et al.*, 1992) que inhibe el crecimiento de especies de *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* y la Iturina B que inhibe el desarrollo de *Colletotrichum trifolii* (Douville y Boland, 1992). Fiddaman y Rossall (1993) observaron vacuolización y deformación de las hifas de *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* Trow ocasionadas por la producción de un compuesto volátil con propiedades fungicidas por parte de *B. subtilis*. También se ha demostrado la eficacia de *B. subtilis* como agente biocontrolador de *S. rolfsii* (Agrawal *et al.*, 1978; Hedge *et al.*, 1980).

B. pumilus, *B. licheniformis* y *B. subtilis* forman un grupo muy homogéneo desde el punto de vista fisiológico y bioquímico ("espectro *subtilis*") (Gordon *et al.*, 1973), razón por la

cual es probable que *B. pumilus* también produzca metabolitos volátiles y/o difusibles con acción fungicida y/o fungistática. Esta hipótesis podrá ser aclarada mediante estudios posteriores.

Por todo lo expuesto se concluye que *B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. licheniformis* ejercen inhibición "in vitro" sobre *S. rolsii* y *F. solani*, sin mostrar diferencias significativas entre ellas.

B. pumilus y *B. licheniformis* producirían

una sustancia volátil o difusible en el medio con acción fungicida cuando se las cultiva en agar nutritivo.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. H E Alippi por la lectura crítica del manuscrito.

A las Ings. Agrs. G Lori y S Wolcan por el aislamiento e identificación de la cepa de *Fusarium solani*.

BIBLIOGRAFIA

- Agrawal SC, MN Khare and PS Agrawal (1978) Biological control of *Sclerotium rolsii* causing collar rot of lentil. Indian Phytopathol 30: 176-179
- Alippi HE y CI Mónaco (1990) Antagonismo "in vitro" entre hongos fitopatógenos y saprobios de suelos hortícolas. Rev Arg Microbiol 22: 90-93
- Castro GR, MA Ferrero and BS Mendez (1991) A system for the differentiation of some closely related *Bacillus* species. J Biotechnol 20: 105-108
- Cook RJ and KF Baker (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society, USA, 539 pp
- Chang I-pin and T Kommedahl (1968) Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. Phytopathology 1395-1401
- Douville Y and GJ Boland (1992) A note on the antibiotic properties of *Bacillus subtilis* against *Colletotrichum trifolii*. Phytoprotection 73: 31-36
- Ebube NK, OK Udeala and AA Ghobashy (1992) Isolation and characterization of a novel polysaccharide from *Bacillus licheniformis* NCIB 11634. J Ind Microbiol 9: 239-245
- Fiddaman PJ and S Rossall (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J Appl Bact 74: 119-126
- Filippi C, G Bagnoli and G Picci (1989) Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* IV Studies on controlled *S. lycopersicum* and *D. caryophyllus* L. rhizosphere. Agricultura Medit-terranea 119: 327-336 (RPP 69:2376, 1990)
- Gordon R, WC Haynes and CH-N Pang (1973) The genus *Bacillus*. USDA Handbook 427
- Hansen H (1984) The incidence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honeys retailed in Denmark. Danish Plant & Soil Science 88: 329-336.
- Hedge RK, S Kulkarni, AL Siddaramaiah and KS Krishna Prasad (1980) Biological control of *Sclerotium rolsii* Sacc. causal agent of foot rot of wheat. Current Research 9: 67-69 (RPP 60, 809, 1981)
- Klein C, C Kaletta, N Schnell and K-D Entian (1992) Analysis of genes involved in biosynthesis of the Lantibiotic subtilin. Appl Environ Microbiol 58: 132-142
- Kilch MA, AR Lax and JM Bland (1991) Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. Mycopathologia 116: 77-80
- Liu ZL and JB Sinclair (1992) Population dynamics of *Bacillus megaterium* strain B 153-2-2 in the rhizosphere of soybean. Phytopathology 82: 1297-1301
- Logan LA and RCW Berkeley (1984) Identification of *Bacillus* strains using the API system. J Gen Microbiol 130: 1871-1882

- Misaghi IJ, MW Olsen, JM Billote and RM Sonoda (1992)**
The importance of rhizobacterial mobility in biocontrol of bacterial wilt of tomato. *Soil Biol Biochem* 24: 287-293
- Priest FG and B Alexander (1988)** A frequency matrix for probabilistic identification of some Bacilli. *J Gen Microbiol* 134: 3011-3018
- Priest FG, M Goodfellow and C Todd (1988)** A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J Gen Microbiol* 134: 1847-1882
- Smith KP, MJ Havey and J Handelsman (1993)** Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW 85. *Plant Dis* 77: 139-142
- Thimon L, F Peypoux, R Maget-Dana and G Michel (1992)** Surface-active properties of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. *J A O C S* 69: 92-93
- Wolcan S y GA Lori (1991)** Podredumbre del pie del tomate causada por *Fusarium solani* (Mart) Sacc. *Rev Fac Agronomía UBA* 12: 47-51