

CAPACIDAD ANTAGÓNICA Y QUITINOLÍTICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE RESIDUOS DE HIGUERILLA (*Ricinus communis*)

ANTAGONISTIC AND CHITINOLYTIC ACTIVITY OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM LIGNOCELLULOSIC RESIDUES OF CASTOR (*Ricinus communis*)

CAPACIDADE ANTAGONISTA E QUITINOLÍTICA DE MICROORGANISMOS ISOLADOS DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DA MAMONEIRA (*Ricinus communis*)

TERESA CABRA C.^{1*}, CRISTIAN ALONSO RODRÍGUEZ G.², CLAUDIA PATRICIA VILLOTA C.³

RESUMEN

*Se ha comprobado que los fertilizantes y controladores biológicos a base de microorganismos benéficos productores de metabolitos de interés, inducen el crecimiento vegetal y actúan contra microorganismos patógenos y plagas que afectan los agroecosistemas. Por lo tanto, su uso constituye una práctica eficiente de producción limpia que ayuda a reducir el impacto ambiental causado por el uso de agroquímicos. En este trabajo se evaluó la capacidad antagonica y quitinolítica de 15 cepas bacterianas y una levaduriforme, aisladas de residuos lignocelulósicos de higuera (*Ricinus communis*). La actividad antagonica de cada cepa se determinó por la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium**

Recibido para evaluación: 3 de octubre de 2013. **Aprobado para publicación:** 28 de abril de 2014

- 1 Universidad Católica de Manizales, Grupo de investigación GIBI, Docente investigadora del Instituto de investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustria. MsC. en Biología. Manizales, Colombia.
- 2 Universidad Católica de Manizales. Asistente de investigación del Instituto de investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial. Especialista en Microbiología Industrial. Manizales, Colombia.
- 3 Universidad Católica de Manizales, asistente de investigación del Instituto de investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial. Especialista en Microbiología Industrial. Manizales, Colombia.

Correspondencia: tcabra@ucm.edu.co

equiseti, en medio de cultivo PDA. Solamente la bacteria *Bacillus subtilis*, presentó una inhibición significativa del crecimiento del hongo equivalente al 76,08%. Por lo tanto se demuestra que la cepa de *Bacillus subtilis* puede ser empleada en la formulación de inoculantes microbianos. La capacidad quitinolítica de las cepas se definió por el crecimiento del microorganismo y por la formación de halos de hidrólisis alrededor de las colonias sobre el medio de cultivo suplementado con quitina coloidal. Ninguna de las cepas evaluadas mostró capacidad para degradar quitina.

ABSTRACT

*It has been shown that fertilizers and biological controllers based on beneficial microorganism producing metabolites induce plant growth and act against pathogens and pests that affect agro ecosystems. Therefore, its use constitutes an efficient practice of clean production that allows to reduce the environmental impact caused by the use of agrochemicals. In this work, we investigated the antagonistic and chitinolytic activity of 15 strains of bacteria and one yeast, isolated from lignocellulosic residues of castor (*Ricinus communis*). The antagonistic activity of each strain was evaluated on the basis of the ability to inhibit the growth of the plant pathogen fungus *Fusarium equiseti*, in PDA culture. Only the *Bacillus subtilis* showed a significant inhibition of the fungus growth, and it was 76,08%. Therefore, the *Bacillus subtilis* strain can be used in the development of microbial inoculants. The chitinolytic capacity of the strains was defined on the basis on the fungus growth and the development of hydrolysis halos around the colonies, in a colloidal chitin based culture. None of the strains showed ability to degrade chitin.*

RESUMO

*Tem sido demonstrado que os fertilizantes controladores biológicos feitos com microorganismos benéficos que são produtores de metabólitos de interesse, induzem o crescimento das plantas e atuam contra os agentes patogênicos e pragas que afetam as agroecossistemas. Pelo qual, sua utilização constitui uma prática eficiente de produção mais limpa que ajuda à redução do impacto ambiental causada pela utilização de produtos agroquímicos. Neste estudo foi avaliada a capacidade antagonista e quitinolítica de quinze cepas de bactérias e uma leveduriforme, isoladas de resíduos lignocelulósicos da mamoneira (*Ricinus communis*). A ação antagonista de cada uma das cepas foi determinada por meio da capacidade de inibição do crescimento do fungo fitopatogênico *Fusarium equiseti*, no meio de cultura PDA. Sómente a bactéria *Bacillus subtilis*, apresentou uma inibição significativa do crescimento do fungo e foi de 76,08%. Assim demonstra-se que a cepa de *Bacillus subtilis* pode ser usada na formulação de inoculantes microbianos. A capacidade quitinolítica das cepas definiu-se pelo crescimento do microorganismo e através da formação dos halos de hidrólise ao redor das colônias acima do meio de cultura suplementado com quitina coloidal. Nenhuma das cepas avaliadas mostrou ter a qualidade para degradar quitina.*

PALABRAS CLAVE:

Desechos lignocelulósicos, *Fusarium equiseti*, *Bacillus subtilis*, Control biológico.

KEYWORDS:

Lignocellulosic wastes, *Fusarium equiseti*, *Bacillus subtilis*, Biological control.

PALAVRAS CHAVE:

Resíduos lignocelulósicos, *Fusarium equiseti*, *Bacillus subtilis*, Control biológico.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas agrícolas son atacados por plagas y enfermedades que causan disminución en la producción y por lo tanto grandes pérdidas económicas. El tratamiento de éstas comúnmente se realiza utilizando indiscriminadamente plaguicidas y fungicidas que aumentan los costos e impactan negativamente el medio ambiente.

La búsqueda de sostenibilidad ha llevado a realizar estudios con microorganismos antagonistas como agentes de control, que tienen la capacidad de producir metabolitos biológicamente activos e interferir en la supervivencia o desarrollo de los patógenos [1].

La manera de interactuar contra los patógenos no se conoce con exactitud aunque se sabe que el control biológico se basa en mecanismos de antibiosis, competencia por alimento y por espacio, inducción de resistencia en la planta, lisis celular y micoparasitismo entre otros [2,3].

Uno de los géneros más estudiados por su capacidad antagonista y su amplia diversidad metabólica es *Bacillus* [4].

Su acción se ha evaluado sobre una gran diversidad de hongos patógenos que causan enfermedades en vegetales, entre ellos *Fusarium oxysporium*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani* [3], *Curvularia sp.* y *Pyricularia grisea* que afectan el cultivo del arroz, *Fusarium oxysporium* var *v. cubensis* que afecta la germinación y el desarrollo de semillas de tomate [5,6].

Una de las especies de *Bacillus* más representativa ha sido *Bacillus subtilis* por su efecto antagonista y por la capacidad que posee de producir compuestos fungicidas como la Iturina, antibiótico de naturaleza lipopeptídica muy estudiado en el control biológico [7].

Los resultados de diversas investigaciones confirman su gran versatilidad al utilizarlo como biofertilizante en diferentes cultivos, como se refiere a continuación: en [3] inocularon cultivos de aguacate con la bacteria antes y después de la cosecha llegando a la conclusión que posee un efecto semejante al de los fungicidas comerciales.

En [8] se comprobó la influencia de la cepa SL-13 de *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento de plántulas de tomate y su actividad antifúngica contra el patógeno *Rhizoctonia solani*.

En [9] se utilizó *Bacillus subtilis* para el control de *Alternaria porri* en plantas de cebolla, alternando aplicaciones de fungicidas con las del producto biológico [9]. Actualmente se comercializan muchos productos a base de *Bacillus subtilis* siendo Estados Unidos el líder en este campo [3].

Además como productor de quitinasas este microorganismo ha sido empleado para recuperar materiales bioactivos como antioxidantes y quitina, a partir de residuos de cáscara de camarón.

Después de la fermentación, su actividad quitinolítica le permite degradar la estructura de la pared celular de los hongos fitopatógenos y los exoesqueletos de insectos considerados plagas en la agricultura, realizando así un control biológico que contribuye a disminuir la aplicación de productos químicos [10].

También se han encontrado cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad quitinolítica, por esta razón se utiliza como biocontrolador en sistemas de agricultura sostenibles [10, 11].

Cuba cuenta con una colección de cepas de esta especie que son utilizadas en control biológico de gran variedad de insectos y organismos considerados plagas en la agricultura, el 40% de todos los controladores biológicos son formulados a base de *Bacillus thuringiensis* [12].

La quitinasa purificada de *Bacillus cereus* inhibe el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Pythium ultimum*, según lo demostraron Chang, Chen, y Wang en su investigación [13].

Los desechos marinos se consideran eficaces inductores de la producción de quitinasas bacterianas, de hecho, se está investigando la bioconversión de caparzones de camarones y cangrejos para la producción de biofungicidas [14]; en Taiwan están trabajando sobre la bioconversión de los residuos del procesamiento de mariscos con el fin de utilizar la enzima como biofertilizante y además pretenden encontrar compuestos bioactivos y enzimas útiles beneficiosas para la salud humana y el medio ambiente [14].

MÉTODO

Para la realización de las pruebas de antagonismo y producción de quitinasas, se utilizaron 15 cepas del género *Bacillus* y una levadura (cuadro 1), aisladas de

Cuadro 1. Lista de microorganismos evaluados y código de identificación.

Microorganismo	Código
Bacillus pumilus	GIBI_000187_AG_B
Bacillus altitudinis	GIBI_000188_AG_B
Bacillus pumilus	GIBI_000189_AG_B
Bacillus pumilus	GIBI_000192_AG_B
Bacillus pumilus	GIBI_000193_AG_B
Bacillus sp.	GIBI_000194_AG_B
Bacillus sp.	GIBI_000195_AG_B
Bacillus sp.	GIBI_000197_AG_B
Bacillus sp.	GIBI_000199_AG_B
Bacillus subtilis	GIBI_000200_AG_B
Bacillus sp.	GIBI_000201_AG_B
Bacillus pumilus	GIBI_000203_AG_B
Bacillus pumilus	GIBI_000204_AG_B
Bacillus pumilus	GIBI_000206_AG_B
Bacillus sp.	GIBI_000208_AG_B
Rhodospiridium paludigenum	GIBI_000209_AG_Y

residuos lignocelulósicos provenientes de la industrialización de la higuera, recolectados en un cultivo del municipio de Palestina, Caldas con las siguientes condiciones climáticas: 1050 msnm, Temperatura media 23°C, precipitación promedio anual de 2200 mm, Humedad relativa del 76%.

Las cepas fueron suministradas por la Colección de microorganismos de la Universidad Católica de Manizales.

La evaluación de la capacidad antagonista de los microorganismos se realizó sembrando cada una de las cepas en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, se hicieron dos líneas paralelas a 2 cm del centro de la caja de Petri y luego se incubaron por 24 horas a 30°C. Posteriormente se sembró en el centro un disco de 0,5 cm de diámetro del hongo fitopatógeno *Fusarium Equiseti* con una semana de crecimiento previo.

Este ensayo se realizó por triplicado, se usó como control negativo una cepa de *Escherichia coli* y un testigo absoluto en donde se sembró únicamente el disco de 0,5 cm del hongo.

Como parámetros evaluativos, se midió el porcentaje de inhibición a partir del crecimiento radial del hongo hacia el lado izquierdo y derecho, el cual se estimó

con base en la diferencia obtenida entre el crecimiento del patógeno confrontado con la cepa antagonista y el crecimiento en el cultivo control.

Esta medición se realizó a los 12 días, tiempo en el cual los controles fueron completamente invadidos, este procedimiento se propone en [16]. Para seleccionar las cepas productoras de quitinasas, se sembraron las 16 cepas y el control positivo por estría y picadura, en el medio suplementado con quitina coloidal como única fuente de carbono, con el objetivo de inducir la actividad quitinolítica evidenciada por la formación de halos de hidrólisis alrededor de la colonia y poder así determinar posibles controladores biológicos [17]. Para esta prueba se utilizó como control positivo la bacteria *Serratia marcescens* reportada como degradadora de quitina [15].

La quitina coloidal utilizada en la elaboración del medio de cultivo para realizar esta prueba, se elaboró de la siguiente manera: se diluyeron 40 g de quitina en 400 mL de HCl concentrado y se colocó en agitación constante (150 rpm) durante 2 horas.

Posteriormente se agregaron 2 L de agua destilada fría y se agitó la mezcla rápidamente para facilitar la formación del precipitado de quitina. La solución resultante se filtró para obtener la pasta de quitina coloidal a la que se le realizaron lavados sucesivos con agua destilada (200 mL), con el fin de eliminar los residuos de ácido. La pasta obtenida se esterilizó durante 15 min a 15 psi y se almacenó a 4°C hasta su posterior uso [18].

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo muestran que el porcentaje de inhibición de crecimiento de las cepas evaluadas respecto al control, fue estadísticamente significativo solamente para la cepa *Bacillus subtilis* GIBI_000200_AG_B, que obtuvo un porcentaje medio de inhibición del 76,08% (figuras 2 y 3). Las demás cepas no presentaron actividad antagonista.

Las pruebas realizadas para identificar las cepas productoras de quitinasas determinaron que ninguna de las evaluadas posee actividad quitinolítica, la formación del halo se evidenció únicamente en el control positivo realizado con *Serratia marcescens*, una bacteria que posee alta actividad quitinolítica (Figura 4).

Figura 1. Comparación del % de inhibición de *F. equiseti* producida por cada cepa.

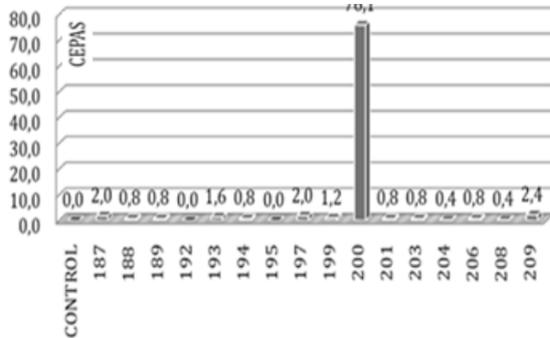


Figura 2. Inhibición de *F. equiseti* (*B. subtilis* en el centro, los controles negativos a los extremos).

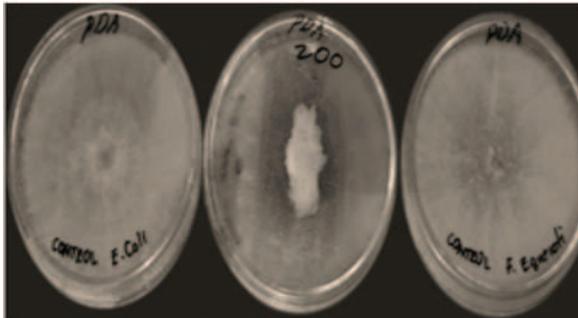


Figura 3. Control positivo con *Serratia marsescens*.



CONCLUSIONES

Las potencialidades que tienen los microorganismos presentes en los residuos generados a partir de la industrialización de la higuera *Ricinus communis*, han

sido poco explorados, de ahí la importancia de identificarlas para emplearlas en procesos biotecnológicos.

La cepa *Bacillus subtilis* mostró tener capacidad para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium equiseti*, como consecuencia de la facultad que posee de sintetizar compuestos como Surfactina, Iturina y Fengicinas [19]; se conoce su efectividad en el control de enfermedades de las plantas, esta actividad despierta el interés para continuar utilizándola en diferentes campos de la investigación, bajo condiciones apropiadas y controladas como en control biológico, contra patógenos vegetales, como biofertilizante o promotor de crecimiento vegetal en diferentes cultivos, con el fin de confirmar su comportamiento en campo y seleccionarla para la formulación de biopreparados que ayuden a mejorar la producción en cultivos de importancia económica.

El efecto de los agroquímicos utilizados para controlar enfermedades y plagas que atacan los cultivos, puede ser minimizado con el uso de inoculantes microbianos, en este caso la cepa de *Bacillus subtilis* se debe tener en cuenta en sistemas de producción más limpia.

Las pruebas cualitativas realizadas a las 16 cepas para la detección de quitinasas, arrojaron resultados negativos concluyendo así que ninguna de las cepas evaluadas posee capacidad de producir enzimas quitinolíticas, sin embargo se debe continuar investigando con el fin de encontrar las condiciones necesarias para que los microorganismos expresen estas enzimas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan sus agradecimientos al Centro de Investigación Proyección y Desarrollo de la Universidad Católica de Manizales por la financiación brindada para el desarrollo de la investigación, según Acuerdo No 9 del 27 de enero de 2011 emitido por el Consejo Académico.

REFERENCIAS

- [1] LAYTON, C., MALDONADO, E., MONROY, L., CORRALES, L. y SÁNCHEZ, L. *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibióticos en cultivos afectados por fitopatógenos. NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas, 9(15), 2011, p. 177-184.

- [2] HERNÁNDEZ, A., BAUTISTA, S., VELÁZQUEZ, M. y HERNÁNDEZ, A. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades post cosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 2007, p. 66 -74.
- [3] FERNÁNDEZ, O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario: Avances en el fomento de productos fitosanitarios No-Sintéticos. *Manejo integrado de plagas*, 62, 2001, p. 96 -100.
- [4] TEJERA, B., ROJAS, M. y HEYDRICH, M. Potenciales del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42(3), 2011, p.131-138.
- [5] TEJERA, B., ROJAS, M. y HEYDRICH, M. Antagonismo de *Bacillus spp.* contra hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 27(2), 2012, p.117-122.
- [6] ROJAS, M., TEJERA, B., LARREA, J., MAHILLON, J. y HEYDRICH, M. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecología*, 6(1), 2011, p. 90-99.
- [7] RAGAZZO, J.A., ROBLES, A., LOMELÍ, L., LUNA, G. y CALDERÓN, M. Selección de cepas de *Bacillus spp* productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 17(1), 2011, p. 5-11.
- [8] YAN, L., JING, T., YUJUN, Y., BIN, L., HUI, L. and CHUN, L. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. *Biotechnology and Bioengineering Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(1), 2011, p. 128 -134.
- [9] HERNÁNDEZ, D., AGUIRRE, A., LIRA, R., GUERRERO, E. y GALLEGOS, G. Bioeficacia de productos orgánicos, biológicos y químicos contra *Alternaria dauci* Kühn y su efecto en el cultivo de zanahoria. *Phyton*, 75, 2006, p. 91-101.
- [10] NAVA, I. Demostración de la actividad de quitina desacetilasa en *Bacillus thuringiensis*. [Tesis Maestro en Ciencias Químico-biológicas]. México D.F (México): Instituto Politécnico Nacional, 2009, p. 82.
- [11] FORTUNA, J.M. Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas Mexicanas de *B. thuringiensis*. [Tesis de Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica]. Reynosa (México): Instituto Politécnico Nacional, 2009, p.106.
- [12] CARRERAS, B. Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. *Revista CORPOICA, Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 2011, p.129 -133.
- [13] CHANG, W.T., CHEN, C.S, and WANG, S.L. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Current Microbiology*, 47(2), 2003, p.102-108.
- [14] SAN-LANG, W., TZU-WEN, L. and YUE-HORNG, Y. Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 2011, p. 732-742.
- [15] SASTOQUE, E.L. Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador [Tesis Microbiología industrial, agrícola y veterinaria]. Bogotá (Colombia): Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 2005, 118 p.
- [16] BENÍTEZ, S., BUSTAMANTE, P., SÁNCHEZ, L.C., CORRALES, L. y BENTLEY, J. Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 5(8), 2007, p. 147-153.
- [17] RODAS, B.A., QUERO, M., MAGAÑA, H.F. y REYES, A. Selección de cepas nativas con actividad Quitino- Proteolítica de *Bacillus sp* aisladas de suelos tropicales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 2009, p.107-113.
- [18] JIN, Y., YU, C. and KUEN, Y. Cloning and expression of chitinase a from *Serratia marcescens* for large-scale preparation of n,n-diacetyl chitobiose. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 56(4), 2009, p. 688-695.
- [19] LANNA, R., MONTEIRO, H. y SILVA, R. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista trópica-Ciencias Agrarias y Biológicas*, 4(2), 2010, p. 12-20.