

Obtención y evaluación *in vitro* de metabolitos secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis* contra el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp.

Marlon Reyniel Bustamante Salgado

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Obtención y evaluación *in vitro* de metabolitos
secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis*
contra *Fusarium spp***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Marlon Reyniel Bustamante Salgado

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2015

Obtención y evaluación *in vitro* de metabolitos secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis* contra *Fusarium* spp.

Presentado por:

Marlon Reyniel Bustamante Salgado

Aprobado:

Rogelio Trabanino, M.Sc.
Asesor principal

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Estela Aguilar, M.Sc.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Ludovic Bouilly Ph.D.
Asesor

Obtención y evaluación *in vitro* de metabolitos secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis* contra el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp.

Marlon Reyniel Bustamante Salgado

Resumen. *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva que produce metabolitos secundarios que contienen propiedades antifúngicas. Entre los metabolitos secundarios producidos se destacan la Iturina A y la surfactina. Se realizó la obtención y evaluación *in vitro* del extracto de metabolitos secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis* con la finalidad de evaluarlos contra el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp. Los objetivos de este estudio fueron evaluar la eficacia de cuatro solventes (metanol, etanol, ácido fórmico y agua destilada estéril) para la obtención de un extracto de metabolitos secundarios producidos por dos cepas de *Bacillus subtilis* (Zamorano y QST 713) y determinar el tiempo de fermentado adecuado de la bacteria para la extracción de los metabolitos secundarios de ambas cepas sobre la inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. Para ello se utilizó la metodología de extracción propuesta por Miizumoto. Se utilizó un diseño completo al azar con un arreglo factorial de 2×4×4 con cuatro repeticiones por tratamiento para un total de 128 unidades experimentales. El método utilizado para la prueba antifúngica fue la de extensión por superficie de placa utilizando 200 microlitros del extracto de metabolitos por placa con el medio Muller Hinton, evaluados a los 7 días de incubación. El mejor resultado sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. se obtuvo utilizando las cepas Zamorano y QST 713, ambas con el solvente agua destilada estéril con 24 horas de fermentación de la bacteria y la cepa Zamorano con el solvente ácido fórmico con 24 horas de fermentación obteniendo 99, 94 y 94% de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. respectivamente.

Palabras claves: Antibiosis, Biocontrol, Esporulación, Polipéptidos.

Abstract. *Bacillus subtilis* is a Gram positive bacterium producing secondary metabolites containing antifungal properties. Among the secondary metabolites produced stand iturin A and surfactin. And obtaining the extract in vitro evaluation of secondary metabolites of two strains of *Bacillus subtilis* in order to evaluate against the phytopathogenic fungus *Fusarium* spp. was performed. The objectives of this study were to evaluate the effectiveness of four solvents (methanol, ethanol, formic acid and sterile distilled water) to obtain an extract of secondary metabolites produced by two strains of *Bacillus subtilis* (Zamorano and QST 713) and determine the time fermented suitable bacteria for extraction of secondary metabolites of both strains on the inhibition of growth of *Fusarium* spp. For this extraction methodology proposed by Miizumoto used. A complete randomized design was used with a factorial arrangement $2 \times 4 \times 4$ with four replicates per treatment for a total of 128 experimental units. The method used for the test was the antifungal extension surface plate by using 200 microliters of extract metabolites plate with Muller Hinton medium, evaluated at 7 days of incubation. The best result on the percent inhibition of growth of *Fusarium* spp. was obtained using Zamorano strains and QST 713, both with the solvent sterile distilled water 24 hours fermentation of the bacterium and Zamorano strain with solvent formic acid 24 hours fermentation taking 99, 94 and 94% inhibition of growth *Fusarium* spp. respectively.

Keywords: Antibiosis, Biocontrol, Polypeptides, Sporulation.

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| Portadilla..... | i |
| Página de firmas..... | ii |
| Resumen..... | iii |
| Contenido..... | v |
| Índice de Cuadros, figuras y anexos..... | vi |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. MATERIALES Y METODOS..... | 3 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 9 |
| 4. CONCLUSIONES..... | 14 |
| 5. RECOMENDACIONES..... | 15 |
| 6. LITERATURA CITADA..... | 16 |
| 7. ANEXOS..... | 18 |

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

| Cuadros | Página |
|---|--------|
| 1. Ingredientes del medio modificado de Luria Bertani, en cantidades para la preparación de 800 ml de medio de cultivo, laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 3 |
| 2. Ingredientes del medio de cultivo 3s, utilizado en el proceso de fermentación, para la preparación de 800 ml de medio de cultivo, laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 4 |
| 3. Solventes utilizados para la extracción de metabolitos secundarios de <i>Bacillus subtilis</i> , laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 5 |
| 4. Tratamientos utilizados en la evaluación del extracto de metabolitos Secundarios de las dos cepas de <i>Bacillus subtilis</i> contra el hongo fitopatógeno <i>Fusarium</i> spp., laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 7 |
| 5. Análisis de Varianza (ANDEVA), laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 9 |
| 6. Efecto de metabolitos secundarios de dos cepas de <i>Bacillus subtilis</i> sobre El porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 10 |
| 7. Efecto de cuatro solventes utilizados para la extracción de metabolitos secundarios de <i>Bacillus subtilis</i> sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Fusarium</i> spp., laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 10 |
| 8. Efecto de cuatro tiempos utilizados para la extracción de metabolitos secundarios de <i>Bacillus subtilis</i> sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Fusarium</i> spp., laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 11 |
| 9. Efecto de la interacción cepa, solvente y tiempo de los nueve mejores tratamientos usados para la extracción de metabolitos secundarios de dos cepas de <i>Bacillus subtilis</i> sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Fusarium</i> spp., laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 13 |

| Figuras | Página |
|---|--------|
| 1. Escala 0.5 de Mc Farland utilizada como patrón para determinar la concentración inicial del inóculo de <i>Bacillus subtilis</i> , laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 4 |
| 2. Diagrama de plato petri utilizando el método de extensión por superficie de placa, en la evaluación de inhibición de crecimiento del aislado de metabolitos secundarios de <i>Bacillus subtilis</i> frente a <i>Fusarium</i> spp., laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 7 |
| 3. Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium</i> spp. causado por metabolitos secundarios de dos cepas de <i>Bacillus subtilis</i> , Según cepa y tiempo de fermentado, laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 12 |

| Anexos | Página |
|--|--------|
| 1. Efecto la interacción cepa, solvente y tiempo para la extracción de metabolitos secundarios de dos cepas de <i>Bacillus subtilis</i> sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Fusarium</i> sp., laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 18 |
| 2. Tratamientos que obtuvieron los mejores porcentajes de inhibición de crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. Comparados con el testigo de <i>Fusarium</i> spp. donde no se aplicó ningún tratamiento, laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano..... | 19 |

1. INTRODUCCIÓN

La investigación consistió en la obtención y evaluación *in vitro* de metabolitos secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis* con la finalidad de evaluarlos contra el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp.

El estudio de alternativas de menor riesgo para el hombre y el medio ambiente, son importantes para ejercer un control sobre organismos fitopatógenos tanto en el suelo como en la parte vegetativa de las plantas. El uso de microorganismos productores de sustancias fisiológicamente activas comienza a ser en nuestros días una alternativa eficaz en el control de patógenos de plantas, pues como ya es conocimiento para todos, los pesticidas químicos usados convencionalmente en la agricultura han quedado en desventaja como consecuencia de los serios problemas ambientales y el daño que representan estos para la salud del hombre. Han reducido la biodiversidad (microorganismos) del agroecosistema, ocasionando la inestabilidad de los mismos, reflejándose en una mayor incidencia y severidad de las enfermedades de las plantas según menciona Báez *et al.* (2010). Los productos biológicos pueden ejercer una protección efectiva de las plántulas; siendo una herramienta importante en aquellos lugares donde el uso excesivo de químicos ha creado resistencia de los organismos patógenos. Por lo anterior los polipéptidos producidos por *Bacillus subtilis* son sustancias naturales y por lo tanto biodegradables sin tener efectos residuales o contaminantes en los cultivos (Khem y Samsber 2015).

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva, aeróbica, que se encuentra comúnmente en la rizósfera del suelo. Pertenece a la familia *Bacillaceae*, género: *Bacillus*, especie *subtilis*. Esta bacteria tiene la capacidad de producir lipopéptidos y metabolitos secundarios que poseen un amplio espectro antifúngico frente a diversos hongos fitopatógenos. La acción biocontroladora de *Bacillus subtilis* esta mediada por la producción de polipéptidos capaces de actuar sobre microorganismos mediante antibiosis. Los polipéptidos que produce y que tienen esta acción son variados y representan un grupo no muy heterogéneo entre sí de metabolitos activos que afectan directamente a hongos fitopatógenos, entre los polipéptidos producidos por *Bacillus subtilis* se destacan la surfactina y la Iturina A (Stein 2005). Uno de los hongos fitopatógenos es *Fusarium* spp. el cual es un organismo patógeno causante de la enfermedad conocida por diferentes nombres como por ejemplo: marchitez vascular, pudrición seca o fusariosis, la cual ocasiona la muerte de la planta por marchitamiento y que está asociada a la obstrucción de los haces vasculares, amarillamiento foliar, defoliación y pudrición radicular (Gonzales *et al.* 2002).

La actividad antimicrobiana de los lipopéptidos se da por la interacción con la membrana de las células del patógeno, en la cual se modifica la permeabilidad y la composición de los lípidos de la membrana, con la formación poros conductores de iones en la bicapa lipídica de la membrana y por lo tanto deforma la estructura de la membrana por modificación de

las vesículas de fosfolípidos de esta forma inhiben el crecimiento del micelio y el desarrollo de los hongos (Aranda *et al.* 2005, Gong *et al.* 2006).

La producción de Lipopéptidos puede ser inducida por señales moleculares. La producción está relacionada con el incremento de la densidad celular. La cantidad liberada de los polipéptidos por célula depende del sustrato utilizado y su disponibilidad, las condiciones ambientales y la fase de crecimiento del microorganismo que normalmente ocurre en la fase estacionaria (Ron y Rosemberg 2002 y Gu *et al.* 2005). Algunos de los medios más utilizados en la producción se mencionan la glucosa, sacarosa, extractos de levadura y carne, peptonas, nitrato de amonio con la finalidad de proporcionar fuentes de carbono y nitrógeno, así como la adición de algunas sales como por ejemplo calcio (Bernal *et al.* 2002) y cloruro de hierro (Yan *et al.* 2003). Con respecto a las condiciones de temperatura, Ohno *et al.* (1995) informan de que existe una relación estrecha entre la temperatura y la producción de polipéptidos, siendo 25°C la temperatura adecuada para iturina A y 37°C para surfactina. Adicional a esto la producción de polipéptidos está estrechamente relacionada con la esporulación de la bacteria, dado que ambos procesos son controlados por represión catabólica (Errington 2003 y Stein 2005).

La síntesis de lipopéptidos la realizan péptidosintetasas no ribosomales que fijan los aminoácidos, los activan en forma de tíoésteres y los enlazan entre sí para formar la cadena peptídica. Estas enzimas son modulares, cada módulo reconoce un aminoácido concreto, a su vez cada módulo está constituido por varios dominios que catalizan cada una de las reacciones sucesivas necesarias. La secuencia del polipéptido está determinada por el orden en que están dispuestos los módulos. Los aminoácidos se mantienen unidos a los módulos por un grupo tiol de estos (Duitman *et al.* 1999)

Algunas empresas han generado productos utilizando diferentes cepas de *Bacillus subtilis* principalmente por capacidad de producir polipéptidos de interés para el control de hongos fitopatógenos. Por ejemplo Serenade® y BAKTILLIS® siendo fungicidas biológicos a base de metabolitos, polipéptidos y esporas de *Bacillus subtilis* que tiene la capacidad de inhibir la germinación y el crecimiento de hongos fitopatógenos. Este puede emplearse en cualquier etapa del cultivo. Normalmente son usados para el tratamiento de semillas, tubérculos, rizomas, plántulas en charola, semilleros y almácigos. Estos pueden aplicarse a través de los sistemas de riego o en la base de las plantas en *drench*, de preferencia desde su establecimiento (Biokrone 2015).

Como objetivos se planteó evaluar la eficacia de cuatro solventes para la extracción de metabolitos secundarios producidos por dos cepas de *Bacillus subtilis* (Zamorano, QST 713) sobre la inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp., además determinar el tiempo de fermentado adecuado para realizar la extracción de metabolitos secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis* (Zamorano, QST 713) sobre la inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en el laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicado a 30 km de la carretera que conduce de Tegucigalpa a Danlí, Honduras.

El ensayo consistió en la extracción de metabolitos secundarios a partir de dos cepas de la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis*, utilizando cuatro solventes para su extracción (metanol, etanol, ácido fórmico y agua destilada estéril), posteriormente los aislados obtenidos fueron evaluados *in vitro* contra *Fusarium* spp. para determinar su capacidad antifúngica.

Obtención del precultivo de las cepas de *Bacillus subtilis*.

Las cepas utilizadas fueron la cepa Zamorano con la que cuenta el laboratorio de control biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, y la QST 713 proveniente de una casa comercial, estas fueron sembradas inicialmente en medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa), dejándose en incubación durante tres días a una temperatura de 30°C, con la finalidad de obtener el desarrollo bacteriano, para ser utilizadas en la preparación del precultivo. Transcurrido el tiempo de incubación de las cepas, éstas fueron inoculadas en el medio de cultivo líquido modificado Luria Bertani, (cuadro 1). Se prepararon 50 ml del medio de cultivo para cada bacteria, usando un asa bacteriológica se procedió a realizar un raspado de la biopelícula producida por la bacteria en el plato petri con medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa), usando un asa para cada inóculo. Posteriormente se incubó durante 24 horas a 30°C y 180 rpm utilizando un agitador orbital Thermo Scientific modelo 4314.

Cuadro 1. Ingredientes del medio modificado de Luria Bertani en cantidades para la preparación de 800 ml de medio de cultivo, laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

| Ingrediente | Gramos |
|------------------------|---------------|
| Peptona bacteriológica | 8 |
| Extracto de carne | 8 |
| Extracto de levadura | 4 |
| NaCl | 4 |

Fermentación líquida de *Bacillus subtilis*.

Para la fermentación líquida, se utilizaron cuatro matraces Erlenmeyer con capacidad de 1,000 ml, teniendo un volumen efectivo de 200 ml por cada Erlenmeyer. La concentración de *Bacillus subtilis* fue de 1.5×10^8 UFC (unidades formadoras de colonia) por cada 100 ml de medio de cultivo modificado 3s, (cuadro 2). La concentración se ajustó tomando como referencia el patrón 0.5 según la escala de Mc Farland, (Figura 1). Estos se inocularon en 400 ml del medio de cultivo modificado 3s para cada cepa de la bacteria, dividiéndose esta en dos Erlenmeyer para cada cepa (200 ml por cada Erlenmeyer). Se dejó en agitación constante durante 24 horas a 25° y 150 rpm; durante las cuales a las 12, 16, 20 y 24 horas se procedió a tomar 25 ml de la solución para realizar la extracción de los metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis*.

Cuadro 2. Ingredientes del medio de cultivo 3s utilizado en el proceso de fermentación, para la preparación de 800 ml de medio de cultivo, laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

| Ingrediente | Gramos |
|--------------------------|--------|
| Peptona bacteriológica | 12 |
| Extracto de carne | 12 |
| Glucosa | 8 |
| KH_2PO_4 | 0.8 |
| MgSO_4 | 0.4 |

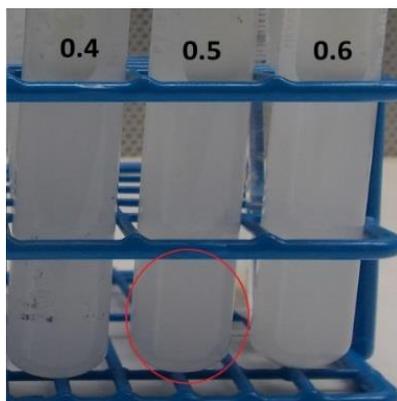


Figura 1. Escala 0.5 de Mc Farland utilizada como patrón para determinar la concentración inicial del inóculo de *Bacillus subtilis*, laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Extracción de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis*.

Para la extracción de los metabolitos secundarios se utilizó el protocolo descrito por Miizumoto *et al.* (2006), al cual se realizaron algunas adaptaciones en el laboratorio de fitopatología de Zamorano. Se utilizaron cuatro solventes (metanol, etanol, ácido fórmico y agua destilada estéril) adicionando 11.5 ml del solvente en 25 ml de la solución en fermentación por cada cepa, para esto se utilizaron ocho Erlenmeyer con capacidad de 250 ml, dividiendo cuatro Erlenmeyer para cada cepa y uno por cada solvente, teniendo cada uno un volumen efectivo de 25 ml de la solución. La solución se dejó en agitación constante en el agitador orbital durante una hora a 150 rpm a una temperatura de 25°C. Luego fue depositado en un tubo cónico de polipropileno para centrifuga Fischerbrand™ (uno por cada Erlenmeyer) para ser centrifugado a 4,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, utilizando una centrifuga IEC HN-SII, la temperatura de 4°C se logró alcanzar colocando los tubos cónicos y los cilindros de la centrifuga a temperar en un congelador de una refrigeradora por 15 minutos. El sobrenadante se filtró utilizando un filtro Durapore® de 0.22 µm. El filtrado obtenido se almacenó en viales de borosilicato Fischerbrand™ con una capacidad de 20ml y se mantuvo a una temperatura de 6°C hasta su utilización en el bioensayo.

Determinación del solvente y tiempo de fermentado de *Bacillus subtilis* para la obtención de metabolitos secundarios.

Consistió en evaluar cuatro diferentes solventes (metanol al 100%, etanol al 95%, ácido fórmico al 1% y agua destilada estéril) para determinar cuál es más efectivo para extraer los metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* para ser evaluados como biocontroladores antifúngicos contra *Fusarium spp.*, (Cuadro 3). Los tiempos de fermentado de *Bacillus subtilis* a evaluar fueron a las 12, 16, 20 y 24 horas después de haber iniciado la fermentación, tomándose como hora cero el inicio de la agitación en el agitador orbital.

Cuadro 3. Solventes utilizados para la extracción de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis*, laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

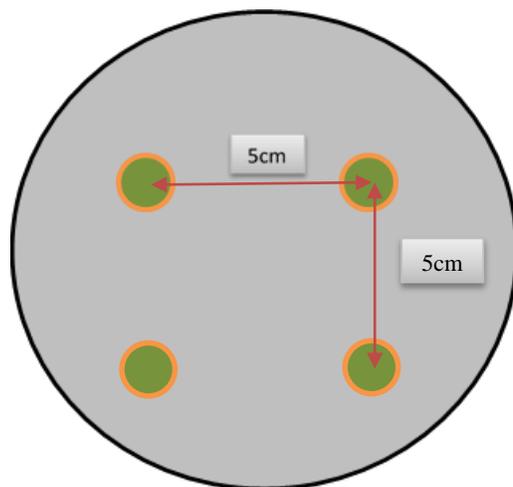
| Solvente | ml / 25 ml del medio en fermentación 3s |
|-------------------------|--|
| Metanol 100% | 11.5 |
| Etanol 95% | 11.5 |
| Acido Fórmico 1% | 11.5 |
| Aguas destilada estéril | 11.5 |

Obtención del hongo fitopatógeno *Fusarium* spp.

Para la obtención del hongo fitopatógeno, se partió de una placa madre obtenida del laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, de esta se usó dos fragmento de un centímetro de diámetro del patógeno *Fusarium* spp. por cada placa petri, en total se tomaron 10 segmentos, que fueron reproducidos en medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa), incubados a 28°C y una humedad relativa de 75% durante siete días.

Determinación del porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. con el uso del aislado de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis*.

Para realizar las pruebas de inhibición de crecimiento sobre *Fusarium* spp. se utilizó el método de extensión por superficie de placa Folman *et al* (2004). El que consistió en preparar un medio de cultivo Mueller Hinton, en una proporción de 38 gramos de medio de cultivo en un litro de agua destilada estéril, posteriormente se calentó en agitación constante y se dejó hervir por un minuto, luego se dejó enfriar para posteriormente ser vertido a las placas petri de poliestireno Fischerbrand™ con dimensiones de 100 mm de diámetro por 15 mm de altura. Con una micropipeta Eppendorf Research® se depositaron 200 µl del aislado de metabolitos secundarios por cada plato petri que contenía 25 ml del medio de cultivo Mueller Hinton, luego con un aza de siembra se distribuyeron uniformemente sobre toda la superficie de la placa. Usando el orificio inicial de una punta de micropipeta de un mililitro de capacidad como sacabocado se cortaron y depositaron fragmentos con 10 mm de diámetro de *Fusarium* spp. con siete días de crecimiento, distribuidos en cuatro puntos de la placa petri a una misma distancia de cinco centímetros de centro a centro del fragmento de *Fusarium* spp., (figura 2). Se utilizó un control negativo por cada hora de extracción de metabolitos (12, 16, 20 y 24 horas) en el cual se realizó el mismo procedimiento usando solamente agua destilada estéril, (Cuadro 4.) Estos platos petri fueron incubados a 28°C y a una humedad relativa de 75% durante siete días en una incubadora Precisión®, modelo 4E6.



 = Fragmentos de 10 mm de diámetro de *Fusarium* spp. sobre la superficie impregnada con el aislado de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis*.

Figura 2. Diagrama de plato petri utilizando el método de extensión por superficie de placa, en la evaluación de inhibición de crecimiento del aislado de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* frente a *Fusarium* spp., laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Cuadro 4. Tratamientos utilizados en la evaluación del extracto de metabolitos secundarios de las dos cepas de *Bacillus subtilis* contra el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp., laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

| Cepa | Solvente | 12 horas | 16 horas | 20 horas | 24 horas |
|------------------|---------------|----------|----------|----------|----------|
| Zamorano | Metanol | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊕ |
| QST 713 | Metanol | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊕ |
| Zamorano | Etanol | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊕ |
| QST 713 | Etanol | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊕ |
| Zamorano | Ácido fórmico | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊕ |
| QST 713 | Ácido fórmico | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊕ |
| Zamorano | Agua | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊕ |
| QST 713 | Agua | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊕ |
| Control negativo | | Ω | Ω | Ω | Ω |

⊕ = Representa cuatro repeticiones por cada tratamiento.

Ω = Representa cuatro repeticiones para cada control negativo (testigo).

Evaluación del ensayo.

Las variables evaluadas fueron: determinar el mejor solvente, tiempo necesario de fermentado de *Bacillus subtilis* y porcentaje de inhibición de los metabolitos secundarios contra *Fusarium* spp.

Siete días de transcurrido la incubación de los platos petri se determinó que combinación entre cepa, solvente y tiempo de fermentado fue más efectiva en su capacidad inhibitoria de crecimiento contra *Fusarium* spp., esto se determinó utilizando la fórmula para obtener el porcentaje de inhibición de crecimiento producido por el aislado de los metabolitos secundarios, ecuaciones [1] y [2] (Tequida *et al.* 2002). Para esto con una regla graduada milimétricamente se realizaron las mediciones del diámetro de crecimiento de *Fusarium* spp., se tomaron dos medidas por repetición, tomando como patrón una medición horizontal y una vertical sobre la colonia del hongo para determinar el promedio de crecimiento (diámetro), para obtener el diámetro absoluto se ajustó restándole al obtenido el diámetro del segmento inicial de *Fusarium* spp. que se colocó al momento de la siembra que fue de 10 mm.

$$\text{Porcentaje de crecimiento} = \left(\frac{D1}{D2} \right) \times 100 \quad [1]$$

Dónde:

D1 = Diámetro ajustado de *Fusarium* spp. testigo el cual solo fue aplicado con agua destilada estéril (control negativo).

D2 = Diámetro ajustado de *Fusarium* spp. donde fue aplicado con el extracto de los metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis*.

Con el resultado obtenido del porcentaje de crecimiento de *Fusarium* spp. tenemos:

$$\text{Porcentaje de inhibición de crecimiento} = (100 - \text{porcentaje de crecimiento}) \quad [2]$$

Diseño experimental.

En el ensayo de obtención y evaluación de metabolitos secundarios de las dos cepas de *Bacillus subtilis* contra *Fusarium* spp. se utilizó un diseño completo al azar (DCA) con un arreglo factorial de (2 × 4 × 4) siendo dos cepas, cuatro solventes y cuatro tiempos, con cuatro repeticiones por tratamiento (siendo cada segmento de *Fusarium* spp. una repetición); además se utilizó un control negativo por cada hora de extracción, el cual consistió en realizar el mismo procedimiento utilizando el método de extensión por superficie de placa, pero sustituyendo el extracto de metabolitos por agua destilada estéril, para obtener un total de 144 unidades experimentales (siendo cada segmento de *Fusarium* spp. una unidad experimental).

Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados usando un Modelo Lineal General (GLM) con una separación de medias DUNCAN para las variables cepa, solvente, tiempo con una probabilidad (P<0.05) y una separación de medias LSMEANS para evaluar la interacción entre los factores (cepa, solvente y tiempo), con una probabilidad (P < 0.05) utilizando el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS® versión 9.1).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de varianza ANDEVA.

Al realizar la separación de medias DUNCAN para las tres variables cepa, solvente y tiempo se encontró que existe diferencias para cada una de las mismas con una alta significancia ($P < 0.0001$). De igual forma al realizar la separación de medias LSMEANS se determinó que existe interacción entre los factores con una alta significancia ($P < 0.0001$), (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de Varianza (ANDEVA), laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

| fuelle | Valor- F |
|--|------------|
| Cepa | < 0.0001 |
| Solvente | < 0.0001 |
| Tiempo | < 0.0001 |
| Cepa \times Solvente \times Tiempo | < 0.0001 |
| R-Cuadrado = 0.87 | |
| Coeficiente de variación = 22.07 | |

Comparación entre las cepas de *Bacillus subtilis* Zamorano y QST 713.

Comparando las medias obtenidas del porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. por cada cepa en el ensayo y realizando la separación de medias DUNCAN se encontró diferencia significativa entre las dos cepas con una probabilidad ($P < 0.05$), siendo la cepa Zamorano la que resulto un 16% más efectiva en el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. (cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de metabolitos secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis* sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp., laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

| Cepa de <i>Bacillus subtilis</i> | Inhibición de crecimiento |
|----------------------------------|---------------------------|
| Zamorano | 60 a [£] |
| QST 713 | 44 b |

[£] = Medias con letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes según la separación de medias de la prueba DUNCAN (P≤0.05).

Comparación entre los solventes utilizados para obtener el extracto de metabolitos secundarios de las dos cepas de *Bacillus subtilis* (Zamorano y QST 713).

Al evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. por cada solvente utilizado para la extracción de metabolitos secundarios en el ensayo (metanol, etanol, ácido fórmico y agua destilada estéril) se encontró diferencia significativa entre los cuatro solventes, siendo el mejor solvente para extraer los metabolitos secundarios de las cepas de *Bacillus subtilis* el agua destilada estéril, con una probabilidad (P<0.05), (cuadro 7). los solventes orgánicos pudieron haber realizado una leve modificación en la estructura de los polipéptidos¹, lo que causa en una reducción de la capacidad antifúngica por parte del metabolito (Bonmatin *et al.* 2003)

Cuadro 7. Efecto de cuatro solventes utilizados para la extracción de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp., laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

| Solvente | Inhibición de crecimiento |
|---------------------------|---------------------------|
| Agua | 74 a [£] |
| Ácido Fórmico | 62 b |
| Metanol | 41 c |
| Etanol | 33 d |
| Probabilidad | < 0.0001 |
| Coefficiente de variación | 22.07 |

[£] = Medias con letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes según la separación de medias de la prueba DUNCAN (P≤0.05).

¹ Bouilly L. 2015. Comportamiento de solventes orgánicos. Ph.D. Profesor asociado Química E.A.P. Zamorano. Comunicación personal. lbouilly@zamorano.edu

Efecto del tiempo de fermentación de *Bacillus subtilis* sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp.

Al evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. por cada tiempo de fermentación utilizado para la extracción de metabolitos secundarios en el ensayo, se encontró diferencia significativa entre los cuatro tiempos, siendo el mejor tiempo para extraer los metabolitos secundarios de las cepas de *Bacillus subtilis* a las 24 horas de fermentación de la bacteria, con una probabilidad ($P < 0.05$), (cuadro 8). Según Gu *et al.* (2004) la producción de metabolitos secundarios está relacionado con la cantidad y calidad del medio de cultivo en el cual se desarrolla, es decir que el medio de cultivo tiene que ser rico en nutrientes principalmente en carbono y nitrógeno. Normalmente la producción de los metabolitos secundarios se presenta en la fase estacionaria que se da entre las 10 y 12 horas de haber iniciado la fermentación, lo cual coincide con el primer pico de producción de metabolitos secundarios en este ensayo para ambas cepas. Pasada esta fase hay una segunda fase la cual se le denomina declive, en la cual hay una reducción en la división celular y permanecen casi inactivas, además en esta fase se produce muerte celular de la bacteria. puede existir una reactivación celular ocasionada porque las células que mueren dejan a la disposición los nutrientes², cabe destacar de que esta reactivación no es en gran escala debido a que ya hay una limitación de nutrientes en el medio. Normalmente la bacteria al encontrarse en situaciones de falta de nutrientes y oxígeno en el medio, inicia un proceso de esporulación como forma de defensa, generando endosporas. la producción de metabolitos secundarios está estrechamente relacionada con la esporulación, coincidiendo de esta manera en el segundo y mayor pico de producción de metabolitos secundarios, coincidiendo en ambas cepas de la bacteria dada a la acumulación de metabolitos generada por este proceso (figura 3), (Katz y Demain 1977, Errington 2003 y Stein 2005)

Cuadro 8. Efecto de cuatro tiempos utilizados para la extracción de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp., laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

| Tiempo en horas | Inhibición de crecimiento |
|---------------------------|---------------------------|
| 24 | 73 a [‡] |
| 12 | 57 b |
| 20 | 45 c |
| 16 | 35 d |
| Probabilidad | < 0.0001 |
| Coefficiente de variación | 22.07 |

[‡] = Medias con distinta letra son significativamente diferentes según la separación de medias de la prueba DUNCAN ($P < 0.05$).

² Aguilar, E. 2015. Cinética de crecimiento bacteriano. M.Sc. Profesora en microbiología E.A.P. Zamorano. Comunicación personal. eaguilar@zamorano.edu

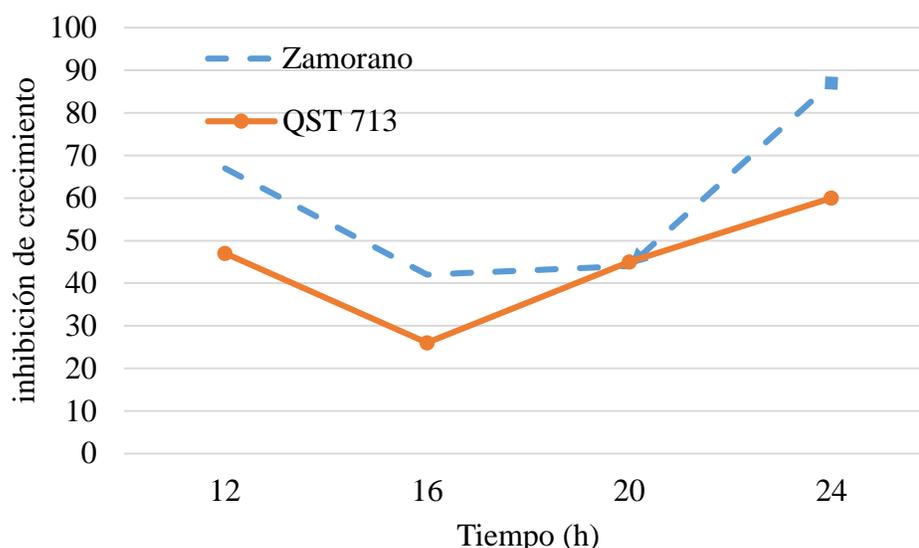


Figura 3. Porcentaje de inhibición de *Fusarium* spp. causado por metabolitos secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis*, Según cepa y tiempo de fermentado, laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Determinación de cepa, solvente y tiempo para la extracción de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp.

Al evaluar la interacción entre las dos cepas de *Bacillus subtilis* más el solvente utilizado y el tiempo en fermentación de la bacteria, se tomó como porcentaje mínimo de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. un 75%. Los mejores resultados sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. se obtuvieron utilizando la combinación entre la cepa Zamorano más agua, cepa Zamorano más ácido fórmico y la cepa QST 713 más agua, los tres con 24 horas de fermentación de la bacteria (cuadro 9). Estos son estadísticamente diferentes a los tratamientos donde se utilizó la cepa Zamorano mas metanol con 24 horas de fermentación, cepa zamorano mas ácido fórmico con 12 horas de fermentación, cepa QST 713 mas ácido fórmico con 12 horas de fermentación y la cepa Zamorano mas etanol con 24 horas de fermentación. A pesar de que la cepa Zamorano con agua y ácido fórmico y la cepa QST 713 mas agua todos con 24 horas de fermentación obtuvieron los porcentajes de inhibición más altos, estos no difieren estadísticamente de los tratamientos utilizando la cepa Zamorano mas agua y la cepa QST 713 ambas con 12 horas de fermentación. Los datos obtenidos son relacionados con los encontrados por Ariza y Sánchez (2012) los cuales encontraron porcentajes de inhibición entre 70% y 93% utilizando Iturina A como metabolito secundario de *Bacillus subtilis* contra *Fusarium* spp. además otros autores encontraron diferentes porcentajes de inhibición dentro de los cuales están Toure *et al* (2004) que encontraron porcentajes de inhibición de 63% y 58% para *Fusarium graminearum* y *Fusarium oxysporum* respetivamente, además fueron evaluados contra *Phythium ultimum* obteniendo 45% y *Rhizoctonia solani* de 56% de inhibición.

Cuadro 9. Efecto de la interacción cepa, solvente y tiempo de los nueve mejores tratamientos usados para la extracción de metabolitos secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis* sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp., laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

| Cepa de <i>Bacillus subtilis</i> | Solvente | Tiempo (h) | Inhibición de crecimiento |
|----------------------------------|---------------|------------|---------------------------|
| Zamorano | Agua | 24 | 99 a [‡] |
| QST 713 | Agua | 24 | 94 a |
| Zamorano | Ácido Fórmico | 24 | 94 a |
| QST 713 | Agua | 12 | 84 a b c |
| Zamorano | Agua | 12 | 83 a b c |
| Zamorano | Metanol | 24 | 78 b c d |
| Zamorano | Ácido Fórmico | 12 | 77 b c d |
| QST 713 | Ácido Fórmico | 12 | 76 b c d e |
| Zamorano | Etanol | 24 | 75 c d e |
| Probabilidad | | | < 0.0001 |
| Coeficiente de variación | | | 22.07% |

[‡] = Medias con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente según la separación de medias de la prueba LSMEANS ($P \leq 0.05$).

4. CONCLUSIONES

- El solvente adecuado para realizar la extracción de metabolitos secundarios de las dos cepas de *Bacillus subtilis* (Zamorano, QST 713) es el agua destilada estéril.
- El tiempo que resultó ser adecuado para extraer los metabolitos secundarios de las dos cepas de *Bacillus subtilis* (Zamorano, QST 713) fue utilizando 24 horas de fermentación de la bacteria.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar una cromatografía de alta resolución (HPLC) a los extractos obtenidos, para determinar el polipéptido y a que concentración se encuentra presente.
- Evaluar los aislados de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* contra otros hongos fitopatógenos de importancia económica.
- Evaluar otras fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis*.
- Seguir con esta línea de investigación con la finalidad de obtener un producto formulado a base de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* que genere soluciones a la problemática en la agricultura ocasionada por hongos fitopatógenos

6. LITERATURA CITADA

Aranda F., J. Teruel y A. Ortíz. 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta* 1713: p. 51–56.

Ariza, Y. y L. Sánchez. 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus Subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* spp. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, D.C. Colombia. *Nova*. 10: p. 150 – 154.

Báez, E., F. Carrillo, M. Báez, R. García, J. Valdez y R. Contreras. 2010. Uso de portainjertos resistentes para el control de la Fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen raza 3) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en condiciones de malla sombra. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:111-123.

Bernal, G., A. Illanes y L. Ciampi. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. With antibiotic activity against plant pathogenesis agents. *Electron. J. Biotechnol.* 5: p. 1-19.

Biokrone. Producción de Baktillis, fungicida biológico a base de metabolitos secundarios y esporas de *Bacillus subtilis*. Consultado en internet 07 de noviembre de 2015. <http://www.biokrone.com/baktillis.php>

Bonmatin, J., O. Laprévotte y F. Peypoux. 2003. Diversity Among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and Surfactins. Activity-Structure Relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screening.*, 6: p. 541-556.

Duitman, E., W. Leender, M. Rembold, G. Venema, H. Seitz, W. Saenger, F. Bernhard, R. Reinhardt, M. Schmidt, C. Ullrich, T. Stein, F. Leenders y J. Vater. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96,13294-13299.

Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 1,117-126.

Folman, L., M. Klein, J., Postma y J. Van. 2004. Production of antifungal compounds by *Lycobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Phytophthora aphanidermatum* in cucumbers *Biological Control*, 31: p. 145-154.

Gong M., J. Wang y J. Zhang. 2006. Study of the Antifungal Ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 in Vitro and Identification of its Antifungal Substance (Iturin A). *Biochimica et Biophysica Sinica*. 38 (4): p. 233–240.

Gonzalez, M., I. Torres y H. Guzman. 2002. Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de Chile. Proceedings of the 16th Internacional Pepper Conference. Tampico y Tamaulipas, Mexico.

Gu, X., Z., Zheng, H. Yu, J. Wang, F. Liang y R. Liu. 2005. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. *Process Biochem*. 40: 3196 – 3201.

Katz, E. y A. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.*, 41: p. 449-474.

Khem R. y S. Samsher 2015. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents. Application in food safety therapeutic. *Biomedical Research International*. ID. 473050: 9 p.

Miizumoto, S., M. Hirai y M. Shoda. 2006. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnology*. 72: p. 869 – 875.

Ohno, A., E. Anot. y M. Shoda. 1995. Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. *J ferment. bioeng.*, 80, 517-519.

Ron Z. y E. Rosenberg. 2002. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* 3 (4): p. 229-236.

Stein, T. 2005. Micro Review *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.*, 56: p. 845–857.

Tequida, M., M. Cortez, E. Rosas y S. Corrales. 2002. “Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*”. *Rev. Iberoam Micol.*, 19: p. 84-88.

Touré, Y., M. Ongena, P. Jacques, A. Guiró y P. Thonart. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol.*, 96: p. 1151-1160.

Yan, L., K. Boyd, D. Adams, y J. Burgess. 2003. Biofilm-specific cross species induction of antimicrobial compounds in bacilli. *Appl Environ Microbiol*. 69: p. 3719–3727.

7. ANEXOS

Anexo 1. Efecto la interacción cepa, solvente y tiempo para la extracción de metabolitos secundarios de dos cepas de *Bacillus subtilis* sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Fusarium* sp., laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

| Cepa de <i>Bacillus subtilis</i> | Solvente | Tiempo (h) | Inhibición de crecimiento |
|----------------------------------|---------------|------------|---------------------------|
| Zamorano | Agua | 24 | 99 a £ |
| QST 713 | Agua | 24 | 95 a |
| Zamorano | Ácido Fórmico | 24 | 94 a b |
| QST 713 | Agua | 12 | 84 a b c |
| Zamorano | Agua | 12 | 83 a b c |
| Zamorano | Metanol | 24 | 78 b c d |
| Zamorano | Ácido Fórmico | 12 | 77 b c d |
| QST 713 | Ácido Fórmico | 12 | 76 b c d e |
| Zamorano | Etanol | 24 | 75 c d e |
| QST 713 | Agua | 20 | 69 c d e f |
| Zamorano | Agua | 20 | 65 d e f g |
| Zamorano | Etanol | 12 | 64 e f g h |
| Zamorano | Ácido Fórmico | 20 | 58 f g h |
| QST 713 | Metanol | 24 | 53 g h i |
| Zamorano | Metanol | 16 | 52 g h i |
| QST 713 | Ácido Fórmico | 20 | 52 g h i |
| QST 713 | Ácido Fórmico | 24 | 51 g h i |
| QST 713 | Agua | 16 | 49 g h i |
| Zamorano | Metanol | 12 | 49 g h i |
| Zamorano | Agua | 16 | 48 h i |
| Zamorano | Ácido Fórmico | 16 | 46 h i |
| Zamorano | Ácido Fórmico | 16 | 41 i |
| Zamorano | Etanol | 24 | 40 i j |
| Zamorano | Metanol | 20 | 38 i j k |
| Zamorano | Metanol | 20 | 38 i j k |
| Zamorano | Etanol | 16 | 25 j k l |
| QST 713 | Etanol | 20 | 22 k l |
| Zamorano | Etanol | 20 | 17 l m |
| QST 713 | Etanol | 12 | 13 l m |
| QST 713 | Metanol | 12 | 13 l m |
| QST 713 | Etanol | 16 | 10 l m |
| QST 713 | Metanol | 16 | 4 m |
| Probabilidad | | | < 0.0001 |
| Coefficiente de variación | | | 22.07 |

£= Medias con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente según la separación de medias de la prueba LSMEANS ($P \leq 0.05$).

Anexo 2. Tratamientos que obtuvieron los mejores porcentajes de inhibición de crecimiento de *Fusarium* spp. Comparados con el testigo de *Fusarium* spp. Donde no se aplicó ningún tratamiento, laboratorio de fitopatología Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.



Testigo



Ceba Zamorano + Agua con 24 horas



Testigo



Ceba QST 713 + Agua con 24 horas



Testigo



Ceba Zamorano + Ácido fórmico con 24 horas