

## Actividad de cepas de bacterias quitinolíticas antagonistas a *Alternaria solani* *in vitro*

Shuichi Okumoto\*  
Elkin Bustamante\*\*  
Arturo Gamboa\*\*

**RESUMEN.** Se evaluó *in vitro* la actividad quitinolítica de dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* y 14 cepas de *Bacillus* sp. antagonistas a *Alternaria solani*. Los medios de cultivo utilizados fueron agar+quitina y agar nutriente + quitina. El crecimiento de las colonias en los medios fue variable, pero la mayoría de ellas alcanzaron mayor desarrollo en agar nutriente + quitina debido al uso de la otra fuente nutricional. Se determinó una correlación significativa entre el crecimiento de la colonia y la transparencia en el medio agar + quitina, mientras que para el medio agar nutriente+ quitina no se encontró relación entre la actividad quitinolítica y el crecimiento de la colonia en presencia de otra fuente de crecimiento. Las cepas Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, A30 y A31 de *Bacillus* sp. produjeron mayor quitinasa que las demás cepas, por lo cual pueden ser consideradas para la evaluación *in vivo*.

**Palabras clave:** *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Alternaria solani*, Control biológico, Bacterias quitinolíticas.

**ABSTRACT.** Activity of chitinolytic bacterial strains antagonistic to *Alternaria solani* *in vitro*. The chitinolytic activity of two strains of *Pseudomonas fluorescens* and 14 strains of *Bacillus* sp., antagonists of *A. solani*, were evaluated *in vitro*. The culture mediums utilised were agar + chitin and nutrient agar + chitin. The growth of the colonies on the mediums was variable, but the highest of these reached greatest development on nutrient agar + chitin due to use of the other nutrient source. A significant correlation was determined between growth of colony and transparency of the agar medium + chitin, whilst for the nutrient agar medium + chitin no relation was found between chitinolytic activity and colony growth in the presence of the other source of growth. The strains Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, A30 and A31 of *Bacillus* produce more chitinase than the other strains and therefore may be considered for evaluation *in vivo*.

**Key words:** *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Alternaria solani*, Biological control, Chitinolytic bacteria.

### Introducción

La lisis de microorganismos ha sido atribuida por varios investigadores a la acción de antibióticos, enzimas, aminoácidos y fagos (Carter y Lockwood 1957, Sohler *et al.* 1958, Whinberg y Pilgren 1958, Welshimer 1951, citados por Morgan 1963).

En la interacción antagónica entre las poblaciones de microorganismos en el ambiente natural, la lisis producida por enzimas es uno de los mecanismos más comunes. Una especie puede eliminar a otra debido a la digestión de la célula o hifa por parte de las enzimas producidas por ésta.

Mitchell y Alexander (1963), citado por Skujins *et al.* (1965) observaron que todas las bacterias micolíticas producían quitinasa, lo cual podía degradar la pared celular del hongo que contenía quitina, como uno de sus principales componentes.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la actividad quitinolítica de diferentes cepas de bacterias antagonistas de *Alternaria solani* para seleccionar las mejores.

### Materiales y métodos

El trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología

Recibido:02/06/97. Aprobado:23/02/2001.

\* CATIE. Area de Fitoprotección. Dirección actual: Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda. Correo electrónico: sokumoto@earth.ac.cr

\*\* CATIE. Area de Fitoprotección. Turrialba, Costa Rica.

del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Turrialba, Costa Rica.

Se utilizaron 16 cepas de bacterias quitinolíticas (Cuadro 1), las cuales fueron aisladas entre enero y julio de 1992. El antagonismo fue evaluado siguiendo la metodología de Okumoto (1992) y Okumoto y Bustamante (1993).

**Cuadro 1.** Cepas de bacterias utilizadas en la prueba de actividad quitinolítica de acuerdo a su origen, fecha de recolección en 1992 y nivel de antagonismo.

Bacterias	Cepas			Antagonismo <sup>2</sup> (%)
	Código	Origen <sup>1</sup>	Fecha	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A6	T2	9-1	44,7
<i>P. fluorescentes</i>	A18	T8	9-1	60,2
<i>Bacillus</i> sp.	A27	T6	9 enero	90,8
	A28	T6	9 enero	91,8
	A29	T6	9 enero	83,2
	A30	T6	9 enero	85,7
	A31	T6	9 enero	90,1
	A32	T6	9 enero	79,2
	B57	T5	17 enero	36,7
	C6	T5	24 enero	45,7
	C8	T7	24 enero	32,9
	Q1	T5	17 julio	-3
Q2	T5	17 julio	-	
Q3	T5	17 julio	-	
Q4	T5	17 julio	-	
Q5	T5	17 julio	-	

1: Cepas aisladas de hojas con aplicaciones de fungicida: T2, Quitina: T5, Quitina+fungicida: T6, Quitina+leche: T7, Quitina+leche+fungicida: T8.

2: Porcentaje de inhibición sobre la longitud de tubo germinativo del testigo (Okumoto 1992).

3: No evaluado.

En el experimento se evaluó la actividad quitinolítica de las 16 cepas de bacterias en los dos medios de cultivo utilizados, agar+quitina y agar nutriente + quitina.

La suspensión bacteriana fue preparada de un cultivo desarrollado en el medio agar nutriente+quitina por 24 h a 30°C y ajustada a 10<sup>8</sup> células/ml, utilizando una cámara de conteo y colorímetro.

Se colocó 1 gota (0,03 ml) de la suspensión bacteriana en un orificio de 6 mm de diámetro previamente hecho con un sacabocado, en el centro de una caja de Petri conteniendo medio de cultivo.

Se midió el diámetro de la colonia y la zona transparente alrededor del orificio para calcular la superfi-

cie (mm<sup>2</sup>) de ambos. Las mediciones se hicieron 24 h después de la siembra, continuando las lecturas 2, 4, 6, 8 y 11 días después.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza, incluyendo las correspondientes pruebas para los efectos de los factores y de las interacciones.

Se estimó el coeficiente de correlación para conocer la relación entre el antagonismo y la actividad quitinolítica de las cepas evaluadas.

## Resultados y discusión

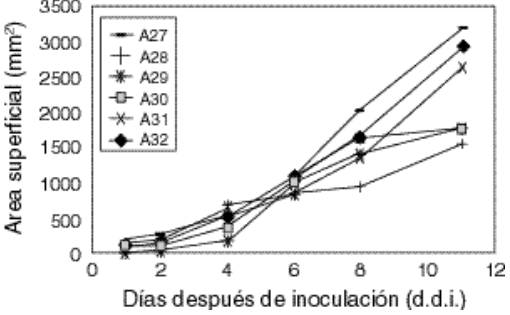
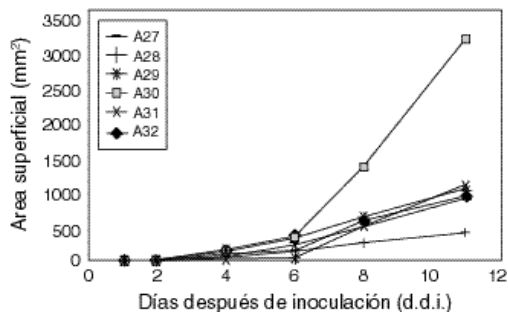
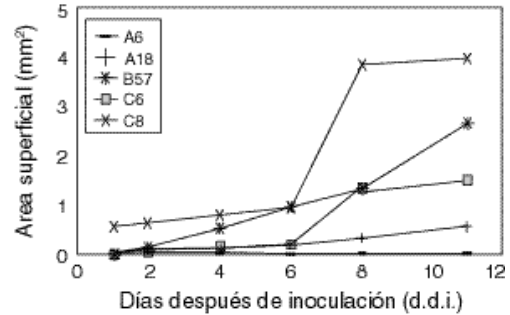
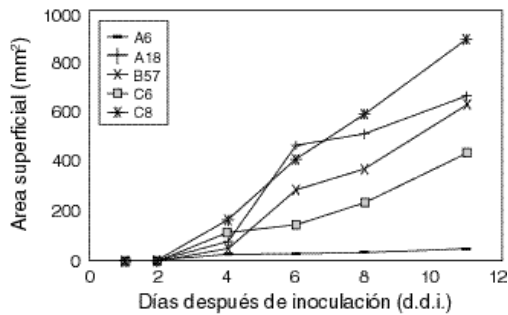
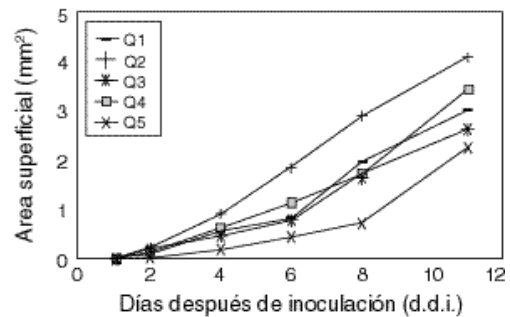
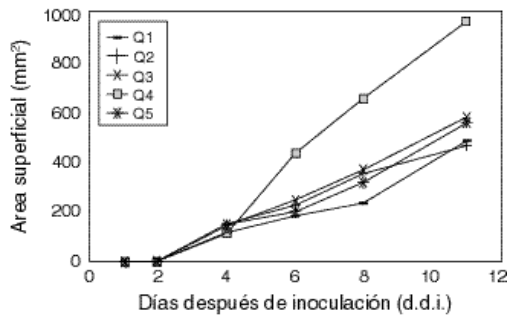
En el medio de agar nutriente+quitina, la mayoría de las cepas, excepto la A6, crecieron formando una colonia un día después de la inoculación (Fig. 2). En el caso de agar+quitina aparecen colonias dos días después de la inoculación, para la cepa A32. (Fig. 1).

El crecimiento de las colonias en los diferentes medios de cultivo fue variable, determinándose interacción altamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre los medios y las cepas evaluadas (Fig. 3, Cuadro 2 y 3). La mayoría de las colonias alcanzaron mayor desarrollo en el medio agar nutriente+quitina con respecto al agar +quitina, debido al uso de otra fuente de nutrición. Esto coincidió al estudio realizado por Okumoto (1992) que el medio de cultivo con agar+nutriente obtuvo mayor aislamiento y crecimiento de cepas de *Bacillus*. Sin embargo, las cepas A18 y A30 crecieron menos en agar nutriente+quitina que en el agar+quitina. Esto indica que estas dos cepas no podrían utilizar muy bien la otra fuente de nutrición en presencia de la quitina.

Las figuras 4 y 5 presentan el crecimiento de una zona transparente producida por las cepas evaluadas en el medio agar+quitina y agar nutriente+quitina, respectivamente. Se encontró una interacción altamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre los medios y las cepas bacterianas con respecto al área debajo de la curva de crecimiento de transparencia (ACCT) producida por las cepas bacterianas.

El valor del área debajo de la curva de crecimiento de la transparencia para cada cepa de las bacterias se muestra en la figura 6. Las cepas A6, A18 y C6 no produjeron transparencia a los 11 días después de la inoculación, las cuales fueron confirmadas como cepas quitinolíticas (Okumoto 1992), es decir, un período de 11 días no es suficiente para que aparezca transparencia en ellas.

Las cepas A29, A32, B57 y C8, produjeron transparencia sólo en el medio agar+quitina, debido a que no utilizaron muy bien la quitina como fuente de carbono en presencia de agar nutriente+quitina quizás, por



**Figura 1.** Crecimiento de colonia producida por cada cepa bacterial en agar+quitina durante 11 días.

**Figura 2.** Crecimiento de colonia producida por cada cepa bacterial en agar nutriente+quitina durante 11 días.

la razón antes mencionada. Además, la cepa A30 obtuvo mayor desarrollo de transparencia entre las cepas evaluadas en agar+quitina.

Las cepas Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, A28 y A31, produjeron más transparencia en el agar nutriente+quitina que en el agar+quitina. Las cepas, Q1, Q2, Q3, Q4 y Q5 desarrollaron marcadamente la transparencia (Cuadro 2 y 3).

Para las 11 cepas estudiadas excepto Q1-Q5 por su antagonismo, se calculó el coeficiente de correlación entre el antagonismo, como porcentaje de inhibición sobre el crecimiento del tubo germinativo y el crecimiento de la colonia, y la zona transparente determinado por el área debajo de la curva de cada uno de ellas. En el medio agar+quitina no se encontró ninguna relación entre el antagonismo y las otras variables. Por el contrario, esta relación sí fue determinada para

agar nutriente+quitina. Sin embargo, esto no es confiable, porque las cepas A6, A18, A32, B52, C6 y C8 no produjeron zona transparente, por lo cual se distribuyeron formando un grupo (encima del eje-Y) en la relación entre antagonismo y transparencia. Estas observaciones confirman lo señalado por Okumoto (1992), de que con el sistema utilizado para la prueba de antagonismo es difícil determinar la actividad quitinolítica.

Para todas las cepas estudiadas por su actividad quitinolítica, se estimó el coeficiente de correlación entre las dos variables calculadas en los diferentes medios de cultivo. Se determinó una correlación altamente significativa  $r^2 = 0,85$  ( $P < 0,01$ ) entre el crecimiento de la colonia y transparencia en el medio de agar+quitina; por tanto, en este medio el tamaño de la colonia se incrementa a medida que aumenta la zona transparente. Por el contrario, ello no se encontró en

el medio agar nutriente+quitina, ya que no existe relación ( $r^2= 0,43$ ) entre la actividad quitinolítica y el crecimiento de la colonia en presencia de otra fuente de nutrición.

**Cuadro 2.** Crecimiento de colonia y transparencia en el medio de cultivo agar+quitina. Turrialba, Costa Rica.

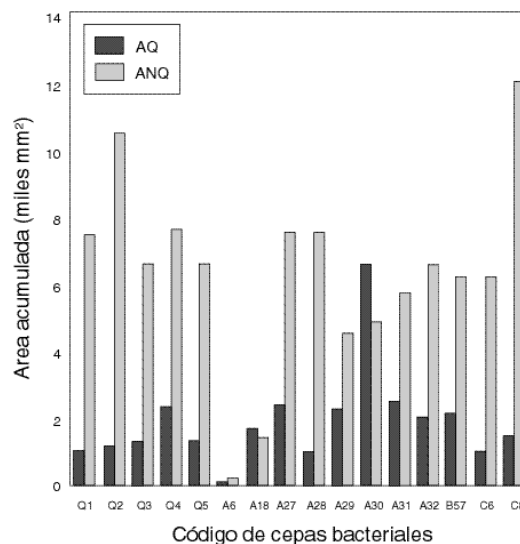
Cepas	Género	Crecimiento	
		Colonia	Transparencia
A6	P	106,7 cd	0,0 c
A18	P	1762,7 bcd	0,0 c
A27	B	2459,4 abc	2477,5 abc
A28	B	1018,5 bcd	1103,3 bc
A29	B	2322,8 abc	1585,3 abc
A30	B	6630,1ab	5369,0 ab
A31	B	2552,2 abc	2723,0 abc
A32	B	2079,5 abc	2103,0 abc
B57	B	2211,3 abc	2159,9 abc
C6	B	996,2 bcd	0,0 c
C8	B	1488,4 bcd	1976,3 abc
Q1	B	1067,4 bcd	1991,2 abc
Q2	B	1208,5 bcd	1806,3 abc
Q3	B	1361,6 bcd	2097,5 abc
Q4	B	2411,5 abc	2890,4 abc
Q5	B	1341,6 bcd	2252,2abc

B: *Bacillus* sp.  
P: *P. fluorescentes*

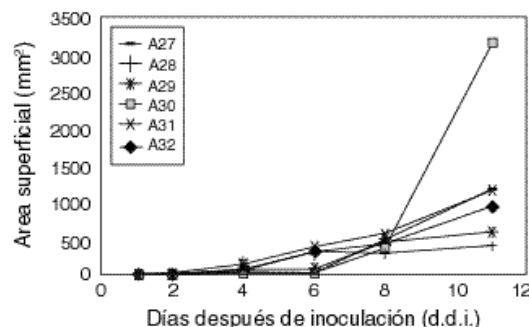
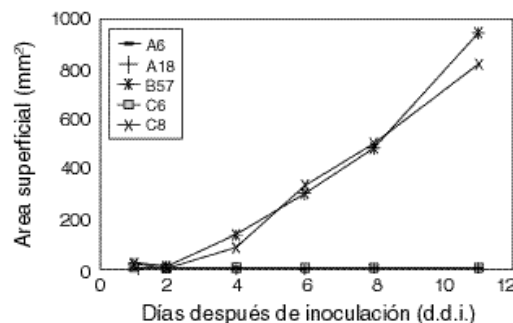
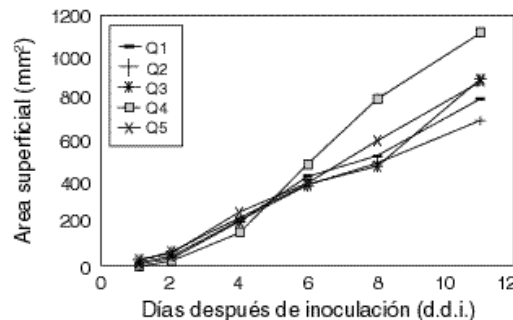
**Cuadro 3.** Crecimiento de colonia y transparencia en el medio de cultivo agar nutriente+quitina. Turrialba, Costa Rica.

Cepas	Género	Crecimiento	
		Colonia	Transparencia
A6	P	228,4 e	0,0 c
A18	P	1480,5 de	0,0 c
A27	B	7575,3 abc	2650,9 bc
A28	B	3604,3 cde	2583,0 bc
A29	B	4582,4 cde	0,0 c
A30	B	4906,6 cde	2689,8 bc
A31	B	5787,0 cd	4608,3 abc
A32	B	6605,4 bc	0,0 c
B57	B	6226,6 bcd	0,0 c
C6	B	4381,5 cde	0,0 c
C8	B	12034,8 a	0,0 c
Q1	B	7511,3 abc	7693,4 ab
Q2	B	10556,7 ab	10928,4 a
Q3	B	6655,6 bc	7222,0 ab
Q4	B	7676,5 abc	8286,1 ab
Q5	B	4486,3 cde	6050,4 abc

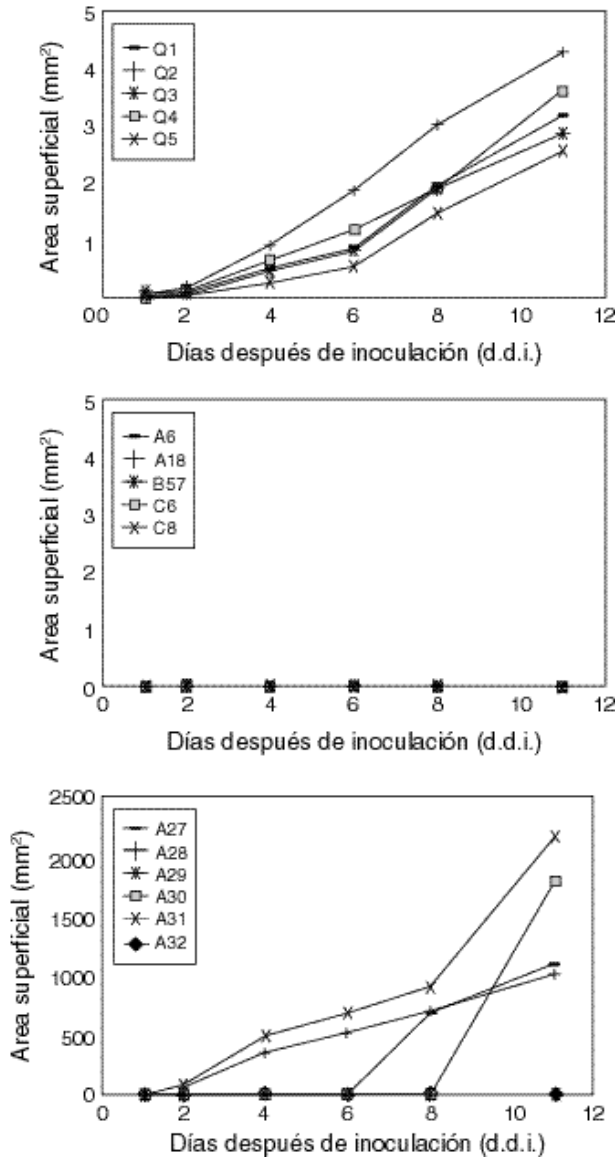
B: *Bacillus* sp.  
P: *P. fluorescentes*



**Figura 3.** Área debajo de la curva de crecimiento de colonia en agar+quitina y agar nutriente+quitina.



**Figura 4.** Crecimiento de transparencia producida por cada cepa bacteriana en agar+quitina durante once días.



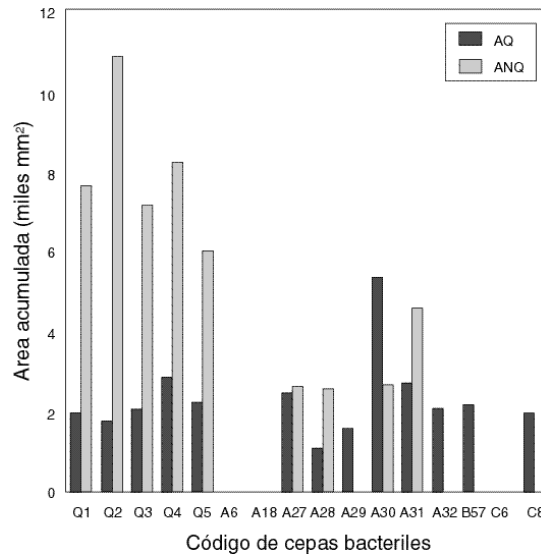
**Figura 5.** Crecimiento de transparencia producida por cada cepa bacteriana en agar nutriente+quitina durante once días.

### Literatura citada

Margan, FL. 1963. Infection inhibition and germ-tube lysis of three cereal rust by *Bacillus pumilus*. *Phytopathology* 53:1346-1348.

Okumoto, S.; Bustamante, E. 1993. Selección in vitro de bacterias antagonistas a *Alternaria solani* Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) no. 28:7-10.

Okumoto, S. 1992. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagonistas a *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 113 p.



**Figura 6.** Área debajo de la curva de crecimiento de transparencia en agar+quitina y agar nutriente+quitina.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, A30 y A31 pueden ser utilizadas en una siguiente evaluación *in vivo*, como agente de control biológico, ya que la producción de quitinasa fue considerablemente alta, con respecto a la de otras cepas.

Ploper *et al.* (1991) observó que la adición de quitina mejoró la supervivencia de microorganismos quitinolíticos y el tizón temprano *Alternaria solani* y la mancha foliar causada por *Septoria* sp. fueron controlados por las cepas quitinolíticas previamente probadas por su antagonismo, con una formulación de quitina.

Por lo tanto, se recomienda el uso de agar+quitina para la prueba de actividad quitinolítica debido a la mayor detección de las cepas quitinolíticas a corto plazo. También, este medio de cultivo es útil para la conservación de la característica quitinolítica.

Ploper, LD; Backman, PA; Cunningham, SD; Martin, MJ. 1991. Effect of chitin amendments and added chitinolytic microorganisms on foliar disease of tomato, potato and apple. *In APS Annual Meeting* (1991, Missouri).

Skujins, JJ; Potgieter, HJ; Alexander, M. 1965. Dissolution of fungal cell walls by a Streptomyces chitin and (1-3)glucanase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 111:358-364