



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
METABOLITOS CON ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE
CEPAS DE
Bacillus sp. HACIA LOS AGENTES FITOPATÓGENOS
Erwinia carotovora (Dye) Hall y *Rhizoctonia solani*
Kühn.**

TESIS DE MAGÍSTER (TRABAJO FINAL DE MAGÍSTER)

YOSSELYN C. GARAY C.

2006.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS CON
ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE CEPAS DE
Bacillus sp. HACIA LOS AGENTES FITOPATOGENOS *Erwinia*
carotovora (Dye) Hall y *Rhizoctonia solani* Kühn.

Tesis (o Trabajo Final) presentada a la Facultad de Ciencias de la
Universidad Austral de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de Magíster en Ciencias.

por

YOSSELYN C. GARAY C.

Valdivia, Chile

2006

Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias

INFORME DE APROBACIÓN TESIS (O TRABAJO FINAL) DE MAGISTER

La Comisión Evaluadora de Tesis (o Trabajo Final) comunica al Director de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

YOSSELYN CARMEN GARAY CATALÁN

ha sido aprobada en el examen de defensa de Tesis (o Trabajo Final) rendido el día __ de mayo de 2007, como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias y, para que así conste para todos los efectos firman:

Profesor Patrocinante

Profesor Luigi Ciampi P.

Comisión Evaluadora

Profesor Marcia Costa L.

Profesor Eduardo Valenzuela F.

INDICE

CAPITULO	CONTENIDOS	PÁG.
1.	RESUMEN.	1
1.1	ABSTRACT.	3
2.	INTRODUCCIÓN.	5
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.	20
3.1.	MATERIALES.	20
3.1.1.	Material biológico.	20
3.1.2.	Materiales y Equipos.	21
3.1.3.	Medios de cultivo.	23
3.2.	MÉTODOS.	24
3.2.1	Activación de cepa antagonista desde cultivos	24
3.2.2.	liofilizados.	26
	Pruebas de antagonismo.	26
	a) Prueba de inhibición frente a bacteria	26
3.2.3.	fitopatógena.	28
3.2.3.1.	b) Prueba de inhibición frente a hongo fitopatógeno.	29
3.2.3.2.	Identificación de cepas antagonistas.	30
	Extracción de DNA genómico bacteriano.	
3.2.3.3.	Aislamiento de DNA genómico con Wizard Genomic	31

3.2.3.4.	DNA Purification Kit (Promega).	33
3.2.3.5.	Amplificación gen ribosomal 16S.	34
3.2.4.	Purificación del gen ribosomal 16S.	36
3.2.5.	Lectura y Análisis de Secuencias.	38
3.2.6	Curvas de crecimiento.	39
3.2.7.	Pruebas de antagonismo con el filtrado.	39
3.2.7.1.	Pruebas de estabilidad del filtrado.	40
3.2.7.2.	Proceso de purificación del compuesto antagonista.	41
3.2.7.3.	Estimación del peso molecular (Ultrafiltración).	41
4.	Espectro de absorción de la sustancia antagonista.	43
4.1.	Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).	43
4.2.	RESULTADOS	46
4.2.1.	Pruebas de antagonismo.	46
4.2.2.	Identificación de cepas antagonistas de <i>Bacillus sp.</i>	47
4.2.3.	mediante PCR.	48
4.2.4.	Amplificación y Producto de PCR.	51
4.3.	Purificación del gen ribosomal 16S.	53
4.4.	Identificación de secuencias.	63
4.5.	Cladograma.	64
4.6.	Curvas de crecimiento.	65
4.7.	Pruebas de estabilidad del filtrado.	66
	Estimación del peso molecular (Ultrafiltración).	
5.	Espectro de absorción de la sustancia antagonista.	73
5.1.	Separación de la(s) sustancia(s) antagonista	75

5.2.	mediante HPLC (High pressure liquid chromatography).	79
5.3.		82
5.4.	DISCUSIÓN	84
5.5.	Pruebas de antagonismo.	85
5.6.	Identificación de cepas antagonistas.	87
5.7.	Curvas de crecimiento	87
6	Pruebas de estabilidad del filtrado.	90
7	Estimación de peso molecular.	91
	Espectro de absorción de la sustancia antagonista.	
	Separación de la(s) sustancia(s) antagonista mediante HPLC.	
	CONCLUSIONES	
	BIBLIOGRAFÍA	

TABLA		PÁG.
Tabla 1.		32
Tabla 2.	INDICE DE TABLAS	44
Tabla 3.		49
	CONTENIDOS	
Tabla 4.	Mezcla utilizada en la reacción de PCR para amplificar 16S rDNA.	50
Tabla 5.	Halos de inhibición generados por 12 cepas de <i>Bacillus</i> spp. sobre los agentes fitopatógenos <i>Erwinia carotovora</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> .	63
Tabla 6.	Porcentajes de identidad de la secuencia molecular de los productos de las cepas antagonistas con la de <i>Bacillus subtilis</i> obtenida del banco de datos del NCBI.	64
Tabla 7.	Comparación de los porcentajes de identidad con el género <i>B. subtilis</i> , resultados obtenidos en la identificación de las cepas antagonistas de <i>Bacillus</i>	65

spp. mediante la utilización de los sistemas de API y PCR.

Estabilidad de los filtrados a distintas temperaturas y posterior ensayo contra *Erwinia carotovora*.

Estabilidad de los filtrados a distintas temperaturas y posterior ensayo contra *Rhizoctonia solani*.

Actividad antagonista de los eventuales metabolitos de distintos pesos molecular (kDa) determinados en los filtrados de cepas de *Bacillus subtilis*.

FIGURA		PÁG.
Figura 1.		25
Figura 2.		27
Figura 3.		29
Figura 4.	INDICE DE FIGURAS	37
Figura 5.		45
	CONTENIDOS	
Figura. 6.	Esquema del procedimiento para activar las cepas de <i>Bacillus</i> sp. que se encontraban liofilizadas.	47
Figura 7.	Esquema de las placas de pruebas de antagonismos.	48

	Organigrama de la identificación de Bacterias antagonistas por amplificación del gen ribosomal 16 S por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR).	52
Figura. 8.	Esquema de la metodología utilizada para la obtención de curvas de crecimiento de las cepas antagonistas en estudio.	55
Figura 9.	antagonistas en estudio.	56
Figura 10.	Enfrentamientos en placa <i>in vitro</i> contra los agentes fitopatógenos <i>E. carotovora</i> y <i>R. solani</i> .	59
Figura 11.	Electroforesis del producto de PCR de 12 cepas de <i>Bacillus</i> sp. que evidenciaron antagonismo.	60
Figura 12.	Electroforesis del producto de PCR de 12 cepas de <i>Bacillus</i> sp. que evidenciaron antagonismo.	61
Figura 13.	Cladograma que indica la relación filogenética de las cepas antagonistas comparadas con <i>B. subtilis</i> y otros géneros bacterianos tales como: <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacterium</i> , <i>V. cholera</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i> . Las cepas en estudio evidenciaron una mayor relación con <i>B. subtilis</i> .	62
Figura 14.	Curva de crecimiento de la cepa MB2.	66
Figura 15.	Curva de crecimiento de la cepa MB5.	68
Figura. 16.	Curva de crecimiento de la cepa MB42.	69
Figura. 17.	Curva de crecimiento de la cepa MBP1.	70
Figura. 18.	Curva de crecimiento de la cepa MBP2.	71
Figura. 19.	Pruebas de antagonismo con los filtrados de las cepas	72

Figura. 20. de *Bacillus* sp. obtenidos a las 60 h de incubación contra los agentes fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani*.

Espectro de Absorbancia de los filtrados de las cepas antagonistas comparado con Iturina A y Surfactina (Sigma) realizado entre una longitud de onda (λ) de 190 y 350 nm.

Cromatograma del filtrado de la cepa antagonista MB2 comparada con los estándares utilizados Iturina A y Surfactina (Sigma).

Cromatograma del filtrado de la cepa antagonista MB5 comparada con los estándares utilizados Iturina A y Surfactina (Sigma).

ANEXO		PÁG.
	A y Surfactina (Sigma).	100
1.	Cromatograma del filtrado de la cepa antagonista	101
2.	MB42 comparada con los estándares utilizados	105
3.	Iturina A y Surfactina (Sigma).	
	Cromatograma del filtrado de la cepa antagonista	106
4.	MBP1 comparada con los estándares utilizados	
	Iturina A y Surfactina (Sigma).	107
5.	Cromatograma del filtrado de la cepa antagonista	
	MBP2 comparada con los estándares utilizados	108
6.	Iturina A y Surfactina (Sigma).	
		109

7.

INDICE DE ANEXOS

CONTENIDOS

Tinción de Gram.

Secuencias de las cepas antagonistas en estudio.

Resumen de los datos evaluados en la curva de crecimiento para la cepa MB2.

Resumen de los datos evaluados en la curva de crecimiento para la cepa MB5.

Resumen de los datos evaluados en la curva de crecimiento para la cepa MB42.

Resumen de los datos evaluados en la curva de crecimiento para la cepa MBP1.

Resumen de los datos evaluados en la curva de crecimiento para la cepa MBP2.

ABREVIATURAS

ECC	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> .
ECA	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> .
ECH	<i>Erwinia chrysanthemi</i> .
PI	Porcentaje de identificación
CBMM	Caldo base melaza modificado
APD	Agar Papa Dextrosa
AP	Agar Peptona
CP	Caldo Peptona
kDa	Kilo Dalton

1. RESUMEN

Es importante destacar el potencial de *Bacillus* sp. para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana se ha utilizado en control biológico de fitopatógenos. De los péptidos antifúngicos producidos por *Bacillus* podemos citar a micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y subporinas. Muchos péptidos antifúngicos secretados por *B. subtilis* tienen un PM de < 2000 Da. La aparición de resistencia contra péptidos antimicrobianos es menos probable que la resistencia a antibióticos convencionales. En Chile hay varias bacterias y hongos que afectan a cultivos de papa, particularmente, la investigación se enfoca en el uso de cepas de *Bacillus* para controlar los fitopatógenos *Erwinia carotovora* y *Rhizoctonia solani*, agentes causales de pudrición blanda y sarna negra en papa respectivamente. Para ello, se analizaron 12 cepas bacterianas del género *Bacillus*, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Siendo las cepas MB2, MB5, MB42, MBP1, MBP2, las que presentan mayores halos de inhibición contra ambos fitopatógenos. La tipificación molecular de las cepas se realizó por amplificación del gen ribosomal 16 S por PCR. El análisis de las secuencias DNA r16S de las cepas antagonistas se realizó mediante BLAST y CLUSTAL W. Las cepas en estudio corresponden a *B. subtilis*

correspondiendo a un porcentaje de identidad sobre el 90%, siendo la cepa MB5 la más distinta con un 77% de identidad. Además, se analizan curvas de crecimiento de las mejores cepas antagonistas.

Las curvas de crecimiento de las mejores cepas antagonistas (MB2, MB5, MB42, MBP1, MBP2) mostraron que la actividad antifúngica predomina a lo largo de su ciclo en todos los casos, excepto en la cepa MBP2 donde predomina la actividad antibiótica, siendo esta la que predomina en la fase de crecimiento exponencial para todas las cepas. Esta actividad antibiótica sería por la posible secreción de surfactina en las primeras etapas, esta potenciaría la acción de iturina a medida que transcurre el ciclo para contrarrestar los hongos. Los mejores resultados promedio de la actividad antibiótica y antifúngica se obtuvieron a las 60 h de incubación.

Los filtrados de las cepas antagonistas evidencian estabilidad a -20, 5, 25 y 80 °C, inactivándose cuando se expone a 121°C durante 15 min.

Para estimar el peso molecular del metabolito antagonista, se utilizó Centriplus (YM-3, YM-10, YM-30 Centrifugal Filter Unit), correspondiente a 3 kDa, 10 kDa y 30 kDa respectivamente. El filtrado es activo a > 30 kDa, < 30 kDa, < 10 kDa, < 3 kDa para todas las cepas en estudio. Por lo tanto, el péptido que buscamos tiene un peso molecular de <3 kDa.

El espectrograma de absorbancia de los filtrados con PM de < 3 kDa, evidenciaron semejanza con Iturina A (Sigma), presentando un máximo a 275 nm. Siendo Surfactina (Sigma) la que presentó una menor absorbancia. Esto podría deberse a que iturina A presenta un residuo de

tirosina en la posición 2 invariable, el que se detectó en el espectrograma, no así para surfactina que carece de tirosina en su estructura.

Las fracciones activas obtenidas en la estimación del peso molecular fueron fraccionadas por HPLC, se compararon con Iturina A y Surfactina (Sigma). Protocolo de acuerdo a Chitarra (2003) modificado. Del análisis de los cromatogramas se desprende que todas las fracciones presentaron picks en los tiempos de retención de Iturina y Surfactina (Sigma). Sin embargo, ambos estándares presentan un mismo tiempo de retención, por lo cual HPLC o el protocolo empleado no serviría para discriminar entre ambos. Varios investigadores sugieren utilizar espectrometría de masa asociado a HPLC, para una adecuada identificación.

Key words: *Bacillus subtilis*, control biológico, iturina, surfactina.

1.1. ABSTRACT

Is important to demonstrate the potential of *Bacillus* spp. in order to synthesize metabolites with antifungus and antibacterial activity and how can be applied to the biological control of plant pathogens. From many antifungal peptides produced by *Bacillus* spp. we can mention micobacilines, iturins, bacylloamicins, surfactins, micosubtilins, fungistatins and subporins. These compounds secreted by *B. subtilis* have a molecular size of < 2000 Da. The appearance of resistance against antimicrobial peptides is probably less possible to appear than the one from conventional antibiotics. In Chile, there are several bacteria and fungi that affect potatoes production, therefore this research focuses the use of selected strains of *Bacillus* spp. to biocontrol *E. carotovora* and *R. solani*, causal agents of soft rot and black scurf in potatoes, respectively. For this purpose, 12 bacterial strains that belong to the strain collection of the Laboratory of Bacteriology, Austral University of Chile were studied: MB2, MB5, MB42, MBP1, MBP2. These were those that presented greater inhibition against both pathogens. The molecular identification of these strains was conducted by amplification of ribosomal gene 16 S using PCR. The analysis of sequences of DNA r16S of the strains was made by means of BLAST and CLUSTAL W. All the strains under study were classified as *B. subtilis* corresponding to a percentage of identity of 90%.

Strain MB5 was the most different with a 77%. In addition, growth curves of the best antagonistic strains MB2, MB5, MB42, MBP1, MBP2 were studied. Results showed that the antifungal activity predominates throughout its cycle in all the cases, except in strain MBP2 in which predominates the antibiotic activity. However, for the rest of the strains this activity appears only during the exponential phase of growth. This antibiotic activity could be related to the possible secretion of Surfactin during the first stages. However, this could increase the effect of Iturin in decreasing fungal growth. Best results of both antifungal and antibiotic activity were established after 60 h of growth in liquid media. The filtrate of the antagonistic strains demonstrates stability to -20, 5, 25 and 80 °C, inactivating itself when exposed to 121°C during 15min. In order to establish the molecular weight of the antagonistic metabolites, Centriplus (YM-3, YM-10, YM-30 Centrifugal Filter Unit), corresponding to 3 was used kDa, 10 kDa and 30 KDa respectively. The filtrate is active to > 30 kDa, < 30 kDa, < 10 kDa, < 3 kDa for all the strains under study. Therefore, the peptide that we looked for has a molecular weight of <3 kDa. The absorbance spectrogram, demonstrates a similarity between the strains of *B. subtilis* tested for Iturin A (Sigma), presenting/displaying a 275 maximum to nm approximately for all the samples. Being Surfactin (Sigma) the one that I present/display a smaller absorbance. This could be due to that Iturin To it presents/displays a remainder of tyrosine in the invariable position 2, the one that was detected in the spectrogram, but not for surfactin that lacks tyrosine in its structure. The active

fractions obtained in the estimation of the molecular weight were freeze dried. These were divided by HPLC, they were compared with Iturin A and Surfactin (Sigma). Analysis of the chromatograms showed that all the fractions presented/displayed peaks in the retention times of Iturin A and Surfactin (Sigma). Nevertheless, both standards present/display a same time of retention, therefore the HPLC protocol used cannot discriminate between both compounds.

Key words: *Bacillus subtilis*, biological control, iturin, surfactin.

2. INTRODUCCIÓN

El uso de microorganismos para combatir agentes fitopatógenos se ha utilizado desde hace muchos años y parece ser una herramienta eficaz, ya que la inadecuada utilización y exceso de aplicación de pesticidas ha sido cuestionada por el riesgo que provoca al medio ambiente y a la salud humana, además por su alto costo.

De acuerdo a la definición de Cook y Baker (1983) se entiende por control biológico “la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar”.

En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos de plantas y sus antagonistas contribuyendo así a que no se desarrolle la enfermedad en muchos de los casos. En condiciones naturales, los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas y también en la rizósfera. Por otra parte, la disminución de la flora de competencia por prácticas agrícolas como lavado de frutos, aplicación de fungicidas, y desinfección de suelos,

entre otras prácticas, favorecen el desarrollo de los patógenos (Rollán y col., 1998).

Sanford (1926) citado por Faull (1988) fue el primero en reconocer la competencia de nutrientes entre organismos saprofitos y patógenos en el sitio de la infección inicial como una forma de control biológico para las enfermedades de las plantas. El control biológico de agentes fitopatógenos puede ocurrir por distintos mecanismos. Ejemplos lo constituyen la competencia de nutrientes o espacio entre un patógeno y especies inofensivas, parasitismo y producción de antibióticos (Faull, 1988; Yoshida y col., 2001) y toxinas, o bien por la producción de enzimas que degradan la pared celular del hospedero (Krechel y col., 2002).

El control biológico de patógenos de plantas ha protagonizado muchas investigaciones los últimos años. Sustancias naturales encontradas en bacterias, hongos y plantas superiores son importantes fuentes de péptidos con actividad antifúngica (Czaczyk y col., 2002).

Se han utilizado microorganismos antagonistas con el fin de prevenir o suprimir a fitopatógenos como algunos tipos que incluyen los géneros *Agrobacterium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* y *Cryphonectria* (Driesche y Bellows, 1996). Por ejemplo, la especie bacteriana *Streptomyces scabies* agente causal de la “sarna común de la papa”, es suprimida por poblaciones naturales de *B.*

subtilis y por cepas saprofiticas de *Streptomyces* sp. Entre otros grupos de microorganismos, cepas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son reconocidos por suprimir hongos causantes de enfermedades, además, estas variantes, se caracterizan por suprimir de manera eficaz patógenos de suelo que infectan la raíz. Por ejemplo, mediante la producción de antibióticos y por competición de iones Fe^{3+} mediante sideróforos. Por su parte, la FDA (Food and Drug Administration) acuña el termino GRAS (generally recognized as safe), es decir “generalmente considerados como seguros”, para designar a aquellas especies de microorganismos que son inocuos para mamíferos y plantas. En este sentido, *B. subtilis* al igual que otras especies de microorganismos tales como los géneros *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Actinomyces*, *Serratia* y *Streptomyces* son considerados como GRAS y poseen una reconocida actividad antagonista contra varios agentes fitopatógenos.

Las pérdidas a los cultivos causadas por los agentes fitopatógenos se pueden restringir con el uso de fungicidas, mediante rotación de cultivos y por el uso de cultivos tolerantes a los agentes causales de enfermedades (Czaczky y col., 2002). El uso de pesticidas, herbicidas y fumigaciones del suelo llegan a contaminar aguas subterráneas. Asimismo, el uso de algunos pesticidas como el insecticida (2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano) perteneciente a la familia de los organoclorados DDT, fue prohibido ya que son tóxicos, y su persistencia en el ambiente, llega a ser de años, se bioacumulan y han provocado la

extinción de aves de presa. Hoy en día, el DDT está presente en la lluvia, en el suelo y en la fauna. Se concentra en la grasa de los animales y del ser humano, a través de los alimentos. Otros pesticidas han causado envenenamientos humanos. El mal uso de los pesticidas puede llegar a una fuente de contaminación y causar envenenamiento accidental (Driesche y Bellows, 1996).

El primer producto natural de origen microbiano que fue comercializado para fines terapéuticos fueron los antibióticos blastocidina S, kasugamicina y validamicina A y fueron desarrollados en Japón para el control del “quemado del arroz” (*Pyricularia oryzae* Briosi & Cavara) y el “tizón de la envoltura” (*R. solani*) (Worthington, 1988). Existen en el mercado algunas cepas antagonistas que se han formulado comercialmente donde se encuentran tanto hongos como bacterias con actividad antibiótica, fungicida, nematocida, etc. Por ejemplo, *B. subtilis* se comercializa con el nombre de Kodiak, Epic y se utiliza para el tratamiento de semillas para prevenir *Rhizoctonia* sp. y también, para agentes causantes de enfermedades de la raíz como las provocadas por los fitopatógenos *Pythium* sp. y *Fusarium* sp. Por su parte, *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula se comercializa como Dagger G y se utiliza para combatir a *Rhizoctonia* sp. y *Pythium* sp. que causan caída de plántulas (Czaczky col., 2002).

De acuerdo a Stein (2005), *B. subtilis*, es un microorganismo "seguro" ubicuo, se utiliza en agricultura como fungicida natural y que promueve la proliferación de los microorganismos en la planta y descontaminación de superficies sólidas.

El potencial de *Bacillus* sp. para sintetizar una amplia variedad de metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana se ha explotado en la industria y en medicina. Además, como agente de control biológico de fitopatógenos. De los péptidos antifúngicos producidos por *Bacillus* podemos citar a: micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y subporinas. Los lipopéptidos de la familia iturina son potentes agentes antifúngicos el cual puede ser usado como biopesticida para la protección de las plantas (Vater y col., 2002).

El efecto antagonista de las bacterias se debería principalmente a la producción de antibióticos antifúngicos. Muchas de estas sustancias se han identificado y caracterizado como péptidos antimicrobianos. Varias de estas sustancias antifúngicas que son secretados por *B. subtilis* tienen un peso molecular de menos de 2 kDa y son sintetizados no ribosomalmente a través de la vía multi enzima catalizada. Este tipo de sustancias incluyen los lipopéptidos iturina, surfactina, fengicina, plipastatina, bi o tripéptido como bacilicina y rhizoctina (Moyne y col., 2001). La mayoría de estos antibióticos son péptidos cíclicos compuestos por aminoácidos, no obstante, algunos contienen otros residuos. Pocos de

estos péptidos son lineales, como por ejemplo la rhizocitina (Sadfi y col., 2002). La aparición de resistencia contra péptidos antimicrobianos es menos probable que la resistencia a antibióticos convencionales (Oard y col., 2004).

De acuerdo a Ahimou y col. (2000), algunas iturinas y surfactinas son capaces de modificar la superficie hidrófoba de la pared bacteriana y consecuentemente, la adhesión microbiana a la superficie del micelio.

Las iturinas corresponden a una familia de lipopéptidos extraídos de varias cepas de *B. subtilis* (Feignier y col., 1995). Estos compuestos amfilícos se caracterizan por poseer un anillo peptídico de siete residuos aminoacídicos incluyendo un D-tyr² invariable (L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser) (Feignier y col., 1996; Asaka y Shoda, 1996), con la secuencia quiral constante LDDLLDL cerrada por un β -aminoácido alifático C14-C17. Estas sustancias presentan una gran actividad hemolítica, antifúngica contra una gran variedad de levaduras y hongos patógenos, sin embargo, tienen una limitada actividad antibacteriana (Stein, 2005).

Al grupo iturina pertenecen la Iturina A, C, D y E; Bacilomicina D, F y L; Bacilpeptina y Micosubtilina (Moyne y col., 2001; Yu y col., 2002, Touré y col., 2004). Hay isómeros para cada una de las iturinas, porque la forma de su cadena ácido graso puede ser *n*-, *iso*-, o *anteiso*- (Yu y col., 2002).

Surfactina también corresponde a un lipopéptido cíclico que contiene siete residuos D- y L-aminoácidos y un residuo de un β -hidroxi ácido graso, con una secuencia de aminoácidos completamente diferente al del grupo iturina (L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-) (Asaka y Shoda, 1996). Por su parte, fengicina y plipastatina son lipopéptidos con 10 aminoácidos y un lípido unido al extremo de N-terminal de la molécula, se diferencian de las iturinas y surfactinas por la presencia de aminoácidos poco comunes como ornitina y allo-treonina.

B. subtilis es excepcional dentro del género *Bacillus* por su potencial para producir diversos antibióticos (Yoshida y col., 2001). Estos son elaborados por cepas específicas y no son necesarios para la supervivencia del microorganismo. La síntesis de estos péptidos, comúnmente comienza al final de la fase exponencial de crecimiento, cuando alcanza la concentración máxima, después que el desarrollo celular ha cesado. Varios autores sugieren que los microorganismos pueden sintetizar antibióticos en la fase de crecimiento. También se sugiere que la síntesis de antibióticos se debe probablemente al agotamiento de nutrientes necesarios para el desarrollo celular. Esta limitación de nutrientes estimula la diferenciación, que en el caso de *Bacillus* conlleva a la formación de endosporas.

El proceso de formación de la endospora se asocia a la síntesis de nueva pared celular y a la degradación de la pared celular antigua. Al

igual que los antibióticos, la pared celular contiene D-aminoácidos y se sugiere que una alteración del metabolismo por la síntesis de la pared podría aportar precursores para la síntesis de antibióticos (Bernal y col., 2002).

Recientemente, se ha documentado que la colonización de las raíces de la planta por *B. subtilis* está asociada a la producción de surfactina y a la formación de un biofilm. A este respecto se ha documentado que, sorprendentemente, surfactina protegió a la planta contra la infección por el patógeno *P. syringae* (Stein, 2005; Bais y col., 2004).

Se ha detectado una estrecha correlación entre la producción de antibiótico y la formación de biofilm. Surfactina también es capaz de inhibir la formación de este tipo de películas de otras bacterias. La acción antimicrobiana y fungicida de lipopéptidos, además de surfactina (fengicina, iturina, bacilomicina) pudo ser ventajosa para que las células del *B. subtilis* eliminen a competidores en el mismo hábitat. Sin embargo, de acuerdo a la investigación de Ohno y col. (1995) surfactina sola no inhibiría el desarrollo de hongos fitopatógenos, pero si aumenta significativamente la actividad antifúngica de iturina A.

De acuerdo a los estudios de Souto y col., (2004) identificaron parcialmente surfactina e iturina de cultivos de *B. amiloliquefaciens*. Según estos autores, la co-producción de surfactina, la cual tiene

propiedades surfactantes, e iturinas con actividad antifúngica por la misma bacteria, podría tener un efecto sinérgico. Estos resultados estarían descritos para *B. subtilis*, donde de acuerdo a Ohno y col. (1995), se encontró iturina A y surfactina. Además, varios autores (Souto y col., 2004; Touré y col., 2004; Yu y col., 2002; Yoshida y col., 2001) postulan que las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* estarían estrechamente relacionadas y se distinguen por el contenido de G+C.

Muchas especies de *Bacillus* incluyendo *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides* son conocidos por suprimir a especies de hongos fitopatógenos como los que incluyen en los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Gaeummanomyces*, *Nectria*, *Pythium* y *Phytophthora* (Sadfi y col., 2002). Las investigaciones de Czaczyk y col. (2002), con *B. coagulans* reveló antagonismo contra *Bipolaris sorokiniana*, *Trichothecium roseum*, *R. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *F. culmorum*.

La literatura describe distintos aislamientos bacterianos productoras de sustancias antagonistas. Por ejemplo, Moyne y col. (2001), aisló Bacilomicina D que pertenece al grupo de las iturinas desde *B. subtilis* que presentó actividad contra *Aspergillus flavus*. Asimismo, Yu y col. (2002), purificaron un compuesto antifúngico de *B. amyloliquefaciens* identificado como isómeros de iturina A, el que era activo contra el fitopatógeno *R. solani*. Por su parte, Touré y col. (2004), trabajaron con *B. subtilis* y revelaron la presencia de una amplia variedad

de isómeros lipopéptidos antifúngicos de las familias de iturina, fengicina y surfactina, los que redujeron al hongo *Botrytis cinerea*. De acuerdo a la investigación de Wulff y col. (2002), con *B. amyloliquefaciens* sugieren la producción de surfactina, iturina, bacilomicina y azalomicina F. Mientras que, *B. subtilis* sintetizó surfactina y artrobactina, que tendrían actividad contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. La investigación de Vater y col. (2002), reveló surfactinas, iturinas y fengicinas aisladas desde *B. subtilis* y Phister y col. (2004), identificaron 3 compuestos: iturina A, bacilisina y clorotetaina de *Bacillus* sp. Por otra parte, filtrados de *B. amyloliquefaciens* presentan una fuerte inhibición al desarrollo de las bacterias fitopatógenas *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y *X. c.* pv. *campestris*.

Por otra parte, en lo que a tipificación bacteriana se refiere, varios investigadores han tipificado muestras de *Bacillus* sp. incluyendo a *B. subtilis* utilizando test API 50 CH y API 20 E (Souto y col., 2004; Logan y Berkeley, 1984). Para la tipificación molecular de microorganismos, particularmente del género *Bacillus* sp., las técnicas más utilizadas son: amplificación de la secuencia del gen ribosomal 16S por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), mediante rep-PCR (repetitive element PCR fingerprint) y mediante el análisis de ISR-PCR (Internal Spacer Region-PCR) 16S-23S RNAr (Souto y col., 2004; De Clerck y col., 2004; Jensen y col., 1993; Versalovic y col., 1994; Woods y col., 1993)

Especies de *Bacillus* son buenos candidatos como agentes de control biológico, son bien conocidos por su actividad contra hongos y bacterias patógenas de plantas. Esta capacidad parece contribuir al establecimiento y persistencia del antagonista en la planta. Además, la formación de endosporas por bacterias Gram positivas otorga una alta viabilidad comparada con las células vegetativas, ya que son resistentes a la desecación y al calor, se pueden formular fácilmente en productos estables y se encuentran comúnmente en el suelo. (Wulff y col., 2002; Handelsman y Stab, 1996).

En Chile, el aislamiento de bacterias antagonistas de fitopatógenos comenzó en 1987 por Ciampi y colaboradores en la Universidad Austral de Chile. Luego de años de investigación, hoy en día, el cepario del Laboratorio de Bacteriología Vegetal, del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, cuenta con una gran cantidad de bacterias antagonistas liofilizadas, destacando los aislamientos de los géneros *Streptomyces* filamentosos, *Pseudomonas* fluorescentes, *Serratia* sp. y *Bacillus* sp.

En Chile se cuenta con una variedad de bacterias y hongos que afectan los cultivos. Particularmente, los fitopatógenos que afectan al cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). En la Décima Región de Los Lagos las plantaciones de este tubérculo alcanzan a 17.010 hectáreas en el

periodo 2004/05, siendo la zona con mayores rendimientos medios del país, (Instituto Nacional de Estadísticas INE, 2007). Entre las bacterias que afectan a cultivos de papa se encuentran *Streptomyces scabies*, agente causal de “sarna común”; *Ralstonia solanacearum* Raza 3-Biovar II agente causal de “marchitez bacteriana”; “pudrición húmeda” y “pie negro” causadas por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y *E. c.* subsp. *atroseptica*, respectivamente. En cuanto a los hongos encontramos: *R. solani* agente causal de sarna negra; *Phytophthora infestans* causal de tizón tardío; tizón temprano causado por *Alternaria solani*; pudrición seca causada por *Fusarium solani* y sarna plateada causada por *Helminthosporium solani* (Apablaza, 2000).

Particularmente se prestará importancia en la presente investigación a los agentes fitopatógenos pertenecientes al género bacteriano *E. carotovora* y al hongo *R. solani*.

De acuerdo a Pérombelon (2002), tres bacterias coliformes causantes de pudrición húmeda, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ECC), *E. c.* subsp. *atroseptica* (ECA) y *E. chrysanthemi* (ECH) están asociadas con tubérculos de papas causando “pudrición húmeda” y “pie negro” (pudrición del tallo). Hace pocos años Hauben y col. (1998), clasificaron a estas bacterias como *Pectobacterium sp. carotovorum*, *P. c.* sp. *atrosepticum* y *P. chrysanthemi*. Esta nomenclatura no ha sido aceptada por la mayoría de los fitopatólogos. Sin embargo, se puede

afirmar que estas son bacterias Gram negativas, no esporuladas, anaerobios facultativas y se caracterizan por la producción de enzimas pécticas extracelulares. Además, producen otro tipo de enzimas que degradan la pared celular del hospedero para causar la enfermedad (Pérombelon, 2002). Asimismo, estos agentes causan grandes pérdidas en productos vegetales, especialmente durante su transporte y posterior almacenaje. De acuerdo a Smadja y col. (2004), ECA está restringida a regiones cálidas, donde causa una infección (pie negro) o pudrición húmeda en tubérculos de papas almacenadas. En cambio, ECC puede causar “pie negro” bajo particulares condiciones y pudrición aérea del tallo.

Determinadas condiciones ambientales, tales como humedad, temperatura, pO_2 y pCO_2 , influyen en la aparición de la enfermedad. Varios autores han descrito que la temperatura tiene el mayor efecto en la capacidad de ECA y ECC de infectar papas (Smadja y col., 2004).

Las bacterias causantes de pudrición húmeda se encuentran en la superficie de la planta y en el suelo donde pueden ingresar al vegetal vía heridas o a través de aberturas naturales que se encuentran en la superficie de la planta, por ejemplo, las lenticelas. Una vez dentro de la planta, residen en el tejido vascular y en los espacios intercelulares de tejido parenquimatoso o suberizado de paredes delgadas, donde permanecen hasta que las condiciones ambientales de agua,

disponibilidad del oxígeno y la temperatura, sean adecuadas para el desarrollo de la enfermedad (Toth y col., 2003a). ECC y ECA se dispersan a través de insectos, agua de riego, maquinaria de cultivo, agua lluvia al ser llevada por el viento, y mediante la utilización de material de propagación contaminado con el patógeno (Smith y col., 1992).

De acuerdo a Smadja y col. (2004), para desarrollar una pudrición húmeda: la bacteria se puede encontrar en estados de latencia en áreas privilegiadas de infección como heridas, lenticelas, o brotes de la papa donde comienza una activa multiplicación sin macerar las células vegetales. Cuando las bacterias alcanzan un número de 10^7 - 10^8 cél/g de tejido, llega al sitio de infección o de putrefacción. La bacteria produce y secreta una gran variedad de enzimas líticas extracelulares que degradan células vegetales, tejidos y órganos. Dentro de las enzimas extracelulares se encuentran: enzima pectinolítica, aparentemente esencial para la virulencia de *Erwinia*. Por su parte, la actividad liasa pectato se ha descrito como la causa más importante de las pudriciones húmedas.

De acuerdo a Pizano (1999), la pudrición es más frecuente en suelos mal drenados, que además predisponen las plantas a la infección por hongos del suelo como *Pythium* o *Rhizoctonia*, cuyo ataque también predispone a la infección bacteriana.

En contraste a la pudrición del tubérculo, la enfermedad en tallos se desarrolla generalmente bajo condiciones aeróbicas. La patología designada como “pie negro” se desarrolla cuando grandes cantidades de inóculo del patógeno invaden el tallo después de la multiplicación y pudrición en el tubérculo. La enfermedad no se desarrolla en plantas sin tubérculos o en plantas que se desarrollan de semillas libres del patógeno, incluso en suelos contaminados (Pérombelon, 2002).

“Pie negro” es una enfermedad económicamente importante, para la cuál no hay control químico. La siembra con tubérculos contaminados con ECA provoca grandes pérdidas, debido a la disminución de emergencia de las plántulas, reducción en la cosecha y por la pudrición de tubérculos en el campo, también se provocan pérdidas en el almacenaje. El “pie negro” es una enfermedad originada en el tubérculo que se desarrolla en suelos húmedos y a temperaturas favorables a la multiplicación del patógeno y pudrición del tubérculo (Toth y col., 2003b).

La contaminación del tubérculo puede ocurrir antes, durante o después de la cosecha. La principal fuente de contaminación que afecta a semillas comerciales son: pudrición húmeda de tubérculos semilla en el campo, donde el fitopatógeno se puede dispersar a través del suelo y contaminar a la progenie del tubérculo, contaminación por equipo de manejo mecánico el que transmite y dispersa la bacteria (Toth y col., 2003b).

Estudios epidemiológicos de “pie negro” en papa causado por ECA revelan que las semillas de tubérculo son la mayor fuente de inóculo. La transmisión ocurre después de la descomposición del tubérculo madre, liberando la bacteria al suelo, contaminando a tubérculos de la progenie (Hélias y col., 2000).

Estas bacterias, causantes de pudrición húmeda, producen un amplio rango de enzimas capaces de degradar la pared celular comparado con muchas bacterias saprófitas pectolíticas. Estas sustancias incluyen a: pectinasas, celulasas, proteasas y xilanasas. Todo este potencial biológico permite a *Erwinia* invadir plantas vivas y causar la enfermedad, con más facilidad que los microorganismos saprófitos. De las enzimas producidas, las pectinasas parecen ser las más importantes en la patogénesis, siendo las responsables de la maceración de tejidos e indirectamente, de la muerte celular. Esto es posible, por la degradación de las sustancias pecticas contenidas en la lamela media entre las células, causando el colapso de los tejidos, daño celular y salida de las células (Toth y col., 2003a; Pérombelon, 2002). Cuatro son las principales enzimas producidas: liasa pectato (Pel), liasa pectina (Pnl), pectina metil esterasa y una poligalacturonasa (Peh) (Pérombelon, 2002).

Las bacterias de pudrición húmeda, asimismo, también afectan al cultivo de calas en Chile. El cultivo industrial de calas (*Zantedeschia* sp.)

de colores para flores de corte, se comercializa tanto a nivel nacional como internacional. Durante estos primeros años de desarrollo del cultivo de este tipo de flores en Chile, se ha podido establecer, la presencia de “pudriciones blandas” que afectan tanto a túberos como plantas, patología que es atribuida a bacterias, en particular a especies del género *Erwinia*. Esta enfermedad es particularmente grave en aquellos países donde la cala constituye un rubro de gran relevancia. Este es el caso de Nueva Zelanda, nación que exporta un gran volumen de flores y túberos, donde la “pudrición blanda” es un problema severo (Kunstmann, 2004).

Otro fitopatógeno importante que encontramos en Chile y que afecta a numerosos cultivos es el hongo *R. solani*. Éste causa “sarna negra” y se encuentra frecuentemente de acuerdo a Apablaza (2000), en la IX y X Regiones a nivel de campo. Aunque no afecta el rendimiento mayormente en esa zona, *R. solani* se transmite mediante esclerocios los que se encuentran adheridos a la superficie de tubérculos de papa que pueden ser usados como semillas en otras regiones del país.

El estado del patógeno en suelo más común, es el anamorfo de *R. solani* del Basidiomycota *Thanatephorus cucumeris*. *R. solani* es responsable de pérdidas de producción de un amplio rango de hospederos de cosechas económicamente importantes, así como en horticultura y la agricultura por todo el mundo (Faltin y col., 2004; Grosch y col., 2005). Presenta un amplio rango de hospederos tales como papa,

remolacha, alfalfa trébol, zanahoria, apio, repollo, poroto, lechuga, brócoli, coliflor, pimiento, pepino, berenjena y otros (Apablaza, 2000).

De acuerdo a Agrios (1996), los síntomas característicos en tubérculos de papa son denominados como “costra negra”, donde aparecen pequeños esclerocios negros y endurecidos sobre la superficie del tubérculo. También pueden producirse agrietaduras, malformaciones, concavidades y necrosis en los tubérculos. Pueden producir cancros en brotes nuevos, estrangulamiento de tallos, menor crecimiento de la planta, pigmentación púrpura de las hojas, formación de tubérculos axiales aéreos y una clorosis de hojas basales de la planta, con presencia de micelio blanco del hongo en la base de los tallos. Los estolones subterráneos también pueden mostrar lesiones de color café (Apablaza, 2000).

R. solani secreta algunas enzimas extracelulares como pectinlisa, pectin metilesterasa, celulasa y fosfatasa. Además, se sabe de la producción de ADNasa, ARNasa, alfaamilasa, quitinasa, betaglucanasa, xilanasa, proteasa y ureasa (Bertagnolli y col., 1996).

Las especies de *R. solani* están reunidas en torno a 12 grupos genéticos llamados “grupos de anastomosis” (AG's) de acuerdo a la reacción de anastomosis hifal entre aislados del mismo grupo. Los grupos AG's tienen distintos grados de especificidad al huésped (Keijer y col., 1997). Según Agrios (1996), AG₃ se encuentra asociados principalmente

a plantas de papas. El control de *R. solani* es difícil, por su capacidad de sobrevivir como esclerocios en el suelo bajo condiciones adversas por muchos años o como micelio en materia orgánica bajo varias condiciones ambientales, por su condición de saprófito y por su amplio rango de huéspedes (Groshy col., 2005).

Algunos agentes de control biológico descritos previamente para *Rhizoctonia* pertenecen a hongos, por ejemplo *Trichoderma* (Lewis y col., 1998). De acuerdo a Faltin y col., (2004), pocas bacterias se han reportado para el control de *Rhizoctonia*, por ejemplo *B. licheniformis*, *Burkholderia cepacia*, *P. fluorescens*, *Chryseobacterium gleum* y *Lisobacter enzymogenes*. Asaka y Shoda (1996), agregan *B. subtilis* que presenta antagonismo contra “damping-off” de tomate, siendo la sustancia antagonista iturina A y surfactina. Mientras que, Kondoh y col. (2001), postulan el uso integrado de pesticidas químicos con microorganismos para controlar el damping-off causado por *R. solani*, el que puede ser un método práctico en el campo, en el caso particular utilizan *B. subtilis* y el pesticida flutolanil, donde el pesticida utilizado se reduce a un cuarto cuando actúa en conjunto con el microorganismo.

En base a lo señalado anteriormente, se puede concluir, que el uso de microorganismos para el control de fitopatógenos es una buena alternativa en reemplazo o en complementación al uso de pesticidas.

En base a lo expuesto se plantea la siguiente hipótesis y objetivos específicos.

Hipotesis De Trabajo.

La actividad antagonista de cepas de *Bacillus* sp. hacía los agentes fitopatógenos *Erwinia carotovora* y *Rhizoctonia solani*, se debería a un péptido cíclico de la familia de las iturinas.

Objetivos específicos.

- Identificar molecularmente hasta el rango de especie 12 cepas de *Bacillus spp.* con actividad antagonista contra los agentes fitopatógenos pertenecientes al género bacteriano *Erwinia carotovora* y al hongo *Rhizoctonia solani*.
- Evaluar la producción de metabolitos con actividad antagonista de las cepas que presenten mayor actividad.
- Evaluar la estabilidad del metabolito producidos por las cepas de *Bacillus* sp. a distintas temperaturas.

- Identificar parcialmente la sustancia responsable de la inhibición de *E. carotovora* y *R. solani*, de las cepas de *Bacillus* sp. que presenten mayor actividad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se describirán los materiales y la metodología que se empleó en el desarrollo de la tesis. Las actividades prácticas se llevaron a cabo en: el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal y el ICYTAL, ambos pertenecen a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile; Instituto de Ictiopatología perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

3.1. MATERIALES

En esta sección se describirán los materiales que se emplearon en el desarrollo de la tesis.

3.1.1. Material biológico

En la presente investigación se utilizaron cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, algunas de estas cepas fueron identificadas con una combinación de Test API 50 CH y API 20E como *Bacillus subtilis*. Estas cepas fueron seleccionadas por su actividad antagonista contra los agentes fitopatógenos perteneciente al género bacteriano *E. carotovora* y al hongo *R. solani*. Las cepas a utilizar, fueron facilitadas por el cepario del Laboratorio de Fitopatología Vegetal, del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile. Estas cepas fueron:

- MB 2 (1) *B. subtilis* 93.2 % PI.*
- MB 5 (1) *B. subtilis* 67.6 % PI.
- MB 19 (1) *B. subtilis* 75.7 % PI.
- MB 42 (1) *B. subtilis* 67.6 % PI.
- MB 55 (1) *B. subtilis* 84.1 % PI.
- MB P1 (1) *Bacillus* sp.
- MB P2 (1) *Bacillus* sp.

PM 04	(2)	<i>B. subtilis</i>	89.7 % PI.
PM 10	(2)	<i>B. subtilis</i>	93.2 % PI.
PM 28	(2)	<i>B. subtilis</i>	93.2 % PI.
PM 136	(2)	<i>B. subtilis</i>	93.2 % PI.
A 47	(3)	<i>Bacillus</i> sp.	

*PI.: Porcentaje de identificación.

(1) Identificación obtenida a partir de los resultados de Barría (2005).

(2) Identificación realizada por Méndez (2005).

(3) Identificación realizada por Silva (1992).

3.1.2. Materiales y Equipos.

- Filtros 0,22 μm , Millipore.
- Centriplus YM 30, YM 10, YM3, Millipore.
- Shaker agitador orbital termorregulado, Max 4.000, Barnstead Lab-line.
- Centrifuga, Universal 320R, Hettich zentrifuguen.
- Espectrofotómetro Genesys 8.
- Espectrofotómetro HP 8453.
- pHmetro.
- Campana de Flujo laminar, Enviroco.

- Balanza analítica.
- Cámara de Incubación, Memmert.
- Micropipetas (P 200 y P 1.000), HTL.
- Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega.
- Termociclador modelo Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer.
- Marcador de peso molecular comercial 1kb DNA Ladder, Fermentas.
- Kit comercial E.Z.N.A. Gel Extracción Kit, Omega Bio-Tek.
- HPLC, Merck-Hitachi.
- H₂O ° HPLC, Merck.
- Metanol ° HPLC, Merck.
- Autoclave.
- Refrigerador.
- Tubos eppendorf 1,5 mL.
- Agua destilada.
- Agua desionizada.
- Material de uso común en laboratorio.

3.1.3. Medios de cultivo.

En esta sección se describen los medios de cultivo utilizados, todos estos se autoclavan a 121°C durante 15 min. Los caldos seleccionados son los utilizados por Ortega (1998) modificado por Giacaman (2006), para el estudio de actividad antagonista de cepas del género *Bacillus* contra distintos fitopatógenos.

Caldo base melaza modificado (CBMM): se utilizará para el cultivo de cepas antagonistas en estudio. Es un medio económico y con un buen rendimiento celular para cepas de *Bacillus* sp. La formulación del medio se describe a continuación:

- Melaza	20 g
- Sacarosa	2 g
- Extracto levadura	1 g
- Sulfato de amonio	5 g
- Tampón fosfato:	0,38 g K ₂ HPO ₄ + 11,23 g KH ₂ PO ₄ . En 1L de agua.

Agar Papa Dextrosa (APD) Difco™: Se utilizó para el cultivo y mantenimiento de hongos fitopatógenos, así como para realizar los enfrentamientos de las cepas antagonistas contra los agentes fitopatógenos perteneciente al género bacteriano *E. carotovora* (Dye) Hall y al hongo *R. solani* Kühn.

Agar Peptona (AP): Se utilizará para el mantenimiento de las cepas antagonistas en estudio y para la bacteria fitopatógica. La formulación del medio se describe a continuación:

- Extracto de carne	3 g
- Peptona	10 g
- NaCl	5 g
- Agar	20 g
- Agua destilada	1 L

Caldo Peptona (CP): utilizado para activar las cepas antagonistas liofilizadas. La formulación del medio se describe a continuación:

- Extracto de carne	3 g
- Peptona	10 g
- NaCl	5 g
- Agua destilada	1 L

3.2. METODOS.

A continuación se describe la metodología utilizada en el desarrollo de la tesis.

3.2.1. Activación de cepa antagonista desde cultivos liofilizados.

A los frascos que contienen las muestras liofilizadas de las cepas antagonistas (*E. carotovora* y *R. solani*), se les agregaron 5 mL de caldo peptona (CP) y se incubó a temperatura ambiente durante 24 h. Después de la incubación se extrajo una alícuota con ayuda de un asa de siembra, la que se siembra por estría en una placa Petri que contenían agar peptona (AP), luego se incubaron a 25 ± 2 °C durante 24 a 48 h. Transcurrida la incubación se procedió a extraer una colonia aislada, la que fue sembrada por estría sobre la superficie de una placa Petri con AP, con la finalidad de obtener un cultivo puro. Luego se incubó a 25 ± 2 °C durante 24 a 48 h (Fig.1). Las muestras se almacenaron a 5°C para posteriores análisis.

Desde las colonias aisladas de las cepas antagonistas respectivas se realizó una tinción de Gram (Anexo 1) para comprobar la pureza del cultivo. Posteriormente, los cultivos puros de las cepas antagonistas fueron respaldados por triplicado en tubos que contenían AP inclinados, los que se almacenaron a 5 °C.



Figura 1. Esquema que muestra el procedimiento para activar las cepas de *Bacillus* sp. que se encontraban liofilizadas.

3.2.2. Pruebas de antagonismo.

En esta sección se describen los métodos utilizados para probar si las cepas que se encontraban liofilizadas conservan la capacidad antagonista. Se evaluó la formación de halo de inhibición que presentan las cepas de *Bacillus* sp. en estudio contra el hongo *R. solani* y la bacteria fitopatogena *E. carotovora* (Fig.2). Empleando dos tipos de pruebas.

a) Prueba de inhibición frente a bacteria fitopatogena.

Sobre placas Petri que contenían agar papa dextrosa (APD) con una tórula estéril se extiende un tapiz de la bacteria fitopatógena *E. carotovora* desde una suspensión en agua destilada estéril o en CP, este tapiz se deja secar aproximadamente 20 min en cámara de flujo laminar. Una vez seco el tapiz, en la periferia se depositan 2 discos (uno a cada extremo) de AP con la cepa antagonista respectiva. Posteriormente, las placas se incubaron a 25 ± 2 °C por 24 a 48 h. La prueba se realizó por duplicado. Procedimiento descrito por Méndez (2005).

b) Prueba de inhibición frente a hongo fitopatógeno.

En el centro de placas que contenían APD se depositó un disco extraído con un sacabocado desde placas Petri con APD donde previamente fue cultivado *R. solani*. Mientras que en la periferia de la placa se depositaron 2 discos (uno a cada extremo) de AP con la cepa antagonista respectiva o se depositaron colonias aisladas con ayuda de un asa de siembra de la cepa respectiva, según Silva (1992). La placa se incubó a 25 ± 2 °C durante 3 a 5 días. La prueba se realizó por duplicado, más un testigo sólo con *R. solani* como control negativo.

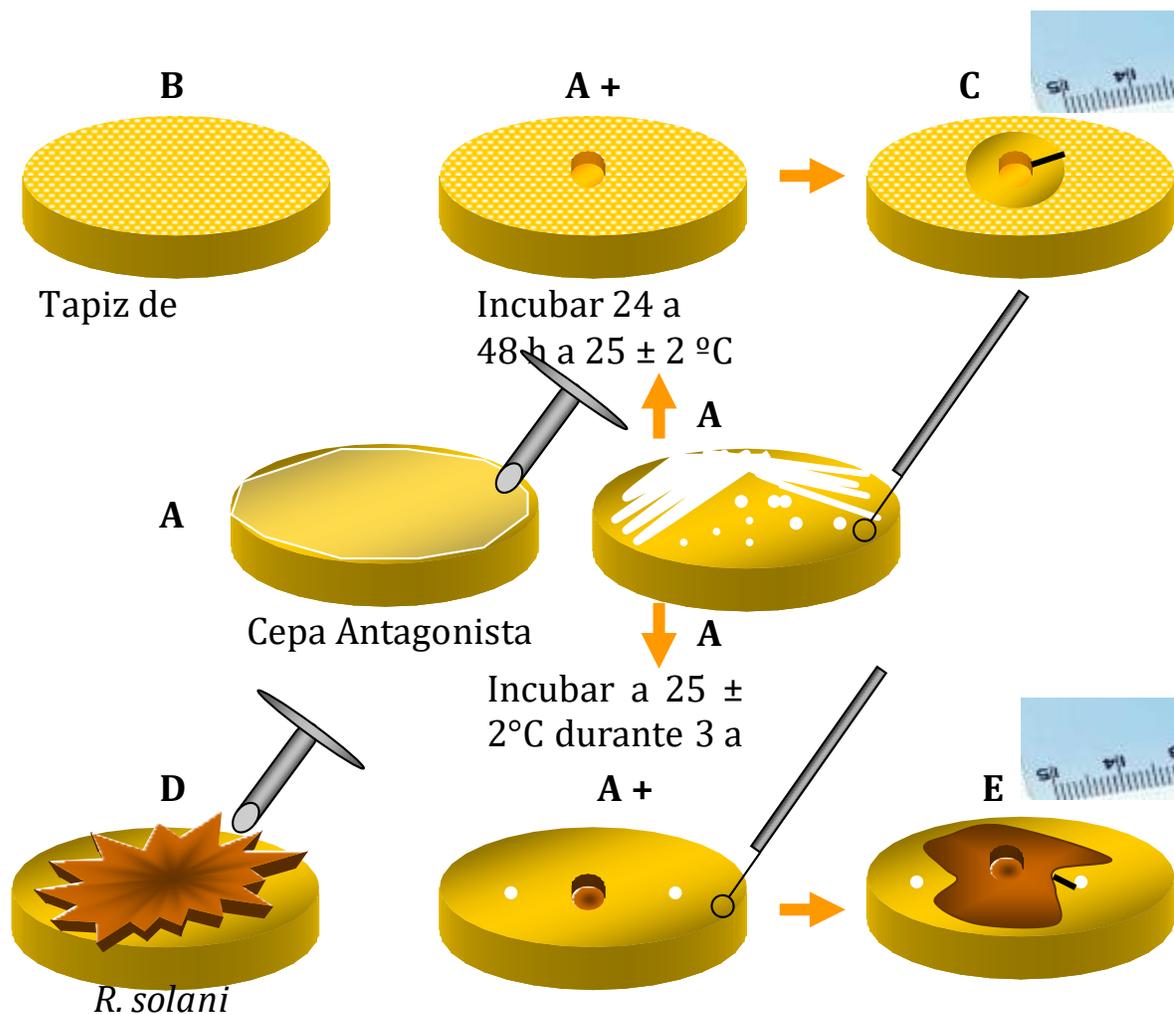


Figura 2. Esquema de las placas de pruebas de antagonismos. La figura ilustra la metodología utilizada para las pruebas de antagonismo contra los agentes fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani*, bajo condiciones *in vitro* sobre placas de agar papa dextrosa. La presencia de halos de inhibición o la detención del crecimiento de los agentes se consideró como prueba positiva. A: placa con cepa de *Bacillus* sp. antagonista, B: placa APD con *E. carotovora*, C: halo de inhibición de

enfrentamiento de *Bacillus* sp. con *E. carotovora*, D: placa APD con *R. solani*, E: halo de inhibición de enfrentamiento de *Bacillus* sp. con *R. solani*.

3.2.3. Identificación de cepas antagonistas.

Las cepas antagonistas utilizadas en la presente investigación y que actúan contra los agentes fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani* fueron tipificadas con técnicas de biología molecular. La técnica elegida es amplificación del gen ribosomal 16 S por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR).

A continuación se describen las técnicas de biología molecular utilizadas para la identificación de las cepas antagonistas y en la Figura 3, se indica un esquema de los pasos seguidos.

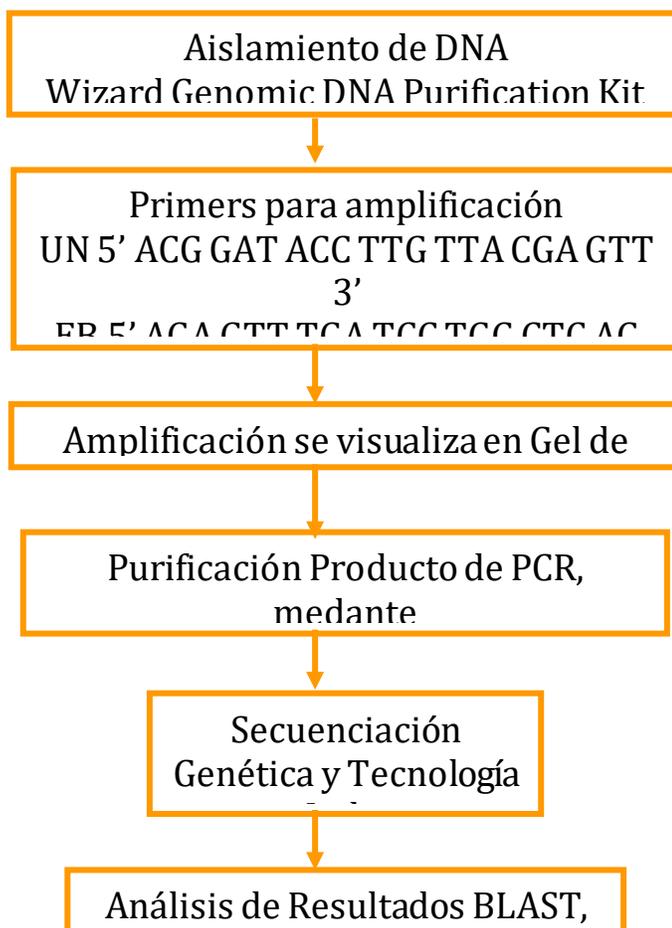


Figura 3. Organigrama de la identificación de Bacterias antagonistas por amplificación del gen ribosomal 16 S por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR).

3.2.3.1. Extracción de DNA genómico bacteriano.

Las cepas antagonistas en estudio fueron identificadas mediante la secuenciación de 16S rDNA. Mediante PCR fingerprint, la extracción de DNA de las cepas antagonistas se preparó a partir de un cultivo bacteriano de 48 h en CP de la cepa respectiva, para ello se utilizó Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acuerdo a Souto *et al.* (2004).

3.2.3.2. Aislamiento de DNA genómico con Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega).

1. Agregue 1 mL de un cultivo bacteriano de una noche a un tubo microcentrifuga de 1,5 mL.
2. Centrifugar a 13.000-16.000 × g por 2 minutos para obtener un pellet de las células. Remover el sobrenadante.
3. Resuspender las células en 480 µL de EDTA 50 mM.
4. Resuspender el pellet celular en un volumen total de 120 µL de lizosima (10 mg/mL), mezclar lentamente. El propósito de este tratamiento previo es debilitar la pared de celular para una lisis eficiente.
5. Incubar la muestra a 37°C por 30-60 minutos. Centrifugar por 2 minutos a 13.000-16.000 × g y remover el sobrenadante.
6. Agregar 600 µL de la solución de lisis nuclear. Pipetear suavemente para resuspender las células.

7. Incubar a 80°C por 5 minutos para lisar las células; enfriar a temperatura ambiente.
8. Agregar 3 μL de la solución RNasa para lisar las células. Invertir el tubo 2-5 veces para mezclar.
9. Incubar a 37°C por 15-60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
10. Agregar 200 μL de la solución de precipitación de proteína al lisado celular tratado con RNasa. Mezclar en vortex por 20 segundos para mezclar la solución de precipitación de proteína con el lisado celular.
11. Incubar la muestra en hielo por 5 minutos.
12. Centrifugar a 13.000-16.000 \times g por 3 minutos.
13. Transferir el sobrenadante que contiene la DNA a un tubo microcentrifuga limpio de 1,5 mL que contiene 600 μL de isopropanol a temperatura ambiente.
14. Mezclar lentamente invirtiendo el tubo hasta observar filamentos de DNA en forma de masa.
15. Centrifugar a 13.000-16.000 \times g por 2 minutos.
16. Vertir cuidadosamente el sobrenadante y drenar el tubo en papel absorbente limpio. Agregar 600 μL de etanol 70% a temperatura ambiente e invertir suavemente el tubo varias veces para lavar el pellet de DNA.
17. Centrifugar a 13.000-16.000 \times g por 2 minutos. Aspirar cuidadosamente el etanol.

18. Drenar el tubo en papel absorbente limpio y permitir que el pellet se seque al aire por 10-15 minutos.

19. Agregar 100 μL de la Solución de Rehidratación de DNA al tubo y rehidratar el DNA, incubar a 65°C por 1 hora. Mezclar periódicamente la solución suavemente golpeando ligeramente el tubo. Alternativamente, rehidratar el DNA e incubar la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4°C .

20. Almacenar el DNA a $2-8^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.3. Amplificación gen ribosomal 16S.

Los primers que se utilizaron para la amplificación son los siguientes: UN 5' ACG GAT ACC TTG TTA CGA GTT 3' y EB 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3', estos son capaces de amplificar el DNA de cualquier eubacteria.

Los componentes, volúmenes y concentraciones de la mezcla utilizada en PCR, se detalla a continuación en la Tabla1.

Tabla 1. Mezcla utilizada en la reacción de PCR para amplificar 16S rDNA.

Componentes	Concentración	Volumen (μL)	Concentración Final
Buffer PCR	10 X	5,0	1 X

MgCl ₂	50 mM	3,0	3,0 mM
DNTPs	10 mM c/u	2,0	0,4 mM c/u
Primer 1	50 pmol/μL	1,0	1,0 μM
Primer 2	50 pmol/ μL	1,0	1,0 μM
Taq polimerasa	5 U/ μL	0,2	1,0 U/ μL
DNA templado	100 ng aprox.	5,0	
H ₂ O		32,8	
Volumen Final		50,0	

El programa de amplificación se detalla a continuación:

- Denaturalización inicial: 3 min a 95 °C.

Posteriormente 35 Ciclos de PCR

- Denaturación: 1 min a 95 °C.
- Anneling: 1 min a 45 °C.
- Extensión: 1 min a 72 °C.
- Extensión final: 5 min a 72 °C.

Se empleó el termociclador modelo Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Los fragmentos obtenidos serán visualizados por electroforesis en gel de agarosa 0,8% en tampón TAE 1x, con tinción de bromuro de etidio y exposición a luz UV_{254nm}. Cada pocillo se cargo con 5 μL de muestra con 2 μL buffer de carga (Buffer de carga; 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; 30% glicerol). La electroforesis se

realizó a 0,07 A durante 1 h. Se utilizó el marcador de peso molecular comercial 1kb DNA Ladder (Fermentas) para comprobar la aparición de una banda de un peso molecular aproximado de 1.500 pb para cada una de las cepas.

3.2.3.4. Purificación del gen ribosomal 16S.

Para la extracción y purificación de DNA desde geles de agarosa se utilizó el kit comercial E.Z.N.A. Gel Extracción Kit (Omega Bio-Tek). El protocolo se detalla a continuación:

1. Recortar la banda que contiene DNA desde gel de agarosa.
2. Depositar la banda en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Pesar la banda. Se asume que la densidad es 1g/mL de gel. Agregar un volumen igual de Binding Buffer. Incubar a 55-60°C por 7 min o hasta que el gel se derrita totalmente. Mezclar con vortex cada 2 o 3 min.

Importante: Cuando el pH de la mezcla banda de gel/Binding Buffer aumenta sobre pH 8, se torna rojo o anaranjado y disminuye el producto DNA. Agregar 5 µL de acetato de sodio 5 M, para disminuir el pH. Luego, el color de la mezcla banda de gel/Binding Buffer debe ser amarillo.

3. Aplique 700 µL de la solución DNA/agarosa en una columna de DNA HiBinding ensamblada en un tubo de 2 mL (provisto por el kit),

centrifugar a 8.000-10.000 x g por 1 min a temperatura ambiente. Descartar el líquido. Para volúmenes mayores a 700 μ L, se debe cargar la columna con 700 μ L por vez. Cada columna HiBinding tiene una capacidad de extracción total de 25-30 μ g de DNA. Si la producción es mayor, dividir la muestra en el número de columnas apropiado.

4. Descartar el líquido y agregar 300 μ L de Binding Buffer. Centrifugar a 10.000 x g por 1 min.

5. Lavar la columna HiBinding, agregar 700 μ L de SPW Buffer diluido con etanol absoluto en la columna y esperar 2 a 3 min. Centrifugar a 10.000 x g por 1 min a temperatura ambiente.

Nota: Concentrado de SPW Buffer debe ser diluido con etanol absoluto antes de usar.

6. **Opcional:** Descartar el líquido y repetir el paso 5.

7. Descartar el líquido y centrifugar la columna vacía por 1 min a 10.000 x g para secar la matriz de la columna. Este paso es crítico para obtención de producto DNA.

8. Depositar la columna en tubo eppendorf de 1,5 mL. Agregar 30-50 μ L (dependiendo de la concentración final deseada) de Buffer de Elusión o agua desionizada directamente sobre la matriz de la columna, centrifugar 1 min a 10.000 x g para eluir el DNA. Esto representa aproximadamente el 70% del DNA. Una segunda elusión opcional extraerá el DNA residual, pero a menor concentración.

Nota: La eficacia de la elusión de DNA de la columna depende del pH. Si se eluye el DNA con agua desionizada, asegurarse que el pH de esta sea alrededor de 8.

9. Producción y calidad de la DNA: Determinar la absorbancia de una dilución apropiada de la muestra a 260 nm y luego a 280 nm. La concentración de DNA se calcula como:

Concentración de DNA 260 = $A_{260} \times 50 \times$ factor de dilución ($\mu\text{g/mL}$).

3.2.3.5. Lectura y Análisis de Secuencias.

Posteriormente el DNA ribosomal 16S purificado se envió a secuenciar a la empresa Genética y Tecnología Ltda. (www.genytec.cl). Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de 16 S ADNr que se encuentran en la base de datos del GenBank mediante el software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, EUA).

El *DNA DataBank of Japan* (DDBJ), *The European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) y el NCBI forman el *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*. Esta base de datos dispone de una colección de aproximadamente 65.369.091.950 bases en 61.132.599 expedientes de secuencias en las divisiones tradicionales de GenBank y 80.369.977.826

bases en 17.960.667 expedientes de secuencias registradas con fecha agosto de 2006 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Estas tres organizaciones se intercambian datos diariamente siendo el objetivo común dar a conocer abiertamente la información obtenida individualmente y formar un GenBank a nivel mundial cada día más amplio.

Las alineaciones de las secuencias se realizaron mediante el software Clustal W de la EBI (European Bioinformatics Institut, Reino Unido, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). ClustalW es un programa para la alineación de secuencias de ADN o proteínas. Produce alineaciones de secuencias múltiples biológicamente significativas de secuencias divergentes. Calcula el mejor fósforo para seleccionar las secuencias, y las alinea hacia arriba para poder considerar las identidades, las semejanzas y las diferencias. Las relaciones evolutivas se pueden considerar vía la visión Cladogramas o Phylogramas.

3.2.4. Curvas de crecimiento.

Se estimó la curva de crecimiento a aquellas cepas de *Bacillus* sp. que evidencian mayor actividad de producto con capacidad antagonista en enfrentamiento en placa. Para ello, se realizó un cultivo primario de la cepa antagonista respectiva, a partir de placas de AP se extrajo una colonia, la que se inoculó en 5 mL de CBMM, se incubó en un shaker a 150 rpm, 25 ± 2 °C durante 48 h hasta alcanzar una D.O. 1. Este cultivo se inoculó en 500 mL de CBMM (al 1%) en un matraz Erlenmeyer de 1 L (Bernal *et al.* 2002). Posteriormente se incubó a 25 ± 2 °C a 150 rpm durante 5 días (Fig. 4).

Para estimar el crecimiento de la cepa antagonista de *Bacillus* sp., se extrajeron 3 mL aprox. del medio a intervalos de 4 h (4 veces al día) y 12 h durante 5 días, y a cada muestra se le determinó Densidad Óptica (D.O.) a 600 nm, también se realizaron recuentos en placas determinando las unidades formadoras de colonia por mL de medio (UFC/mL) por medio de diluciones seriadas y por último se probó actividad antagonista del medio filtrado (cada 12 h) contra ambos fitopatógenos (*E. carotovora* y *R. solani*). Para ello, muestras a cada intervalo de tiempo (12 h) de la medición para la curva de crecimiento, fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 min. Luego, se extrajo el sobrenadante con ayuda de una jeringa estéril y el contenido fue filtrado a través de filtro low protein binding de 0,22 μ m (Millipore). El filtrado obtenido se deposita en tubos estériles para su posterior análisis. Este filtrado se utilizó para los

enfrentamientos contra los fitopatógenos en estudio. Los halos de inhibición fueron medidos en mm como se describe a continuación, eligiendo así el intervalo de tiempo donde las cepas antagonistas presentan mayor inhibición. Estas pruebas se realizarán por duplicado.

Para el recuento en placa, se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^7 . De cada dilución se tomaron alícuotas de 0,1 mL que fueron sembradas en placas de AP por duplicado, éstas se incubaron a 25 ± 2 °C durante 48 h. Para el recuento total se seleccionarán las placas que contenían entre 30 y 300 colonias.

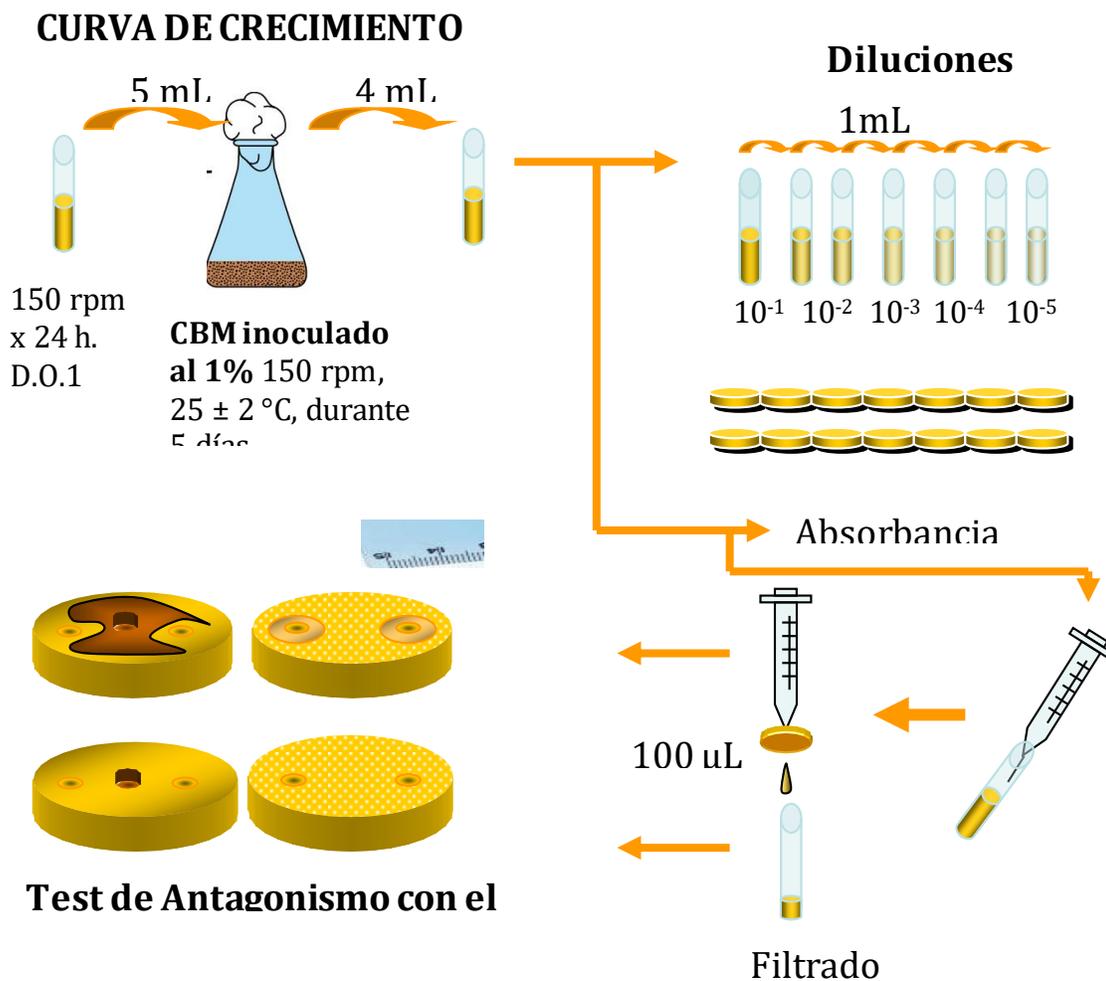


Figura 4. Esquema que muestra la metodología utilizada para la obtención de curvas de crecimiento de las cepas antagonistas en estudio. Los parámetros evaluados fueron: UFC/mL de medio, datos obtenidos mediante diluciones seriadas; A 600 nm y formación de halo de inhibición (cm), datos obtenidos de los enfrentamientos de los filtrados de las cepas de *Bacillus* evaluadas contra *E. carotovora* y *R. solani*.

3.2.5. Pruebas de antagonismo con el filtrado.

En esta sección se describen los métodos utilizados para probar la capacidad antagonista de los filtrados de las cepas bacterianas de *Bacillus* sp. en estudio (Fig. 4), según Bernal *et al.* (2002); Yu *et al.* (2002); Sadfi *et al.* (2002). En todos los métodos utilizados que se describen a continuación se evaluó la formación del halo de inhibición que presentan los filtrados de las bacterias en estudio contra el hongo *R. solani* y la bacteria fitopatógena *E. carotovora*.

- a) Sobre placas Petri con APD con una tórula estéril se extiende un tapiz de la bacteria antagonista *E. carotovora* desde una suspensión en CP o agua destilada estéril, éste tapiz se deja secar aproximadamente 20 min en cámara de flujo laminar. Después de seco el tapiz, en la periferia de la placa Petri se hicieron 2 pocillos con un sacabocado estéril de aproximadamente 1 cm de diámetro, en ellos se depositaron 100 µL del filtrado en estudio y se dejó secar aproximadamente por 20 min en cámara de flujo laminar. Posteriormente, la placa se incubó a 25 ± 2 °C durante 24 a 48 h. La prueba se realizó por duplicado.

b) En el centro de placas Petri conteniendo APD se depositó un disco de APD con *R. solani*. Mientras que en la periferia de la placa se hicieron 2 pocillos con un sacabocado estéril de aproximadamente 1 cm de diámetro, en ellos se depositaron 100 µL del filtrado en estudio y se dejó secar aproximadamente por 20 min en cámara de flujo laminar. Posteriormente, la placa se incubó a 25 ± 2 °C durante 3 a 5 días. La prueba se realizó por duplicado, más un testigo sólo con *R. solani* como control negativo.

3.2.6 Pruebas de estabilidad del filtrado.

Se probó la estabilidad de los filtrados de las cepas de *Bacillus* sp. de acuerdo al procedimiento descrito por Yu *et al.* (2002).

Estabilidad a la temperatura: el filtrado fue sometido a condiciones de esterilización (121 °C por 15min), también se expuso a -20 °C, 5 °C durante 48 h y a 80 °C durante 15 min. Las muestras fueron estabilizadas a temperatura ambiente y transcurrida 24 h se evaluó su actividad antagonista como se describió previamente (Punto 3.2.5.).

3.2.7. Proceso de purificación del compuesto antagonista.

A continuación se describe la metodología utilizada para la purificación de el o los compuesto(s) antagonista(s) de las cepas de *Bacillus* sp. en estudio. Los pasos a seguir son: Filtración, Ultrafiltración y HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión).

3.2.7.1. Estimación del peso molecular (Ultrafiltración).

Para estimar el peso molecular del metabolito antagonista, se utilizó el sistema de membrana Centriplus (YM-3, YM-10, YM-30 Centrifugal Filter Unit), correspondiente a 3 kDa, 10 kDa y 30kDa respectivamente, las fracciones obtenidas respectivamente filtradas y retenidas fueron sometidas a prueba de antagonismo (Sadfi y col., 2002). El procedimiento es el siguiente:

1. Desde matraces que contenían CBM inoculado al 1% con la cepa respectiva, se tomaron alícuotas y se depositaron en envases Falcon de 50 mL, estos fueron centrifugados a 9.000 rpm a T^o ambiente durante 15 min.

2. El sobrenadante de la cepa respectiva fue extraído cuidadosamente para ser filtrados mediante filtro low protein binding de 0,22 μm (Millepore). Con los filtrados obtenidos se procede como se indica en el punto 4.
3. Antes de utilizar el sistema de membranas Centriplus se debe agregar 0,5 mL de agua desionizada. Luego, se debe esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.
4. Alícuotas de 10 mL de la cepa respectiva se depositaron en la membrana Centriplus de 30 kDa y se centrifugaron durante 40 min a 25 °C a 3.000 g. Las fracciones filtradas y retenidas fueron sometidas a pruebas de antagonismo.
5. Las fracciones retenidas del procedimiento anterior, se depositaron en la membrana Centriplus de 10 kDa y se centrifugaron durante 90 min a 25 °C a 3.000 g. Las fracciones filtradas y retenidas fueron sometidas a pruebas de antagonismo.
6. Las fracciones retenidas del procedimiento anterior, se depositaron en la membrana Centriplus de 3 kDa y se centrifugaron durante 250 min a 25°C a 3.000 g. Las fracciones filtradas y retenidas fueron sometidas a pruebas de antagonismo.
7. Las fracciones filtradas del procedimiento anterior fueron liofilizadas, para ello se utilizó el Liofilizador LYOVAC GT2 (Instituto de Microbiología, UACH), las condiciones fueron presión 6×10^{-1} mbar durante 24 h a 20°C. Estos liofilizados fueron utilizados posteriormente para su separación mediante HPLC.

3.2.7.2. Espectro de absorción de la sustancia antagonista.

Con el fin de ajustar la absorbancia del equipo HPLC se realizó un espectro de absorbancia entre 190 y 350 nm en el Espectrofotómetro HP 8453 (Instituto de Bioquímica, UACH). Varios autores, concuerdan que los lipopéptidos producidos por *B. subtilis* absorben entre 210 y 280 nm.

3.2.7.3. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).

Las fracciones activas y liofilizadas obtenidas en el procedimiento anterior, fueron fraccionadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), y comparadas con Iturina A y Surfactina (Sigma). Para ello, se inyectaron 200 μL de las fracciones activas liofilizadas a una concentración de 100mg/mL, ésta concentración se ajustó con H_2O HPLC estéril. El equipo HPLC utilizado es Merck-Hitachi (Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ICYTAL, UACH). La columna utilizada es Columna Spherisorb S5 ODS2, 5 μm , 4,6 x 250 mm (Waters), monitoreada a 270 nm. El flujo fue de 1 mL min^{-1} con un gradiente lineal en metanol:agua (50:50 v/v) durante 0 a 10 min, metanol:agua aumentando

hasta llegar a (80:20 v/v) durante 11 a 21 min, metanol:agua (80:20 v/v) durante 22 a 26 min, luego de 26 a 32 min un aumento gradual de metanol hasta un 100% y por último de 33 a 36 min metanol:agua (50:50 v/v). Protocolo de acuerdo a Chitarra (2003) modificado. Fracciones individuales fueron colectadas manualmente y ensayadas para actividad antagonista como se indicó previamente.

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se describen en concordancia secuencial a los experimentos realizados y corresponden a: pruebas de antagonismo, identificación de las cepas antagonistas de *Bacillus* sp., curvas de crecimiento de las 5 mejores cepas antagonistas *Bacillus* sp. y finalmente aislamiento e identificación de los productos bacterianos responsables de la inhibición.

4.1. Pruebas de antagonismo.

En esta sección se describen los resultados obtenidos de las pruebas de antagonismo para los agentes fitopatógenos efectuadas bajo condiciones *in vitro* y por duplicado. Estas evaluaciones de inhibición se realizaron en placas con APD. La prueba consistió en evaluar la presencia de halos de inhibición, o la detención del crecimiento de las cepas de los agentes fitopatógenos utilizados. Los resultados obtenidos de estas evaluaciones, se describen en la Tabla 1 y la Figura 5.

Las cepas de *Bacillus* sp. que presentaron mayor actividad antagonista en los enfrentamientos contra los agentes fitopatógenos *R. solani* y *E. carotovora* realizadas bajo condiciones *in vitro* fueron las siguientes: MB2, MB5, MB42, MBP1, MBP2. Estas cepas fueron seleccionadas como las mejores antagonistas por presentar los mayores radios (mm). A todas ellas se les realizaron curvas de crecimiento y posteriormente se aisló la o las sustancias antagonistas. Cabe destacar la cepa PM 136 que presenta un halo mayor contra *E. carotovora* (11,5 mm), pero no presenta este mismo efecto contra *R. solani*, por este motivo no fue elegida dentro de las mejores cepas con actividad antagonista.

Tabla 2. Halos de inhibición generados por 12 cepas de *Bacillus* spp. sobre los agentes fitopatógenos *Erwinia carotovora* y *Rhizoctonia solani*. Cada cifra refleja el promedio de dos observaciones.

Cepas de <i>Bacillus</i> sp.	<i>Erwinia carotovora</i> Halos de inhibición (mm)	<i>Rhizoctonia solani</i> Halos de inhibición (mm)
MB2	8,5	8
MB5	11	9
MB19	10,5	4,5
MB42	9,5	5
MB55	7,5	4
MBP1	9,5	7,5
MBP2	9	8,5
PM04	5,5	4
PM10	8,5	6
PM28	10	7
PM136	11,5	1,5
A47	7,5	4

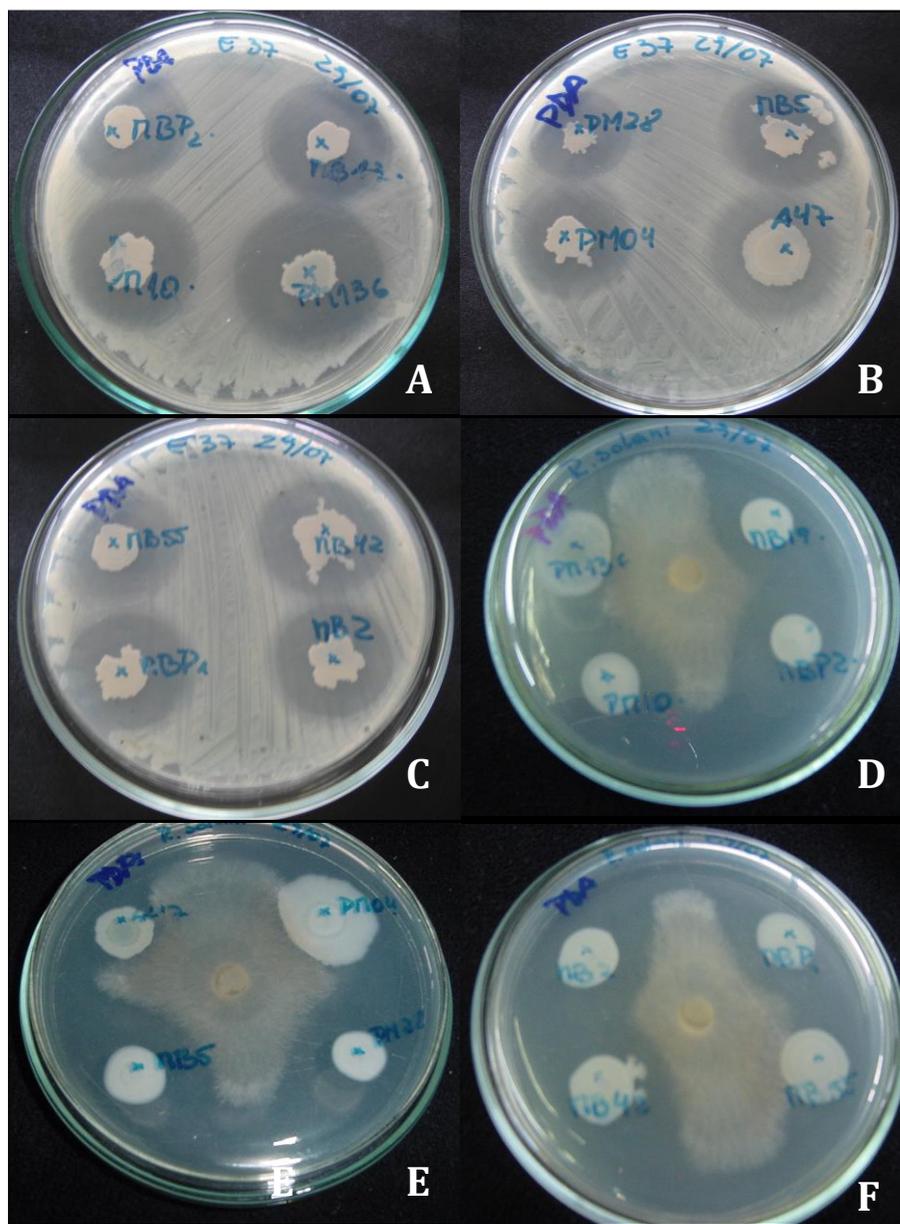


Figura 5. La figura ilustra los enfrentamientos en placa *in vitro* contra los agentes fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani*. A. Muestra las cepas antagonistas MBP2, MB19, PM10, PM136 contra *E. carotovora*. B. Muestra las cepas antagonistas PM28, MB5, PM04, A47 contra *E. carotovora*. C.

Muestra las cepas antagonistas MB55, MB42, MBP1, MB2 contra *E. carotovora*. D. Muestra las cepas antagonistas PM136, MB19, PM10, MBP2 contra *R. solani*. E. Muestra las cepas antagonistas A47, PM04, MB5, PM28 contra *R. solani*. F. Muestra las cepas antagonistas MB2, MBP1, MB42, MB55 contra *R. solani*.

4.2. Identificación de cepas antagonistas de *Bacillus* sp. mediante PCR.

A continuación se describen los resultados de los procesos de identificación de las cepas antagonistas de *Bacillus* sp mediante amplificación de 16S ADNr por PCR.

4.2.1. Amplificación y Producto de PCR.

En la Figura 6. se observa la fotografía del gel de agarosa de las muestras de 16S ADNr amplificado de cada cepa antagonista seleccionada. Los fragmentos obtenidos se visualizaron por electroforesis en gel al 0,8 %, con tinción de bromuro de etidio y exposición a luz UV_{254nm}. La comparación con el patrón de peso molecular demuestra que en todos los casos se obtuvieron bandas de aproximadamente 1.500 pb, que es el peso

molecular del 16S ADNr. La evaluación de las bandas permitió corroborar la integridad del ADN amplificado y descartar la presencia de artefactos de técnica.

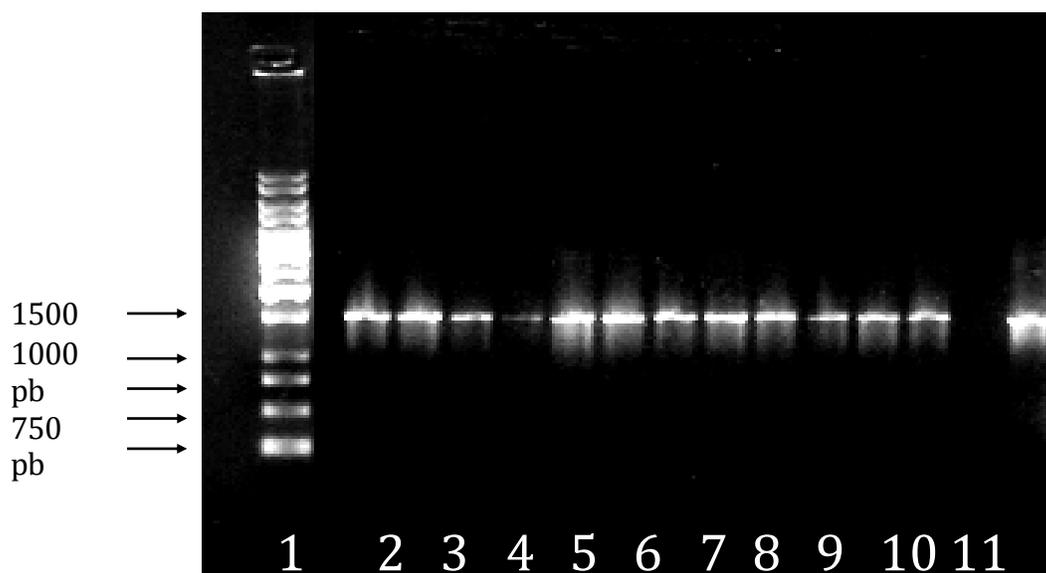


Figura. 6. Electroforesis del producto de PCR de 12 cepas de *Bacillus* sp. que evidenciaron antagonismo. Carriles: 1: Estándar 1kb DNA Ladder. 2: MB19. 3: MBP1. 4: MBP2. 5: MB5. 6: PM04. 7: PM28. 8: PM10. 9: MB2. 10: PM136. 11: A47. 12: MB55. 13: MB42. 14: CB (Control Blanco) y 15: C+ (Control positivo, gen 16S de *Vibrio* spp.).

4.2.2. Purificación del gen ribosmoal 16S.

En la Figura 7. se muestran los resultados obtenidos de la purificación del gen 16S DNAr extraído y purificado desde geles de agarosa mediante el kit comercial E.Z.N.A. (Gel Extracción Kit Omega Bio-Tek).

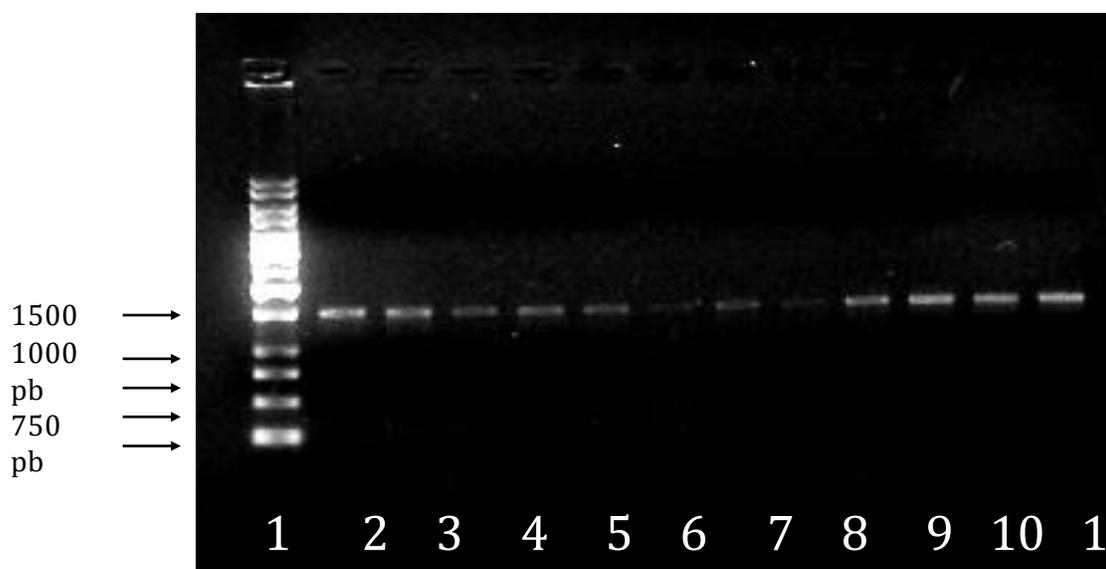


Figura 7. Electroforesis del producto de PCR de 12 cepas de *Bacillus* sp. que evidenciaron antagonismo. Carriles 1: Estándar 1kb DNA Ladder. 2: MB2. 3: MB42. 4: MB55. 5: PM136. 6: A47. 7: PM10. 8: MB19. 9: MB5. 10: PM28. 11: MBP1. 12: PM04. 13: MBP2

4.2.3. Identificación de secuencias.

Las secuencias obtenidas se compararon con aquellas de 16 S ADNr que se encuentran en la base de datos del GenBank mediante el software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, EUA).

La Tabla 3, muestra los resultados de la comparación de las secuencias de las 12 cepas antagonistas con los datos de la base del GenBank. En el Anexo 2 se encuentran las secuencias de las 12 cepas antagonistas en estudio.

Tabla. 3. Porcentajes de identidad de la secuencia molecular de los productos de las cepas antagonistas con la de *Bacillus subtilis* obtenida del banco de datos del NCBI. Cepas: (1) = MB55, (2) = PM28, (3) = PM10, (4) = PM04, (5) = MBP1, (6) = A47, (7) = MB5, (8) = MB19, (9) = MB42, (10) = MB2, (11) = MBP2, (12) = PM136, (13) = Cepa control *B. subtilis*.

Secuencias	Cepas de <i>Bacillus</i> sp.												<i>B.subtilis</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	-	94	91	98	96	97	81	98	97	98	97	98	97
2		-	88	93	96	94	77	94	93	93	94	92	92

									4				
3			-	91	89	94	85	91	9	90	91	92	91
									1				
4				-	96	96	81	98	9	97	97	97	97
									7				
5					-	95	80	95	9	95	95	95	94
									4				
6						-	84	97	9	96	96	96	96
									7				
7							-	84	8	82	83	81	77
									3				
8								-	9	98	99	98	99
									8				
9									-	97	99	98	99
10										-	97	98	98
11											-	98	99
12												-	98
13													-

Cabe destacar que todas las cepas presentan un porcentaje de identidad de la secuencia 16S de *B. subtilis* sobre un 90%, a excepción de la cepa antagonista MB5 (7) que presenta un porcentaje de 77%. Mientras que, las cepas antagonistas que más se asemejan son MBP2 (11), MB42 (9) y MB 19 (8) con un 99 % de similitud.

En cuanto a los distintos sistemas de identificación bacteriana, los resultados obtenidos por una combinación de Test API 50 CH y API 20E comparados con los obtenidos por la amplificación del gen ribosomal 16S, coinciden en que la cepa que presenta menor porcentaje de identidad, es MB5 con un 67,5% obtenida por API y un 77% obtenido por PCR (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de los porcentajes de identidad con el género *B. subtilis*, resultados obtenidos en la identificación de las cepas antagonistas de *Bacillus* spp. mediante la utilización de los sistemas de API y PCR.

Cepas de <i>Bacillus</i> sp.	API	Secuencia molecular (PCR)
MB2	93,2 (1)	98
MB5	67,6 (1)	77
MB19	75,5 (1)	99
MB42	67,6 (1)	99
MB55	84,1 (1)	97
MBP1	<i>Bacillus</i> sp. (1)	94
MBP2	<i>Bacillus</i> sp (1)	99
PM04	89,7 (2)	97
PM10	93,2 (2)	91

PM28	93,2 (2)	92
PM136	93,2 (2)	98
A47	<i>Bacillus</i> sp. (3)	96

(1) Identificación obtenida a partir de los resultados de Barría (2005).

(2) Identificación realizada por Méndez (2005).

(3) Identificación realizada por Silva (1992).

4.2.4. Cladograma

La Figura 8 muestra el cladograma que indica la relación filogenética de las cepas antagonistas en estudio comparadas con la secuencia de *B. subtilis* (banco de genes NCBI). Asimismo, se compara con otros géneros bacterianos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Bacterium*, *Vibrio cholerae* y *Bacillus amyloliquefaciens*. Se puede observar que la totalidad de las cepas en estudio pertenecen a la rama de *B. subtilis*, siendo las cepas más cercanas filogenéticamente identificadas como MB42 y MBP2, lo que coincide con la identificación molecular con 99% de identidad con *B. subtilis*. Por otro lado, las cepas que presentan más distancia filogenética son MB5 y PM10 y fueron identificadas molecularmente con un 77% y 91% respectivamente. Estas presentaron el porcentaje más bajo de identidad con *B. subtilis*.

De acuerdo a los datos obtenidos en 4.2.3. y 4.2.4. se puede concluir que las doce cepas antagonistas identificadas previamente como *Bacillus*

sp. utilizadas en la presente investigación, corresponden a *Bacillus subtilis*.



Figura. 8. Cladograma que indica la relación filogenética de las cepas antagonistas comparadas con *B. subtilis* y otros géneros bacterianos tales como: *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacterium*, *V. cholera* y *B. amyloliquefaciens*. Las cepas en estudio evidenciaron una mayor relación con *B. subtilis*.

4.3. Curvas de crecimiento.

A continuación se presentan las curvas de crecimiento de las cepas de *B. subtilis* que evidenciaron mayor actividad de producto con capacidad antagonista en los enfrentamientos realizados en placa. Estas cepas son: MB2, MB5, MB42, MBP1 y MBP2. Los resultados se presentan en los Anexos 4, 5, 6, 7 y 8, respectivamente.

En las Figuras 9, 10, 11, 12 y 13 se muestran los gráficos de las curvas de crecimiento. En cada uno de ellos es posible además apreciar la actividad antagonista del filtrado obtenido para las 5 cepas en estudio.

En la Figura 9., se observa que la cepa MB2 alcanza la fase estacionaria entre 12 h de acuerdo a los datos de log UFC/mL y 24 h de acuerdo a A 600nm respectivamente, ya que presenta un pick a esos tiempos. Esto coincide con la aparición de los halos de inhibición contra *E. carotovora* a las 12 h e inhibición contra *E. carotovora* y *R. solani* a las 24 h. También se observa, que la inhibición que primero se presenta es contra *E. carotovora* y luego contra *R. solani*, predominando la inhibición contra éste último a lo largo del tiempo de evaluación. El mayor halo de inhibición para *E. carotovora* se observa a las 36 h con un promedio de 0,65 cm, mientras que el mayor halo de inhibición observado para *R. solani* se presenta a las 60 h (Figura 14) y 96 h con un promedio de 1,05

cm. Los datos oscilantes estimados para A 600nm, log UFC/mL y halos de inhibición contra ambos fitopatógenos, podrían deberse a la naturaleza de *B. subtilis*, ya que es capaz de formar endosporas y volver a germinar, éste proceso se vería reflejado a lo largo del tiempo en la curva de crecimiento.

En la Figura 10, se observa que la cepa MB5 alcanza la fase estacionaria entre 12 acuerdo a los datos de log UFC/mL y 24 h de acuerdo a A 600 nm respectivamente al igual que MB2, ya que presenta un pick a esos tiempos. Los halos de inhibición aparecen a las 24 de incubación, predominando la inhibición contra *E. carotovora* con 0,7 cm v/s la inhibición de *R. solani* con 0,4 cm. Al igual que con la cepa MB2 predomina la inhibición contra el hongo a lo largo del tiempo de evaluación. El mayor halo de inhibición para *E. carotovora* se observa a las 96 h con un promedio de 0,85 cm, mientras que el mayor halo de inhibición observado para *R. solani* se presenta a las 60 h (Figura 14) con un promedio de 1,35 cm. De acuerdo a los parámetros medidos, la fase estacionaria se presentaría más estable que la el de la cepa MB2 y los halos de inhibición obtenidos para ambos fitopatógenos serían mayores.

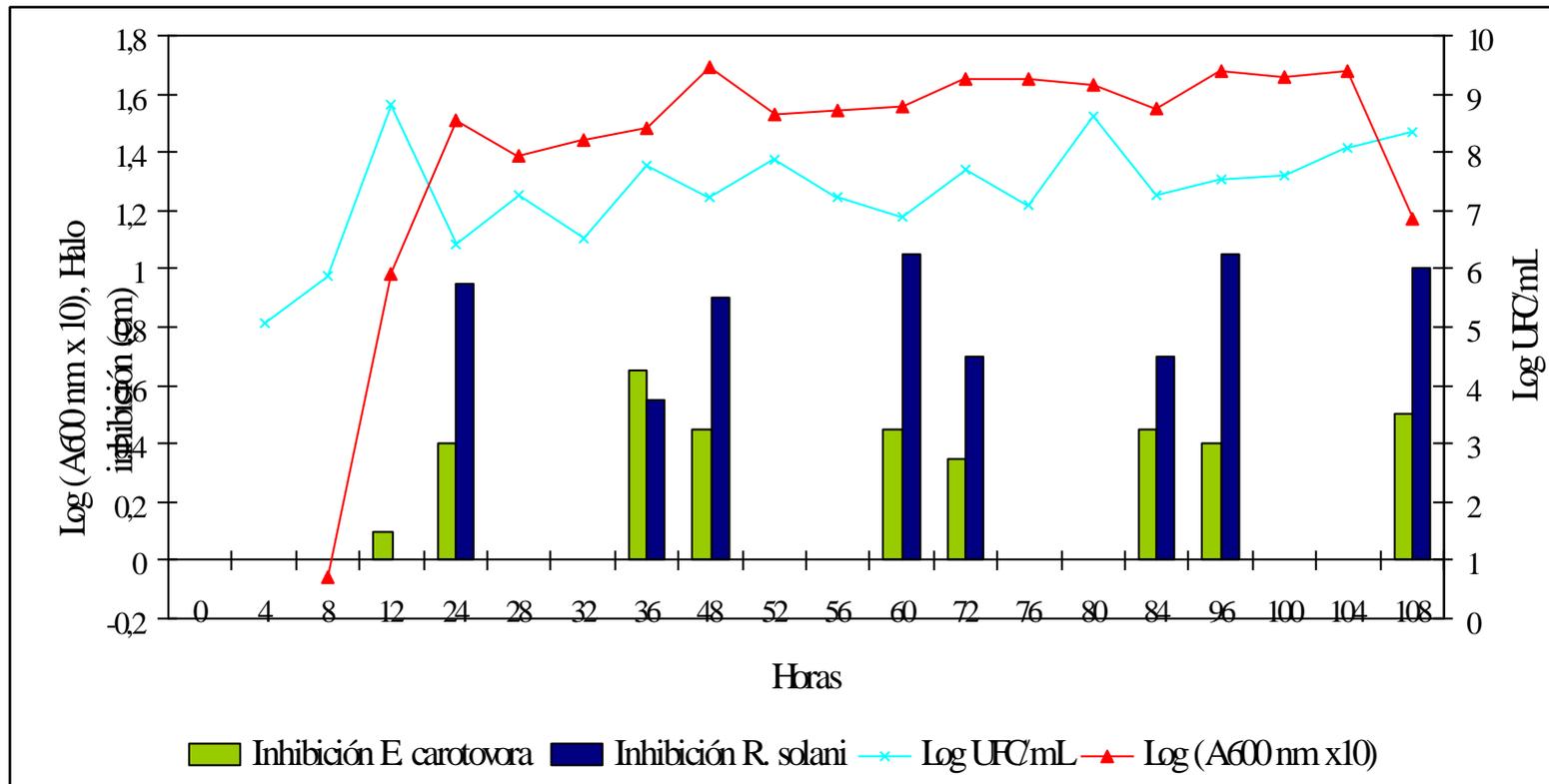


Figura 9. Curva de crecimiento de la cepa MB2. Los parámetros medidos fueron A 600 nm, el tamaño de la población (Log UFC/mL). Además se determinaron el tamaño de los halos de inhibición para los fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani*.

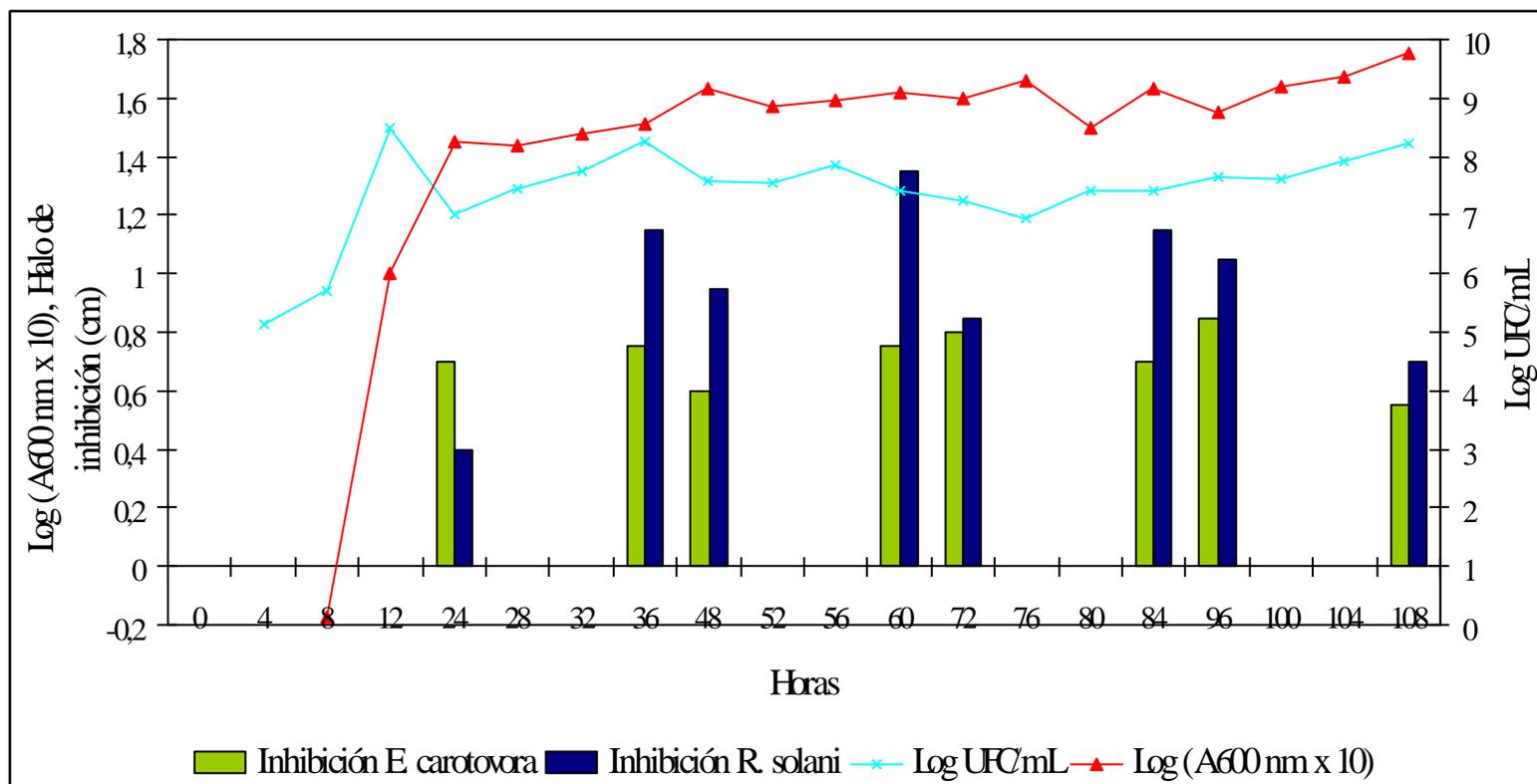


Figura 10. Curva de crecimiento de la cepa MB5. Los parámetros medidos fueron A 600 nm, el tamaño de la población (Log UFC/mL). Además se determinaron el tamaño de los halos de inhibición para los fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani*.

En la Figura 11, se observa que la cepa MB42 alcanza la fase estacionaria entre 12 y 24 h respectivamente al igual que las cepas anteriores, ya que presenta un pick a esos tiempos respectivamente. Esto coincide con la aparición de los halos de inhibición contra *E. carotovora* a las 12 h, e inhibición contra *E. carotovora* y *R. solani* a las 24 h. También se observa, que la inhibición que primero se presenta es contra *E. carotovora* al igual que con la cepa MB2 y luego contra *R. solani*, predominando la inhibición contra éste último a lo largo del tiempo de evaluación al igual que las anteriores cepas. El mayor halo de inhibición para *E. carotovora* se observa a las 24 h y 60 h (Figura 14) con un promedio de 0,9 cm respectivamente, mientras que el mayor halo de inhibición observado para *R. solani* se presenta a las 60 h (Figura 14) con un promedio de 1,25 cm. De acuerdo a los parámetros medidos, la fase estacionaria se presentaría más estable a contar desde las 48 h.

En la Figura 12, se observa que la cepa MBP1 alcanza la fase estacionaria entre 12 y 24 h respectivamente, al igual que las cepas anteriores, ya que presenta un pick a esos tiempos. Esto coincide con la aparición de los halos de inhibición contra *E. carotovora* a las 12 h, con un promedio de 0,5 cm, e inhibición contra *E. carotovora* y *R. solani* a las 24 h, con un promedio de 1 y 0,5 cm respectivamente. Claramente se observa el predominio de la inhibición contra *E. carotovora* en las primeras 36 h de evaluación, después de éste tiempo predomina la inhibición contra *R. solani*. El mayor halo de inhibición para *E. carotovora*

se observa a las 36 h con un promedio de 0,8 cm, mientras que el mayor halo de inhibición observado para *R. solani* se observa a las 96 h con un promedio de 1,25 cm. De acuerdo a los parámetros medidos, la fase estacionaria se presentaría a las 24 h, desde las 28 h se observa un nuevo crecimiento en la curva llegando a las 48 h de ahí en adelante se estabiliza la fase estacionaria.

En la Figura 13, se observa que la cepa MBP2 alcanza la fase estacionaria 24 h. Esto coincide con la aparición de los halos de inhibición contra *E. carotovora* y *R. solani* con un promedio de 0,85 y 0,75 cm respectivamente. A diferencia de las cepas anteriores se observa el predominio inhibición contra *E. carotovora* excepto a las 48 y 108 h. El mayor halo de inhibición para *E. carotovora* se observa a las 72 h con un promedio de 1,1 cm, mientras que el mayor halo de inhibición observado para *R. solani* fue a las 48 h con un promedio de halo de 0,95 cm. De acuerdo a los parámetros medidos, al igual que con la cepa MBP1, la fase estacionaria se presentaría a las 24 h, desde las 28 h se observa un nuevo crecimiento llegando a las 48 h de ahí en adelante se estabiliza la fase estacionaria.

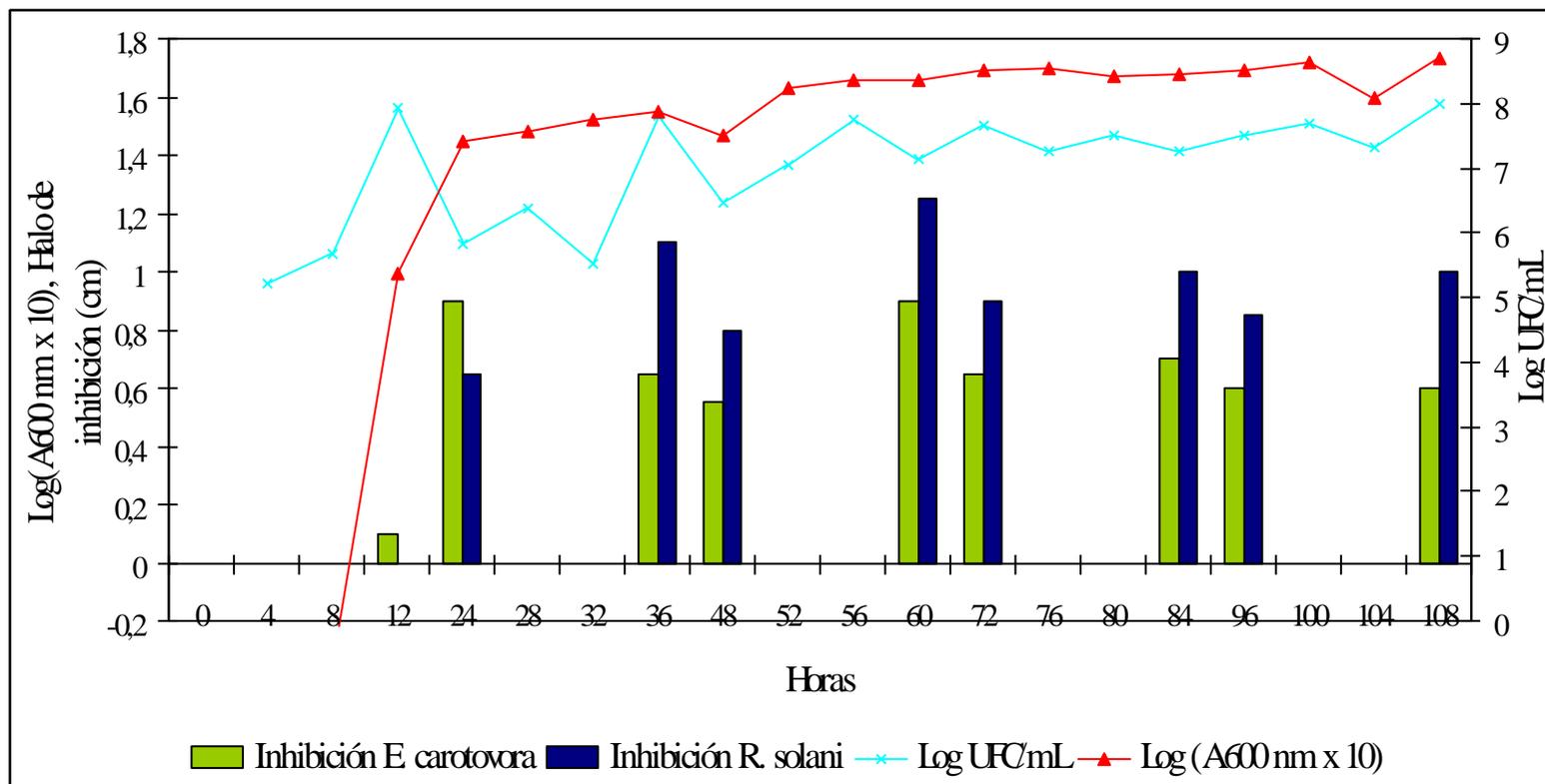


Figura 11. Curva de crecimiento de la cepa MB42. Los parámetros medidos fueron A 600 nm, el tamaño de la población (Log UFC/mL). Además se determinaron el tamaño de los halos de inhibición para los fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani*.

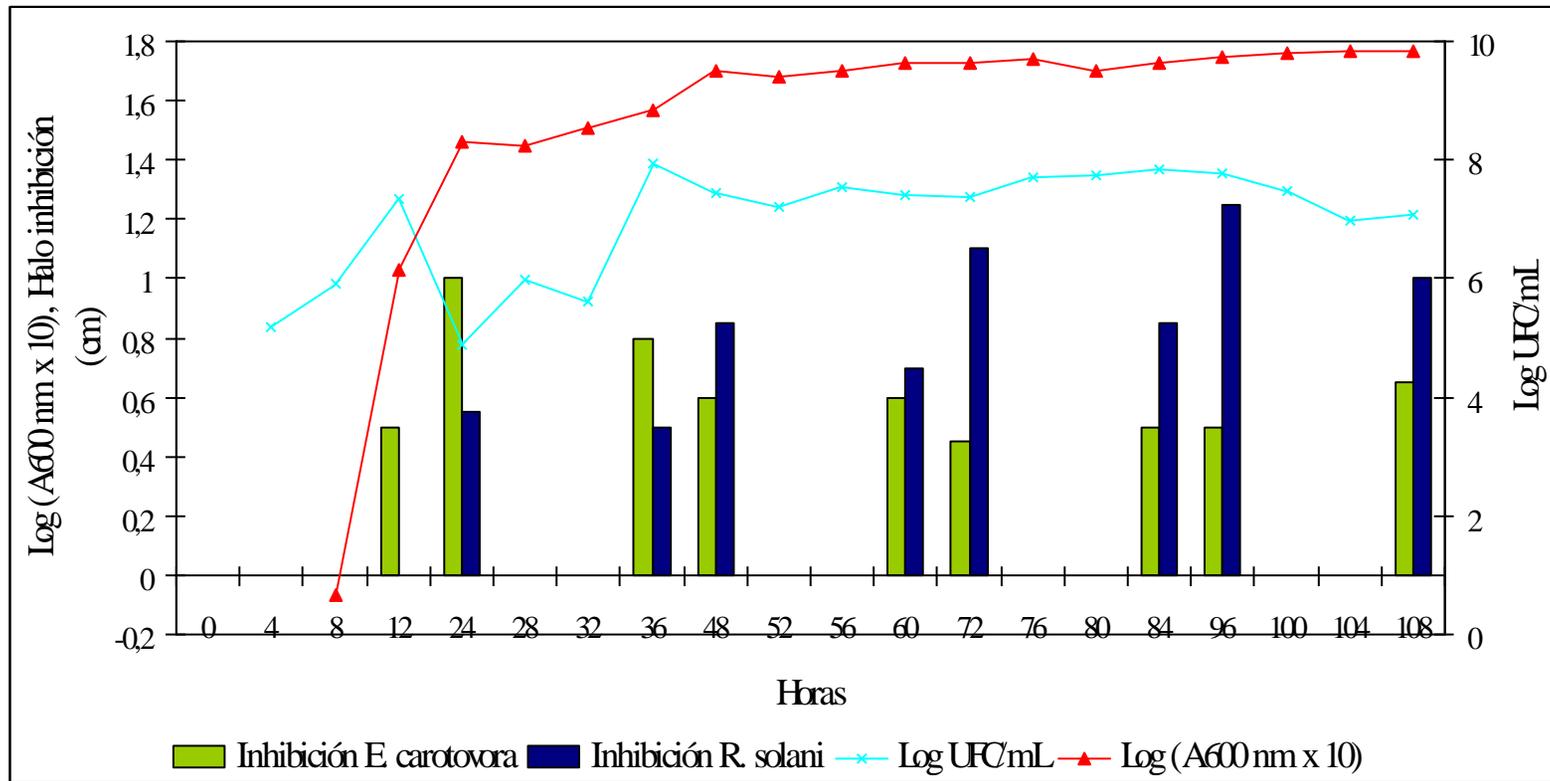


Figura 12. Curva de crecimiento de la cepa MBP1. Los parámetros medidos fueron A 600 nm, el tamaño de la población (Log UFC/mL). Además se determinaron el tamaño de los halos de inhibición para los fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani*.

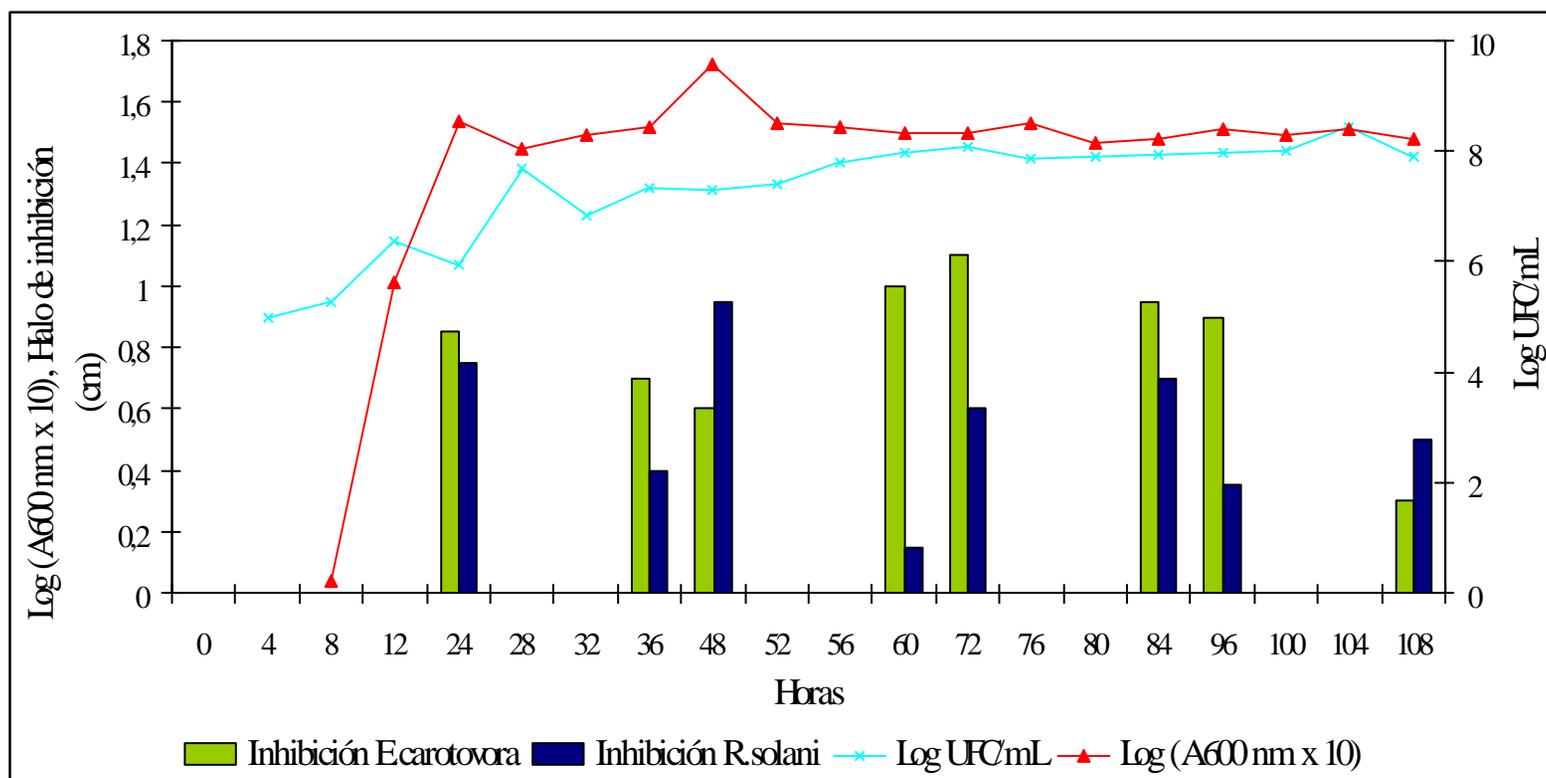


Figura 13. Curva de crecimiento de la cepa MBP2. Los parámetros medidos fueron A 600 nm, el tamaño de la población (Log UFC/mL). Además se determinaron el tamaño de los halos de inhibición para los fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani*.

La Figura 14, ilustra la fotografía de las pruebas de antagonismo con los filtrados realizadas a las 60 h de incubación. Este es el tiempo promedio donde se observó una mayor actividad antagonista contra los agentes fitopatógenos en estudio, para las 5 cepas antagonistas evaluadas.

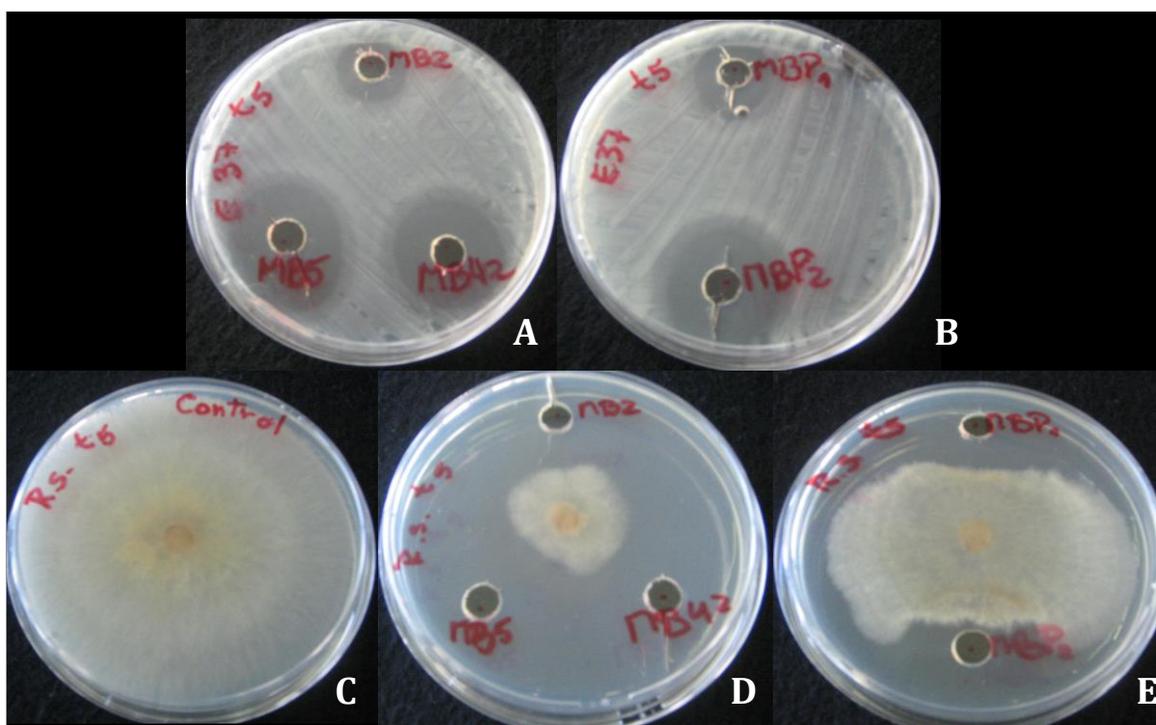


Figura 14. La Fotografía muestra las pruebas de antagonismo con los filtrados de las cepas de *Bacillus* sp. obtenidos a las 60 h de incubación contra los agentes fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani*. A. Muestra los filtrados de las cepas antagonistas MB2, MB5 y MB42 contra *E. carotovora*. B. Muestra los filtrados de las cepas antagonistas MBP1, MBP2 contra *E. carotovora*. C. Placa de APD con el hongo fitopatógenos *R. solani* como control de crecimiento de éste. D. Muestra los filtrados de las

cepas antagonistas MB2, MB5 y MB42 contra *R. solani*. E. Muestra los filtrados de las cepas antagonistas MBP1 y MBP2 contra *R. solani*.

4.4. Pruebas de estabilidad del filtrado.

Después de los distintos tratamientos térmicos, se observó que los filtrados conservan la actividad antagonista hasta ser expuestos a 80 °C contra *E.carotovora* y *R. solani* ensayados en placa de APD. También se aprecia un nulo antagonismo cuando se expusieron a 121°C durante 15 min (Tabla 5 y 6).

Tabla 5. Estabilidad de los filtrados a distintas temperaturas y posterior ensayo contra *Erwinia carotovora*.

T°/Cepas	MB2	MB5	MBP1	MBP2
-20 °C	+	+	+	+
5 °C	+	+	+	+
TA	+	+	+	+
80°C	+	+	+	+
121°C	-	-	-	-

+: halos de inhibición en mm.

- : no se observaron halos de inhibición.

Tabla 6. Estabilidad de los filtrados a distintas temperaturas y posterior ensayo contra *Rhizoctonia solani*.

T°/Cepas	MB2	MB5	MBP1	MBP2
-20 °C	+	+	+	+
5 °C	+	+	+	+
TA	+	+	+	+
80°C	+	+	+	+
121°C	-	-	-	-

+: halos de inhibición en mm.

- : no se observaron halos de inhibición.

4.5. Estimación del peso molecular (Ultrafiltración).

El peso molecular del metabolito antagonista se estimó utilizando el sistema de membrana Centriplus (YM-3, YM-10, YM-30 Centrifugal Filter Unit), correspondiente a 3 kDa, 10 kDa y 30 kDa respectivamente, las fracciones obtenidas respectivamente filtradas y retenidas fueron sometidas a pruebas de antagonismo (Tabla 7).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la o las sustancia(s) antagonista(s) de las 5 cepas evaluadas evidencian un peso molecular menor a 3 kDa.

Tabla 7. Actividad antagonista de los eventuales metabolitos de distintos pesos molecular (kDa) determinados en los filtrados de cepas de *Bacillus subtilis*.

Cepas/ Peso	+ 30 kDa	- 30 kDa	- 10 kDa	- 3 kDa
MB2	++	++	++	++
MB5	++	++	++	++
MB42	++	++	++	++
MBP1	++	++	++	++
MBP2	++	++	++	++

++: inhibición observada.

Como se observa en la Tabla 7, los metabolitos de peso molecular < 3 kDa mantienen la capacidad antagonista contra *E. carotovra* y *R. solani*.

4.6. Espectro de absorción de la sustancia antagonista.

El espectro de absorbancia realizado mostró actividad entre la longitud de onda (λ) de 190 y 350 nm. Cabe destacar que las cepas en estudio, al igual que Iturina A y Surfactina (Sigma) presentan un espectrograma similar, destacando un pick a aproximadamente 270 nm para todas las muestras evaluadas. Siendo Surfactina (Sigma) la que presentó una menor absorbancia. Es por éste motivo que se eligió la absorbancia de 270 nm para ajustar el programa en HPLC para la posterior separación de la sustancia antagonista (Figura 15).

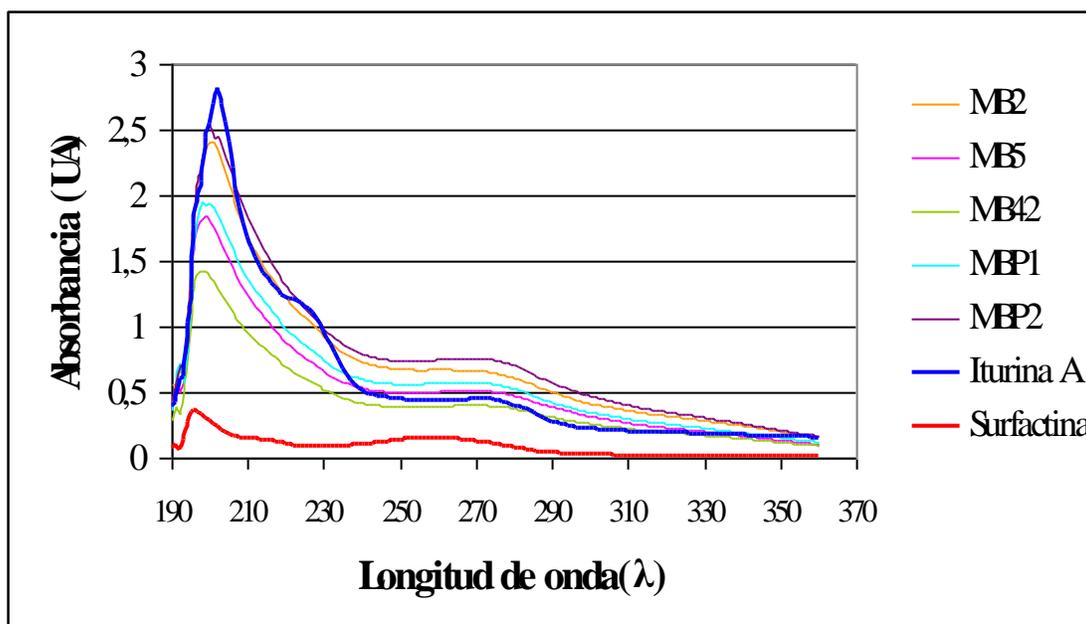


Figura 15. La Figura muestra el espectro de Absorbancia de los filtrados de las cepas antagonistas comparado con Iturina A y Surfactina (Sigma) realizado entre una longitud de onda (λ) de 190 y 350 nm.

4.7. Separación de la(s) sustancia(s) antagonista mediante HPLC (High pressure liquid chromatography).

A continuación, se presentan los cromatogramas obtenidos en HPLC (Figura 13 a 17).

La Figura 16, muestra el cromatograma obtenido para el filtrado de la cepa antagonista MB2. El mayor pick se puede observar a los 23 min, otros tres pick de menor tamaño entre 24 y 26 min, un quinto pick que coincide con los estándares Iturina A y Surfactina (Sigma) evaluados y un último pick a los 26,9 min que concuerda con el pick dado para Iturina A.

La Figura 17, muestra el cromatograma obtenido para el filtrado de la cepa antagonista MB5. A diferencia del cromatograma de MB2, hay dos pequeños pick, que coinciden con los estándares evaluados, pero a una muy pequeña concentración, ya que la altura de los picks es difícil de percibir en la gráfica, estos tienen una altura de 2,230 y 2,173 mV.

La Figura 18, muestra el cromatograma obtenido del filtrado de la cepa antagonista MB42. Se pueden observar ocho pequeños picks, siendo el séptimo y octavo pick concordantes con ambos estándares evaluados.

La Figura 19, muestra el cromatograma obtenido del filtrado de la cepa antagonista MBP1. En este cromatograma se puede observar claramente la concordancia de los picks del filtrado con los estándares Iturina A y Surfactina (Sigma) evaluados.

La Figura 20, muestra el cromatograma obtenido del filtrado de la cepa antagonista MBP2. Este cromatograma muestra un pequeño pick del

filtrado que concuerda con los picks de los estándares Iturina A y Surfactina (Sigma) evaluados.

Se tomaron fracciones de los 21 a 30 min, todas las fracciones fueron probadas para antagonismo en placas de APD con 30 μ L de la fracción evaluada de la cepa respectiva. Todas las fracciones presentaron antagonismo contra *E. carotovora*, mientras que sólo hubo una demora en el desarrollo de *R. solani*, quizás el inóculo de la fracción fue insuficiente.

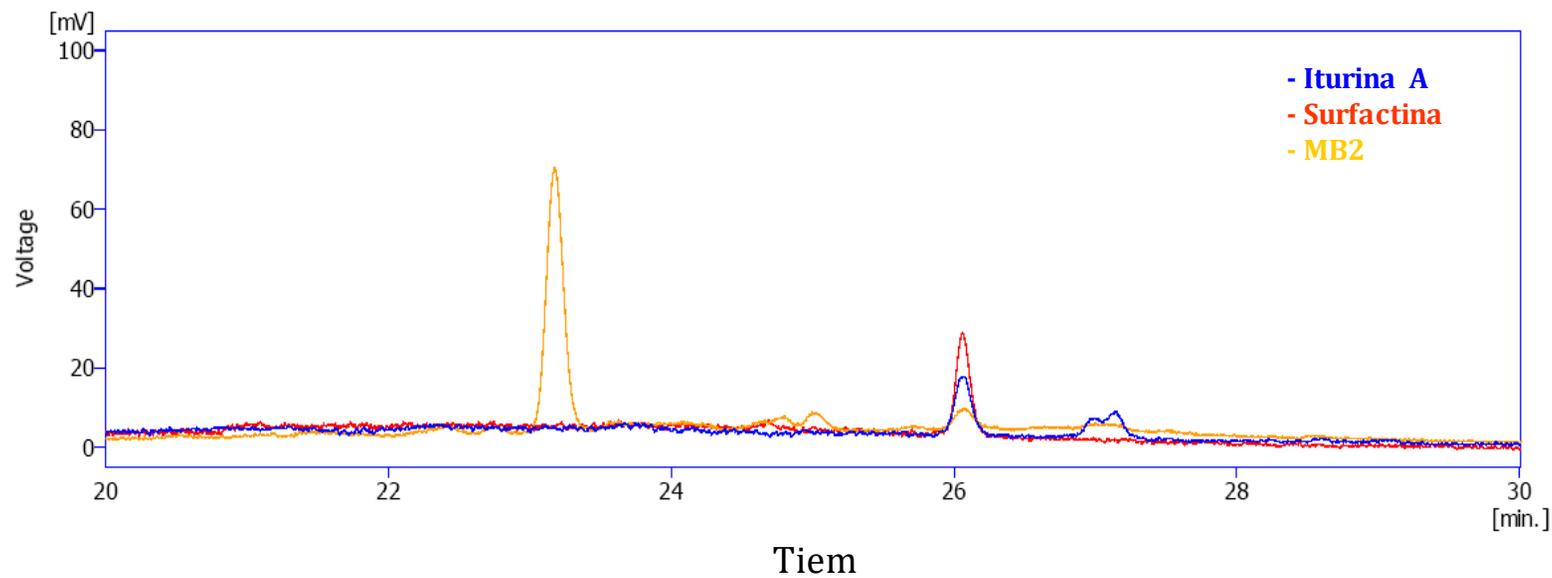


Figura. 16. Cromatograma del filtrado de la cepa antagonista MB2 comparada con los estándares utilizados Iturina A y Surfactina (Sigma).

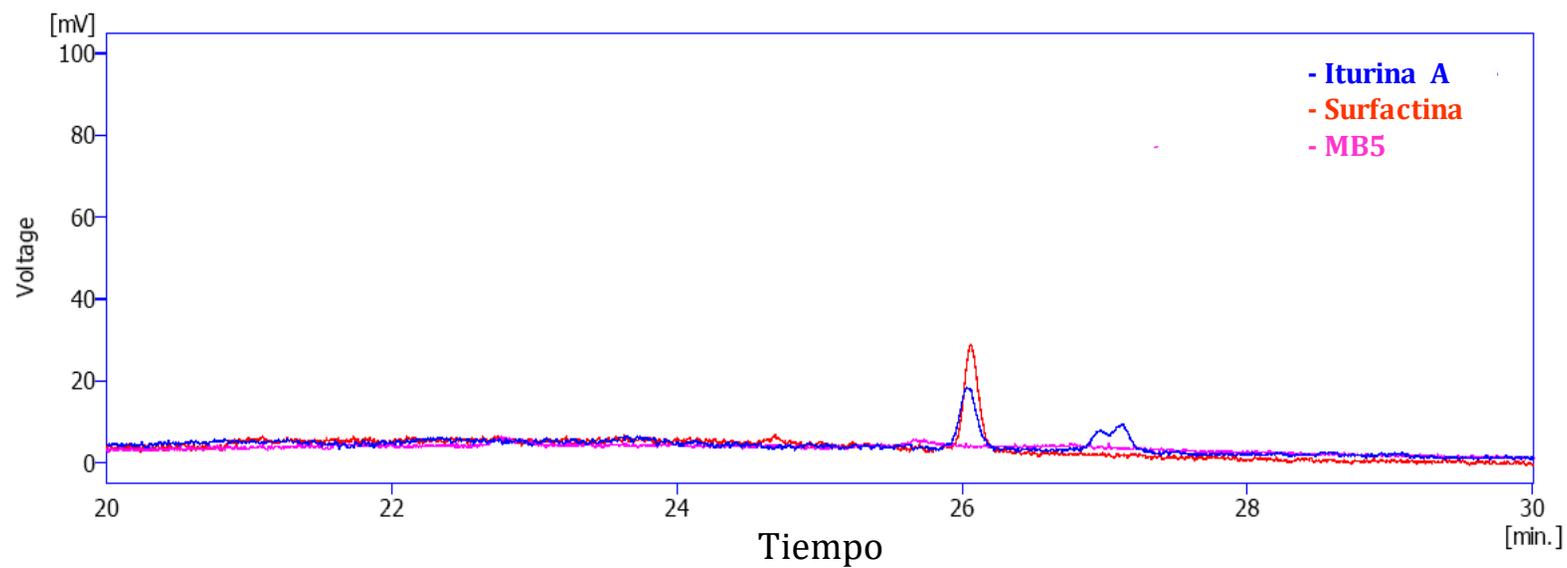


Figura. 17. Cromatograma del filtrado de la cepa antagonista MB5 comparada con los estándares utilizados Iturina A y Surfactina (Sigma).

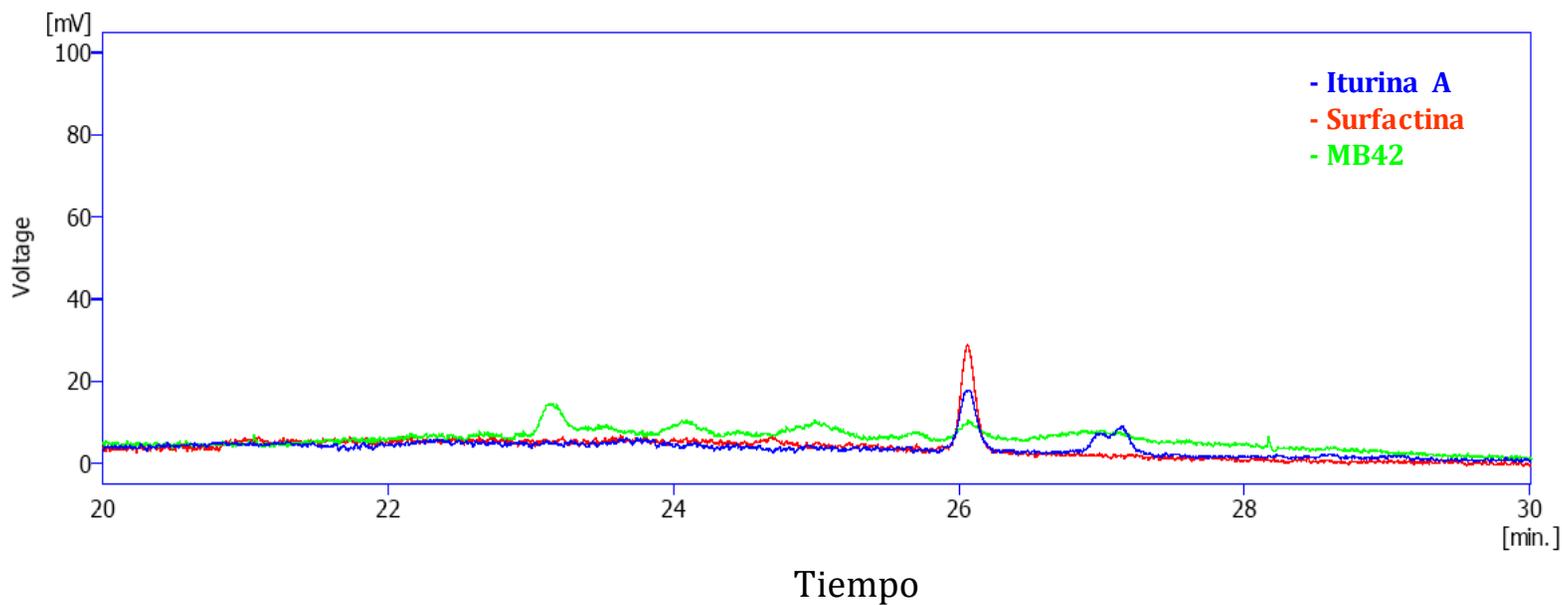


Figura. 18. Cromatograma del filtrado de la cepa antagonista MB42 comparada con los estándares utilizados Iturina A y Surfactina (Sigma).

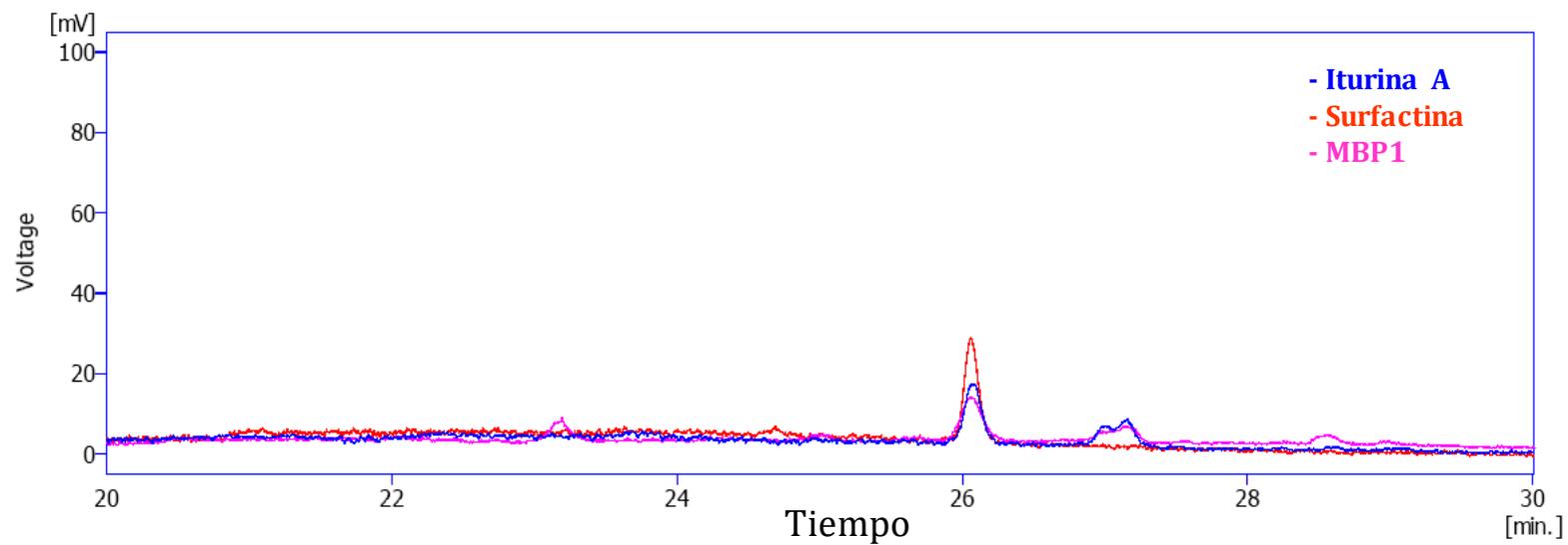


Figura. 19. Cromatograma del filtrado de la cepa antagonista MBP1 comparada con los estándares utilizados Iturina A y Surfactina (Sigma).

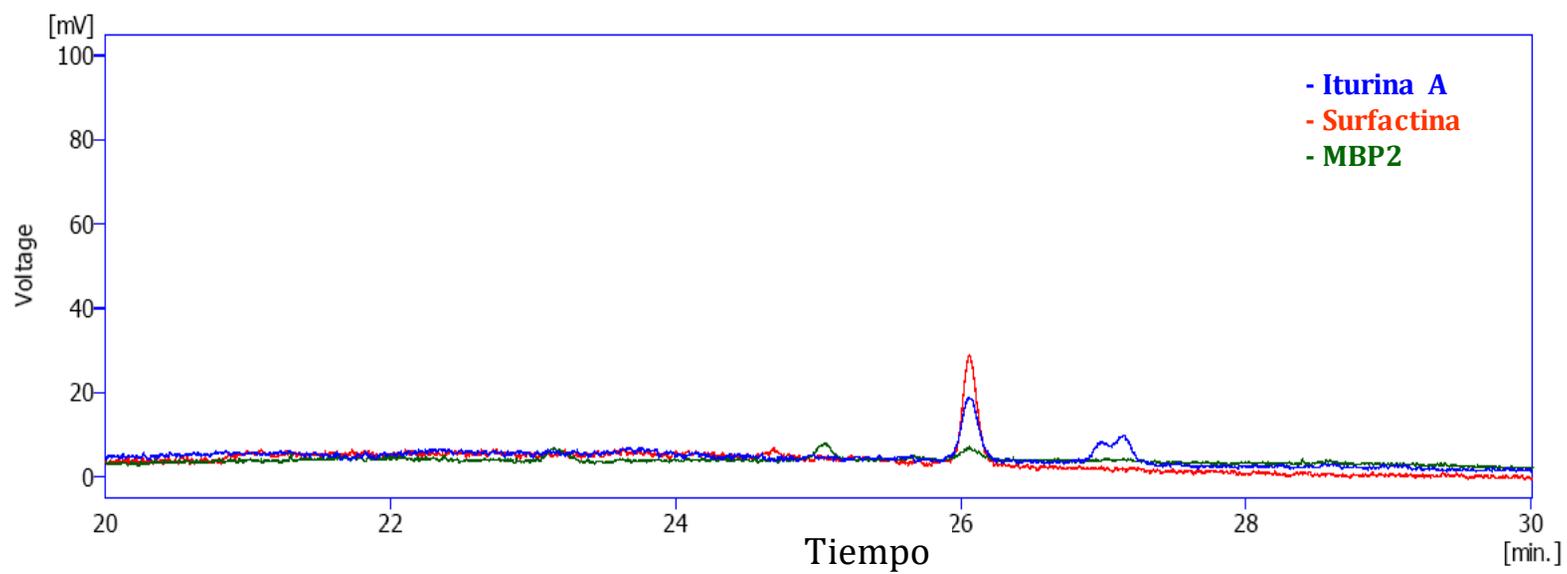


Figura. 20. Cromatograma del filtrado de la cepa antagonista MBP2 comparada con los estándares utilizados Iturina A y Surfactina (Sigma).

5. DISCUSIÓN.

El control de agentes fitopatógenos en agricultura es un desafío constante. Si bien, buenas prácticas culturales como lo son la elección de un suelo apropiado para las siembras, rotaciones de cultivos, y un buen manejo del agua constituyen prácticas que pueden disminuir la incidencia de agentes fitopatógenos. Asimismo, mediante la ingeniería genética también se pueden obtener variedades de cultivos resistentes a enfermedades. Todas estas son herramientas que entregan una primera línea de defensa contra los patógenos vegetales.

De igual manera, mediante el uso de pesticidas, también se colabora en la prevención del ataque de patógenos de vegetales. Sin embargo, este tipo de herramientas no son siempre productivas o económicamente sustentables. Por lo tanto, el control biológico surge como una alternativa a tales prácticas agronómicas, cuando éstas son escasas o no suficientes para el control eficaz de la enfermedad.

La utilización de microorganismos como controladores biológicos, no es una práctica reciente y en algunos casos se han utilizado desde hace varios años. Determinadas variantes como *Bacillus*, *Pseudomonas*,

6. CONCLUSIONES

1. Las 12 cepas en estudio corresponden a *B. subtilis* con un porcentaje de identidad sobre el 90%, siendo la cepa MB5 la más distinta con un 77% de identidad.
2. Las cepas que presentaron mayor actividad antagonista para *R. solani* y *E. carotovora* fueron las siguientes: MB2, MB5, MB42, MBP1, MBP2.
3. De acuerdo a las curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas de *B. subtilis*, exhiben tendencias similares, predominando la actividad antifúngica. Los filtrados obtenidos a las 60 h de incubación, presentan la mejor producción de metabolitos o sustancias con actividad antibiótica y antifúngica. Estas sustancias son estables hasta los 80 °C, tienen un peso molecular menor a 3 kDa y un pick máximo de absorción de aproximadamente 270 nm.
4. Los cromatogramas obtenidos a partir de los análisis de HPLC a que fueron sometidos los filtrados de las cepas antagonistas seleccionadas, indican que las cinco cepas de *B. subtilis* evaluadas presentaron actividad similar a los estándares Iturina A y Surfactina (Sigma), sugiriendo la síntesis de éstos por parte de las cepas en estudio. Sin embargo, la cepa MB5 evidenció una débil o nula similitud con los estándares evaluados. Por lo tanto, para conocer y elucidar los metabolitos con actividad inhibitoria de las cepas de

Bacillus subtilis se deben realizar análisis más específicos como la espectrometría de masa.

Pantoea, *Actinomyces*, *Serratia* y *Streptomyces* son reconocidos por suprimir enfermedades causadas por agentes fitopatógenos.

Los microorganismos utilizados en el biocontrol deben ser inocuos para la especie que se desea controlar. Asimismo, para otras no blanco y que se encuentran compartiendo el mismo hábitat en el medio ambiente.

La presente investigación tuvo como objetivo central el estudio de 12 cepas de *Bacillus* sp. de reconocido antagonismo hacia hongos y bacterias patógenas de plantas. En especial, la especie *B. subtilis* ha cobrado relevancia en los últimos años. En la actualidad, varias investigaciones apuntan a su formulación como biopesticidas. Las propiedades de esta cepa la hacen muy interesante para estos fines. Por ejemplo: la producción de una variedad de lipopéptidos antibióticos y antifúngicos, ser residente normal del suelo, presentar una alta viabilidad debido a la capacidad de formar endosporas resistentes a la desecación y al calor, y ser inocua a especies vegetales y animales. Estas connotaciones hacen que *B. subtilis* se pueda formular fácilmente en la construcción de productos estables, siendo un excelente candidato como controlador biológico.

Algunas de estas características, fueron estudiadas y evaluadas con las cepas utilizadas en este estudio. Es relevante hacer notar que todas ellas, poseen las connotaciones anteriormente descritas por varios

investigadores. Ejemplo de ello, es la actividad antagonista comprobada, y su resistencia al shock térmico.

En Chile, se encuentra una variedad de agentes fitopatógenos que afectan los cultivos. En particular, la presente investigación se enfoca en la bioprotección del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) contra los agentes fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani* patologías ampliamente tratadas en la Introducción. De acuerdo al INE (2007), la superficie sembrada de papa a nivel regional para el periodo 2004/05 alcanza a 17.010 hectáreas, seguida por la novena región con 15.620 hectáreas. Mientras que las intenciones de siembra de papa para el periodo 2006/2007 llega a 18.500 hectáreas seguidas de 17.700 hectáreas de la novena región de un total nacional de 63.960 hectáreas. El cultivo de papas a nivel nacional, se encuentra en cuarto lugar, después del cultivo de cereales como trigo, avena y maíz. Evidentemente que estas superficies destinadas a la producción de un bien agrícola y de consumo masivo e industrial como lo son los tubérculos, constituye un campo de acción interesante para aplicar un control biológico.

5.1. Pruebas de antagonismo.

El antagonismo biológico es definido por Cooky Baker (1983) como “la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o

durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar”. El control biológico de agentes fitopatógenos puede ocurrir por distintos mecanismos tales como: competencia de nutrientes o espacio entre un patógeno y especies inofensivas, parasitismo, producción de antibióticos (Faull, 1988; Yoshida y col., 2001) y toxinas o por la síntesis de enzimas que degradan la pared celular del huésped (Krechel y col., 2002).

En concordancia con los pensamientos anteriores y a la luz de los resultados obtenidos (punto 4.1) se puede apreciar que las cepas evaluadas concurren con sus actividades biológicas a este concepto. A este respecto, todas aquellas cepas de *Bacillus* sp. evaluadas presentaron actividad antagonista contra *E. carotovora* y *R. solani*. A excepción de la cepa PM 136 que presentó un mínimo halo de inhibición contra *R. solani*. Por lo tanto, los resultados señalan claramente que de un grupo de cepas evaluadas como lo son las utilizadas en este estudio, u otras que se puedan analizar bajo este mismo concepto, se tienen diferentes respuestas de antagonismo. Por lo tanto, la selección inicial frente a un agente fitopatógeno específico debe ser muy rigurosa.

Algunas de las cepas utilizadas en este estudio ya fueron identificadas con anterioridad por Barría (2005). Su investigación indica que las cepas MB2 y MB5 presentaron actividad antagonista contra una variedad de

hongos de importancia ambiental como son *R. solani*, *Saprolegnia* sp., *Mucor* sp. *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Botrytis* sp., *Trychophytum rubrum*, *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. Mientras que, la MB42, evidenció actividad antagonista contra *R. solani*, *Saprolegnia* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. Cabe destacar, si bien el espectro de estos dos grupos de cepas es amplio, al mismo tiempo es distinto por las especies que inhiben.

De acuerdo a Stein (2005), varias cepas de *B. subtilis*, presentan potencial de producir más de dos docenas de antibióticos con variedad de estructuras. Todos los genes que especifican la biosíntesis antibiótica en conjunto alcanzan a 350 kb, un promedio de cerca de 4% a 5% del genoma del *B. subtilis* se dedica a la producción antibiótica. Sin embargo, ninguna cepa los posee todos. De ahí, que se presentan marcadas diferencias de espectros antibióticos. Así mismo, se sugiere que *B. subtilis* posee la capacidad de adquirir DNA exógeno, mediante transferencia horizontal de material genético, por medio de fagos, plasmidos o DNA desnudo, esto podría ser responsable de la divergencia de espectro antibiótico dentro de una misma especie.

Según Barría (2005), las cepas MB2, MB5 y MB42 fueron aquellas que presentaron actividad antagonista contra el mayor número de hongos evaluados de un total de 10. Así mismo, éstas se destacaron por presentar los mayores halos de inhibición. Sin embargo, las MBP1 y MBP2 sólo

presentaron actividad antagonista contra el hongo *R. solani*. En este sentido, el halo de inhibición detectado correspondió al cuarto y quinto lugar respectivamente, después de MB2, MB5 y MB42. En la presente investigación, estas cinco cepas también fueron las que presentaron los mejores resultados para inhibir a *E. carotovora* y *R. solani*, éstas fueron seleccionadas para el aislamiento de la sustancia antagonista.

Estos resultados avalan la idea que dentro de un grupo de microorganismos antagónicos contra determinados agentes fitopatógenos, las respuestas son variables y las pruebas de inhibición deben ser orientadas al agente específico que se desea inhibir.

Mendez (2005) evaluó antagonismo contra la especie bacteriana *E. carotovora*, siendo las cepas de *Bacillus* sp. PM 04, PM10, PM28 y PM136 las que presentaron actividad antagonista, destacando la PM136 con una mayor actividad. Mientras que, Silva ya en el año 1992, identificó la cepa A 47 como pertenecientes al género *Bacillus* sp., la cual presentó actividad antagonista contra el hongo *B. cinerea*, y las especies de bacterias fitopatógenas *E. carotovora* y *P. solanacearum*.

Por su parte, Barría (2005) informó que las cepas MB5 y MB42 fueron aisladas desde las rizósferas de raíces de calas, MB2 a partir de tierras de cultivo de calas, MBP1 y MBP2 de musgo y tierra respectivamente. Las MB 19 y MB55 se obtuvieron desde tallo podrido de

planta y de hoja de calas que evidenciaban enfermedad respectivamente. Mientras que las cepas PM 04, PM10, PM28 y PM136 se aislaron desde hojas de arbustos y la última de hoja de árbol (Mendez, 2005). La cepa A47 fue aislada por Silva (1992) desde frutos sanos de frambueso. Estos antecedentes implican que una cepa antagonista que cause inhibición de cultivos activos de agentes fitopatógenos pueden tener un variado y disperso origen. Lo relevante en todos estos casos son las pruebas que se realizan para detectar el antagonismo y descartar las cepas que carecen de esta actividad.

La literatura recomienda, aislar el agente o agentes antagónicos preferentemente del órgano de la planta que se desea proteger, ó también del cultivo o producto que evidencie signos de enfermedad. Estos microambientes en la naturaleza se caracterizan por contener numerosas especies de microorganismos que están interactuando. Por lo tanto, representan una buena fuente para detectar aislamientos con características de antagonistas.

En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas contribuyendo así a que no se desarrolle la enfermedad en la mayoría de los casos. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas. De lo anteriormente señalado, se desprende que un buen lugar para buscar posibles cepas antagonistas sería desde

órganos o plantas que presenten la lesiones atribuibles a agentes fitopatógenos. Así mismo, de cualquier otra parte de la planta, principalmente, hojas, flores y frutos son fuentes de obtención utilizadas con mucha frecuencia ya que la flora en estos órganos es abundante y variada. La selección de cepas antagonistas realizadas por Barría (2005), Mendez (2005) y Silva (1992) concuerda con lo señalado, ya que las distintas cepas antagonistas provienen desde suelo, órganos sanos y enfermos, siendo estas cepas residentes normales de nuestros suelos.

Las cepas antagonistas evaluadas y utilizadas en el presente estudio pertenecen al cepario del Laboratorio de Fitopatología Vegetal (Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile). Todas ellas presentan actividad antagonista contra una amplia variedad de hongos, así como también de bacterias agentes causales de enfermedades en las plantas (Barría, 2005; Mendez, 2005 y Silva, 1992). Parece pertinente, estudiar en profundidad el modo de acción de este grupo de inhibidores, ya sea en pruebas de antagonismo en placa, como también en pruebas a nivel de campo. Principalmente de aquellas cepas que presentan mayor espectro antagonista. Asimismo, se debería estudiar las distintas maneras de aplicar o formular estas cepas o sus productos y probarlos a nivel de campo. Otra alternativa, evidentemente, es evaluar mediante Ingeniería genética, la transferencia de genes entre cepas para aumentar el antagonismo contra más fitopatógenos, así como también, evaluar la

capacidad de producir alimentos de carácter transgénico resistentes a una amplia variedad de enfermedades. Hay mucho que hacer, estas interrogantes podrían dar pie para futuras investigaciones.

5.2. Identificación de cepas antagonistas.

Mediante el uso de los primers universales UN y EB descritos por Barry y col. (1990), fue posible obtener la amplificación del gen 16S DNAr de las 12 cepas antagonistas de *Bacillus* sp. evaluadas. El producto amplificado fue de aproximadamente 1.500 pb para todas las cepas antagonistas, lo que concuerda con el tamaño de 16S DNAr para una amplia variedad de bacterias. Esto indica que las cepas en estudio poseen una secuencia homóloga conservada. Varias investigaciones han revelado que la secuencia del gen ribosomal 16S presenta regiones conservadas y entre ellas se encuentran algunas regiones que son hipervariables, las cuales contienen suficiente información para ser especie o género específicas (Jensen y col. 1993). Estas regiones variables son bien definidas y su rol se encuentra en la formación de estructuras secundarias o terciarias en 16S DNAr. El alineamiento de las secuencias de 16S DNAr, exhiben regiones variables denominadas V2 y V6, éstas presentan mayor

variabilidad entre las especies que otras regiones variables. Ambas regiones se encuentran flanqueadas por regiones conservadas. Barry y col., (1990), desarrollaron un método que permite establecer el tamaño de la secuencia de las regiones V2 y V6, el análisis de estas secuencias permitiría caracterizar en forma especie específica un grupo bacteriano, mediante la amplificación por PCR. Esta metodología se empleo en el estudio de las cepas antagonistas, utilizando lo primers R1 5'AATTGAAGAGTTTGATCATG3' y R2 5'ACATTACTCACCCGTCCGGC3' para amplificar la región V2 y para amplificar la región V6 se utilizaron los siguientes primers U1 5'GCAACGCGAAGAACCTTA3' y U2 5'ACATTACTCACCCGTCCGGC3'. El producto de PCR estimado para la región V2 es de 120 pb, mientras que para la región V6 corresponde a 100 pb. A diferencia de los resultados obtenidos por Barry y col., (1990) y Rodríguez (2002), las 12 cepas antagonistas de *Bacillus* sp. en estudio no presentaron amplificación, esto podría deberse a la complejidad de la estructura de 16S DNAr, ya que esta podría impedir la adecuada unión de los primers con la cepa que se quiere evaluar (Datos no mostrados).

El resultado de identificación obtenido a partir de la comparación de las secuencias 16S DNAr de las cepas antagonistas con las secuencias del programa BLAST de la base de datos de NCBI concuerdan con *B. subtilis* en su totalidad. En la Tabla 3, se muestra el valor del porcentaje de similitud, es el parámetro que asigna el análisis del programa Clustal W entre la secuencia problema *B. subtilis* y cada una de las cepas

antagonistas evaluadas. Las cepas antagonistas presentan un porcentaje de identidad sobre un 90% con *B. subtilis*, excepto la cepa antagonista MB5 que presenta un porcentaje de 77%. Mientras que, las cepas antagonistas que más se asemejan son MBP2, MB42 y MB 19 con un 99 % de similitud. . Se puede observar que para una única especie hay un grado de disimilitud, lo cuál demuestra que existe una gran variabilidad de las secuencias de estos microorganismos aún cuando pertenecen en la misma especie.

La identificación bacteriana realizada mediante una combinación de Test API 50 CH y API 20E, al ser comparados con los porcentajes de identidad obtenidos por amplificación de 16S DNAr son coincidentes en la cepa que presenta los menores porcentajes de identidad con ambas metodologías, correspondiendo la cepa MB5 con un 67,5% obtenida por API y un 77% obtenido por PCR (Tabla 4).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Souto y col., (2004) para identificar la cepa de *Bacillus* sp. con actividad antagonista contra *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*. Utilizaron API 50 CH obteniendo un 47% de identidad para *B. subtilis* y un 36% de identidad para *B. licheniformis*, con API 20E obtuvieron un 76,7 % de identidad con *B. subtilis*, 18,1% con *B. licheniformis* y un 3,7% con *B. amyloliquefaciens*. Utilizando amplificación por PCR de 16S DNAr la cepa dio como resultado una estrecha relación entre *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Mientras

que utilizando la amplificación por PCR de 16S-23S rRNA (Internal Spacer Region: ISR) y mediante rep-PCR (repetitive element PCR fingerprint) reveló que la cepa estudiada correspondería a *B. amyloliquefaciens*.

De los resultados obtenidos por Souto y col., (2004) y los de la presente investigación se desprende la complejidad de identificación del género *Bacillus* sp., no bastando para su identificación las pruebas de API, si no que se debe realizar un acabado estudio a nivel molecular de la cepa que se desea estudiar.

En la Figura 8 se puede observar el cladograma, este indica la relación filogenética entre las cepas antagonistas en estudio comparadas con la secuencia de *B. subtilis* (banco de genes NCBI), así también, con otros géneros bacterianos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Bacterium*, *Vibrio cholerae* y *Bacillus amyloliquefaciens*. La Figura muestra una estrecha relación de las cepas antagonistas evaluadas con *B. subtilis*, no así con *B. amyloliquefaciens*, ni con los demás géneros bacterianos. Cabe destacar que, varios autores (Souto y col., 2004; Touré y col., 2004; Yu y col., 2002; Yoshida y col., 2001) postulan que las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* estarían estrechamente relacionadas y se distinguen por el contenido de G+C. Por su parte, Dong y Côté (2003) determinaron la relación filogenética entre 46 especies de *Bacillus* y ocho especies bacterianas más distantes utilizando la amplificación por PCR de una combinación de 3' de 16S DNAr y 5' 16S-23S, ellos determinaron que *B.*

subtilis se encontraba en el mismo clusters que *B. amyloliquefaciens*, junto a *B. atrophaeus* y *B. mojavensis*, siendo estas cepas estrechamente relacionadas. Estos antecedentes, avalan la identificación de las cepas antagonistas del presente estudio como *B. subtilis*, observándose claramente en la Figura 8, que si bien *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* son estrechamente relacionados, éstos se encontrarían en clusters distintos.

Las cepas MB42 y MBP2 se encuentran filogenéticamente más cercana a *B. subtilis*, siendo estas identificadas con 99% de identidad. Por otro lado, las cepas que presentan más distancia filogenética son MB5 y PM10 y fueron identificadas molecularmente con un 77% y 91% respectivamente. Estas presentaron el porcentaje más bajo de identidad con *B. subtilis*.

Si bien, todas las cepas evaluadas en este estudio son identificadas como *B. subtilis*, los distintos porcentajes de identidad indican que hay un grado de disimilitud, es decir, variabilidad de las secuencias aún cuando pertenecen a la misma especie.

5.3. Curvas de crecimiento

Los estudios de la cinética de crecimiento de las cepas de *B. subtilis* que evidenciaron mayor actividad antagonista contra los agentes fitopatógenos *E. carotovora* y *R. solani* se exponen en el punto 4.3 (Resultados). Las cepas MB2, MB5 y MBP2 alcanzaron su máximo crecimiento, es decir finaliza su fase exponencial a las 12 h de acuerdo a los datos UFC/mL y a las 24h según A 600 nm. Estas cepas evidenciaron actividad antibiótica a las 12 h y actividad antifúngica a las 24 h, excepto la cepa MBP2 que evidenció actividad antifúngica y antibiótica a las 24 h. Asimismo, se puede observar en todas las curvas de crecimiento de cepas de *B. subtilis* la actividad antibiótica predomina al final de la fase logarítmica, en cambio, la actividad antifúngica predomina en la fase estacionaria. A excepción de la cepa MBP2 donde predomina la actividad antibiótica a lo largo de todo el ciclo de crecimiento.

Mientras que la estimación de UFC/mL y A 600 nm para la cepa MB42 alcanzo su máximo desarrollo a las 12 h y 36 h respectivamente. Evidenciando actividad antibiótica y antifúngica en la fase exponencial del ciclo de crecimiento. Sin embargo, la cepa MBP1 alcanzo su máximo desarrollo a las 12 h de acuerdo a la estimación de UFC/mL y a las 48 h según la medición de A 600 nm. Esta cepa evidencia una fuerte actividad antibiótica durante la fase exponencial, asimismo, también presenta actividad antifúngica, pero en menor medida. Sin embargo, su actividad antifúngica predomina en la fase estacionaria.

Estos resultados son coincidentes a los datos obtenidos por Ortega (1998), la cepa A 47 (*B. subtilis*) alcanza su máximo crecimiento a las 24 h en CBM. De igual manera, coinciden con los resultados obtenidos por Touré y col.(2004), donde la acción antibiótica producida por surfactina se produjo principalmente en la fase exponencial después de las 12 h. Sin embargo, la acción antifúngica de iturina y fengicina se sintetiza en la fase estacionaria con su máximo después de las 72 h.

Según Yoshida y col. (2001), la actividad antifúngica de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 produjo Iturina A 2, mostrando que su producción aumenta proporcionalmente con el número de células bacterianas, aumentado su actividad en la fase estacionaria. Esto coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación para la mayoría de las cepas de *B. subtilis* evaluadas, excepto para MBP2. La producción de antibióticos se sintetiza en la última fase del crecimiento exponencial o en el comienzo de la fase estacionaria.

En cambio, Bernal y col. (2002) con la cepa mutante de A 47 alcanzó su máximo crecimiento a las 120 h, esto podría deberse a la mutación propiamente tal o a los precursores para la formación de antibióticos presentes en el medio de cultivo.

Varios autores postulan, que el medio de cultivo utilizado para el cultivo de cepas antagonistas, debiera entregar precursores para la

síntesis de antibióticos. Según Yoshida y col. (2001), los compuestos antifúngicos producidos por *B. amyloliquefaciens* RC-2 pueden requerir peptona o varias clases de aminoácidos como substratos para su biosíntesis. Los resultados de Sadfi y col. (2002) con *B. cereus*, sugieren que la producción antifúngica hacia *F. roseum* var. *sambucinum* es inducida por la presencia del hongo patógeno, además, pareciera también depender de las características del medio y de las condiciones del crecimiento. De igual manera, otros autores sugieren que la producción de una gran cantidad de lipopéptidos, es dependiente de la composición de los medios de cultivos, donde la regulación catabólica e inducción aparecen generalmente como los mecanismos que controlan la biosíntesis de lipopéptidos (Yakimov y col., 1995; Fisher y col., 1991).

De acuerdo a Giacaman (2006), el medio CBMM utilizado en la presente investigación, tiene un alto valor nutritivo, aportando un 50,46 % de azúcares fermentables y un 53,83 % de azúcares reductoras, dentro de los cuales se encuentra glucosa, rafinosa y sacarosa, siendo ésta última la que se encuentra en mayor concentración (~ 45 %). Según Bronn, (1985) citado por Rehm y col. (1993) y a su vez citado por Giacaman (2006), la melaza, además de ser una buena fuente de carbono de fácil asimilación para el microorganismos, es un alimento rico en vitaminas del grupo B, contiene aminoácidos esenciales y minerales como calcio, sodio, cloro, magnesio, potasio, hierro y cobre.

5.4. Pruebas de estabilidad del filtrado.

En la presente investigación se evaluó la estabilidad del filtrado de las mismas cepas antagonistas de *B. subtilis* utilizadas en la curva de crecimiento. Los filtrados fueron sometidos a distintos tratamientos térmicos: se expusieron a condiciones de esterilización (121 °C por 15 min), a 80 °C por 15 min y a temperatura ambiente, 5 °C y -20 °C durante 48 h. Después de 24 h se realizaron pruebas de antagonismo con el filtrado. Se observó que el filtrado con actividad antagonista es estable hasta la exposición de 80 °C contra los fitopatógenos *E.carotovora* y *R. solani*. Estos resultados coinciden con los planteados por Sadfi y col. (2002) con cepas de *B. cereus*, ya que la actividad antagonista antifúngica es estable hasta los 80 °C, inactivándose a la exposición a 100 °C por 30 min y a 121 °C por 15 min.

Asimismo, Chitarra y col., (2003), da cuenta que el compuesto antifúngico producido por *B. subtilis* YM 10-20 es estable a la exposición a 70 °C y 100 °C, conserva su actividad antagonista contra *Penicillium roqueforti*.

Sin embargo, Yu y col. (2002), el filtrado de *B. amyloliquefaciens* con actividad antagonista contra *R. solani*, es estable a la exposición a 100 °C

por 30 min y reduce su actividad en un 40% al exponerlo a 121 °C durante 15 min.

5.5. Estimación de peso molecular.

El peso molecular del metabolito antagonista se estimó utilizando el sistema de membrana Centriplus (YM-3, YM-10, YM-30 Centrifugal Filter Unit), correspondiente a 3 kDa, 10 kDa y 30kDa respectivamente. Los resultados obtenidos, indican que la o las sustancia(s) antagonista(s) de las 5 cepas de *B. subtilis* evaluadas evidencian un peso molecular menor a 3 kDa, para ambos fitopatógenos al igual que los resultados obtenidos por Giacaman (2006) para la cepa de *Bacillus* sp. BC10. Esto coincide a lo expresado por Zuber y col. (1993) citado por Moyne y col. (2001) “muchos de los péptidos antifúngicos secretados por *B. subtilis* tienen un peso molecular de menos de 2000 Da”.

Algunos autores han determinado el peso molecular que tendría Iturina A. De acuerdo a Yu y col. 2002, detectaron un péptido identificado como Iturina A2 mediante espectrometría de masa se estimó un peso de 1042.5533. Asimismo, Peypoux y col. (1978) e Isogai y col. (1982), ambos citados por Yu y col. (2002), determinaron la fórmula molecular de Iturina A2 como $C_{48}H_{74}N_{12}O_{14}$ y calcularon que su masa es de 1042.5115.

Mientras que, Chitarra y col. (2003), estimaron mediante espectrometría de masa de picos de 1029, 1043, 1046, 1060, 1068, 1074 y 1082, concluyendo que el compuesto antagonista es similar a Iturina A.

Los resultados obtenidos en la presente investigación difieren a los obtenidos por Yu y col. (2002). Ellos utilizaron el sistema de ultrafiltración para reducir el volumen total de muestra y eliminar impurezas de mayor tamaño. Iturina fue retenida por una membrana de 300 kDa, pero no por la membrana de 1.000 kDa. Esto sugiere que la sustancia antagonista tendría un peso entre 300 y 1000 kDa. Esto podría deberse a la formación de agregados, tales como micelas o vesículas, que consisten en más de un monomero molecular.

Mientras que, por medio de experimentos de ultrafiltración Sadfi y col. (2002), observaron que la fracción con actividad antagonista de *B. cereus* pasa a través de la membrana de 20 kDa, aunque es retenida totalmente por la membrana de 10 kDa. A diferencia de Oscáriz y de Pisabarro (2000) citado por Sadfi y col. (2002), que encontraron actividad antagonista de *B. cereus* entre 3 y 10 kDa.

5.6. Espectro de absorción de la sustancia antagonista.

Varios autores, concuerdan que los lipopéptidos producidos por *B. subtilis* absorben entre 210 y 280 nm. De acuerdo a Murray (1990) citado por Giacaman (2006), indica que las proteínas en solución evidencian máximas absorbancias en el espectro UV a 280 y 210 nm, los aminoácidos con anillos aromáticos como triptófano, tirosina, fenilalanina e histidina son los responsables de la absorción a 280 nm, mientras que la absorbancia a 210 nm se debería a los enlaces peptídicos. Aunque el triptófano absorbe mucho más intensamente, normalmente hay muchos más residuos de tirosina en una proteína que triptófano, por lo cual la contribución de ambos suele ser similar. Tirosina presenta un máximo de absorbancia a 275 nm.

En el espectro de absorbancia que se muestra en la figura 12, se puede observar que las 5 fracciones antagonistas de < 3 kDa obtenidas de las cepas de *B. subtilis* en estudio, evidencian un espectrograma similar, al igual que Iturina A (Sigma). presentando un máximo a 275 nm aproximadamente para todas las muestras evaluadas. Siendo Surfactina (Sigma) la que presentó una menor absorbancia. Esto podría deberse a que iturina A presenta un residuo de tirosina en la posición 2 invariable, el que se detectó en el espectrograma, no así para surfactina que carece de tirosina en su estructura. Estos resultados coinciden a los obtenidos por Giacaman (2006).

5.7. Separación de la(s) sustancia(s) antagonista mediante HPLC.

En el punto 4.7 (Resultados), se muestran los cromatogramas obtenidos mediante la separación de la sustancia antagonista por HPLC. Las cinco cepas de *B. subtilis* evaluadas presentaron actividad similar a los estándares Iturina A y Surfactina (Sigma), sugiriendo la síntesis de éstos por parte de las cepas en estudio. Sin embargo, la cepa MB5 evidenció una débil o nula similitud con los estándares evaluados.

Chitarra y col. (2003), identificaron mediante HPLC y análisis de espectrometría de masa la presencia de iturina A producida por cepas de *B. subtilis*. Sin embargo, en la presente investigación utilizando la misma metodología descrita por Chitarra y col. (2003) no se pudo discriminar si las cepas de *B. subtilis* secretaban Iturina A, Surfactina o ambos u otro tipo de metabolito, ya que estos presentaban el mismo tiempo de retención. Esto podría deberse a que Chitarra y col. (2003) planificaron la metodología solamente para identificar Iturina A. Además, estos investigadores, al igual que muchos otros, confirmaron sus resultados utilizando espectrometría de masa, siendo esta última técnica, más sensible y certera para la identificación de lipopéptidos, los cuales presentan estructuras muy similares.

Hay que recordar que *Bacillus subtilis*, puede producir más de dos docenas de antibióticos con una variedad asombrosa de estructuras Stein (2005).

Quizás la cepa de *B. subtilis* MB5 evaluada en la presente investigación, produce otro tipo de lipopéptido o algún isómero de estos, como los descritos por Touré y col. (2004), ellos indicaron que *B. subtilis* GA1 coproduce tres familias de lipopéptidos. Estos fueron identificados como isómeros de fengicinas A C-14 a C-18 y fengicinas B C-17, iturinas A C-14 a C-17 y surfactinas C-13 a C-15. De igual manera, Moyne y col. (2001) reportaron que la cepa *B. subtilis* AU195 antagonista de *Aspergillus flavus*, sintetizaba una mezcla de dos análogos de bacilomicina D analizado con espectrometría de masa. Phister y col. (2004) detectaron 3 compuestos antimicrobianos iturina, bacilomicina y clorotetaina mediante HPLC y espectrometría de masa desde una cepa de *Bacillus* sp. Por su parte, Vater y col., 2002, revelaron surfactinas, iturinas y fengicinas aisladas desde *B. subtilis*, mediante espectrometría de masa MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight).

Sin embargo, Leelasuphakul y col. (2006), reportaron que la actividad antifúngica de *B. subtilis* se debería no sólo a compuestos antimicrobianos, sino que también, a la síntesis de la enzima 1,3 β glucanasa, donde la enzima ejercería un efecto sinérgico con el compuesto antimicrobiano.

El proceso de purificación de lipopéptidos producidos por *B. subtilis* es una tarea engorrosa. Varios autores han utilizado precipitación de lipopéptido con HCl, extracción con solventes orgánicos, además de varios procesos cromatográficos incluyendo HPLC y espectrometría de masa. Parece pertinente, recomendar la utilización de técnicas como espectrometría de masa, para la adecuada identificación de los lipopéptidos producidos por las cepas de *B. subtilis* evaluadas.

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis se considera que la hipótesis formulada se acepta como fue formulada.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agrios G. 1996. Fitopatología. 2° Ed. Mexico, Limusa. 838 p.

Ahimou F., Jacques P. y Deleu M. 2000. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enz. Microb. Technol.* 27: 749.

Apablaza G. 2000. Patología de cultivos, epidemiología y control holístico. Ed. Universidad Católica de Chile. 347 p.

Asaka O. y Shoda M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology.* 62(11): 4081-4085.

Bais H., Fall R. y Vivanco J. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *J. Plant. Physiol.* 134: 307-319.

Barría M. 2005. Antagonismo biológico en contra de hongos de importancia ambiental. Tesis de Pregrado. Escuela Tecnología Médica. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. 65 p.

ANEXO 1.

Tinción de Gram: permite diferenciar las bacterias por su afinidad a los colorantes utilizados en la tinción, lo que depende de las características de la pared celular.

Procedimiento: hacer un frotis a partir de un cultivo de la cepa bacteriana que se desea teñir, luego se cubre la preparación con violeta de genciana por 2 minutos, lavar con agua, cubrir con lugol por 1 minuto, lavar con alcohol acetona por 20 segundos, enseguida cubrir con safranina al 0.25% por 15 segundos, lavar con agua y observar al microscopio. Son Gram positivas las bacterias que se tiñen de color azul violeta y Gram negativas las bacterias que se tiñen de color rojizo.

ANEXO 2

A continuación se muestran las secuencias de las cepas antagonistas en estudio, estas se compararon con la base de datos de GenBank de NCBI.

MB2

CTTTGACATCCTCTTACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAG
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACT
 CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
 ATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAA
 GGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCCG
 GATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
 ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTNCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
 CACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACTTTTAGGAGCCA
 GCCGCGAAGGTGAA

MB5

CTTTGACATCCCTCGTCAACAGTTCCTAGAAGANTAGGGACCGTCCCNTTT
 CCTGGGGCCAGAGGTGACAAGGTGGGTGCAAGGGTTGTTGGTCAAGCCTCGC

ATTGNGTGAAATGGTTGGGAGTAAGTCCGCCTCATTCGATGCGGCCAACCCC
 CTTGATTGTAAAGTTGACCAAGCATTTTCAGGTTGGGCANCTTCTAAAGGNTG
 TCCTGCCCGGATGACAAGCCCGGGAGGGAAAGGGTGGGGAAGACGGGCAAAA
 CTCATCATTGCCCTCTTTATGACCTGGGCTACACCACGTGATACATAGGACA
 GAGCAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCT
 CAGTTCGGATCGCAGTGCTGCAACTCGCACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAG
 TAATTCGCGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTACCCGGGCCTTGTAAC
 ATCCGTCCCGTCACACNCACGGAGGAGTCTTGTANACANCCGGCAAGT

MB19

TCTTGACATCCTTCTGACAATCCTAGAAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAG
 AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGC
 ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
 ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAC
 AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGT
 TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
 CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTTCCCGGGCCTTGTAACACCGCCCG
 TCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTAGGA
 GCCAG

MB42

CTTTCTGGTAGGTCCCGCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTC
 CCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGGCGTTGC
 TCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG
 AGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGT
 ACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCCCGCG

GGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGG
 TTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAAGATCT
 TAACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGGCTAACATGGAGG
 TTTCCCCCCCAGTTTAAACCGCGGACTGNGATGTCCCCACTCTTTTACAGCTT

MB55

CCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAG
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCAC
 TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
 CATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAA
 AGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTC
 GGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCG
 GATCAGGCATGCCGCGGTGAATACGTTACCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
 CACACCACGAGAGTTTGTAACACCGGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAG
 CCAGCCGCGGAAGGTGAAACAAA

MBP1

CTTACCAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGG
 TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTG
 ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
 CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCG
 AAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAG
 TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT
 GCCGCGGTGAATACGTTACCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA
 GAGTTTGTAACACCGGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCGGGG
 NCCCCAAAAAAAAAAAA

MBP2

ACCAGGTCTTGACATCCTCTTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGG
GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGT
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACA
GAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCT
CAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTACCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTT
AGGAGCCAG

PM04

CTTTACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGT
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACT
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAA
GGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTTCG
GATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGTAACCTTTTAGGAGCCAG
CCGCCGAAGGAANAAAAAA

PM 10

GCCATCCTTCTGACAATTCCTAGAAGATTAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGA
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTTCGTGTGAGGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGG
GCACTCTAAGGTGACTTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAG

AACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTC
 AGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
 TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTACCCGGGCCTTGTACACACCGC
 CCGTCACACCACGAGAGTTTTGTANTCAGGGGGGNNGTNCCCCCAAAAAA
 NAAAA

PM28

CCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTG
 TCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
 TTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGG
 TTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
 CTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
 ACGTTACCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTTGTAACA
 CCCGAAGTCGGTGAGGTAACTTTTAGGAGCCAGCGGCGCCCCAAGNGAAAAA
 ACCCCCCCNAANCCCCC

PM136

GTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCGAG
 AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTA
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCA
 CTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
 TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACA
 AAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTT
 CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC
 GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTACCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
 CACACCACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGGAGGTAACTTTTAGGAGCC
 AGCNGCGAGGTGAAACAAA

A47

CCTTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTTGACAG
 GTGGTGCATGGTTTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATTGTTGGGTTAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTA
 AGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
 ATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGG
 CAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGAT
 CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
 AGCATGCCGCGGTGAATACGTTACCCGGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
 CCACGAGAGTTTGTATACATGCGGGAAGTTCGGTGAGGAAAACCTT

Anexo 3

Muestra el resumen de los datos evaluados en la curva de crecimiento para la cepa MB2.

MB2

Horas	Log UFC/mL	A 600 nm	Antagonismo <i>E. carotovora</i> (cm)	Antagonismo <i>R. solani</i> (cm)
0		0	-	-
4	5,06	0	-	-
8	5,87	0,086	-	-
12	8,81	0,955	0,1	0
24	6,41	3,261	0,4	0,95
28	7,27	2,484	-	-
32	6,52	2,788	-	-
36	7,78	3,025	0,65	0,55
48	7,24	4,944	0,45	0,9

52	7,88	3,426	-	-
56	7,23	3,522	-	-
60	6,88	3,606	0,45	1,05
72	7,69	4,494	0,35	0,7
76	7,1	4,476	-	-
80	8,61	4,272	-	-
84	7,26	3,558	0,45	0,7
96	7,54	4,806	0,4	1,05
100	7,61	4,584	-	-
104	8,08	4,878	-	-
108	8,34	5,19	0,5	1

Anexo 4

Muestra el resumen de los datos evaluados en la curva de crecimiento para la cepa MB5.

MB5

Horas	Log UFC/mL	A 600 nm	Antagonismo <i>E. carotovora</i> (cm)	Antagonismo <i>R. solani</i> (cm)
0			-	-
4	5,12	0	-	-
8	5,7	0,068	-	-
12	8,5	1	0	0
24	7	3	0,7	0,4

28	7,46	2,76	-	-
32	7,76	3	-	-
36	8,27	3,25	0,75	1,15
48	7,6	4,224	0,6	0,95
52	7,56	3,696	-	-
56	7,86	3,96	-	-
60	7,43	4,122	0,75	1,35
72	7,24	4,02	0,8	0,85
76	6,96	4,578	-	-
80	7,41	3,132	-	-
84	7,41	4,266	0,7	1,15
96	7,65	3,582	0,85	1,05
100	7,62	4,374	-	-
104	7,91	4,632	-	-
108	8,23	5,562	0,55	0,7

Anexo 5

Muestra el resumen de los datos evaluados en la curva de crecimiento para la cepa MB42.

MB42

Horas	Log UFC/mL	A 600 nm	Antagonismo <i>E. carotovora</i> (cm)	Antagonismo <i>R. solani</i> (cm)
0			-	-

4	5,23	0	-	-
8	5,68	0,045	-	-
12	7,94	0,973	0,1	0
24	5,82	2,823	0,9	0,65
28	6,38	3,051	-	-
32	5,52	3,332	-	-
36	7,8	3,52	0,65	1,1
48	6,47	2,928	0,55	0,8
52	7,04	4,272	-	-
56	7,75	4,536	-	-
60	7,15	4,584	0,9	1,25
72	7,67	4,854	0,65	0,9
76	7,26	5,064	-	-
80	7,51	4,65	-	-
84	7,25	4,806	0,7	1
96	7,52	4,926	0,6	0,85
100	7,69	5,19	-	-
104	7,33	3,978	-	-
108	7,98	5,346	0,6	1

Anexo 6

Muestra el resumen de los datos evaluados en la curva de crecimiento para la cepa MBP1.

MBP1

Horas	Log UFC/mL	A 600 nm	Antagonismo <i>E. carotovora</i> (cm)	Antagonismo <i>R. solani</i> (cm)
0			-	-
4	5,17	0	-	-
8	5,9	0,085	-	-
12	7,33	1,071	0,5	0
24	4,89	2,877	1	0,55
28	5,98	2,814	-	-
32	5,62	3,212	-	-
36	8	4	0,8	0,5
48	7,44	5,004	0,6	0,85
52	7,21	4,842	-	-
56	7,54	5,052	-	-
60	7,4	5,322	0,6	0,7
72	7,37	5,358	0,45	1,1
76	7,7	5,478	-	-
80	7,74	5,022	-	-
84	7,83	5,352	0,5	0,85
96	7,78	5,688	0,5	1,25
100	7,47	5,808	-	-
104	6,98	5,868	-	-
108	7,08	5,874	0,65	1

Anexo 7

Muestra el resumen de los datos evaluados en la curva de crecimiento para la cepa MBP2.

MBP2

Horas	Log UFC/mL	A 600 nm	Antagonismo <i>E. carotovora</i> (cm)	Antagonismo <i>R. solani</i> (cm)
0			-	-
4	4,97	0	-	-
8	5,28	0,109	-	-
12	6,37	1,012	0	0
24	5,94	3,45	0,85	0,75
28	7,67	2,79	-	-
32	6,83	3,08	-	-
36	7	3	0,7	0,4
48	7,31	5,196	0,6	0,95
52	7,41	3,342	-	-
56	7,81	3,306	-	-
60	7,98	3,18	1	0,15
72	8,07	3,168	1,1	0,6
76	7,88	3,36	-	-
80	7,89	2,928	-	-
84	7,92	3,012	0,95	0,7
96	7,96	3,212	0,9	0,35
100	8,01	3,09	-	-
104	8,44	3,222	-	-
108	7,9	3,018	0,3	0,5

Barry T., Powell R. y Gannon F. 1990. "A general method to generate DNA probes for microorganisms". *Biotechnology*. 8: 233-236.

Bernal G., Illanes A. & Ciampi L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. With antibiotic activity against plant pathogenic agents. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 5(1): 9 p. <<http://www.ejb.org/content/vol5/issue1/full/4>> (Abril, 2007). On Line.

Bertagnolli, B.; Dal Soglio, F. y Sinclair, J. 1996. Extracellular enzyme profile of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B-12 and of two antagonists, *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 and *Trichoderma harzianum* isolate Th008.I. Possible correlations with inhibition of growth and biocontrol. *Physiology and Molecular Plant Pathology*. 45: 253-258.

Chitarra G., Breeuwer P., Nout M., van Aldest A., Rombouts F. y Abee T. 2003. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal Applied Microbiology*. 94, 159-166.

Cook, J. y Baker, K. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. APS Press 539 p.

Czaczyk K., Trojanowska K. & Stachowiak B. 2002. Inhibition of ergosterol biosynthesis in fungal plant pathogens by *Bacillus* sp. *Polish Journal of Environmental Studies*. 11(5): 593-597.

De Clerck E., Vanhoutte T., Hebb T., Geerinck J., Devous J. y De Vos P. 2004. Isolation, Characterization, and identification of Bacterial Contaminants in Semifinal gelatin Extracts. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(6): 3664-3672.

Dong X. y Côté J. 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 695-704.

Driesche R. y Bellows T. 1996. Biological control. Chapman & Hall, New York, USA. 539 p.

Faull, J. 1988. Competitive antagonism of soil-borne plant pathogens. In Burge, M.N., (ed). *Fungi in Biological Control Systems*. Manchester University Press, Manchester, U. K. 125-140 p.

Faltin F., Lottmann J., Grosch R. y Berg G. 2004. Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Can. J. Microbiol.* 50: 811-820.

Feignier C., Françoise B. y Michel G. 1995. Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: Isolation and characterization of iturin⁻, surfactin⁺ mutants. *FEMS Microbiology Letters*, 127: 11-15.

Feignier C., Françoise B. y Michel G. 1996. Characterization of iturin synthetase in the wild-type *Bacillus subtilis* strain producing iturin and in an iturin deficient mutant. *FEMS Microbiology Letters*, 136: 117-122.

Fisher S. y Sonenshein A. 1991. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 107-135.

Giacaman A. 2006. Formulación de un biopesticida para combater la pudrición húmeda en cala (*Zantedeschia* spp) producida por *Erwinia carotovora*. Tesis de Pregrado. Escuela Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. 165 p.

Grosch R. Faltin F., Lottmann J., Kofoet A. y Berg G. 2005. Effectiveness of 3 antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kühn on lettuce and potato. *Can. J. Microbiol.* 51: 345-353.

Handelsman J. y Stab E. V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8, 1855-1869.

Hauben L., Moore E., Vauterin L., Steenackers M., Mergaet J., Verdonck L. y Swings J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 384-397.

Hélias V. Andrivon D. y Jouan B. 2000. Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*. *Plant Pathology*, 49: 33-42.

Instituto Nacional de Estadística (INE). 2007. Estadísticas Agropecuarias.

<http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/estadisticas_agropecuarias/estadisticas_agropecuarias.php> (16 de abril de 2007). On line.

Jensen M., Webster J. y Straus N. 1993. Rapid Identification of Bacteria on the Basis Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 945-952.

Keijer J., Korsman M., Dulleman A., Houterman P., De Bree J. y Van Silfhout C. 1997. In vitro analysis of host plant specificity in *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathol.* 46: 659-669.

Kondoh M., Hirai M. y Shoda M. 2001. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using

Bacillus subtilis RB14-C and flutolanil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91(2):173-177.

Krechel A., Faupel A., Hallmann J., Ulrich A y Berg G. 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Can. J. Microbiol.* 48: 772-786.

Kunstman J. 2004. Determinación de subespecies de *Erwinia carotovora* (Dye) Hall como agentes causales de “pudrición blanda” en calas (*Zantedeschia spp.*). Tesis de Pregrado. Escuela de Agronomía. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 103 p.

Leelasuphakul W, Sivanunsakul P. y Phongpaichit S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme and Microbial Technology* 38; 990–997.

Lewis J., Larkin R. y Rogers D. 1998. A formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* to reduce damping off caused by *Rhizoctonia solani* and growth of the pathogen in soilless mix. *Plant Dis.* 82: 501-506.

Logan N. y Berkeley C. 1984. Identification of *Bacillus* strains using API system. *Journal of General Microbiology*, 130: 1871-1882.

Méndez P. 2005. Selección e identificación de antagonistas bacterianos en contra de *Erwinia carotovora*, agente causal de pudrición húmeda en plantas de importancia económica (papas y calas). Tesis de Pregrado. Escuela Tecnología Médica. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. 59 p.

Moyne A., Shelby R., Cleveland T. y Tuzun S. 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 622-629.

Oard S., Rush M. y Oard J. 2004. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 169-180.

Ohno A., Ano T. y Shoda M. 1995. Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80(5): 517-519.

Ortega S. 1998. Parametros microbiológicos para la formulación de medios de cultivo para la producción semi-industrial de cepas

antagonistas de patógenos vegetales. Tesis de Pregrado. Escuela de ingeniería en Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. 102 p.

Pérombelon M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51: 1-12.

Phister T., O'Sullivan D. y McKay L. 2004. Identification de bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. Strain CS93 isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(1): 631-634.

Pizano, M. 1999. Zantedeschia, Calla Lily. Horticultura. Santafé de Bogotá, Colombia. 54p.

Rodríguez R. 2002. Caracterización molecular de aislados chilenos de *Flavobacterium psychrophilum*: Estudios del operón ribosomal. Tesis de Posgrado del Magíster en Ciencias c/m Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. 92 p.

Rollán, M., Mónaco, C. Lampugnani, G. y Arteta, N. 1998. Variación de la población de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* en el suelo por la aplicación de agroquímicos, Primer congreso argentino de control biológico de enfermedades de plantas. Acta de resúmenes.

Universidad de Buenos Aires, Secretaría de Agricultura, Ganadería y pesca. Buenos Aires, Argentina. p 27.

Sadfi N., Chérif M., Hajlaoui M. , Boudabbous A. y Bélenger R. 2002. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Ann. Microbiol.*, 52: 323-337.

Silva J. 1992. Control biológico de *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. en frambueso (*Rubís ideaus* L.) mediante bacterias antagonistas. Tesis de Grado Magíster en Ciencias Mención Protección Vegetal. Universidad Austral de Chile. 183 p.

Smadja B., Latour X., Trigui S., Burini J., Chevalier S. y Orange N. 2004. Thermodependence of grow and enzymatic activities implicated in the pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). *Can.J. Microbiol.* 50: 19-27.

Smith I., Dunez J., Lelliott R., Phillips D. y Archer R. 1992. Manual de Enfermedades de las plantas. Mundi - Prensa. Bilbao, España. 671 p.

Souto G.I., Correa O.S., Montecchia M.S., Kerber N.L., Pucheu N.L., Bachur M. & García A.F. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. Strain excreting surfactin and antifungal metabolites

partially identified as iturin like compounds. *Journal Applied Microbiology*. 97: 1247-1256.

Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. 56(4):845-857.

Toth I., Bell K., Holeva M. y Birch P. 2003a. Pathogen profile: Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4(1): 17-30.

Toth I. Sullivan L., Brierly J., Avrova A., Hyman L., Holeva M., Broadfoot L., Pérombelon M. y Mcnicol J. 2003b. Relationship between potato seed tuber contamination by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, blackleg disease development and progeny tuber contamination. *Plant Pathology*, 52: 119-126.

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

Vater J., Kablitz B., Wilde C., Franke P., Metha N. y Cameotra S. 2002. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture

filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12): 6210-6219.

Versalovic, J. Schneider M., de Bruijn F. y Lupski J. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods of Molecular and Cell Biology.* 5: 25-40.

Woods Ch., Versalovic J., Koeuth T. y Lupski J. 1993. Whole-Cell repetitive Element Sequence-Based Polymerase Chain Reaction Allows rapid Assessment of Clonal Relationships of Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 31(7): 1927-1931.

Worthington P.A. 1988. Antibiotics with antifungal and antibacterial activity against plant diseases. *Nat. Prod. Rep.* 5: 47.

Wulff E., Mguni C., Mansfeld-Giese K., Fels J., Lübeck M. y Hockenhull J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Plant Pathology.* 51: 574-584.

Yakimov M., Timmis K., Waray V. y Fredrickson H. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1706-1713.

Yoshida S., Hiradate S. Tsukamoto T., Hatakeda K y Shirata A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 91(2): 181-187.

Yu G., Sinclair J., Hartman G. y Bertagnolli B. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressin *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology & Biochemistry*. 34, 955-963.