

SELECCIÓN DE CEPAS DE *Bacillus* spp. PRODUCTORAS DE ANTIBIÓTICOS AISLADAS DE FRUTOS TROPICALES

Juan Arturo Ragazzo-Sánchez¹; Alejandra Robles-Cabrera¹;
Leopoldo Lomelí-González¹; Guadalupe Luna-Solano²; Montserrat Calderón-Santoyo¹.

¹Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos (LIIA), Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico 2595. Tepic, Nayarit, C.P. 63175. MÉXICO. Correo-e: montserratcalder@gmail.com (¹Autor para correspondencia).

²Instituto Tecnológico de Orizaba. Av. Oriente 9,852. Orizaba, Veracruz, C. P. 94300. MÉXICO

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo consistió en seleccionar cepas de *Bacillus* con base en su capacidad de producción de antibióticos, para el control de fitopatógenos postcosecha de frutos tropicales. Se aislaron 50 cepas de frutos tropicales y de suelo. Ocho cepas presentaron las mejores características de inhibición *in vitro* versus los fitopatógenos. Se extrajeron los antibióticos lipopeptídicos con 1-butanol, analizándose en cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en una columna C18 VARIAN® con un gradiente de acetonitrilo (0-80 % v/v). Las cepas aisladas produjeron antibióticos de las familias iturina A y surfactina. La cepa Pla10 obtuvo la mayor concentración tanto de iturina A como de surfactina. Las fracciones de iturina A presentaron una actividad fungicida, mientras las fracciones de surfactina no presentaron actividad alguna. Sin embargo, cuando ambas fracciones fueron aplicadas en conjunto, se observó un efecto sinérgico en la inhibición de *Colletotrichum* sp. de mango. La cepa Pla10 fue identificada como *Bacillus subtilis*.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Control biológico, iturina, surfactina, *Colletotrichum*, *Fusarium*, enfermedades postcosecha

SELECTION OF ANTIBIOTIC-PRODUCING STRAINS OF *Bacillus* spp. ISOLATED FROM TROPICAL FRUITS

ABSTRACT

The aim of this work was to isolate and select *Bacillus* strains according to their ability to produce antibiotic substances useful in the control of postharvest diseases of tropical fruits. Fifty strains were isolated from the surface of tropical fruits and from soil samples. Eight strains showed better *in vitro* inhibition rates versus postharvest fungi of tropical fruits. Lipopeptidic antibiotics were extracted with 1-butanol and analyzed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) with a C18 column VARIAN®. The mobile phase was acetonitrile (0-80 % v/v). The isolated strains produced antibiotics from the family iturin A and surfactin. The strain Pla10 produced the highest concentrations of iturin A and surfactin. Iturin A fractions had fungicidal activity, but the surfactin fractions did not show any activity. However, when both fractions were applied together, a synergistic effect was obtained during the inhibition of *Colletotrichum* sp. from mango. The strain Pla10 was identified as *Bacillus subtilis*.

ADDITIONAL KEY WORDS: Biological control, iturin, surfactin, *Colletotrichum*, *Fusarium*, postharvest diseases

INTRODUCCIÓN

Los factores más importantes que reducen la vida de anaquel de los frutos son las infecciones fúngicas, la senescencia y la transpiración. Adicionalmente, algunos factores como los daños mecánicos, el estado fisiológico y las condiciones inadecuadas de almacenamiento aceleran este proceso (Janisiewicz y Korsten, 2002). Las frutas de origen tropical y subtropical, típicamente son atacadas por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, que causa antracnosis. Este patógeno penetra en la fruta mientras

está en el huerto, pero los síntomas de la antracnosis en la epidermis se observan sólo en la fruta madura después de la cosecha (Barkai-Golán, 2001). *C. gloeosporioides*, es el principal hongo patógeno responsable de importantes pérdidas económicas en frutales en zonas tanto de climas templados como subtropicales y tropicales. Los síntomas asociados con la enfermedad son manchas hundidas, redondas y acuosas en los frutos maduros. Sobre estas manchas pueden observarse masas de esporas de color rosado naranja en un patrón de anillos (Barkai-Golán,

2001). Recientemente, el hongo *Colletotrichum* en sus especies *C. gloeosporioides* y *C. musae*, ha provocado serios problemas entre los productores mexicanos de frutos tropicales como mango, papaya y plátano, principalmente debido a las condiciones de alta humedad relativa que prevalecen en las regiones de producción y a la resistencia que han adquirido estas especies a los fungicidas de síntesis, por lo que es necesario aplicar dosis cada vez más elevadas y con mayor frecuencia, lo que ha llevado a la persistencia de residuos tóxicos en los frutos, daños a la salud de consumidores y trabajadores en campo y contaminación del medio ambiente (Benítez-Camilo *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2009). A nivel mundial se ha visto la importancia de reducir el uso de fungicidas de síntesis, de tal manera que es preciso desarrollar métodos de control alternativos que sean compatibles con el medio ambiente y salud humana (Mari *et al.*, 2007).

El control biológico o el uso de microorganismos antagonistas como las bacterias, hongos y levaduras ha surgido como una alternativa viable para el control de enfermedades en pre y postcosecha (Sharma *et al.*, 2009). El potencial de *Bacillus* spp. para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana se ha utilizado en control biológico de fitopatógenos. La formación de endosporas les otorga una alta viabilidad comparada con células vegetativas, ya que son resistentes a la desecación y al calor, pudiéndose formular fácilmente en productos estables (Wulff *et al.*, 2002). De los péptidos antifúngicos producidos por *Bacillus* podemos citar a micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y subporinas. Estos péptidos generalmente tienen un PM < 2000 Da. Particularmente, *Bacillus subtilis* es una especie que produce diferentes metabolitos secundarios en la forma de lipopéptidos con buena actividad antifúngica, antibacteriana y frente a algunas levaduras, como consecuencia son de alto valor biotecnológico y farmacéutico (Volpon *et al.*, 2000). La aparición de resistencia contra péptidos antimicrobianos es menos probable que la resistencia a antibióticos convencionales (Oard *et al.*, 2004). La búsqueda de nuevos agentes de biocontrol con actividad frente a patógenos de frutos y con características aptas para su aplicación en pre y postcosecha, es una práctica vigente, por lo que en el presente estudio se propuso la selección de cepas de *Bacillus* con capacidad inhibitoria para fitopatógenos de plátano (*Musa paradisiaca* L.), mango (*Mangifera indica* L.) cv Ataulfo y papaya (*Carica papaya* L.) var. Maradol del estado de Nayarit, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Bacillus* spp.

El aislamiento de cepas de *Bacillus* se realizó de la superficie de frutas tropicales y de suelo en las huertas de producción. Se seleccionaron muestras de frutas

tropicales (10 papayas var. Maradol, 10 mangos cv Ataulfo, 10 melones cantaloup y 10 plátanos). Todas estas frutas fueron colectadas en huertas; de dos huertas por especie y cinco frutos por huerta del municipio de San Blas, Nayarit en el mes de julio 2009. Los frutos fueron trasladados al Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos (LIIA) del Instituto Tecnológico de Tepic, en donde se realizó la parte experimental. Los frutos se colocaron enteros en bolsas de poliestireno con cierre y agua peptonada estéril, cuyo volumen fue dos veces el peso del fruto. Los frutos se agitaron durante 2 min. Las muestras de suelo se colectaron de cinco huertas de frutos tropicales (dos muestras por huerta), para ello se tomaron 10 g de suelo en un radio de 3 cm de las raíces de los árboles y a una profundidad de 10 cm. Las muestras se colocaron en 100 ml de agua peptonada, agitándose vigorosamente en vortex. Del agua peptonada utilizada para muestras de fruto y de suelo, se tomaron alícuotas de 5 ml que se incubaron en baño maría a 80 °C con agitación a 100 rpm por 30 min para destruir las células vegetativas. Se tomaron alícuotas de 0.1 ml que se inocularon en caldo nutritivo a 37 °C durante 24 h, posteriormente se sembró en agar nutritivo, incubándose a 37 °C durante 24 h (Wichitra *et al.*, 2007). Las colonias aisladas se resembraron en agar nutritivo hasta obtener cultivos puros y evaluar las características típicas de *Bacillus* según Koneman *et al.* (1997).

Tinción de esporas

Se utilizó la técnica de Schaeffer-Fulton para evidenciar la presencia de endosporas en las cepas aisladas. La muestra fue fijada al calor, se agregó una solución de verde de Malaquita al 5 %, la muestra se calentó por 3 min al mechero Bunsen, se lavó con agua corriente y se aplicó el colorante de contraste safranina al 0.5 % durante 1 min. Se lavó con agua corriente y se observó al microscopio óptico con objetivo 100X (Bradshaw, 1976).

Cultivo de las cepas de *Bacillus* spp.

Las cepas de *Bacillus* se inocularon en tubos de ensayo con 10 ml de caldo Luria incubándose a 37 °C por 48 h (Collins y Jacobsen, 2003).

Pruebas de inhibición

En cajas Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) se realizaron cinco horadaciones de 5 mm, una en el centro de la caja, y las restantes en las orillas en disposición equidistante. En el centro se colocó micelio del hongo fitopatógeno con siete días de crecimiento en PDA a 28 °C (*Colletotrichum gloeosporioides* aislado de papaya, *Colletotrichum* sp. aislado de plátano, *Colletotrichum* sp. aislado de mango, *Fusarium* sp. aislado de plátano). En cada horadación de las orillas de la caja se colocó 0.1 ml del medio fermentado por las especies de *Bacillus* (10^8 células·litro $^{-1}$). Se incubaron por siete días a 30 °C y se midió el diámetro en mm del halo de inhibición del antagonista (Yu *et al.*, 2002).

CUADRO 1. Inhibición de fitopatógenos por las suspensiones de células de *Bacillus*, expresada como halos de inhibición.

| Cepa ^z | <i>Colletotrichum</i> sp. de plátano (mm) | <i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i> de papaya (mm) | <i>Colletotrichum</i> sp. de mango (mm) | <i>Fusarium</i> sp. de plátano (mm) |
|-------------------|--|--|--|--|
| S2 | 13±0.2 | 16±0.2 | 12±0.1 | 14±0.2 |
| S4 | 14±0.3 | 20±0.1 | 12±0.2 | 10±0.1 |
| S5 | 20±0.2 | 10±0.1 | 12±0.1 | 10±0.1 |
| S7 | 10±0.1 | 10±0.1 | 0±0.0 | 10±0.1 |
| S8 | 10±0.0 | 10±0.2 | 15±0.2 | 10±0.3 |
| S10 | 10±0.1 | 10±0.1 | 14±0.1 | 10±0.1 |
| S12 | 10±0.2 | 10±0.3 | 10±0.2 | 10±0.1 |
| S13 | 14±0.3 | 14±0.3 | 18±0.3 | 14±0.2 |
| P3 | 10±0.4 | 10±0.1 | 0±0.0 | 12±0.1 |
| P6 | 22±0.3 | 20±0.3 | 12±0.2 | 14±0.3 |
| P9 | 16±0.2 | 15±0.3 | 13±0.3 | 0±0.0 |
| P11 | 22±0.1 | 14±0.3 | 18±0.4 | 26±0.3 |
| Me2 | 0±0.0 | 10±0.2 | 10±0.1 | 10±0.2 |
| Me3 | 0±0.0 | 10±0.3 | 18±0.2 | 14±0.1 |
| Me5 | 13±0.2 | 13±0.4 | 17±0.2 | 13±0.1 |
| Me8 | 18±0.3 | 18±0.2 | 10±0.1 | 10±0.1 |
| Ma3 | 0±0.0 | 10±0.3 | 10±0.1 | 10±0.1 |
| Ma4 | 0±0.0 | 12±0.2 | 10±0.2 | 0±0.0 |
| Ma5 | 13±0.2 | 12±0.1 | 17±0.1 | 0±0.0 |
| Pla3 | 0±0.0 | 10±0.1 | 20±0.3 | 10±0.1 |
| Pla7 | 0±0.0 | 10±0.2 | 10±0.1 | 12±0.1 |
| Pla9 | 16±0.2 | 10±0.1 | 10±0.1 | 12±0.1 |
| Pla10 | 10±0.1 | 16±0.1 | 25±0.3 | 14±0.2 |

^z S=Cepa aislada del suelo, P=Cepa aislada de papaya, Me=Cepa aislada de melón, Ma=Cepa aislada de mango, Pla=Cepa aislada de plátano

Producción y purificación de las sustancias antibióticas

Se utilizó un medio de producción con la siguiente composición por litro: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, pH ajustado a 7 en tubos con 10 ml. Se incubó en un baño maría a 30 °C con agitación a 120 rpm durante 18 a 22 h (Mendo *et al.*, 2004). El medio fermentado se centrifugó a 10,000 g durante 10 min y se filtró en membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.2 µm (Mackeen *et al.*, 1986). El sobrenadante clarificado se extrajo dos veces con 1/10 del volumen del caldo de 1-butanol en cada extracción. La capa de 1-butanol fue removida y congelada a -70 °C en alícuotas de 0.5 ml. La fracción butanólica fue liofilizada por 4 h. Las muestras se re-hidrataron con una solución de fosfatos, pH 7.0 0.1 M, centrifugándose a 10,000 g por 10 min. La pastilla formada se solubilizó en una solución de acetonitrilo al 80 % (v/v) y ácido trifluoracético al 0.1 % (v/v). La solución fue analizada

en una columna C18 VARIAN® en HPLC Prostar-210 VARIAN®. La elución se obtuvo con un gradiente de acetonitrilo (0-80 % v/v) a 0.8 ml·min⁻¹ durante una hora. Se utilizó un detector UV-VIS VARIAN® 325 a 220 nm. Al final del detector se colocó un colector de fracciones VARIAN® para recuperar las distintas fracciones de lipopéptidos obtenidas. Las fracciones lipopeptídicas se identificaron y cuantificaron usando estándares externos (Mendo *et al.*, 2004).

Determinación de la efectividad *in vitro* de las fracciones de lipopéptidos frente a fitopatógenos de frutos tropicales

En cajas con PDA se realizaron cinco horadaciones de 5 mm, una en el centro de la caja y las restantes en las orillas con disposición equidistante. En el centro se colocó micelio del hongo fitopatógeno con siete días de crecimiento. Cada fracción colectada de las sustancias antibióticas, se colocó en los pocillos de la orilla de la

caja. Se incubó a 25 °C durante siete días y se evaluó el diámetro de inhibición de las fracciones de las sustancias antibióticas (Yu *et al.*, 2002).

Identificación de *Bacillus* spp.

Para la identificación de las especies de *Bacillus* se utilizó el sistema API 50 CH. Este método está basado en la determinación del perfil bioquímico de la cepa, mediante la fermentación de 49 carbohidratos y derivados (heterosidos, polialcoholes, ácidos urónicos). La cepa a evaluar se resuspendió en el medio API 50CHB/E hasta alcanzar una turbidez de 2 en la escala de McFarland. Las galerías conteniendo los carbohidratos se inocularon con esta suspensión hasta llenar completamente las cúpulas y se incubaron a 30 °C haciendo lecturas a las 24 y 48 h. Durante el periodo de incubación, la fermentación se tradujo por un cambio de coloración en la cúpula, debida a la producción de ácido en anaerobiosis. El perfil bioquímico obtenido se comparó con la base de datos API®/ID32 mediante el programa apiweb™ (Logan y Berkeley, 1984).

Análisis estadístico

Para seleccionar las cepas con mayor potencial como agentes de biocontrol se establecieron las diferencias entre tratamientos mediante una prueba de Tukey con una $P \leq 0.05$, con el paquete estadístico SAS System para Windows Versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cepas de *Bacillus* spp.

De acuerdo al procedimiento de aislamiento, se obtuvieron 50 cepas. Durante la tinción diferencial de Schaeffer-Fulton y observación al microscopio, sólo 23 de las 50 cepas presentaron las características típicas del género *Bacillus*, es decir, la morfología de bacilos o bastoncillos alargados (teñidos en rojo) y la presencia de endosporas (teñidas en verde) según Bradshaw (1976). Cabe señalar que la esporulación se presentó entre las 72 y 96 h para las distintas cepas, evidenciando la presencia de diferentes especies.

Pruebas de inhibición de los hongos de frutas tropicales

La capacidad inhibitoria de las cepas aisladas de *Bacillus*, se probó frente a diversos patógenos de postcosecha de frutas tropicales, obteniéndose halos de inhibición de hasta 26 ± 0.3 mm (Cuadro 1). Estos resultados son alentadores considerando resultados similares por Jiang *et al.* (2001) quienes utilizaron a *Bacillus subtilis* para controlar a *Peronophythora litchi* en el control postcosecha de litchi, reportando que con una concentración de 10^8 células·L⁻¹ de la bacteria antagonista se obtuvieron 28.9 mm de halo de inhibición. Durante las pruebas de inhibición se observaron dos patrones de inhibición, en el primero, el crecimiento de los fitopatógenos estuvo delimitado por el

crecimiento de las cepas de *Bacillus*. Esto probablemente debido a una baja producción de lipopéptidos y a la manifestación de un mecanismo de competencia por espacio, como ha sido descrito por Butt *et al.* (1999). El segundo patrón de inhibición estuvo caracterizado por la formación de un halo de inhibición, manifestando la posible producción de compuestos fungitóxicos y la difusión de los mismos en el agar, como ha sido descrito por Cavaglieri *et al.* (2004) y Joshi *et al.* (2008). La producción de compuestos fungicidas ya ha sido ampliamente descrita para cepas de *Bacillus*, siendo los antibióticos de naturaleza lipopeptídica como la iturina y la surfactina los más estudiados en el biocontrol (Volpon *et al.*, 2000; Hiradate *et al.*, 2002; Touré *et al.*, 2004). Sin embargo, Janisiewicz y Korsten (2002) mencionan que por lo general más de un mecanismo puede estar implicado en el biocontrol y en ningún caso se ha observado que exista un solo mecanismo de acción involucrado en el control del patógeno, esta multiplicidad de mecanismos de acción es favorable, si consideramos que para el fitopatógeno será más complicado generar resistencia ante un agente de biocontrol que presente varios mecanismos de acción.

Para seleccionar las mejores cepas inhibidoras se tomaron aquéllas que habían presentado un patrón de inhibición por antibiosis. Adicionalmente se realizó un análisis de diferencia de medias (Tukey $P \leq 0.05$) tomando en cuenta la inhibición global de todos los fitopatógenos por cada cepa, de esta manera se seleccionaron a las ocho cepas que presentaron más eficiencia durante las pruebas de inhibición *in vitro* en agar PDA (Cuadro 2). El análisis global se realizó sobre la base de que una formulación con propiedades antifúngicas a base de agentes de biocontrol tiene más probabilidades de éxito en el mercado si ésta es adecuada para inhibir una gama amplia de fitopatógenos en diferentes frutales.

CUADRO 2. Selección de las mejores cepas biocontroladoras en base a la capacidad de inhibición global de los fitopatógenos de frutas tropicales.

| Cepa | Halo de inhibición promedio (mm) |
|-------|----------------------------------|
| Pla10 | 19.70 a ^z |
| S13 | 16.83 b |
| P6 | 15.83 c |
| Me5 | 14.95 d |
| Me8 | 13.99 e |
| S2 | 13.88 e |
| S4 | 13.88 e |
| P11 | 13.63 e |

^z Valores con la misma letra en la columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

Identificación de las sustancias antibióticas producidas por las cepas de *Bacillus* spp.

El análisis por cromatografía de líquidos de los extractos de antibiótico de las ocho cepas de *Bacillus*, mostró la presencia de los antibióticos iturina A y surfactina. Estos antibióticos generalmente se presentan como una serie de compuestos lipopeptídicos. Iturina A está formada por un grupo de compuestos lipopeptídicos con cadenas de 13-15 carbonos, unidos a un β -aminoácido y diferenciados por la secuencia y orden de aminoácidos. Así mismo, la surfactina se presenta como un grupo de compuestos de lipopéptidos de 13-15 carbonos, unidos a una lactona, y diferenciados por la sustitución de un ácido graso (Noah *et al.*, 2002). En este estudio la iturina A presentó cuatro compuestos antibióticos con tiempos de retención de 27.66, 29.26, 30.02 y 31.8. La surfactina estuvo compuesta por cinco compuestos antibióticos con tiempos de retención de 47.6, 50.52, 51.94, 53.63 y 54.82 (Figura 1). Chen *et al.* (2008) encontró en un extracto de *Bacillus subtilis* JA, antibióticos atribuidos a tres familias de lipopéptidos: surfactina, iturina y fengicina. Iturina y fengicina tienen fuertes propiedades de biocontrol ya que pueden inhibir un rango amplio de patógenos de plantas. En el caso de surfactina, ésta no es fungitoxica por sí misma; sin embargo, tiene un efecto sinergista con la actividad antifúngica de iturina A. Estos mismos autores refieren que las cepas de *Bacillus subtilis* pueden producir más de 24 compuestos antifúngicos con una gran variedad de estructuras, incluyendo compuestos volátiles que inhiben el crecimiento y la germinación de esporas de patógenos de frutas y verduras. De esta forma se podría intuir que la producción de antibióticos de las familias de iturina A y surfactina por las cepas de este estudio, obedece a la necesidad de establecer un efecto sinergista entre ambos antibióticos para lograr una efectiva acción fungicida. Lo anterior descrito es confirmado por Heins *et al.* (2000), quienes establecieron que las surfactinas poseen una actividad surfactante excepcional, provocando así daños subletales a nivel de la membrana celular de los microorganismos sensibles, permitiendo así un acceso más fácil de las iturinas. Por su parte, las iturinas interactúan con las membranas fúngicas, creando canales de transmembrana que permiten la liberación de iones vitales, evitando el crecimiento de los hongos.

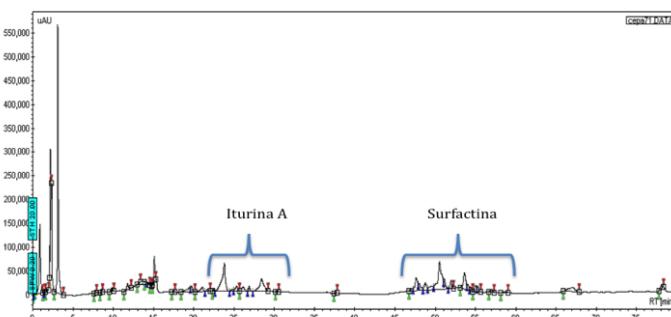


FIGURA 1. Identificación de los compuestos antibióticos producidos por la cepa de *Bacillus* Pla10.

Determinación de la efectividad *in vitro* de las fracciones de lipopéptidos

Dado que la cepa Pla10 fue la que presentó mayor concentración en la producción de iturina A y surfactina, se utilizó para comprobar el efecto sinergista de las fracciones de estos antibióticos. Se colectaron cuatro fracciones para iturina A y cinco fracciones para surfactina. Las pruebas de inhibición *in vitro* en agar PDA se realizaron frente al hongo *Colletotrichum* sp. aislado de mango. Los resultados mostraron una cierta inhibición de las fracciones de iturina A, presentando halos de inhibición desde 12 hasta 17 mm. Las fracciones colectadas de surfactina no presentaron ninguna actividad frente a *Colletotrichum* sp. aislado de mango. Sin embargo, cuando se mezclaron todas las fracciones de iturina A y de surfactina, el halo de inhibición alcanzó un valor de 23 mm, evidenciándose de esta manera el efecto sinergista entre ambos lipopéptidos (Cuadro 3), en concordancia con lo establecido por Heins *et al.* (2000).

CUADRO 3. Actividad antifúngica de las fracciones de iturina A y surfactina producidas por la cepa de *Bacillus* Pla10.

| | Fracción | Tiempo de retención (min) | Halo de inhibición (mm) |
|--------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|
| Iturina A | | 27.66 | 13.0 d ^z |
| | | 29.26 | 13.0 d |
| | | 30.02 | 15.0 c |
| | | 31.8 | 17.0 b |
| | Surfactina | 47.6 | 0.0 e |
| Surfactina | | 50.52 | 0.0 e |
| | | 51.94 | 0.0 e |
| | | 53.63 | 0.0 e |
| | | 54.82 | 0.0 e |
| | Iturina A | | |
| + Surfactina | Todas las fracciones | | 23.0 a |

^z Valores con la misma letra en la columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

Estimación de la concentración de lipopéptidos producidos por las cepas de *Bacillus* spp.

La estimación de la concentración de iturina A y surfactina producidos por la cepas de *Bacillus* se realizó mediante la sumatoria de las áreas de las fracciones de los estándares externos. La cepa Pla10 presentó las concentraciones más altas tanto de iturina A como de surfactina (Cuadro 4), coincidiendo esto con los resultados de las pruebas de inhibición *in vitro*, ya que esta cepa produjo los halos de inhibición más grandes (Cuadro 1, 2). La cepa Me8 aun cuando presentó una concentración mínima de iturina A produjo buenos niveles de inhibición frente a los patógenos postcosecha de los frutos tropicales

CUADRO 4. Concentración de lipopéptidos producidos por las cepas de *Bacillus*.

| Cepa de <i>Bacillus</i> | Iturina A (mg·L ⁻¹) | Surfactina (mg·L ⁻¹) |
|-------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Pla10 | 316.37 a | 1125.25 a |
| S13 | 177.77 b | 269.66 d |
| P6 | 176.50 b | 405.68 c |
| P11 | 39.25 c | 84.69 e |
| Me5 | 32.25 c | 19.37 f |
| Me8 | 2.45 d | 644.82 b |
| S2 | 31.08 c | 443.71 c |
| S4 | 39.25 c | 242.93 d |

* Valores con la misma letra en la columna de cada antibiótico son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

(Cuadro 2), debido posiblemente a la presencia de una cantidad considerable de surfactina (Cuadro 4).

Identificación de las cepas de *Bacillus* spp.

De acuerdo a las pruebas realizadas mediante las galerías de identificación rápida para *Bacillus* (API 50CH), se identificaron las cepas aisladas (Cuadro 5), mostrando que las especies encontradas no son patógenas.

CUADRO 5. Identificación de la cepas de *Bacillus* mediante API 50CH.

| Cepa | Identificación |
|-------|-----------------------------------|
| Pla10 | <i>Bacillus subtilis</i> |
| S4 | <i>Bacillus megaterium</i> |
| P11 | <i>Bacillus licheniformis</i> |
| S13 | <i>Bacillus licheniformis</i> |
| Me8 | <i>Bacillus licheniformis</i> |
| S2 | <i>Paenibacillus lautus</i> |
| P6 | <i>Paenibacillus amylolyticus</i> |
| Me5 | <i>Bacillus pumilis</i> |

CONCLUSIONES

Las cepas aisladas y caracterizadas en este estudio muestran un potencial como agentes de biocontrol en frutos tropicales, dada su producción de antibióticos de hasta 316 mg·L⁻¹ para iturina A y de 1125 mg·L⁻¹ para surfactina, obtenidos para la cepa Pla10 y los niveles de inhibición globales obtenidos cercanos a 20 mm para la misma cepa, *Bacillus subtilis* Pla10 produjo cuatro fracciones de iturina A y cinco de surfactina, cuya evaluación del poder de inhibición reveló que sólo las fracciones de iturina A poseen capacidad de inhibición por sí mismas. Las fracciones de surfactina no presentaron actividad antifúngica, sin embargo, mostraron un efecto sinérgico al combinar su acción con las fracciones de iturina A. La información

recabada permitirá diseñar un proceso tecnológico, optimizando las condiciones de aplicación de estas especies de *Bacillus* en frutos tropicales en postcosecha.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACYT por la beca otorgada para estudios de Maestría en Ciencias a A. Robles-Cabrera, así como a SEP-CONACYT por el financiamiento al proyecto Clave 26075.

LITERATURA CITADA

- BARKAI-GOLÁN, R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Development and Control. Elsevier Academy Press. New York, USA. pp 147-273.
- BENÍTEZ-CAMILO, F. A.; HUERTA-PALACIOS, G.; HOLGUÍN-MELENDEZ, F.; TOLEDO-ARREOLA, J. 2003. Efecto de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en la caída de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 21(2): 223-227.
- BRADSHAW, L. J. 1976. Microbiología de Laboratorio. Traducido al español por GONZALO-PEÑA. Ed.. El Manual Moderno. D.F. México. pp 33.
- BUTT, T. M.; HARRIS, J. G.; POWELL, K. A. 1999. Microbial biopesticides: The European Scene, pp. 23-44. In: Biopesticides use and delivery. HILL, F. R.; MENN, J. J. (eds.). Humana Press. New Jersey, USA.
- CAVAGLIERI, L. R.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M. G. 2004. Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. Biological Control 31: 259-267.
- CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; YU, Z. 2008. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. Biotechnology Letters 30(5): 919-923.
- COLLINS, D. P.; JACOBSEN B. J. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. Biological Control 26(2): 153-161.
- HEINS, D.; MANKER, D.; JIMENEZ, R. 2000. Nueva cepa de *Bacillus* destinada a luchar contra las enfermedades de las plantas y del gusano de las raíces del maíz. Patente española No. 2268774.
- HIRADATE, S.; YOSHIDA, S.; SUGIE, H.; YADA, H.; FUJII, Y. 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. Phytochemistry 61: 693-698.
- JANISIEWICZ, W. J.; KORSTEN, L. 2002. Biological control of post-harvest diseases of fruit. Annual Review of

- Phytopathology 40: 411–441.
- JIANG, Y. M.; ZHU, X. R.; LI, Y. B. 2001. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie 34(7): 430-436.
- JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A. J. 2008. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. Bioresource Technology 99: 4603-4608.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. JR. 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. 1535 p.
- LOGAN, N. A.; BERKELEY, R. C. W. 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API System. Journal of General Microbiology 130: 1871-1882.
- MCKEEN, C. D.; REILLY, C. C.; PUSEY, P. L. 1986. Production of partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilia fructicola* from *Bacillus subtilis*. Phytopathology 76: 136-139.
- MARI, M.; NERI, F.; BERTOLINI, P. 2007. Novel approaches to prevent and control postharvest diseases of fruit. Stewart Postharvest Review 3(6): 1-7.
- MENDO, S.; NUNO, A. F.; SARMENTO, A. C.; AMADO, F.; MOIR, A. J. G. 2004. Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. Biotechnology letters 26(2): 115-119.
- NOAH, K. S.; FOX, S. L.; BRUHN, D. F.; THOMPSON, D. N.; BALA, G. A. 2002. Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor. Applied Biochemistry and Biotechnology 98(100): 803-815.
- OARD, S.; RUSH, M. C.; OARD, J. H. 2004. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. Journal of Applied Microbiology 97: 169-180.
- SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50: 205-221.
- TOURÉ, Y.; ONGENA, M.; JACQUES, P.; GUIRO, A.; 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.
- VOLPON, L.; BESSON, F.; LANCELIN, J. M. 2000. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A₂. FEBS Letters 485: 76-80.
- WICHITRA, L.; PUNPEN, H.; SAMERCHAI, C. 2007. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest Biology and Technology 48: 113-121.
- WULFF, E. G.; MGUNI, C. M.; MANSFELD-GIESE, K.; FELS, J.; LÜBECK, M.; 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(5): 574-584.
- YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biology and Biochemistry 34(7): 955-963.