

## Actividad antagonista de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)\*

### Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* vs *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)

Esau Ruiz-Sánchez<sup>1</sup>, Miguel Ángel Mejía-Bautista<sup>1</sup>, Jairo Cristóbal-Alejo<sup>1</sup>, Alberto Valencia-Botín<sup>2</sup> y Arturo Reyes-Ramírez<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Conkal-División de Estudios de Posgrado e Investigación. Antigua carretera Mérida-Motul, Conkal, km 16.3, Yucatán, México. C. P. 97345. Tel. (999)9124135. (esauruizmx@yahoo.com.mx, mike\_221084@hotmail.com, jairoca54@hotmail.com, alberto.valencia@cuci.udg.mx)<sup>2</sup>Universidad de Guadalajara-Centro Universitario de la Ciénega. Av. Universidad 1115, Col. Linda Vista, Ocotlán, Jalisco. C. P. 47810. §Autor para correspondencia: areyes.itconkal@gmail.com.

#### Resumen

*Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo fitopatógeno que causa pérdidas considerables en frutales tropicales, principalmente por producir tizones foliares y pudrición de frutos en postcosecha. Las bacterias del género *Bacillus* son una alternativa para el control de enfermedades causadas por este hongo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antagonista en pruebas de confrontación directa y mediante el uso del filtrado del cultivo de *B. subtilis* nativas del sureste de México. En pruebas de confrontación directa antagonista-patógeno, las cepas de *Bacillus* mostraron capacidad de inhibición de crecimiento de *C. gloeosporioides* entre 62 y 80%, con halos de inhibición de 0.20-0.88 cm. Con los filtrados de los cultivos bacterianos tratados con calor, se observó que todas las cepas de *Bacillus* inhibieron el crecimiento de *C. gloeosporioides* entre 13 y 42% y se observaron halos de inhibición de 0.13-0.26 cm. Los filtrados de cultivos bacterianos de cinco de los aislados tuvieron efecto en la inhibición de germinación de conidios, la cepa CBCC2 causó 70% de inhibición. Las cepas CBCC2, CBRF24, CBCK47 y CBMN22 tuvieron actividad inhibitoria, tanto en confrontación directa como en la evaluación de los filtrados de cultivos bacterianos, lo que indica el potencial de estas cepas en el control de *C. gloeosporioides*.

#### Abstract

*Colletotrichum gloeosporioides* is a phytopathogenic fungus that causes considerable losses in tropical fruits, mainly for producing leaf blights and fruit rots in postharvest. Bacteria of the genus *Bacillus* are an alternative for the management of diseases caused by this fungus. The aim of this study was to evaluate the antagonistic activity in direct comparison tests and using the culture *B. subtilis*, native of south-eastern Mexico. For antagonist testing, pathogen direct confrontation, *Bacillus* strains showed growth inhibition ability of *C. gloeosporioides* from 62 and 80%, with inhibition zones of 0.20 to 0.88 cm. With the bacterial culture treated with heat, it was observed that all *Bacillus* strains inhibited the growth of *C. gloeosporioides* from 13 to 42%, and inhibition halos were observed from 0.13 to 0.26 cm. Bacterial culture of five isolates had inhibition effect on the germination of conidia, the CBCC2 strain caused 70% inhibition. Strains CBCC2, CBRF24, CBCK47 and CBMN22 had inhibitory activity, both in direct confrontation as in the evaluation of bacterial culture, indicating the potential of these strains in the management of *C. gloeosporioides*.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, antagonism, inhibition halos.

\* Recibido: marzo de 2014  
Aceptado: junio de 2014

**Palabras clave:** *Bacillus subtilis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, antagonismo, halos de inhibición.

## Introducción

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) es uno de los patógenos de plantas más comunes y de mayor distribución en el mundo, causante de la antracnosis (Chakraborty *et al.*, 1997), que es considerada la más importante enfermedad de frutos en regiones tropicales y subtropicales. *C. gloeosporioides* se presenta en una amplia gama de hospedantes como chirimoya (*Annona cherimola* Mill) (Villanueva-Arce *et al.*, 2008), aguacate (*Persea americana* Mill) (Montero-Talavera *et al.*, 2010), mango (*Mangifera indica* L.) (Lakshmi *et al.*, 2011) y papaya (*Carica papaya* L.) (Santamaría-Basulto *et al.*, 2011). Este patógeno se controla con el uso de fungicidas químicos que elevan costos de producción, contaminan el ambiente, presentan riesgos de residuos en productos cosechados y ocasionan resistencia en el patógeno (Lewis y Papavizas, 1991).

La utilización de microorganismos en el control biológico del patógeno es una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas químicos (Whipps, 2001). Bacterias del género *Bacillus* presentan potencial debido a su capacidad para ejercer actividad antagonista mediante competencia, producción de antibióticos (Compant *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010), y producción de enzimas líticas como quitinasas (Compant *et al.*, 2005).

Las especies de *Bacillus* se han usado para el control de patógenos del suelo y raíces (Fernández-Larrea, 2001). Dos aislados de *B. firmus* inhibieron el crecimiento micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides* aislado de papaya cv. Maradol roja en 75.32 y 69.17% a las 96 h (Baños-Guevara *et al.*, 2004). Cinco bacterias formadoras de endosporas aisladas de rizósfera de plantas ornamentales inhibieron de 52 y 58% a *C. gloeosporioides*, observándose una zona de lisis interna del hongo (Orberá *et al.*, 2009). El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad antagonista *in vitro* de cepas nativas de *Bacillus subtilis* por la inhibición del crecimiento micelial y el efecto del filtrado libre de células en *C. gloeosporioides*.

## Introduction

*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) is one of the most common pathogens of plants and most widely distributed in the world, causing anthracnose (Chakraborty *et al.*, 1997), which is considered the most important disease in tropical regions and subtropical fruits. It comes in a wide range of hosts such as cherimoya (*Annona cherimola* Mill) (Villanueva-Arce *et al.*, 2008), avocado (*Persea americana* Mill) (Montero-Talavera *et al.*, 2010), mango (*Mangifera indica* L.) (Lakshmi *et al.*, 2011) and papaya (*Carica papaya* L.) (Santamaría-Basulto *et al.*, 2011). This pathogen is handled with the use of chemical fungicides, which raise production costs, pollute the environment, pose risks of residues in the harvested product and result in pathogen resistance (Lewis and Papavizas, 1991).

The use of microorganisms for biological management of the pathogen is an efficient and environmentally friendly alternative that contributes to the development of sustainable agriculture, as it reduces the effects inherent to the use of chemical pesticides (Whipps, 2001). Bacteria of the genus *Bacillus* have potential usage, because of their ability to exert antagonistic activity by competition, production of antibiotics (Compant *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010), and production of lytic enzymes such as chitinases (Compant *et al.*, 2005).

The *Bacillus* species has been used for the management of soil and root pathogens (Fernández-Larrea, 2001). Two isolates of *B. firmus* inhibited the mycelial growth *in vitro* of *C. gloeosporioides*, isolated from papaya Maradol cv. Roja in 75.32 and 69.17% at 96 h (Toilets-Guevara *et al.*, 2004). Five endospore-forming bacteria isolated from rhizosphere of ornamental plants inhibited 52 and 58% of *C. gloeosporioides*, showing an internal lysis zone of the fungus (Orberá *et al.*, 2009). The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antagonistic capacity of native strains of *Bacillus subtilis* by inhibiting the mycelial growth and the effect of cell-free filtrate of *C. gloeosporioides*.

## Microorganisms used

Seven strains of *B. subtilis* were used from the collection of the Laboratory of Microbiology Institute of Technology Conkal, Yucatán, Mexico, bacteria isolated from soil

## Microorganismos utilizados

Se utilizaron siete cepas de *B. subtilis* pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, México, las bacterias fueron aisladas de suelo de distintas localidades de Yucatán y Campeche. Las bacterias se activaron en agar nutritivo, se verificó su forma bacilar, producción de endosporas, catalasa y tinción de Gram positivo posteriormente se incubaron hasta su autólisis a 28 °C por 4 días, el cultivo autolisado se conservó en refrigeración a 4 °C hasta su uso. El patógeno *C. gloeosporioides* se aisló de frutos de papaya Maradol, fue aislado por medio de siembra de cortes de tejido infectado y sano en medio agar papa-dextrosa (PDA) e incubados a 28 °C (Herrera-Parra *et al.*, 2011). El patógeno se sembró y se mantuvo en PDA hasta su uso.

## Actividad antagonica *in vitro* por confrontación directa

Los bioensayos de confrontación antagonista-patógeno se llevaron a cabo en medio de PDA. Secciones de 0.5 cm de diámetro de crecimiento activo del hongo fitopatógeno se sembraron en el centro de cajas Petri, se inocularon suspensiones ( $1 \times 10^7$  UFC) de las cepas bacterianas en cuatro puntos alrededor del hongo a una distancia de 2 cm. Como testigo se utilizó cajas Petri con el hongo patógeno sin la presencia de la cepa bacteriana todas las cajas se incubaron a 28 °C. Se midió el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno a los siete días y se calculó el porcentaje de inhibición del patógeno mediante la fórmula  $PICR = (R1 - R2)/R1 * 100$ , donde PICR es el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, R1 es valor promedio del radio de la colonia de referencia y R2 es el valor promedio del radio de la colonia inhibida por las bacterias (Ezziyyani *et al.*, 2004). Se determinó el halo de inhibición, para esto se midió la zona de inhibición de crecimiento entre la colonia fúngica y las cepas bacterianas que se formaron alrededor del hongo, las mediciones se registraron en cm de inhibición.

## Actividad antagonica *in vitro* del filtrado bacteriano

Las cepas de *B. subtilis* se cultivaron en caldo papa dextrosa, se utilizaron 24 g de medio de cultivo por litro de extracto de papa (300 g de papa cruda por L de agua, hervida por 15 min). Para el cultivo de cada bacteria se inoculó 1 ml de una suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC) a 100 ml del medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad. Los matraces inoculados se mantuvieron en un agitador orbital a 150 rpm por 72 h a 27 °C. Al término de la incubación,

in different localities of Yucatán and Campeche. The bacteria were activated on nutrient agar, its bacillary form was observed, endospores production, catalase and positive Gram stain, subsequently incubated until autolysis at 28 °C for 4 days, the autolysed culture was stored under refrigeration at 4 °C until use. The pathogenic *C. gloeosporioides* was isolated from papaya Maradol fruits, isolated by seeding cuts and infected tissue in healthy potato dextrose agar (PDA) and incubated at 28 °C (Herrera-Parra *et al.*, 2011). The pathogen was replanted and remained in PDA until used.

## Antagonistic activity *in vitro* by direct confrontation

Bioassays antagonist-pathogen confrontation took place in PDA medium. Sections of 0.5 inch of diameter active growth of the phytopathogenic fungus plated in the center of a Petri dish, suspensions ( $1 \times 10^7$  CFU) of the bacterial strains were inoculated at four points around the mold at a distance of 2 cm. As the control, Petri dishes were used with fungal pathogen in the absence of the bacterial strain all plates incubated at 28 °C. Mycelial growth of phytopathogenic fungus to seven days was measured and the percent inhibition of the pathogen and calculated by the formula  $PICR = (R1 - R2)/R1 * 100$  where PICR is the percent inhibition of mycelial growth, R1 is the average value of the radius of the reference strain and R2 is the average value of the radius of the colony inhibited by bacteria (Ezziyyani *et al.*, 2004). The zone of inhibition, to this zone of inhibition of fungal colony growth between the bacterial strains and that formed around the mold, the measurements were recorded in cm was measured inhibition was determined.

## Antagonistic activity *in vitro* bacterial filtration

Strains of *B. subtilis* were grown in potato dextrose broth, 24 g of culture medium were used per liter potato extract (300 g of raw potato per L of water, boiled for 15 min). For culturing each bacterium 1 ml of a bacterial suspension ( $1 \times 10^8$  CFU) was inoculated to 100 ml of medium in 250 ml Erlenmeyer flasks. The inoculated flasks were kept in an orbital shaker at 150 rpm for 72 h at 27 °C. After the incubation, the cultures were placed into centrifuge tubes of 50 ml and centrifuged at  $8765 \times g$  for 10 min. The bacterial cell-free supernatant was sterilized at 120 °C for 15 min to test the antifungal activity (Pusey and Wilson 1984). In order to determine the activity of the filtered diffusion method agar discs of filter paper were used (Lagunas-

los cultivos se colocaron en tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugaron a 8765 x g por 10 min. El sobrenadante libre de células bacterianas se esterilizó a 120 °C por 15 min para las pruebas de la actividad antifúngica (Pusey y Wilson, 1984). Para determinar la actividad de los filtrados se utilizó el método de difusión en agar en discos de papel filtro (Lagunas-Lagunas *et al.*, 2001). Tomando secciones de 0.5 cm de diámetro de crecimiento activo del patógeno se sembraron en el centro de la caja Petri colocando cuatro discos de 6 mm de diámetro de papel filtro estéril (Whatman Núm.1) que previamente fueron sumergidos en el filtrado bacteriano. Los discos de papel filtro tratados, se colocaron en cuatro puntos alrededor del hongo a una distancia de 2 cm. Las siembras se incubaron a 29 °C y se midió el crecimiento micelial y los halos de inhibición de los hongos fitopatógenos como se describe anteriormente.

### **Inhibición de germinación de conidios**

Los conidios de *C. gloeosporioides* se obtuvieron mediante raspado ligero de una colonia fúngica con un bisturí, adicionando 10 ml de agua destilada estéril al medio PDA. La suspensión se filtró con gasas estériles para eliminar micelio y fragmentos de medio de cultivo. Una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{ml}^{-1}$  se mezcló con filtrado bacteriano (1:1 v/v). La mezcla se sembró en una caja Petri con PDA. Para la observación, a cada punto de siembra se le colocó un cubreobjetos y se registró el porcentaje de germinación de conidios con ayuda de un microscopio compuesto (LEICA DM500®) con un objetivo de 100 x, después de 3, 5, 8 y 10 h. La germinación en este contexto se definió como un tubo germinativo que se extienda más de la mitad de la longitud de la célula. El porcentaje de germinación del hongo se determinó contando al azar 100 conidios de cada punto de siembra y determinando la proporción de germinados con respecto al total observado (Mahadtanapuk *et al.*, 2007).

### **Diseño experimental y análisis de datos**

Los tratamientos se establecieron en un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. Los datos obtenidos del porcentaje de inhibición se transformaron mediante la función del arcoseno:  $y = \arcsin[\sqrt{y/100}]$ . Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA), la comparación de medias se realizó mediante el método de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), usando el paquete estadístico SAS ver. 8.1 para Windows (SAS Institute, 2000).

Lagunas *et al.*, 2001). Taking sections of 0.5 cm diameter active growth of the pathogen were planted in the center of the Petri dish by placing four discs of 6 mm diameter sterile filter paper (Whatman No.1) that were previously submerged in the bacterial filter. The treated filter paper discs were placed on four points around the mold at a distance of 2 cm. Plantings were incubated at 29 °C and mycelial growth inhibition halos phytopathogenic fungi was measured as described above.

### **Inhibition of conidia germination**

The conidia of *C. gloeosporioides* were obtained by gently scraping with a scalpel fungal colony, adding 10 ml of sterile distilled water to the PDA. The suspension was filtered through sterile gauze to remove mycelial fragments and culture medium. A suspension of  $1 \times 10^8$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  was mixed with bacterial filtration (1:1 v/v). The mixture was plated in a Petri dish with PDA. For observation, each seed point is placed with a coverslip and the percentage of germination of conidia using a compound microscope (LEICA DM500®) with a target of 100 x, after 3, 5, 8 and 10 h was recorded. Germination in this context was defined as a germ tube that extends over half the length of the cell. The percentage of germination of the fungus was determined by counting 100 conidia randomly each seed point and determining the proportion of germinated to total observed (Mahadtanapuk *et al.*, 2007).

### **Experimental design and data analysis**

The treatments were established in a completely randomized experimental design with five replications. Data obtained from the percent inhibition was transformed by arcsine function:  $y = \arcsin[\sqrt{y/100}]$ . All data to an analysis of variance (ANOVA) underwent a comparison of means was performed using Tukey's method ( $p \leq 0.05$ ) using the SAS statistical package view. 8.1 for Windows (SAS Institute, 2000).

### **Antagonistic activity in direct confrontation**

#### **Mycelial growth inhibition**

The antagonistic ability of native strains of *Bacillus* on the mycelial growth of *C. gloeosporioides* showed significant differences ( $p \leq 0.05$ ). The strains caused greater inhibition of mycelial growth accounted for, CBCC2, CBK47, CBCK36 and CBRF24 showed between 74.4 and 80.6% inhibition (Table 1).

## Actividad antagonica en confrontación directa

### Inhibición de crecimiento micelial

La capacidad antagonica de las cepas nativas de *Bacillus* sobre el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* mostr6 diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Las cepas que causaron mayor inhibición de crecimiento micelial correspondieron a, CBCC2, CBK47, CBCK36 y CBRF24 que mostraron entre 74.4 y 80.6% de inhibición (Cuadro 1).

La actividad de estas cepas es mayor con lo que reportan otros autores, como Orberá *et al.* (2009), quienes obtuvieron porcentajes de inhibición inferiores en evaluaciones de cinco cepas de *Bacillus* spp. aisladas a partir de rizósfera de plantas ornamentales, mostrando entre 52 y 58% de inhibición de crecimiento micelial para este hongo, además también observaron zona de lisis interna y un engrosamiento del borde en la zona de inhibición. Se ha reportado el efecto de *B. subtilis* en la tasa de crecimiento micelial de *G. gloeosporioides* aislado en mango de 5.1 a 0.6 mm día<sup>-1</sup> (Gutiérrez *et al.*, 2003).

### Halos de inhibición

La cepa CBMT51 causó mayor halo de inhibición, con 0.88 cm, seguido de las cepas CBCK36 y CBMT2, cuyos valores fueron 0.62 y 0.70 cm, respectivamente, no siendo significativamente diferentes (Cuadro 1). Los halos de inhibición en la actividad de algunas cepas son comunes en este tipo de bioensayos. Gutiérrez *et al.* (2003), usando las bacterias antagonistas *Bacillus licheniformis* y *B. subtilis* contra *C. gloeosporioides* observaron formación de halos de inhibición color blanco debidos a la estimulación de la densidad de esporulación y con una clara delimitación de la colonia fúngica.

## Actividad antagonica de los filtrados bacterianos mediante difusión en agar con la técnica de papel filtro

### Inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*

Los valores de inhibición de crecimiento micelial con los filtrados bacterianos fueron entre 13.2 y 42.8%, las cinco cepas más activas estuvieron entre 33.9 y 42.8%. (Cuadro 2). Rahman *et al.* (2007), utilizando la bacteria *Burkholderia cepacia* para el control *in vitro* de *C. gloeosporioides*, describen que al esterilizar el filtrado del cultivo bacteriano se obtenía inhibición 59.2% en el crecimiento micelial

## Cuadro 1. Medias ( $\pm$ error estándar) de la inhibición (%) del crecimiento micelial y de los halos (cm) de inhibición de *C. gloeosporioides* por las cepas de *B. subtilis*.

**Table 1. Means ( $\pm$  standard error) of inhibition (%) of mycelial growth and halos (cm) of inhibition of *C. gloeosporioides* by strains of *B. subtilis*.**

Cepas de <i>B. subtilis</i>	Inhibición de crecimiento micelial (%)	Halos de inhibición (cm)
CBCK36	77.9 $\pm$ 2.7 a	0.62 $\pm$ 0.1 abc
CBCC2	74.4 $\pm$ 1.2 ab	0.32 $\pm$ 0.05 cd
CBCK47	74.4 $\pm$ 2.1 ab	0.48 $\pm$ 0.03 bcd
CBMN22	69.1 $\pm$ 1.9 bc	0.4 $\pm$ 0.08 bcd
CBRF24	80.6 $\pm$ 1.4 a	0.2 $\pm$ 0.1 d
CBMT2	63 $\pm$ 2 c	0.7 $\pm$ 0.03 ab
CBMT51	62.7 $\pm$ 0.6 c	0.88 $\pm$ 0.03 a

Medias con la misma letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

The activity of these strains was higher with what others report by Orberá *et al.* (2009), who obtained lower percentages of inhibition assessments with five strains of *Bacillus* spp. isolated from rhizosphere of ornamental plants, showing between 52 and 58% inhibition of mycelial growth of this fungus, also observed internal lysis zone and a thickening of the border zone of inhibition. It is reported the effect of *B. subtilis* in mycelial growth rate of *G. gloeosporioides* isolated on handle 5.1 to 0.6 mm day<sup>-1</sup> (Gutiérrez *et al.*, 2003).

### Inhibition halos

The CBMT51 strain caused a bigger inhibition zone with 0.88 cm, followed CBMT2 and CBCK36 strains, the values were 0.62 and 0.70 cm, respectively, being not significantly different (Table 1). The zones of inhibition in the activity of some strains are common in this type of bioassay. Gutiérrez *et al.* (2003), using the antagonistic bacteria *Bacillus licheniformis* and *B. subtilis* vs *C. gloeosporioides* observed white inhibition halos due to the stimulation of sporulation density and a clear delineation of the fungal colony.

## Antagonistic activity of bacterial filtered by agar diffusion technique with filter paper

### Inhibition of mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*

The inhibitory values of mycelial growth with bacterial filtrates between 13.2 and 42.8%, the five most active strains were between 33.9 and 42.8% (Table 2). Rahman *et al.*

del fitopatógeno. Gutiérrez *et al.* (2003), usando las bacterias antagonistas *B. licheniformis* y *B. subtilis* contra de *C. gloeosporioides*, observaron reducción de tasa de crecimiento micelial de 5.7 a 0.26 mm d<sup>-1</sup> por efecto de los metabolitos que fueron sometidos a una alta presión y temperatura. La termoestabilidad de los metabolitos antifúngicos producidos por *B. subtilis* fue reportada por Pusey y Wilson (1984) al confirmar la reducción del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

### Halos de inhibición

Al comparar los halos de inhibición con la técnica de papel filtro, se observó que cinco de las siete cepas produjeron halos entre 0.13 y 0.26 cm (Cuadro 2), datos similares reportaron Kim *et al.* (2003) al utilizar cepas de *Bacillus* spp. mediante el método de discos en difusión en agar que generaron halos de inhibición contra varios patógenos incluyendo *C. gloeosporioides*, donde la actividad de las sustancias antifúngicas se mantuvo estable al tratamiento de 80 °C durante 1 h. Se ha reportado que fracciones de iturina A y fengicina producidas por *Bacillus subtilis* CMB32 producen halos de inhibición en *C. gloeosporioides* (Kim *et al.*, 2010). Las pruebas de difusión en agar se usan para determinar y establecer de forma cuantitativa el efecto de un conjunto de sustancias difusibles en un medio de cultivo que puedan inhibir la actividad de un microorganismo formando halos de inhibición de crecimiento (Ramírez y Marín, 2009).

#### Cuadro 2. Inhibición de crecimiento micelial (%) y halos de inhibición (cm) de *C. gloeosporioides* con la técnica de difusión en agar con papel filtro por *B. subtilis* (medias ± error estándar).

**Table 2. Inhibition of mycelial growth (%) and inhibition zones (cm) of *C. gloeosporioides* with the agar diffusion method with filter paper by *B. subtilis* (means ± standard error).**

Cepas	Inhibición de crecimiento micelial (%)	Halos de inhibición (cm)
CBCC2	41.5±2.2 a	0.25±0.02 a
CBCK47	41.5±1.5 a	0.26±0.04 a
CBRF24	40.7±2.4 a	0.20±0.04 a
CBCK36	33.9±1.0 a	0.13±0.04 ab
CBMN22	42.8±1.5 a	0.20±0.03 a
CBMT2	15.2±3.3 b	0.0±0.0 b
CBMT51	13.2±4.3 b	0.0±0.0 b

Medias con la misma letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

(2007) using the bacteria *Burkholderia cepacia* for *in vitro* monitoring of *C. gloeosporioides* disclose that to sterilize the bacterial culture was obtained 59.2% inhibition in mycelial growth of the pathogen. Gutiérrez *et al.*, (2003), using the antagonistic bacteria *B. licheniformis* and *B. subtilis* vs *C. gloeosporioides*, observed a reduction in mycelial growth rate of 5.7 to 0.26 mm d<sup>-1</sup> effect of metabolites that were subjected to high pressure and temperature. The thermostability of the antifungal metabolites produced by *B. subtilis* was reported by Pusey and Wilson (1984) to confirm the reduction of mycelial growth of *C. gloeosporioides*.

### Inhibition halos

When comparing the zones of inhibition with the technique of filter paper, it was noted that five of the seven strains produced halos between 0.13 and 0.26 cm (Table 2), similar data reported Kim *et al.* (2003) using strains of *Bacillus* spp. by the method of diffusion in agar discs which generated halos of inhibition against several pathogens including *C. gloeosporioides*, where the activity of the antifungal substance was stable to treatment at 80 °C for 1 h. It has been reported that fractions of iturin A and fengicina produced by *Bacillus subtilis* CMB32 produce halos of inhibition in *C. gloeosporioides* (Kim *et al.*, 2010). The agar diffusion test is used to determine and establish quantitatively the effect of a set of diffusible substances in a culture medium which can inhibit the activity of a microorganism forming growth inhibition halos (Ramírez and Marín, 2009).

### Conidia germination inhibition

Strains which showed a higher percentage of inhibition of conidia germination of *C. gloeosporioides* were CBMN22 and CBCC2 with values of 57.3 and 70.6%, respectively (Table 3). The CBMT51 and CBMT2 strains showed no effect for this fungus. Rahman *et al.* (2007), 100% inhibition observed germination filtered using *B. cepacia*.

Morphological changes were observed as well as deformations of germ tubes, causing swelling of the cells by the five strains that inhibited germination of conidia, the effect was visible in the CBCC2 strain (Figure 1). These results agree with those reported by Gutiérrez *et al.* (2003) *B. licheniformis* and *B. subtilis*, where it was observed that the germinated conidia of *C. gloeosporioides* showed deformations of bulbs or areas with small remnants of

### Inhibición de germinación de conidios

Las cepas que mostraron mayor porcentaje de inhibición de germinación de conidios de *C. gloeosporioides* de fueron CBMN22 y CBCC2, con valores de 57.3 y 70.6%, respectivamente (Cuadro 3). Las cepas CBMT51 y CBMT2 no mostraron efecto para este hongo. Rahman *et al.* (2007), observaron 100% de inhibición de germinación utilizando filtrados de *B. cepacia*.

Se observaron cambios morfológicos y deformación de los tubos germinativos, provocando de las células hinchamiento por las cinco cepas que inhibieron la germinación de conidios, el efecto fue más visible en la cepa CBCC2 (Figura 1). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gutiérrez *et al.* (2003) con *B. licheniformis* y *B. subtilis*, donde se observó que los conidios germinados de *C. gloeosporioides* presentaron deformaciones a manera de bulbos o esferas con pequeñas remanentes de tubo germinativo. También Mahadatanapuk *et al.* (2007) encontraron distintos cambios morfológicos como la inflamación de los conidios y los tubos germinales se visualizaron fácilmente. Los resultados mostraron que el tratamiento de esterilización (121 °C, 15 min.) no afectó los compuestos fungitóxicos y el efecto inhibitorio, demostrando la termoestabilidad de los metabolitos antifúngicos.

### Conclusiones

Las cepas *B. subtilis* presentaron actividad *in vitro* contra el patógeno *C. gloeosporioides*, mostrando capacidad de inhibición de crecimiento y presencia de halos de inhibición en confrontación directa. Los filtrados de los cultivos bacterianos de cinco de las cepas, después de haber sido sometidos a tratamiento con calor no perdieron actividad inhibitoria. *B. subtilis* CBCC2 mostro tener la mejor capacidad antagonica ya que los filtrados mostraron mayor deformación del tubo germinativo del patógeno, los resultados permitieron seleccionar asilados promisorios para el control biológico de *C. gloeosporioides*.

### Literatura citada

Baños-Guevara, P. E.; Zavaleta-Mejía, E.; Colinas-León, M. T.; Luna-Romero, I. y Gutiérrez-Alonso, J. G. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya Maradolrojo (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. Rev. Mex. Fitopatol. 22:198-205.

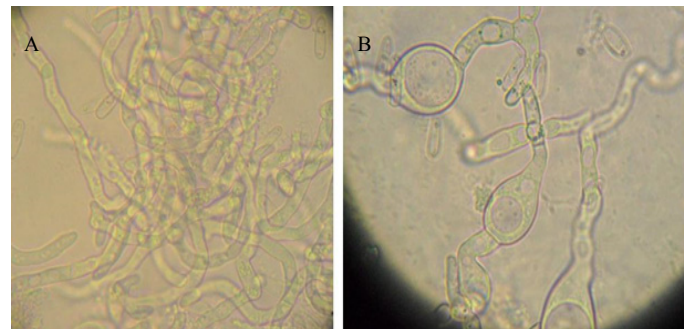
germ tube. Also Mahadatanapuk *et al.* (2007) found different morphological changes such as swelling and conidial germ tube is easily visualized. The results showed that the sterilization treatment (121 °C, 15 min.) did not affected the fungitoxic compounds nor the inhibitory effect, showing the thermostability of the antifungal metabolites.

**Cuadro 3. Inhibición de germinación (%) de conidios de *C. gloeosporioides* por *B. subtilis* (medias ± error estándar).**

**Table 3. Conidia germination inhibition (%) of *C. gloeosporioides* by *B. subtilis* (mean ± standard error).**

Cepas	Inhibición de germinación de conidios (%)
CBCC2	70.6±1.5 a
CBCK47	15±1 d
CBRF24	29.1±2.2 c
CBCK36	25.7±2.4 cd
CBMN22	57.3±1.5 b
CBMT2	0±0 e
CBMT51	0±0 e

Medias con la misma letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 1. Deformación de tubos germinativos en *C. gloeosporioides* por efecto de *B. subtilis* CBCC2. A) testigo; y B) en presencia de filtrado libre de células.**

**Figure 1. Deformation of germ tubes in *C. gloeosporioides* effect of *B. subtilis* CBCC2. A) control; and B) in the presence of cell-free filtrate.**

### Conclusions

The strains *B. subtilis* showed *in vitro* activity against the pathogen *C. gloeosporioides*, showing growth inhibition ability and the presence of zones of inhibition in direct confrontation. The filtrates of the bacterial cultures of the five strains, after being subjected to heat did not lost any

- Chakraborty, S.; Perroti, R.; Charchar, M. J. D'A.; Fernandes, C. D. and Kelemu, S. 1997. Biodiversity, epidemiology and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides*. II. Genetic and pathogenic diversity in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from eight species of *Stylosanthes*. *Tropical Grasslands*. 31: 393-401.
- Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C. and Barka, E. A. 2005. Use of growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9):4951-4959.
- Ezziyyani, M.; Pérez-Sánchez, C.; Requena, M. E.; Rubio, L. y Candela, M. E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*. 26:69-78.
- Fernández-Larrea, V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* 62:96-100.
- Gutiérrez-Alonso, J. G.; Gutiérrez-Alonso, O.; Nieto-Ángel, D.; Téliz-Ortiz, D.; Zavaleta-Mejía, E.; Delgadillo-Sánchez, F. y Vaquera-Huerta, H. 2003. Evaluación *in vitro* de agentes biológicos y físicos para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21:199-206.
- Herrera-Parra, E.; Bacab-Pérez, I. M.; Cristóbal-Alejo, J.; Tun-Suárez, J. M. y Ruiz Sánchez, E. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) sacc. y *Alternaria alternata* (Fries) keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) k. Schum. y su control *in vitro*. *Fitosanidad* 15(4):231-236.
- Kim, H. S.; Park, J.; Ghoi, S. W.; Choi, H. H.; Lee, G. P.; Ban, S. J.; Lee, C. H. and Kim, C. S. 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *J. Microbiol.* 41(3):196-201.
- Kim, P. I.; Ryu, J.; Kim, Y. H. and ChI, Y. T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(1):138-145.
- Lagunas-Lagunas, J.; Zavaleta-Mejía, E.; Osada-Kawasoe, S.; Aranda-Ocampo, S.; Luna-Romero, I. y Vaquera-Huerta, H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev. Mex. Fitopatol.* 19(1):57-65.
- Lakshmi, B. K. M.; Reddy, P. N. and Prasad R. D. 2011. Cross-infection potential of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolates causing anthracnose in subtropical fruit crops. *Trop. Agric. Res.* 22(2):183-193.
- Lewis, J. H. and Papavizas, G. C. 1991. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Crop Protection*. 10(2):95-105.
- inhibitory activity. *B. subtilis* CBCC2 showed to have the best antagonistic capacity as the filtered strain showed higher pathogen germ tube, the results allowed inmates to select promising biological management of *C. gloeosporioides*.

*End of the English version*



- Mahadatanapuk, S.; Sanguansermsri, M.; Cutler, R. W.; Sardud, V. and Anuntalabhochai, S. 2007. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* Gagnep. Using antagonistic *Bacillus* spp. *Am. J. Agril. Biol. Sci.* 2(2):54-61.
- Montero-Talavera, M.; Morales-García, J. L.; González-Chavira, M. M.; Anaya-López, J. L.; Corona-Torres, T. y Gálvez-Mariscal, A. 2010. Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 1(2):159-174.
- Orberá, R. T. M.; Serrat, D. M. J. y González, G. Z. 2009. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad*. 13(2):95-100.
- Pusey, P. L. and Wilson, C. L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* 68:753-756.
- Rahman, M. A.; Kadir, J.; Mahmud, T. M. M.; Abdul, R. A. and Begum, M. M. 2007. Screening of antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya. *Asian J. Plant Sci.* 6(1):12-20.
- Ramírez, L. E. y Marin C. D. 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 15(42):263-268.
- Santamaría-Basulto, F.; Díaz-Plaza, R.; Gutiérrez-Alonso, O.; Santamaría-Fernández, J. y Larqué Saavedra, A. 2011. Control de dos especies de *Colletotrichum* y su efecto sobre el color y sólidos solubles en frutos de papaya maradol. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*. 12(1):19-27.
- SAS Institute. 2000. The SAS System for Windows 8e. Cary, NC. USA. Software en CD.
- Villanueva-Arce, R.; Yáñez-Morales, M. J. y Hernández-Anguiano, A. M. 2008. Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia*. 42:689-701.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52(1):487-511.