



Actividad antibacteriana *in vitro* de una colección de actinomicetos contra *Pectobacterium carotovorum* cepa 71

Gabriel Rincón-Enríquez | Zahaed Evangelista-Martínez
| Joaquín Qui-Zapata | Evangelina Quiñones-Aguilar
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño

correo-e: equinones@ciatej.mx

Resumen

La pudrición blanda es una enfermedad asociada al grupo de bacterias antiguamente pertenecientes al género *Erwinia*, actualmente este género ha sido dividido en dos grupos: *Dickeya* sp. y *Pectobacterium* sp. De manera particular *P. carotovorum* (sin *Erwinia carotovora*) es una enterobacteria Gram negativa que provoca pudrición blanda en diversos cultivos de importancia agrícola. Generalmente el control de esta fitobacteria se realiza mediante métodos químicos (antibióticos y productos a base de cobre). No obstante, el control biológico puede ser una alternativa viable. En ese sentido, el empleo de actinomicetos ha sido poco explorado, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad inhibitoria de aislamientos de actinomicetos sobre el crecimiento de *P. carotovorum*. Se realizó un experimento completamente al azar con 81 tratamientos y tres repeticiones. Se evaluó la inhibición de *P. carotovorum* cepa 71 mediante una escala ordinal de inhibición, los datos fueron analizados con la prueba Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$). El análisis mostró diferencias estadísticas significativas: los actinomicetos ABV63 y ABV79 presentaron mayor inhibición del crecimiento de *P. carotovorum*, por lo que los resultados revelan el potencial empleo de estos actinomicetos como agentes de control biológico de *P. carotovorum*, mediante estrategias específicas para el combate de enfermedades causadas por esta bacteria fitopatógena.

Palabras clave: pudrición blanda, *Erwinia carotovora*, actinobacterias.

Introducción

La pudrición blanda de diversos cultivos de plantas es una enfermedad que provoca cuantiosas pérdidas en cultivo como la papa (*Solanum tuberosum*) (Perombelon, 2002). En 1984 Sawyer estimó una pérdida mundial de la producción de papa en un 24%. Los mecanismos por los cuales *P. carotovorum* provoca la enfermedad se resumen en los siguientes: producción y secreción de enzimas pectolíticas como pectinasas, poligalacturonasas, proteasas y celulasas (Barras *et al.*, 1984); lipo-polisacáridos; asimilación de hierro y movilidad de las células bacterianas. Estos factores de virulencia contribuyen para que la fitobacteria sea capaz de macerar los tejidos constituyentes de la pared vegetal, provocando así la pudrición de la planta.

Las medidas de control de este fitopatógeno están basadas principalmente en el empleo de estrategias culturales, físicas, químicas y biológicas (Czajkowski *et al.*, 2014). Respecto a las medidas de control biológico se han empleado principalmente microorganismos antagonistas con capacidad para competir por espacio, nutrientes, antibiosis, inducción del sistema de resistencia vegetal. De manera similar se ha usado péptidos provenientes del metabolismo secundario con actividad antibacteriana (Arce *et al.*, 1999). También son utilizados enemigos naturales de la fitobacteria para combatirla como los virus bacterianos (bacteriófagos) o bacterias depredadoras (*Bdellovibrio bacteriovorus*) (Rendulic *et al.*, 2004). Igualmente se ha propuesto el uso de microorganismos que inhiban los factores de virulencia del fitopatógeno como el quorum-sensing (Jafra *et al.*, 2006) o la formación de biofilms (Ragunath *et al.*, 2012).

A pesar de esto, el uso de microorganismos del grupo de los actinomicetos ha sido poco estudiado. En ese sentido, el desarrollo de tecnologías con herramientas biotecnológicas como los actinomicetos podría contribuir al diseño de nuevas estrategias de control biológico de enfermedades que afectan a

los cultivos agrícolas, reduciendo las pérdidas económicas y disminuyendo el impacto ambiental. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de una colección de actinomicetos aislados de suelos agrícolas (colección ABV del CIA-TEJ), contra la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* en condiciones *in vitro*.

Metodología

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIA-TEJ. La cepa de la bacteria fitopatógena empleada en las pruebas de antagonismo microbiano fue *P. carotovorum* (Pc) cepa 71. Se estableció un experimento bajo un diseño completamente al azar con un total de 81 tratamientos (cada cepa de actinomiceto confrontada con Pc) y un tratamiento testigo (sólo con la bacteria fitopatógena). Cada tratamiento con tres repeticiones.

La confrontación *in vitro* de actinomicetos contra Pc cepa 71 se realizó en condiciones *in vitro* entre los aislamientos de actinomicetos (ABV01 a ABV80) con *P. carotovorum* y un testigo que sólo comprendió la bacteria fitopatógena. Se empleó como medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) a pH de 7.0. El experimento permaneció durante cinco días en incubación a 26 °C y la inhibición de Pc se evaluó cuando las placas con el testigo que contenía al fitopatógeno presentó un crecimiento total sobre la superficie inicialmente inoculada en el medio de cultivo.

Como variable de respuesta se evaluó la inhibición del crecimiento de Pc mediante una escala ordinal de inhibición propuesta por Quiñones-Aguilar *et al.* (2013) y que explica que los valores 0, 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a porcentajes del crecimiento bacteriano de Pc del 0, $\leq 25\%$, $\leq 50\%$, $\leq 100\%$ y $> 100\%$, respectivamente. Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis e intervalos de confianza de la mediana ($P \leq 0.05$) mediante el programa estadístico StatGraphics (StatGraphics, 2005).

Resultados y discusión

La prueba estadística de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticas altamente significativas (0.0001) entre los aislamientos de actinomicetos para la variable de respuesta de la inhibición del crecimiento bacteriano de *P. carotovorum*. De igual forma, en la figura 1 se aprecian los resultados del experimento para todos los aislamientos, esos datos revelan que varios de los actinomicetos aislados podrían ser potencialmente aprovechados como inóculo en el desarrollo de algún producto para control biológico (como el caso del Actinovate) o como sustancia o compuesto derivado del actinomiceto (metabolitos secretados por el microorganismo e implicados en la inhibición del crecimiento bacteriano) para el control de la bacteria fitopatógena Pc.

Varios de los evaluados mostraron una fuerte inhibición del crecimiento bacteriano de Pc: por ejemplo, el aislamiento ABV63, presentó un valor de 0 en la escala ordinal de inhibición (figura 1), lo cual muestra una inhibición total del crecimiento de Pc por parte del actinomiceto. Otras cepas que mostraron fuerte inhibición del crecimiento de Pc fueron ABV03 y ABV79 (figura 1). Sin embargo, otros aislamientos de actinomicetos no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento bacteriano de Pc (valor 4 y 5 en la escala ordinal de inhibición, figuras 1 y 2) e incluso algunas fueron invadidas por el crecimiento de la bacteria fitopatógena (valores 4 y 5 en la escala ordinal de inhibición, figura 1).

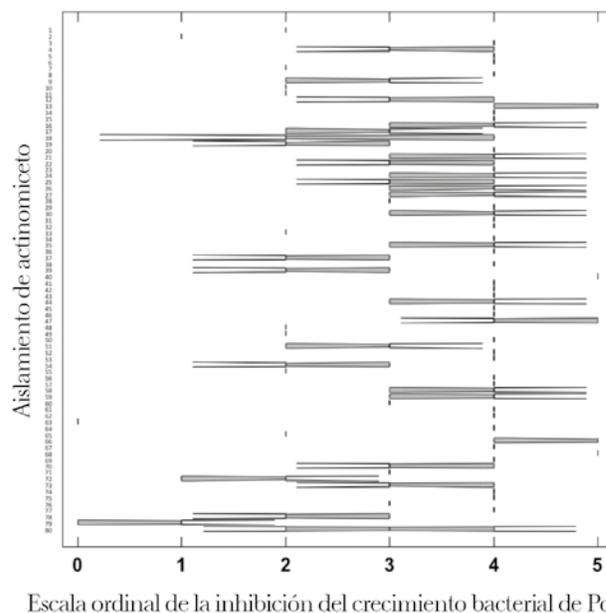


Figura 1. Efecto de 80 aislamientos de actinomicetos sobre el crecimiento bacteriano de *Pectobacterium carotovorum* cepa 71 (Pc). La prueba de Kruskal-Wallis produjo un estadístico de 203.66 con un valor de $P \leq 0.0000$. Las líneas prolongadas de las medianas indican un intervalo de confianza a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

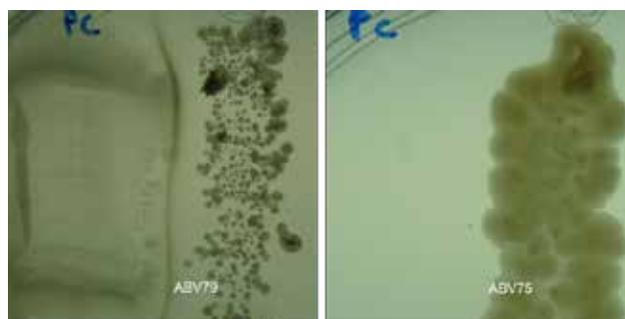


Figura 2. Comportamiento del crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* cepa 71 (Pc) sobre medio PDA en presencia de dos cepas de actinomicetos. El aislamiento ABV75 no fue capaz de inhibir a Pc mientras que ABV79 inhibió el crecimiento de Pc (en flechas).

Cabe mencionar que la utilización de actinomicetos como agentes de control biológico puede ser efectivo; por ejemplo, el producto Actinovate comercializado como biofungicida es elaborado a base de esporas de *Streptomyces lydicus*. El empleo de este producto es recomendado contra diversos fitopatógenos que causan enfermedades en cultivos de importancia comercial como chile, fresa, uva, jitomate y algunas cucurbitáceas. Por otro lado, diversos trabajos

de investigación científica muestran la efectividad de los actinomicetos del género *Streptomyces* contra microorganismos fitopatógenos, como *S. rochei* contra *Phytophthora* que afecta a chile (Ezziyyani *et al.*, 2007) y *S. griseoviridis* contra *Fusarium* que afecta a jitomate (Minuto *et al.*, 2006).

En el caso de bacterias se han evaluado con éxito contra *Ralstonia solanacearum* (Boukaew *et al.*, 2011) y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2013). Los actinomicetos, también pueden ser utilizados como promotores de crecimiento, lo cual constituye un beneficio adicional pues como bioinsumo puede proporcionar a los agricultores un uso como biofertilizantes o agentes de control biológico (biofungicidas o biobactericidas), lo cual constituye una alternativa viable para reemplazar el uso de fertilizantes y pesticidas.

Conclusiones

Existen aislamientos de actinomicetos capaces de inhibir en distinto grado el crecimiento bacteriano de *Pectobacterium carotovorum* cepa 71. El aislamiento que inhibió por completo el crecimiento de la bacteria fitopatógena fue ABV79.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo del proyecto AGS-2011-02-181930 del FOMIX Aguascalientes-Conacyt.

Referencias

Arce, P., Moreno, M., Gutierrez, M. *et al.* (1999). Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or the cecropin SB-37 genes. *American Journal of Potato Research*, 76:69-77.

Barras, F., van Gijsegem, F., Chatterjee, A.K. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32:201-234.

Boukaew S., Chuenchit, S., Petcharat, V. (2011). Evaluation of *Streptomyces spp.* for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper. *BioControl*, 56:365-374.

Czajkowski, R., Perombelon, M.C.M., van Veenb, J.A., van der Wolf, J.M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*, 60(6):999-1013.

Ezziyyani, M., Requena, M.E., Egea-Gilabert, C., Candela, M.E. (2007). Biological control of phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Phytopathology*, 155(6):342-349.

Jafra S., Przynsowa J., Czajkowski, R., Michta, A., Garbeva, P., van der Wolf, J.M. (2006). Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(10):1006-10015.

Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2006). Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces cesgriseoviridis* and solarization. *Crop Protection*, 25(5):468-475.

Perombelon, M.C.M. (2002). Potato diseases caused by soft rot Erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Path*, 51(1):1-12.

Quiñones-Aguilar, E.E., Rincón-Enríquez, G., Qui-Zapata, J.A. (2013). Actividad inhibitoria de actinobacterias del suelo para el biocontrol del agente causal del tizón de halo en frijol. Memoria en extenso del XXXVIII Congreso de la SMCS AC. 24-29 de Noviembre de 2013. *Terra Latinoamericana* 31, Suplemento especial III(1):277-281.

Ragunath, C., Shanmugam, M., Bendaoud, M., Kaplan, J.B., Ramasubbu, N. (2002). Effect of a biofilm-degrading enzyme from an oral pathogen in transgenic tobacco on the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Plant Pathology*, 61(2):346-354.

Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A. *et al.* (2004). A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, 303(5658):689-692.

Sawyer, R.L. (1984). Potatoes for the Developing World. *International Potato Center*.