

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Importancia de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* en el control biológico de enfermedades en cultivos de gran valor económico

### Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value

Franklin Eduardo Sánchez Pila

Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay, Ecuador.

## RESUMEN

Se determinaron los avances en el control biológico de enfermedades en cultivos de importancia económica, en donde *Bacillus subtilis* tiene un rol preponderante, puesto que sus lipopéptidos demuestran su efectividad al momento de controlar un rango muy amplio de enfermedades que atacan a los cultivos de mayor importancia en nuestro país y en el mundo. En los tres cultivos analizados se dan detalles de la efectividad de *Bacillus subtilis* para el control de las enfermedades más devastadoras. En *Magnaporthe oryzae* se determina que la severidad puede ser detenida con gran efectividad, por lo que será necesario ampliar la experimentación hacia la protección de la semilla del arroz. Para *Rhizoctonia solani* los resultados exhibidos son muy alentadores. Esta enfermedad es de mucha importancia no solo en el cultivo de papas, sino que en toda la variedad de solanáceas y leguminosas cultivadas principalmente en el callejón interandino. En tanto que para *Mycosphaerella fijiensis* se detallan excelentes resultados ante un patógeno extremadamente agresivo y que su control trae grandes impactos en la población y en el ambiente. Ante lo manifestado el *Bacillus subtilis* se perfila como uno de los principales agentes biocontroladores para lograr un correcto manejo fitosanitario de los cultivos de mayor importancia en nuestro medio.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, Surfactinas, Iturrinas, Fengicinas, arroz, solanáceas, banano.

## ABSTRACT

Advances in the biological control of diseases in economically important crops, where *Bacillus subtilis* has a preponderant role were determined, since their lipopeptides demonstrate its effectiveness when controlling a wide range of diseases that attack crops of major importance in our country and the world. In the three crops tested details *Bacillus subtilis* effectiveness for control of the most devastating diseases are given. In *Magnaporthe oryzae* it is determined that the severity can be stopped very effectively, so experimentation will be necessary to extend the protection of seed rice. For *Rhizoctonia solani* displayed results are very encouraging. This disease is very important not only in the cultivation of potatoes, but in every variety of Solanaceae and legumes grown mainly in the inter-Andean alley. While for *Mycosphaerella fijiensis* excellent results are detailed to an extremely aggressive pathogen and its control brings great impacts on the population and the environment. Given what was said *Bacillus subtilis* is emerging as a major biocontrol agents for proper phytosanitary management of crops of major importance in our environment.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, surfactin, Iturrinas, Fengicinas, rice, Solanaceae, bananas.

### Introducción

El uso indiscriminado de agroquímicos para el control de enfermedades de las plantas cultivadas ha perturbado el balance ecológico de los microorganismos del suelo, conduciendo al desarrollo de cepas de patógenos resistentes, contaminación de aguas freáticas y obviamente riesgos a la salud de los humanos [1].

En el contexto del control biológico de enfermedades de los cultivos, las tres familias de lipopéptidos de *Bacillus*, Surfactina, Iturrinas y Fengicinas han sido estudiadas por sus potenciales actividades antagónicas contra varios fitopatógenos [1].

Las surfactinas es la familia más estudiada de los lipopéptidos [2], tiene la habilidad de inducir resistencia sistémica en plantas y la propiedad para proliferar

células bacterianas, facilitando así la colonización de la rizósfera [1]. Con esta característica, este lipopéptido en condiciones *in situ*, expresa acción protectora y un biocontrol eficiente en *Arabidopsis* frente a *Pseudomonas syringae*, debido a la formación de un biofilm antimicrobiano que permite la colonización de las superficies de las raíces para la secreción de un antibiótico, la surfactina [3].

La familia de las iturrinas representada por la iturrina A, micosubtilinas y baciliomicinas, muestran una fuerte actividad antifúngica [2]. La iturrina A purificada suprime el crecimiento de varios tipos de hongos incluyendo *Rhizoctonia solani* en ensayos con placas [5]. Aunque las surfactinas tienen una actividad antibiótica relativamente débil, la actividad antibiótica de la iturrina A es muy fuerte [6].

<sup>1</sup>Licenciado en Bioquímica. Máster en Biotecnología Mención Investigación de nuevos productos. Quito, Ecuador.  
Correspondencia: Alexey Llopiz. E mail: alexey-llopiz@outlook.com.

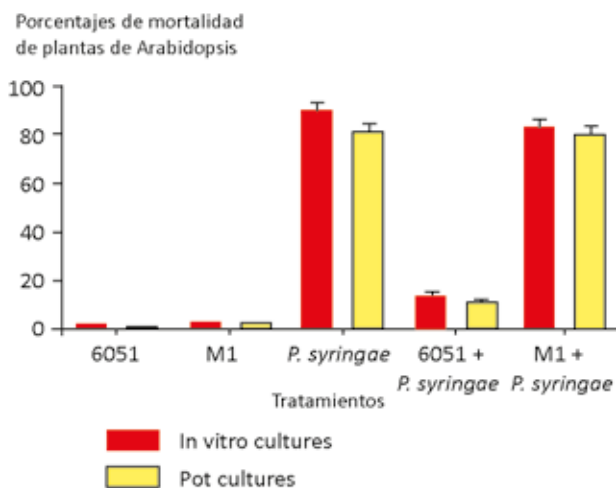


Fig. 1. Resultados del porcentaje de mortalidad de las plantas de *Arabidopsis* antes los diferentes tratamientos.

Las fengicinas son un lipopéptido bioactivo producido por algunas cepas de *Bacillus subtilis*, que demuestra actividad antifúngica contra los filamentos de los hongos. Como la mayoría de péptidos naturales antimicrobianos, las fengicinas probablemente actúan haciendo la membrana plasmática de la célula objetivo más permeable [7].

Los lipopéptidos son conocidos por actuar de manera sinérgica, algunos estudios sugieren surfactinas con iturrinas [8], surfactinas con fengicinas [9] y fengicinas con iturrinas [10].

### Modo de acción

#### • Colonización de la rizósfera

Las raíces de las plantas exudan un enorme rango de compuestos de bajo peso molecular potencialmente valiosos dentro de la rizósfera. Algunas de las experiencias de interacciones químicas, físicas y biológicas en plantas terrestres son aquellas que ocurren entre las raíces y su ambiente circundante en el suelo [11].

Bais [3] reporta que parte del mecanismo de biocontrol de *Bacillus subtilis* 6051 se adhiere a la superficie de las raíces de *Arabidopsis*. Después de cuatro días en medios Murashige y Skoog para crecimiento conjunto de *Arabidopsis* y *Bacillus subtilis* 6051, utilizando microscopio de barrido láser, se observa que las células de *Bacillus subtilis* 6051 han colonizado toda la superficie de la raíz de *Arabidopsis*. En parte del mismo estudio, la *Arabidopsis* cultivada en suelo estéril con *Bacillus subtilis* 6051 forma una biopelícula estable y no patogénica.

### Antagonismo

Una vez establecido en la rizósfera, los aislados de *Bacillus* pueden desplegar todo su arsenal de antibióticos [1]. La Iturina A muestra una fuerte actividad antibiótica con un amplio espectro antifúngico, haciéndola un agente ideal para el control biológico con el objetivo de reducir el uso de pesticidas en la agricultura. Este efecto se demuestra cuando en una suspensión de esporas de *P. crustosum*, estas se hinchan y los lados crecen. Esto es debido al desequilibrio osmótico causado por los antibióticos [12]. Igualmente Marrone informa que los lipopéptidos extraídos de *Bacillus subtilis* UMAF6639, el cual produce iturina A, fengicina y surfactina inhiben la germinación de las esporas. [13]

La producción de iturina A es frecuentemente un factor muy importante con respecto a la actividad antimicótica. Ensayos de inhibición in vitro contra siete diferentes patógenos de poscosecha en cítricos, aguacates y mangos, probaron el rango de la capacidad antagonista de iturina A de *Bacillus amyloliquefaciens*. Todos los patógenos fueron afectados sin excepción, en comparación con otros dos lipopéptidos, fengicinas y surfactinas que no tuvieron mayor efecto en todos los patógenos [12].

La iturina A trastorna la membrana citoplasmática del hongo, creando canales a través de la membrana, lo cual permite la liberación de iones vitales como el  $K^+$  [14].

### Inducción a la resistencia

Las fengicinas y las surfactinas pueden interactuar con las células de las plantas como factor determinante para la activación de una respuesta inmunitaria a través de la estimulación del fenómeno de inducción al sistema de resistencia [1].

Junto con el antagonismo directo, algunas bacterias benéficas pueden proteger las plantas indirectamente, a través de la estimulación del mecanismo inducible, que hace al hospedero más resistente al futuro ingreso de patógenos. Esa inducción, de la capacidad defensiva mejorada puede ser sistémica, como se mostró con los tratamientos de raíces con bacterias para provocar la protección de la parte aérea y de raíces de las plantas. Este fenómeno es conocido como "resistencia sistémica inducida" RSI [15].

Las fengicinas muestran una fuerte actividad antifúngica y, por lo tanto, puede desempeñar un doble rol para la reducción de las enfermedades de las plantas. Estos compuestos pueden actuar mejorando la capacidad defensiva del hospedero, pero también a través del antagonismo microbiano directo [15]. Las surfactinas no son fungotóxicas, pero tienen fuertes propiedades hemolíticas, antibacteriales, antivirales and antitumorales X. Mucha de su actividad biológica puede estar relacionada a su efecto sobre la parte lipídica de las membranas. De su estructura tipo detergente, estas moléculas pueden fácilmente asociarse y anclarse firmemente dentro de las capas de lípidos, creando algún disturbio o perforaciones en el plasma de la membrana que puede activar un torrente de eventos moleculares derivando en respuestas defensivas. Las fengicinas también pueden fácilmente interactuar con las capas de lípidos e igualmente pueden alterar la estructura de las membranas y permeabilizarla [15].

### Utilización de *Bacillus subtilis* en cultivos de importancia económica

#### Arroz

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los cultivos más importantes en la alimentación, el cual provee el 23 % de las calorías consumidas alrededor del mundo [16]. El consumo per capita de arroz en Ecuador es de 54 kilogramos. El tizón del arroz es la enfermedad más destructiva del cultivo, causada por *Magnaporthe oryzae*, cada año esta enfermedad causa pérdidas entre el 10 al 30 % del arroz cultivado [17].

La habilidad del tizón del arroz de mutar en nuevas razas, es la causa del limitado éxito en el control a través de la inducción a la resistencia [18]. En un ensayo donde se utilizaron hojas de arroz tratadas con y sin *Bacillus subtilis* en presencia del patógeno fueron incubadas de 5 a 10 días, las hojas tratadas no mostraron síntomas visibles del tizón permaneciendo verdes y saludables. Estas mostraron que desarrollaron protección en contra de *Magnaporthe oryzae*. Las hojas que no fueron tratadas con *Bacillus subtilis* y que fueron infestadas con el patógeno mostraron desarrollo de la enfermedad [19].

Las dosis utilizadas en el ensayo demuestran que es un factor determinante para el control del patógeno los tratamientos C, D, E presentan diferencias muy significativas, con respecto de A y B. Por lo que se deduce que la utilización de *Bacillus subtilis* controla de manera eficaz, según la dosis aplicada la proliferación de *Magnaporthe oryzae*.

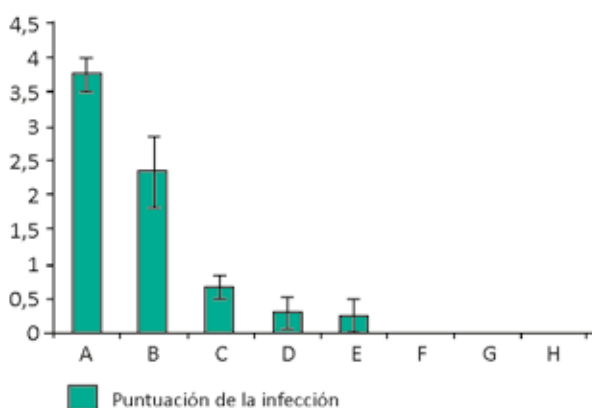
#### Solanáceas

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el tercer cultivo para alimentación más importante del mundo después del trigo y el arroz (<http://www.fao.org/potato-2008/en/potato/pdf.html>). La producción de papas es amenazada por muchas enfermedades, incluido el tizón temprano causado por *Rhizoctonia solani* que es

una de las mayores enfermedades de la papa alrededor del mundo [19]. Los síntomas son los siguientes [20]

- **Hojas:** manchas necróticas en las hojas de color marrón claro a oscuro con anillos concéntricos, manchas restringidas por las nervaduras.
- **Tallos:** manchas necróticas.
- **Tubérculos:** manchas circulares o irregulares de color marrón oscuro, ligeramente hundidas.

Aunque algunos fungicidas químicos han probado su efectividad para el control de *Rhizoctonia solani* estos son útiles en producción orgánica, por lo que el uso de agentes biológicos parece ser una buena alternativa para proteger los cultivos. Recientemente, bacterias y agentes fúngicos han sido descritos para el control de *Rhizoctonia solani*. [21]. En este contexto, *Bacillus subtilis* ha sido ampliamente estudiado como potencial agente biológico contra varias enfermedades de cultivos, debido a su habilidad de producir ciertos antibióticos, lipoproteínas y enzimas hidrolíticas [22].



**Fig. 2.** Resultados del ensayo para determinar la efectividad de *Bacillus subtilis* para contrarrestar *Magnaporthe ryzae*. Se detallan los tratamientos [19].

- A. Hojas inoculadas *Magnaporthe ryzae*.
- B. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (0,5 ml/mL) + inoculadas *Magnaporthe ryzae*.
- C. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (1,0 ml/mL) + inoculadas *Magnaporthe ryzae*.
- D. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (2,0 ml/mL) + inoculadas *Magnaporthe ryzae*.
- E. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (0,5 ml/mL).
- F. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (1,0 ml/mL).
- G. Hojas tratadas con *Bacillus subtilis* (2,0 ml/mL).
- H. Control.

La habilidad de *Bacillus subtilis* V26 para el control de *Rhizoctonia solani* fue confirmada por la determinación del radio de inhibición en contra de este hongo, además se verificó mediante la observación con microscopio óptico. El sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* V26 contiene quitosanas y proteasa, además de compuestos antifúngicos. [19]

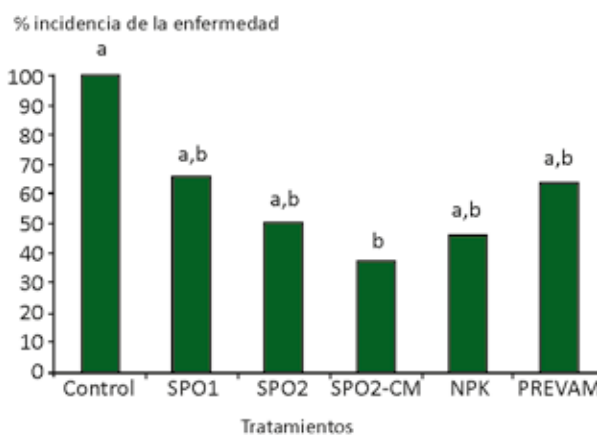
La habilidad de esta cepa para producir quitosanas y proteasa sugiere que esta puede actuar sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani* por antibiosis. De hecho, la actividad de las quitosanas hidroliza el quitosano, el cual se encuentra entre uno de los principales constituyentes de la pared celular del hongo. El sobrenadante del cultivo *Bacillus subtilis* V26 provoca vacuolización y deformación en las hifas de *Rhizoctonia solani*. [19]

Rodajas de patatas fueron tratadas con *Bacillus subtilis* V26 antes y después de inocular el hongo, con el fin de revelar si V26 desarrolla actividades curativas o protectantes. Aunque los dos tratamientos fueron efectivos en reducir la infección fúngica, el control más efectivo fue alcanzado cuando V26 fue aplicado 24 horas antes de la inoculación (actividad protectante). Esto podría ser debido al hecho que las endosporas de *Bacillus subtilis* necesitan tiempo

para germinar antes de que estén listos para inhibir la germinación de *Rhizoctonia solani*.

Las cepas de *Bacillus* mejoran significativamente el crecimiento de las plantas, inhibiendo los patógenos del suelo cuando se usa un tratamiento de suelo. Análisis estadísticos en la pudrición negra y llagas de las raíces causadas por *Rhizoctonia solani* indicaron que hay diferencias significativas entre los tratamientos. La cepa V26 fue capaz de controlar la pudrición negra (81 % eficacia), así como las llagas de las raíces (63 % eficacia) más eficiente que el fungicida comercial Prevam (Decahidrato Tetraborohidrato de sodio). Curiosamente, la cepa V26 parece ser más efectiva en la supresión de la pudrición negra que muchos otros hongos y bacterias antagonistas. [6]

La incidencia de la enfermedad en raíces de todas las plantas tratadas fue significativamente menor que las plantas que no recibieron tratamiento y que fueron usadas como control



**Fig. 3.** Incidencia de *Rhizoctonia solani* en raíces después de 60 días de inoculación del patógeno en un experimento montado en macetas, tratadas con la cepa V26 de *Bacillus subtilis*.

- Control .
- SPO1 106 esporas/mL lavadas en suspensión de esporas .
- SPO2 109 esporas/mL.
- SPO2-CM 109 esporas/mL.
- NPK fertilizante.
- PREVAM fungicida comercial.

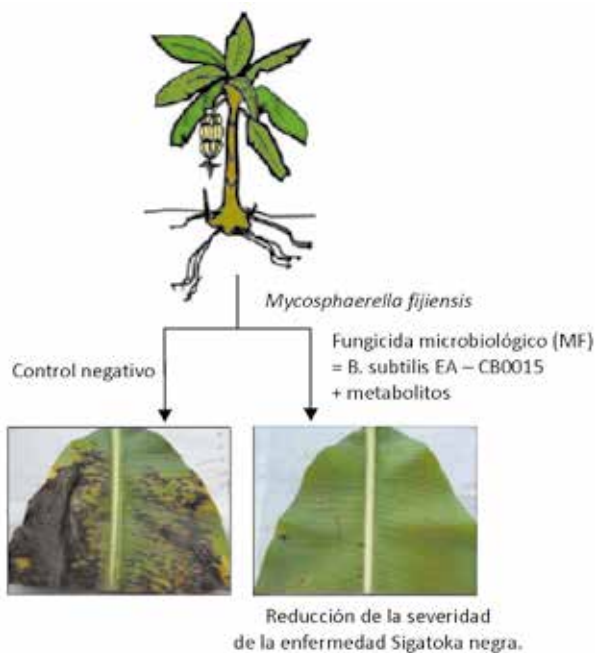
#### • Banano

El cultivo del banano es el cuarto más importante después del arroz, trigo y maíz, es cultivado en regiones tropicales de más de 100 países y juega un rol clave en las economías de muchos países en desarrollo [23].

Entre las enfermedades que reduce la producción de banano está la Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* siendo esta la más peligrosa. El hongo ataca las hojas, disminuyendo el área fotosintética de la planta y causa la maduración prematura de la fruta resultado en significantes pérdidas [24]. Actualmente el control de esta enfermedad mayormente se basa en recurrentes aplicaciones de fungicidas protectantes y sistémicos, los cuales son aplicados vía aérea todo el año en plantaciones que producen banano de exportación [25].

Gutiérrez-Monsalve [25], utilizando un fungicida microbiano a base de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 demuestra mediante experimentos de campo y en invernadero la efectividad de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y sus metabolitos para el control de *Mycosphaerella fijiensis*. El fungicida fue aplicado como una suspensión en agua a una dosis de 1,5 L/ha, la cual fue capaz de reducir la severidad de la enfermedad en el mismo rango de fungicidas como chlorothalonil y mancozeb, fungicidas protectantes comúnmente usados en los programas de control de Sigatoka negra. Además, el fungicida microbiano a 1,5 L/ha mostró ser efectivo cuando se aplica en combinación con fungicidas sistémicos como parte de un programa de control comparable a un programa con fungicidas comercialmente usados para el control de la enfermedad.





**Fig. 4.** Reducción de la severidad de la enfermedad de Sigatoka negra en plantas de *Mycosphaerella fijiensis* utilizando *B. subtilis*.

Los resultados mostraron que se podría introducir un conjunto de herramientas para el control de Sigatoka negra en el cultivo de banano, ya sea como una suspensión en agua o en combinación con fungicidas sistémicos, reduciendo la carga de fungicidas en las regiones productoras y el riesgo del desarrollo de resistencia del patógeno a los fungicidas.

## Conclusiones

Es necesario implementar en el país planes de investigación que permitan profundizar aún más en campo del biocontrol de enfermedades, con la perspectiva de encontrar soluciones viables y conjuntos a los modelos que cada día se van implementando y que se direccionan en métodos que no pongan en riesgo al productor o al medio ambiente.

Los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* se enmarcan en agentes biológicos de gran potencialidad, en donde es necesario detallar sus roles, principalmente en las sinergias que podrían desarrollar, no solo entre ellos, sino con otros microorganismos de la rizósfera. Al disponer de buena cantidad de evidencia con respecto de las surfactinas, es necesario entender y ampliar los conocimientos con respecto de las iturinas y las fengycinas.

Una de los grandes retos para los investigadores gira en torno a desarrollar alternativas prácticas para la obtención a gran escala de los lipopéptidos, así como la mejor formulación para las aplicaciones en los cultivos, si bien la evidencia muestra gran efectividad a nivel de laboratorio, es necesario encontrar la mejor forma para que puedan ser aplicadas a campo abierto. En esta revisión, existe suficiente evidencia de la efectividad de los lipopeptidos como controladores de las enfermedades más devastadoras en los cultivos de mayor importancia, pero es necesario determinar formulaciones que faciliten su obtención y aplicación.

## Referencias bibliográficas

1. M. Ongena and P. Jacques, "Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol," *Trends in Microbiology*, vol.16, no.3, pp.115–125, 2008.
2. Meenu Saraf, Urja Pandya, Aarti Thakkar, "Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens" *Microbiological Research*, 2014

3. Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *B. subtilis* against infection of Arabidopsis Roots by *P. syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 2004; 134:307–19.
4. Phae CG, Shoda M, Kubota H (1990) "Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms." *J Ferment Bioeng* 69:1–7
5. Asaka O, Shoda M (1996) "Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14." *Appl Environ Microbiol* 62:4081–4085
6. M. Deleu, M. Paquot, and T. Nylander, "Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes," *Biophysical Journal*, vol.94, no.7, pp.2667–2679, 2008.
7. Maget-Dana, R. et al. (1992) "Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A." *Biochimie* 74, 1047–1051
8. Ongena, M. et al. (2007) "Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants." *Environ. Microbiol.* 9, 1084–1090
9. Romero, D. et al. (2007) "The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*." *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 430–440
10. Bais, H.P. et al. (2006) "The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms." *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266
11. Arrebola, E., Jacobs, R. & Korsten, L. (2010). "Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens." *J. Appl. Microbiol.* 108: 386–395.
12. Marrone, P.G. (2002) "An effective biofungicide with novel modes of action." *Pesticide Outlook* 13, 193–194.
13. Hsieh, F.C., Lin, T.C., Meng, M. and Kao, S.S. (2008) "Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A." *Curr Microbiol* 56, 1–5.
14. Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, et al. "Surfactin and fengycin Lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants." *Environ Microbiol* 2007; 9 (4):1084–90.
15. Brar, D.S. & Khush, G.S. 2002. "Transferring genes from wild species into rice." In Kang, M.S. ed. *Quantitative genetics, genomics and plant breeding*, p. 197–217, Oxford, CABI.
16. Savary, S., Willocquet, L., Elazegui, F. A., Castilla, N. P., and Teng, P. S. 2000. "Rice pest constraints in tropical Asia: quantification of yield losses due to rice pests in a range of production situations." *Plant Dis.* 84:357–369.
17. Gnanamanickam, S.S., Candole, B.L., and Mew, T. W. (1992) "Influence of soil factors and cultural practice on biological control of sheath blight of rice with antagonistic bacteria." *Plant and Soil*, 144: 67–75.
18. S. Ben Khedher, et al., "Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato," *C. R. Biologies* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2015.09.005>
19. W. Pérez y G. Forbes (2011). "Guía de identificación de plagas que afectan a la papa en la zona andina. Centro Internacional de la Papa" (CIP). 44 pags.
20. R. Grosch, K. Scherwinski, J. Lottmann, G. Berg, "The most promising candidates were applied in field trials. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community," *Microbiol. Res.* 110 (2006) 1464–1474.
21. C.D. De Jensen, J.A. Percich, P.H. Graham, "Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota," *Field Crop. Res.* 74 (2002) 107–115.
22. Frison, E.A., Escalant, J.V., Sharrock, S., 2004. "The global *Musa* genomic consortium: A boost for banana improvement, in: Mohan Jain, S., Swennen, R. (Eds.), *Banana improvement: Cellular, molecular biology, and induced mutations*. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.
23. Marín, D.H., Romero, R.A., Guzmán, M., Sutton, T.B. 2003. "Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation." *Plant Dis.* 87, 208–222.
24. Gutierrez-Monsalve, J.A., Mosquera, S., González-Jaramillo, L.M., Mira, J.J., VillegasEscobar, V., "Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EACB0015 culture," *Biological Control* (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.012>

**Recibido:** 3 de junio de 2016.

**Aprobado:** 10 de julio de 2016.