

# Bioprospección de bacterias con actividad antibacteriana para el manejo de *R. solanacearum* a nivel de microcosmos

Valencia-Vargas, Merlin Andrea<sup>1</sup>; Sierra-Zapata, Laura<sup>2</sup>; Villegas-Escobar, Valeska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudiante de Maestría en Ingeniería, Grupo CIBIOP, Departamento de Ciencias Biológicas Universidad EAFIT, Carrera 49 No 7 Sur 50. Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Grupo CIBIOP, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT. Carrera 49 No 7 Sur 50. Medellín, Colombia

## Resumen

Los fitopatógenos bacterianos transmitidos por el suelo limitan la producción agrícola, siendo *Ralstonia solanacearum* una de las bacterias de mayor impacto a nivel mundial por su amplio rango de hospederos susceptibles y deficientes métodos de control. En el cultivo de banano y plátano, el control implica la aplicación de herbicidas y períodos de cuarentena para su contención, por lo que desarrollos de nuevas tecnologías sostenibles con el medio ambiente son de vital importancia. Este estudio se centró en la bioprospección de bacterias aisladas de plantas de banano con potencial para producir compuestos antibacterianos para el manejo de *R. solanacearum* a nivel de microcosmos. En el tamizaje de 584 cepas bacterianas se encontró que 25 (4.3%) fueron antagonistas de *R. solanacearum* EAP-009 en medio BGA sólido, pero solo las cepas *Bacillus subtilis* EA-ED0525 y *Bacillus* sp EA-ED0076 produjeron sobrenadantes libres de células (SLC) activos, siendo este último potencial en tres medios de cultivo líquido (TSB, BG y MLC). El SLC obtenido del cultivo de *Bacillus* sp. EA-ED0076 en medio BG fue estable a cambios fisicoquímicos de pH, temperatura y a la adición de proteinasa K; reduciendo la población de *R. solanacearum* en microcosmos 158 veces con relación al control. Los metabolitos contenidos en el SLC de *Bacillus* sp. EA-ED0076 fueron purificados por técnicas cromatográficas (SPE<sub>C18</sub>, RP-HPLC), encontrando actividad antibacteriana en la fracción metanólica separada en SPE y en 15 fracciones equivalentes a 25 picos cromatográficos separados mediante la técnica RP-HPLC. Estos resultados sugieren que los compuestos bioactivos no son de naturaleza protéica, posiblemente tengan carácter anfífilo y son estables a cambios fisicoquímicos, características promisorias para reducir la población de *R. solanacearum* en suelos afectados y reducir los periodos de cuarentena aplicados a los cultivos.

**Palabras clave:** Actividad antimicrobiana, control biológico, metabolitos y estabilidad.

## Introducción

Las enfermedades bacterianas son una amenaza para la seguridad alimentaria en el mundo ya que afectan diversos cultivos agrícolas y no existen métodos de control efectivos. La bacteria *Ralstonia solanacearum* es uno de los fitopatógenos más relevantes, afectando a 50 familias botánicas y 250 especies (Elphinstone 2005), incluyendo la familia de las Musáceas. Dentro de esta familia, en el género *Musa* sp. se encuentran los bananos y plátanos, cultivos en la economía de diferentes regiones tropicales productoras en el mundo.

*R. solanacearum* es una bacteria Gram negativa, del filo Proteobacteria compuesto por cuatro filotipos (I a IV), correspondientes a diferentes orígenes geográficos (Fegan y Prior 2014, Denny 2006). Diferentes estudios han demostrado que la bacteria invade las plantas a través de las heridas radiculares y coloniza rápidamente los vasos del xilema, donde se multiplica ampliamente y produce grandes cantidades de exopolisacáridos (EPS) (Turner *et al.*, 2009), bloqueando el sistema radicular y dando como resultado la muerte de la planta (Digonnet *et al.*, 2012). Varios estudios señalan que este microorganismo es un modelo de patogenicidad tanto bioquímico como genético (Staskawicz *et al.*, 2001). Adicionalmente, este microorganismo posee una alta capacidad de residir en el suelo por tiempos prolongados (Spraker *et al.*, 2016).

En la literatura se reporta el uso de diferentes métodos de control de este patógeno, como la desinfección química, la rotación de cultivos, solarización de suelos y mejoramiento genético de plantas; buscando reducir la enfermedad de marchitamiento bacteriano (Mao *et al.* 2017, Lemaga *et al.* 2011, Schönfeld *et al.* 2003 Gamliel *et al.* 2000). Se ha determinado que algunas de estas medidas reducen el impacto ocasionado por la bacteria, no obstante reducir la severidad o incidencia de la enfermedad no es suficiente, debido a que una sola planta enferma puede convertirse en inóculo para la diseminación en un cultivo (Augura 2016). Por lo anterior, muchos cultivos afectados por *R. solanacearum* eliminan las plantas enfermas y sanas empleando con herbicidas, en un radio de 5 metros, para luego implementar largos periodos de cuarentena (Augura 2016).

Una de las alternativas de control de bacterias fitopatógenas se basa en el principio del control biológico, el cual se define como el uso de organismos vivos o productos derivados de sí mismos para reducir poblaciones de plagas o el impacto de estas, haciéndola menos abundante o menos dañina (Eilenberg *et al.*, 2001). La mayoría de estudios están enfocados en el uso de organismos vivos (Shields *et al.*, 2019, Wang y Liang 2014, Ramesh y Phadke 2012), los cuales requieren colonizar la rizosfera y subsistir a factores adversos del nicho donde se aplican para poder ejercer sus funciones (Restrepo *et al.*, 2008). Los filos bacterianos más estudiados

para el control biológico han sido las Actinobacterias (especialmente *Streptomyces* sp.), Proteobacterias (*Pseudomonas* sp.) y Firmicutes (*Bacillus* sp.), (Krober *et al.*, 2014). Los géneros *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. han recibido la mayor atención y son ingredientes activos de diversos productos empleados actualmente en los planes de manejo integrado de plagas y enfermedades a nivel mundial (Savitri *et al.*, 2018). No obstante, la efectividad de estos microorganismos vivos es variable y la reproducibilidad en algunos casos es limitada, principalmente por la falta de especificidad de los metabolitos producidos por diversas cepas, el desconocimiento del modo de acción y de la identificación de estas moléculas antibacterianas (Stein 2005). A partir de esta problemática surge como estrategia la bioprospección de bacterias antagonistas con capacidad para producir compuestos antibacterianos que puedan mitigar el impacto de *R. solanacearum* en suelos contaminados.

El género *Bacillus* sp. ha sido muy estudiado a nivel genético y bioquímico durante varias décadas, siendo el modelo de estudio en el grupo de bacterias Gram positivas formadoras de endosporas (Moszer 2002, Posada *et al.*, 2016). La formación de esporas hace a este género resistente a condiciones ambientales adversas, como pH, altas temperaturas, entornos de nutrición limitados y deshidratación (Barbosa *et al.*, 2000); por lo que los microorganismos de este género son altamente promisorios para diversas aplicaciones biotecnológicas. Las especies más estudiadas son *B. subtilis* (Chen *et al.*, 2012), *B. amyloliquefacies* (Tan *et al.*, 2013), *B. thuringiensis* (Zheng *et al.*, 2018) y *B. cereus* (Chang *et al.*, 2015), las cuales se ha encontrado en diversos ambientes, como la rizosfera donde forman biopelículas y colonizan la superficie radicular (Pandin *et al.*, 2017). Su potencial metabólico también ha sido ampliamente descrito, encontrando que cepas de *B. amyloliquefacies* y *B. subtilis* dedican entre el 4%-8.5% de su genoma para la síntesis de metabolitos secundarios (Chen *et al.* 2009, Stein 2005).

Las moléculas bioactivas más importantes en el género *Bacillus* son los péptidos sintetizados ribosomalmente y lipopéptidos no sintetizados ribosomalmente (NRPS, por sus siglas en inglés) (Marahiel, 2009); los compuestos policétidos, las bacteriocinas y los sideróforos también son de gran interés (Ongena y Jacques, 2008). Dentro de los lipopéptidos se han descrito cuatro familias: surfactinas, iturinas, fengicinas y kurkatinas (Diep y Nes, 2002, Ongena *et al.*, 2007, Villegas-escobar *et al.*, 2018, y Béchet *et al.*, 2012). Las surfactinas actúan como biosurfactantes en las capas lipídicas e interfieren en la estructura de la membrana celular formando poros e interrupción completa de algunas funciones celulares debido a la lisis, además solubilizan la bicapa lipídica. La actividad de estos compuestos se ha establecido como antibacteriana (Ongena y Jacques 2008, Nanjundan *et al.*, 2019). Las iturinas actúan formando poros conductores de iones, en lugar de la ruptura de la membrana; mientras que las fengicinas ocasionan cambios en la estructura de la membrana y permeabilidad. Estas dos últimas actúan

como sustancias antifúngicas para diversos fitopatógenos (Aranda *et al.* 2005, González-Jaramillo *et al.*, 2017, González *et al.*, 2017). Por su parte, Béchet *et al.* (2012), sugirió que las kurkatinas también son moléculas formadoras de poros en la membrana celular, pero son moléculas con actividad más específica, limitando el espectro de la actividad antimicrobiana.

*Bacillus subtilis* tiene además la capacidad de producir algunos antibióticos peptídicos que contienen lantionina, denominados lantibióticos (Thunell *et al.*, 1988), en base a sus propiedades estructurales se distinguen los Tipo A (subtilina) (Stein, 2005) y Tipo B (mersacidina) (Brötz *et al.*, 1997). Las bacteriocinas también son características de *Bacillus*, estas hacen parte del grupo de los péptidos sintetizados ribosomalmente y se ha reportado actividad antibacteriana (Lee y Chang 2018). Otros compuestos como los policétidos y los sideróforos son metabolitos secundarios considerados como unidades de iniciación de diversos productos naturales y antibióticos y son ampliamente producidos por este género microbiano (Singh *et al.* 2018). Dentro de los sideróforos se encuentran compuestos químicos quelatantes de bajo peso molecular, como las pioverdinas que poseen actividad antifúngica sobre varios fitopatógenos (Řezanka *et al.* 2018).

El efecto de estas moléculas ha sido estudiado sobre varios patógenos de plantas de interés económico. El reporte de Villegas-Escobar *et al.* (2018), mostró que los lipopéptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* EA-CB959 inhibieron el crecimiento de *R. solanacearum* y redujeron la incidencia del Moko en Banano. Específicamente las tres familias de lipopéptidos (iturinas, surfactina y fengicina) tuvieron efecto sobre la inhibición de patógeno (Villegas-escobar *et al.*, 2018). Otros estudios apoyan la eficacia del género *B. amyloliquefaciens* BZ6-1, en la disminución de la incidencia de *R. solanacearum* en plantas de maní, el cual indicó presencia de surfactinas y fengicina en los extractos producidos (Wang y Liang 2014). Las moléculas bioactivas identificadas hasta ahora y su efecto sobre patógenos de plantas, ha sido explorada principalmente a nivel *in vitro*, siendo pocos los reportes de investigación con moléculas microbianas específicas que contrarresten enfermedades en plantas, en microcosmos e invernaderos (Shields *et al.*, 2019, Ongena *et al.*, 2007).

Por lo anterior, este estudio tuvo por objetivo realizar un proceso de bioprospección de microorganismos con actividad antibacteriana, que permitiera seleccionar un microorganismo productor de metabolitos bioactivos contra *R. solanacearum* a nivel de microcosmos. Para ello se realizó un proceso de bioprospección a nivel *in vitro*, donde la cepa *Bacillus* sp. EA-ED0076 se destacó como productora potencial de metabolitos estables a cambios fisicoquímicos que fueron activos en la reducción de poblaciones de *R. solanacearum* a nivel de microcosmos. También se caracterizaron y purificaron las moléculas responsables de dicha actividad por

técnicas cromatográficas, con el fin de encontrar extractos o metabolitos candidatos para reducir los periodos de cuarentena en suelos contaminados por este agente fitopatógeno.

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1 Microorganismos**

Las cepas microbianas (584 cepas) pertenecientes a la colección de bacterias endófitas aisladas de *Musa* sp. con registro N° 226 del Instituto Von Humboldt fueron seleccionadas para este estudio. Estas estaban conservadas en TSB con glicerol al 20% v/v a -80°C. La cepa *Bacillus* sp. EA-ED0076, potencial controlador del patógeno, fue aislada de una planta de banano cv Valery (Urabá-Antioquia) y fue identificada con la secuencia del gen 16S rDNA (GenBank NR151897).

La cepa *Ralstonia solanacearum* EAP-09, patógena de plantas de banano, fue aislada de corno de banano enfermo bajo la metodología descrita por Álvarez–Restrepo *et al.*, (2008). Se almacenó en medio BG (Clough *et al.*, 1994) con 20% de glicerol a -80°C, y fue identificada por análisis de la secuencia del gen 16S rDNA (N° de acceso de GenBank KU603426). En este estudio se empleó el medio BG (caldo) compuesto por peptona especial 10 g/L (Oxoid), casaminoácidos 1 g/L, extracto de levadura 1 g/L (Oxoid) y glucosa 5 g/L (Merck). Además, el medio BGA (sólido) contenía la misma composición del BG más 15 g/L agar (BD).

### **2.2 Tamizaje de bacterias antagonistas**

El tamizaje de bacterias activas contra *R. solanacearum* se realizó mediante el método de difusión de discos de agar (Mora *et al.* 2015). Brevemente, se adicionó una suspensión celular de *R. solanacearum* en medio BGA para obtener una concentración final de  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Posteriormente, discos de 6 mm con biomasa de cepas bacterianas, activadas en medio TSA al 50% por 24 h a 30°C, se transfirieron a BGA inoculado con *R. solanacearum*. En total se dispusieron cinco cepas por cada caja en forma equidistante al centro y se incubaron durante 48 h a 30°C, tiempo en el cual se determinó la actividad antagonista midiendo el radio (mm) de la zona de inhibición. Aquellas cepas que reportaron halos de inhibición, se evaluaron nuevamente, pero disponiendo solo una cepa por caja Petri y usando tres replicas por tratamiento y dos repeticiones en el tiempo.

## 2.2 Identificación de bacterias antagonistas

La identificación de las bacterias potenciales se realizó mediante la secuenciación del gen 16S rDNA. Para esto, se utilizaron los primers para eubacterias 8F/1492R (8F: 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'; 1492R: 5'ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3'), los cuales producen un amplicón de aproximadamente 1500 pb. La extracción de ADN se realizó con el kit, UltraClean Microbial DNA Isolation (Mobio) o por extracción con choque térmico. La PCR se realizó empleando el protocolo reportado por (Posada 2017) usando TopTaq® (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla de PCR se preparó en un volumen total de 50 µL, conteniendo 0.5 µM de cada primer, 0,25 µL de Toptaq polimerasa, 1 µL de 2 mM de dNTP's, 5 µL de buffer de enzima y 10 µL de Q-solution (mejorador de PCR de Qiagen). Además, no se empleó MgCl<sub>2</sub> adicional al ya contenido en el buffer de la TopTaq. Los ciclos de PCR consistieron de una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 20 s, 70°C por 90 s y un período final de extensión a 70°C por 5 min, **la amplificación del producto de la PCR se verificó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Amresco), bajo la metodología descrita por Sambrook y Russel (2001).** La secuenciación fue realizada por el método (Sanger 1997) **en el laboratorio de MacroGen (Korea),** usando los primers 8F y 907R (5' CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3'). La secuencia consenso se construyó empleando el software Mega 7 y se procedió a la comparación con las secuencias almacenadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando el algoritmo Blast y considerando el porcentaje de similitud más alto.

## 2.3 Obtención de sobrenadantes libres de células

Para la obtención del sobrenadante libre de células de los cultivos de los microorganismos a evaluar se procedió de esta manera: 1 mL de un preinóculo de 24 h de cada cepa bacteriana fue transferido a un matraz de 100 mL con 20 mL del caldo de cultivo (fuera TSB, BG, medio limitado en carbono (MLC), King B ó medio Molp) y se incubó a 150 rpm durante 72 h a 30°C. El medio MLC contenía: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 g/L, NaCl, 5 g/L el pH se ajustó con solución de NaOH a 6.5 (Garbeva *et al.* 2009). El medio MOLP contenía: sacarosa 20 g/L, peptona especial 30 g/L (oxid), extracto de levadura 7 g/L (oxid), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9 g/L, solución Mn/Mg 9 mL/L, solución de elementos traza 1 mL/L (1 mg/L CuSO<sub>4</sub>, 5 mg/L FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 4 mg/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 2 mg/L KI, 0.14 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, y 10 g/L C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>7</sub>), y 9 mL/L solución Mn-Mg (0.4 mg/L MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O y 50 mg/L MgSO<sub>4</sub>), el pH fue ajustado a 7 con una solución de NaOH 1 M (Jacques *et al.* 1999). El medio

King B contenía: Proteosa peptona N°2 especial 20 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g/L, glicerol 15 mL y 1.5 g/L de MgSO<sub>4</sub>, el pH se ajustó a 7.2 (King *et al.* 1954).

Posteriormente, cada 24 h, se tomaron muestras de 2 mL que fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se filtró (filtro de membrana de acetato celulosa de 0.2 µm, Sartorius Biolab) para obtener el sobrenadante libre de células (SLC). Para las pruebas de estabilidad y microcosmos, el SLC de la cepa *Bacillus* sp. EA-ED0076 se obtuvo en cultivo sumergido en medio BG y se almacenó a 4 °C.

### **2.3 Actividad de sobrenadantes libres de células**

La actividad antibacteriana de los metabolitos producidos por 14 cepas bacterianas contra *R. solanacearum*, se evaluó mediante la evaluación de la actividad de SLC por el método de difusión en pozos de agar (CLSI 2003). Para ello, 40 µL de cada SLC fue aplicado en pozos de 6 mm de diámetro en medio BGA inoculado con 5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL de *R. solanacearum* por sumergido. Se midió el radio (mm) de la zona de inhibición, luego de 48 h de incubación a 28°C, como control negativo se incluyó agua destilada estéril (ADE) y se realizaron tres replicas por tratamiento.

### **2.4 Difusión de compuestos bioactivos a través de filtros de membranas**

Para determinar la capacidad de las cepas bacterianas para producir los compuestos bioactivos en ausencia del patógeno, se evaluó la actividad antibacteriana mediante la prueba de membranas descrita por Sierra-Zapata *et al.* (2018). Para ello se dispusieron filtros de membrana estériles de acetato celulosa de 0.2 µm sobre medio BGA, y posteriormente se transfirieron tres discos de agar de 6 mm de diámetro provenientes del cultivo de cada cepa bacteriana en TSA, sobre los filtros de membrana; los cuales se incubaron por 48 h a 30°C. Posteriormente se retiró el filtro de membrana del agar y se inocularon 100 µL de *R. solanacearum* a 1 x 10<sup>7</sup> UFC/mL. Luego de 48 h de incubación a 30°C se determinaron las zonas de inhibición generadas por los compuestos difundidos a través del filtro de membrana. Como controles negativos se tomaron dos cepas (sin actividad inhibitoria al patógeno) y para el control positivo se platearon 100 µl de *R. solanacearum* a 1 x 10<sup>7</sup> UFC/mL y se dispusieron discos de crecimiento bacteriano directamente en el agar.

### **2.5 Estabilidad fisicoquímica de SLC**

La estabilidad de la actividad de los SLC producidos por la cepa *Bacillus* sp. EA-ED0076, fue evaluada mediante cambios en pH, temperatura y desnaturalización por la enzima Proteinasa K.

- **Estabilidad de los compuestos a diferentes pH's**

El pH del SLC fue ajustado a pH de 2 y 10 adicionando HCL 5 M y NaOH 5 M respectivamente e incubando a 20°C por 24 h. Posteriormente, se restableció el pH de las muestras a 7.2. Como control positivo se tomó una muestra del SLC sin tratar.

- **Estabilidad de los compuestos a diferentes temperaturas**

El SLC (2 mL) fue sometido a diferentes temperaturas (50, 70 y 100° C) por 30 min, tiempo después del cual se restituyó a la temperatura ambiente. El control positivo consistió en una muestra de SLC sin someter a cambios de temperatura.

- **Estabilidad de los compuestos en presencia de Proteínasa K**

Se evaluó la acción de la enzima Proteínasa K® (Promega) sobre la degradación de los compuestos bioactivos. Brevemente, se incubaron 2 mL de SLC con 2 mg de proteínasa K por 4 h a 37°C. Posteriormente, la acción de la enzima se inactivó a una temperatura de 100°C por 1 min. Los controles fueron SLC sin aplicación de proteínasa (positivo) y un control de temperatura con SLC tratado a 100°C por 1 mín. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, y la actividad se evaluó mediante el método de difusión en pozos de agar.

## **2.6 Efecto de SLC a nivel de microcosmos**

El efecto del SLC de *Bacillus* sp. sobre la población de *R. solanacearum* se evaluó a nivel de microcosmos según la metodología descrita por Bhunchoth *et al.* (2015). Para ello se inocularon 20 g de suelo (marca Tierra Negra®, clasificado con textura Arenosa, pH 5.6 y 0.46% de carbono orgánico calculado con el factor de Van Bemmelen de acuerdo a la materia orgánica arrojada por el análisis de suelos). Este suelo se mezcló con cascarilla de arroz 2:1 v/v, y se adicionaron 40 mL de una suspensión acuosa de *R. solanacearum* ( $1 \times 10^6$  UFC/g) en tarrinas de 565 mL. Transcurridas 18 h de la inoculación bacteriana, se adicionaron 50 mL de SLC de *Bacillus* sp. EA-ED0076. Cada unidad experimental se mantuvo a un 60% de retención de humedad a 30°C. Al cabo de 0, 4, 18, 24, 48, 72 y 96 h se tomaron 3 submuestras de 1 g cada una para determinar la población bacteriana. La población de *R. solanacearum* se determinó por medio de diluciones seriadas y conteo de unidades formadoras colonias (UFC) en el equipo easySpiral (Interscience®) en medio TSA-S, (TSA suplementado con 0.5 ppm de cloranfenicol, 5 ppm ampicilina y 5 g/L de sacarosa) e incubadas durante 48 h a 30°C para determinar las UFC/g



suelo del patógeno. El control de crecimiento de *R. solanacearum* se determinó en microcosmos con adición de ADE. Se contó con tres réplicas por tratamiento y dos repeticiones.

## 2.7 Purificación de compuestos bioactivos

La purificación de los compuestos antimicrobianos se realizó mediante metodología descrita previamente por Villegas-Escobar *et al.* (2018). Brevemente, *Bacillus* sp EA-ED0076 se cultivó en un matraz de 1000 mL con 160 mL de medio BG a 150 rpm y 30°C. Al cabo de 12 h de incubación se añadió 3.8% de Amberlite XAD16® (Alfa Aesar) y se incubó el cultivo a 30°C por 72 h. Posteriormente, la resina adsorbente se recuperó por decantación, se transfirió a una columna de vidrio y se lavó con 200 mL de agua destilada estéril (ADE). La elución de los productos adsorbidos se realizó con 200 mL de MeOH al 100%, solución que fue evaporada a presión reducida (-50 psig, 50° C, 50 rpm). Finalmente se obtuvo 338.4 mg de residuo sólido. La separación intermedia del residuo sólido se realizó mediante una columna C<sub>18</sub> de (SPE) (10 g Varían) de Agilent Technologies (EE. UU). Para esto, la columna se acondicionó con metanol y agua. Posteriormente se aplicaron 9 mL de la muestra (37 mg/L) y se eluyeron los compuestos retenidos por etapas con: 100 mL de agua, 100 mL de MeOH al 50% y 100 mL de MeOH al 100%. Cada fracción fue evaluada para determinar su actividad contra *R. solanacearum* mediante el método de difusión en pozo de agar.

La fracción activa (100% MeOH) fue posteriormente purificada por cromatografía líquida de alta presión en fase inversa (RP-HPLC) utilizando un Eclipse XDB C<sub>18</sub> Columna (250 por 4.6 mm, 5 µm, Agilent) conectada a una bomba cuaternaria Agilent G1311A. El sistema disolvente consistía en TFA al 0.1% en agua (disolvente A) y TFA al 0,1% en acetonitrilo (disolvente B). Se inyectaron 20 µL de la muestra a una concentración de (20 mg/mL) y los compuestos se eluyeron mediante un programa en gradiente 20/100/100 B en 10/30/40 min, descrito previamente por (Villegas-Escobar *et al.* 2018) a un flujo velocidad de 1 mL/min y detección de UV a 214 y 280 nm. Se recolectaron 25 muestras con diferentes tiempos de retención, se evaporaron por centrifugación de vacío Eppendorf™, posteriormente se solubilizaron con 500 µL de MeOH 100% y se determinó su actividad contra *R. solanacearum* por el método de difusión en pozos de agar con sus respectivos controles (MeOH 100%). Se realizaron dos replicas por tratamiento.

## 2.8 análisis estadístico

Los datos obtenidos de las pruebas de inhibición de *R. solanacearum* fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza

del 95%. Para la verificación de los supuestos se analizó la normalidad por medio del valor-P de Shapiro-Wilks y los supuestos de igualdad de varianzas y de independencia de residuos por medio del test de Bartlett y de Durbin-Watson, respectivamente. La diferencia entre las medias de los tratamientos fue evaluada con un análisis comparaciones múltiples por medio de la prueba de Tukey (valor P <0.005), para todas las pruebas con el software R Project versión 3.4.2.

### **3. Resultados**

#### **3.1 Diferentes géneros bacterianos inhiben a *R. solanacearum* a nivel *in vitro***

El tamizaje de 584 cepas bacterianas contra *R. solanacearum* EAP-009 arrojó que 25 cepas (4.3%) generaron halos de inhibición entre 5.1 y 36.6 mm en medio BGA. Estas cepas se identificaron a partir del secuenciamiento del gen 16S rDNA, encontrando 4 filos, 5 clases, 9 familias y 6 especies. El 62.5% de los géneros encontrados (ej. *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., y *Staphylococcus* sp.) pertenecían a Firmicutes, el 31.2% a Proteobacteria (*Pseudomonas nitroreducens*, *Burkholderia* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* sp y *Variovorax* sp.) y el 6.3% a Actinobacterias (Ej. *Microbacterium foliorum*). Esto nos sugieren que estas cepas bacterianas producen metabolitos con actividad antibacteriana que son difusibles en agar. Por otro lado, el número de cepas activas fue mayor en pruebas múltiples (16 cepas) que en pruebas individuales (11 cepas), inclusive en el espesor del halo disminuyó en algunas cepas en pruebas individuales (Tabla 1). Estos resultados sugieren que posiblemente la interacción bacteriana en pruebas múltiples puede influir en la actividad antimicrobiana hacia *R. solanacearum*.

**Tabla 1.** Cepas bacterianas con actividad inhibitoria de *R. solanacearum* EAP-009 a nivel *in vitro* en medio BGA.

Código	Origen <sup>a</sup>	Filo	Identificación (16s rDNA)			Halo de inhibición (mm)	
			Cepas bacterianas <sup>b</sup>	GB	ID (%)	Prueba múltiple	Prueba individual
EA-ED0010	FVH5E	Proteobacteria	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	NR_041396	100	24.8 ± 2.1	0
EA-ED0017	FVCE		<i>Pseudomonas</i> sp.	NC_002947.4	96	29.1 ± 0.6	32.0 ± 1.4
EA-ED0047	FVPE		<i>Burkholderia</i> sp.	NC_011002.1	99	8.4 ± 1.3	23.6 ± 0.6
EA-ED0058	FVPE		<i>Variovorax</i> sp.	NZJHVQ01000038	100	23.2 ± 0.9	18.4 ± 0.9
EA-ED0164	FVH2E		<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	NR_133020	100	16.0 ± 0.9	14.7 ± 1.3
EA-ED0251	FVH2E		<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	NR_113601	99	19.7 ± 1.3	0
EA-ED0268	FVPE		<i>Enterobacter tabaci</i>	NR_146667	97.8	10.1 ± 5.1	0
EA-ED0076	AVH10S	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	NR_151897	97	33.0 ± 1.3	18.3 ± 2.5
EA-ED0479	IWH2S		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_112030	99	32.2 ± 0.3	19.2 ± 3.8
EA-ED0523	IWRS		<i>Paenibacillus</i> sp.	KX_664444	99	36.1 ± 1.6	30.7 ± 1.7
EA-ED0524	IWRS		<i>Staphylococcus</i> sp.	KF_777659	99	20.9 ± 0.6	18.3 ± 0.7
EA-ED0525	IWRS		<i>Bacillus subtilis</i>	KJ_872853	100	36.6 ± 0.7	36.3 ± 1.4
EA-ED0532	IWRS		<i>Paenibacillus</i> sp.	DQ_870733	99	11.9 ± 1.3	24.1 ± 0.6
EA-ED0534	IWRS		<i>Paenibacillus</i> sp.	EU937966	99	13.0 ± 1.5	11.9 ± 1.1
EA-ED0539	IWRS		<i>Paenibacillus</i> sp.	KR_029220.1	99	14.0 ± 1.1	10.8 ± 0.5
EA-ED0540	IWRS		<i>Paenibacillus</i> sp.	KJ_438704.1	99	13.8 ± 1.9	8.5 ± 1.1
EA-ED0226	FVPE		Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium ginsenosidimutans</i>	NR_108691	98.2	5.0 ± 5.0
EA-ED0426	AVH5S	Actinobacterias	<i>Microbacterium foliorum</i>	JN_700199	99.7	5.1 ± 1.7	0

a Origen de aislamiento: A: Campo experimental Augura; I: plántulas *in vitro* provenientes de Meristemos Colombia S.A.S; F: finca mi Capi. V: cv. Valery; W: cv. Williams. C: cormo; H: Hojas (posición 2, 5 y 10), P: Pseudotallo. R: Raíz. E: enfermas; S: Sanas.

b Cepas bacterianas que mostraron mejor resultado en BLAST desde el análisis del 16S rDNA

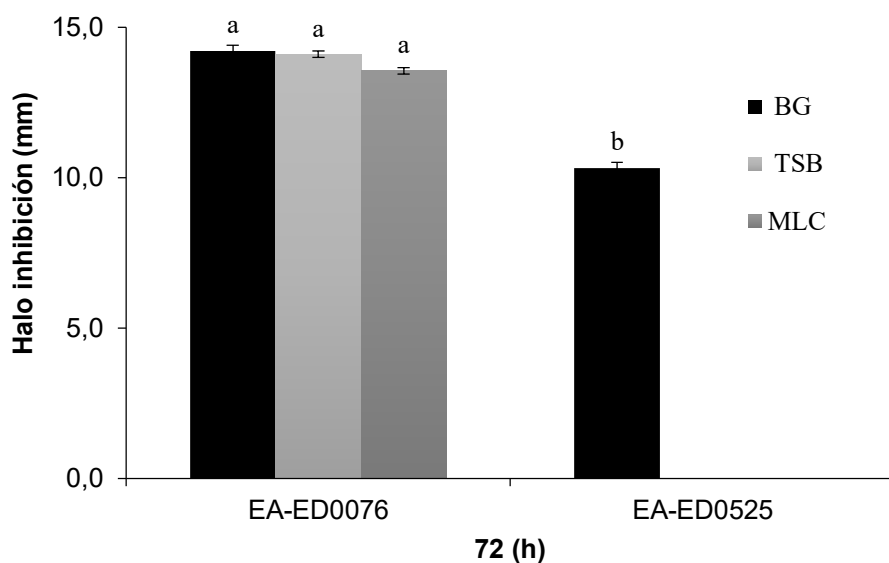
GB número de accesoión de GeneBank

d ID: Porcentaje Identidad. Para aislamientos identificados por secuenciación 16S ADNr. El rango de valores está entre 0 y 100%.

Prueba múltiple denota método de difusión de discos de agar con 5 cepas por caja Petri (n = 3); prueba individual denota método de difusión de discos de agar con 1 cepas por caja Petri (n = 3). ± denota desviación estándar.

### 3.2 La actividad antibacteriana de *Bacillus* sp. EA-ED0076 y *B. subtilis* EA-ED0525 es dependiente del medio de cultivo

Con el fin de determinar si las cepas activas contra *R. solanacearum* obtenidas en la prueba de difusión de discos de agar, producían metabolitos con actividad antibacteriana en medio líquido, se cultivaron las bacterianas en diferentes medios de cultivo y se obtuvieron los SLC respectivos. De las 13 cepas evaluadas solo 2 cepas inhibieron el crecimiento de *R. solanacearum* mediante la producción de SLC a las 72 h de cultivo (Figura 1). Específicamente la cepa *Bacillus* sp. EA-ED0076 produjo SLC activos en los tres medios de cultivo (BG, TSB, MLC) con una inhibición promedio de  $14.2 \pm 0.2$  mm; mientras que la cepa *B. subtilis* EA-ED0525 solamente produjo un SLC activo en medio BG con halos de inhibición de  $10.2 \pm 0.2$  mm en pruebas de difusión en pozo de agar.



**Figura 1.** Efecto de los SLC bacterianos producidos por *Bacillus* sp. EA-ED0076 y *B. subtilis* EA-ED0525 obtenidos a las 72 h de cultivo diferentes medios. Letras diferentes denotan diferencias significativas según prueba de rangos múltiples de Tukey (valor  $P < 0.005$ ).

Estos resultados indican que *R. solanacearum* es sensible a los compuestos sintetizados por ambas cepas. Adicionalmente la cepa EA-ED0076 tiene una alta capacidad para producir compuestos antimicrobianos en condiciones limitadas de carbono, lo que nos sugiere que esta cepa produce metabolitos altamente bioactivos contra *R. solanacearum*. El 84.6% de las cepas evaluadas (*Pseudomonas* sp EA-ED0017, *Burkholderia* sp. EA-ED0047, *Variovorax* sp. EA-ED0058, *Stenotrophomonas* EA-ED0479, *Paenibacillus* sp. EA-ED0523, *Staphylococcus* sp. EA-ED0524, *Paenibacillus* sp. EA-ED532, *Paenibacillus* sp EA-ED0534 y dos cepas *Paenibacillus* sp. EA-ED0539 y EA-ED0540), no produjeron SLC con actividad antibacteriana, lo que sugiere que la producción de compuestos bioactivos

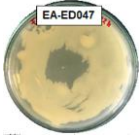

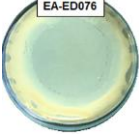

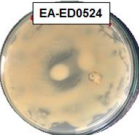

pueden ser dependientes de la presencia del patógeno o de otros factores dependientes de las condiciones de cultivo.

### **3.3 Los compuestos antibacterianos son producidos en la ausencia de *R. solanacearum* en la mayoría de las cepas bacterianas**

Al observar que solo el 15.4 de las cepas bacterianas produjeron SLC activos, se determinó si la producción de los compuestos antibacterianos era dependiente de la presencia de *R. solanacearum*. Para ello se evaluó la capacidad de diferentes cepas bacterianas de generar halos de inhibición antes de entrar en contacto con el fitopatógeno por medio de pruebas de filtros de membrana (Tabla 2). Las cepas *Burkholderia* sp. EA-ED0047, *Variovorax* sp. EA-ED0058 y *Bacillus* sp. EA-ED0076 generaron halos de inhibición significativos con respecto al control ( $\phi_{\text{control-1}}$ ) en pruebas tanto en ausencia ( $\phi_{\text{membrana}}$ ) como en presencia de *R. solanacearum* ( $\phi_{\text{control+1}}$ ). *Bacillus* sp. EA-ED0076 generó un halo de  $63.5 \pm 0.7$  mm indicando la mayor inhibición de *R. solanacearum* por lo que las posteriores pruebas se realizaron con esta cepa. Estos resultados indican que las cepas producen compuestos antibacterianos en la ausencia del patógeno en la mayoría de las cepas y los halos de inhibición no son producto de un agotamiento por nutrientes el cual corroboramos con el control ( $\phi_{\text{control-1}}$ ) sin actividad.

Por otro lado, las cepas *Paenibacillus* sp. EA-ED0523 y *Staphylococcus* sp. EA-ED0524 no generaron halos de inhibición cuando fueron cultivadas por 72 h antes del contacto con *R. solanacearum* ( $\phi_{\text{membrana}}$ ), mientras que al ser cultivadas simultáneamente con *R. solanacearum* generaron halos de inhibición de  $30.7 \pm 0.7$  y  $31.6 \pm 0.4$  mm ( $\phi_{\text{control+1}}$ ). Estos resultados, conjuntamente con la nula actividad del SLC de estas cepas, sugiere que producción de los metabolitos activos están regulados por la interacción patógeno-bacteria (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto de la ausencia del patógeno sobre la actividad antibacteriana de diferentes cepas bacterianas.

Tratamiento	Halo de inhibición(mm)			Valor P	Foto ( $\phi$ membrana)
	$\phi$ membrana	$\phi$ control+1	$\phi$ control-1		
<i>Burkholderia</i> sp. EA-ED0047	37.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	33.6 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	<1.51e-9	
<i>Variovorax</i> sp. EA-ED0058	47.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	38.5 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	<1.51e-9	
<i>Bacillus</i> sp. EA-ED0076	63.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	52.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	<1.51e-9	
<i>Paenibacillus</i> sp. EA-ED00523	0.0 <sup>a</sup>	30.7 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	< 2.2e-16 <sup>***</sup>	
<i>Staphylococcus</i> sp. EA-ED00524	0.0 <sup>a</sup>	31.6 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	< 2.2e-16 <sup>***</sup>	
$\phi$ control-1 EA.ED0384					

Donde:

$\phi$ membrana: halo de inhibición de cepas bacterianas creciendo durante 72 h sobre filtros de membrana antes de sembrar por superficie a *R. solanacearum* en medio BGA.

$\phi$ control+1: Halo de inhibición de cepas bacterianas creciendo simultáneamente con *R. solanacearum* en medio BGA.

$\phi$ control-1: Halo de inhibición de la cepa EA-ED0384 creciendo durante 72 h sobre filtros de membrana antes de sembrar por superficie a *R. solanacearum* en medio BGA.

### 3.2 La actividad del SLC de *Bacillus* sp. EA-ED0076 es estable a cambios fisicoquímicos

Los metabolitos producidos por *Bacillus* sp. EA-ED0076 fueron potencialmente activos en diferentes pruebas de inhibición contra *R. solanacearum*, por lo que se caracterizó la estabilidad de la actividad del SLC a cambios fisicoquímicos. En condiciones de acidez (pH 2) se encontró que el SLC inhibió en 14.9 ± 0.9 mm y en condiciones de basicidad (pH 10.2) en 12.4 ± 1.2 mm, siendo este último diferente al control (pH 7.2). Los cambios de temperatura y la acción de la Proteínasa K no tuvieron un efecto significativo sobre la actividad del SLC, mostrando halos de

inhibición iguales al control SLC (Tabla 3). Estos resultados sugieren que las moléculas bioactivas no son de carácter proteico.

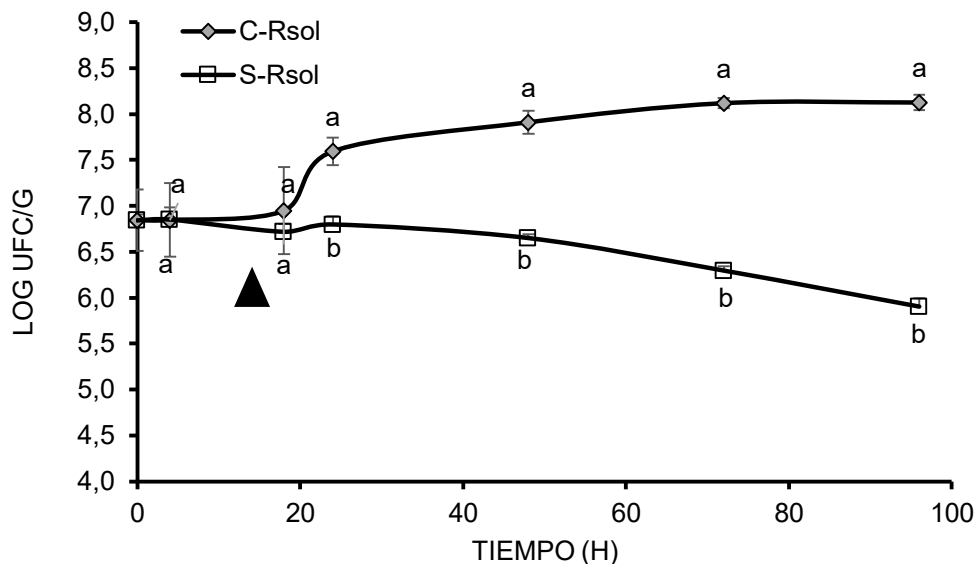
**Tabla 3.** Estabilidad antimicrobiana del SLC de *Bacillus* sp. EA-ED0076 bajo condiciones adversas

Tratamientos	Halo (mm)	
<b>Temperatura (°C)</b>	0	15.9 ± 0.5
	50	15.9 ± 0.5
	70	14.6 ± 0.7
	100	14.3 ± 0.5
<b>pH</b>	7.2	15.9 ± 0.5
	2.0	15.0 ± 0.5
	10.2	12.4 ± 0.9*
<b>Proteinasa K</b>	control	15.9 ± 0.5
	100°C	16.0 ± 0.6
	Pk	16.0 ± 0.7

Donde 0 = Control. pH= 7.2 pH inicial SLC. PK= Proteinasa K (2 mg-1mL). Temperatura (valor-p = 0.072), pH (valor-p < 0.012\*). Proteinasa K (valor-p = 0.713). ± Desviación estándar, n = 9.

### 3.3 El SLC de *Bacillus* sp. EA-ED0076 inhibe el crecimiento de *R. solanacearum* a nivel de microcosmos

El SLC obtenido del cultivo de la cepa *Bacillus* sp. EA-ED0076 en medio BG fue evaluado para determinar su efecto antimicrobiano sobre *R. solanacearum* bajo condiciones de crecimiento en microcosmos. El SLC de EA-ED0076 redujo la población de *R. solanacearum* a  $5 \times 10^5$  UFC/g a las 96 h, lo que equivalente a una reducción de 158 veces con relación al control el cual alcanzó  $8 \times 10^8$  UFC/g. Esta reducción fue altamente significativa ( $p < 2.898 \times 10^{-10}$ ) desde las 5 h después de aplicar el SLC directamente al suelo hasta las 96 h de evaluación en el suelo (Figura 2).



**Figura 2.** Efecto del SLC de *Bacillus* sp EA-ED0076 sobre el crecimiento de *R. solanacearum* en microcosmos. (♦) C-R.sol: control negativo inoculado con *R. solanacearum*. (□) S-Rsol: microcosmo inoculado con *R. solanacearum* con tratamiento SLC de *Bacillus* sp. EA-ED0076. (▲): aplicación del SLC a las 18 h al microcosmo. Letras diferentes indican diferencia significativa entre el tratamiento y el control ( $p < 2.898e-10$  \*\*\*) en pruebas de comparación de rangos múltiples de Tukey. Los intervalos representan el error estándar de la media ( $n = 9$ ).

Determinamos que el tratamiento del SLC de *Bacillus* sp. EA-ED0076 aplicado al suelo interviene en el crecimiento de *R. solanacearum* disminuyendo su población en el suelo. Estos resultados sugieren que la bacteria *R. solanacearum* es altamente sensible a los metabolitos presentes en el SLC de *Bacillus* sp y adicionalmente la acción de estos perdura en el tiempo de evaluación sobre la disminución de poblaciones del *R. solanacearum*, lo cual podría reducir la incidencia de la enfermedad del Moko en plantas de banano.

### 3.4. Purificación de compuestos por cromatografía (HPLC)

El SLC de *Bacillus* sp. es altamente bioactivo contra *R. solanacearum* a nivel de *in vitro* y de microcosmos. Con el fin de purificar los compuestos de esta cepa, se implementaron técnicas de SPE<sub>C18</sub> y RP-HPLC. De las fracciones obtenidas por SPE, solo aquella eluida con 100% MeOH fue activa contra *R. solanacearum* generando un halo de inhibición  $26.7 \pm 0.1$  mm (Tabla 4).

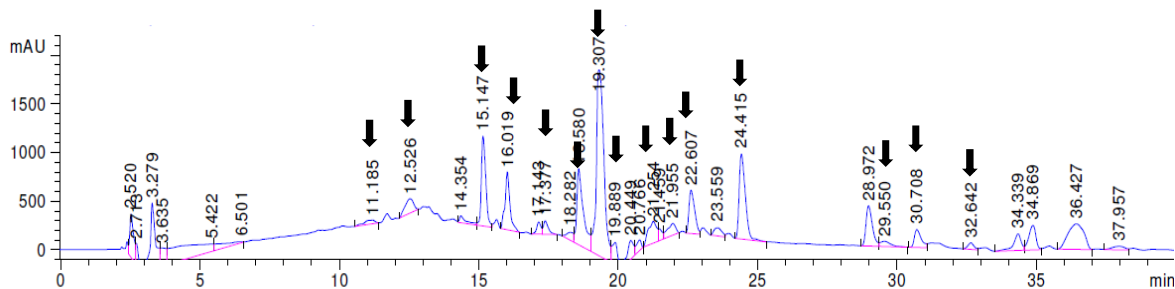


**Tabla 4.** Fracciones con actividad antimicrobiana separadas por SPE-C18

Fracción SPE	Halo inhibición (mm)
100% MeOH	26.7 ± 0.1 ***
50% MeOH	0.0
0% MeOH	0.0
C-MeOH	0.0

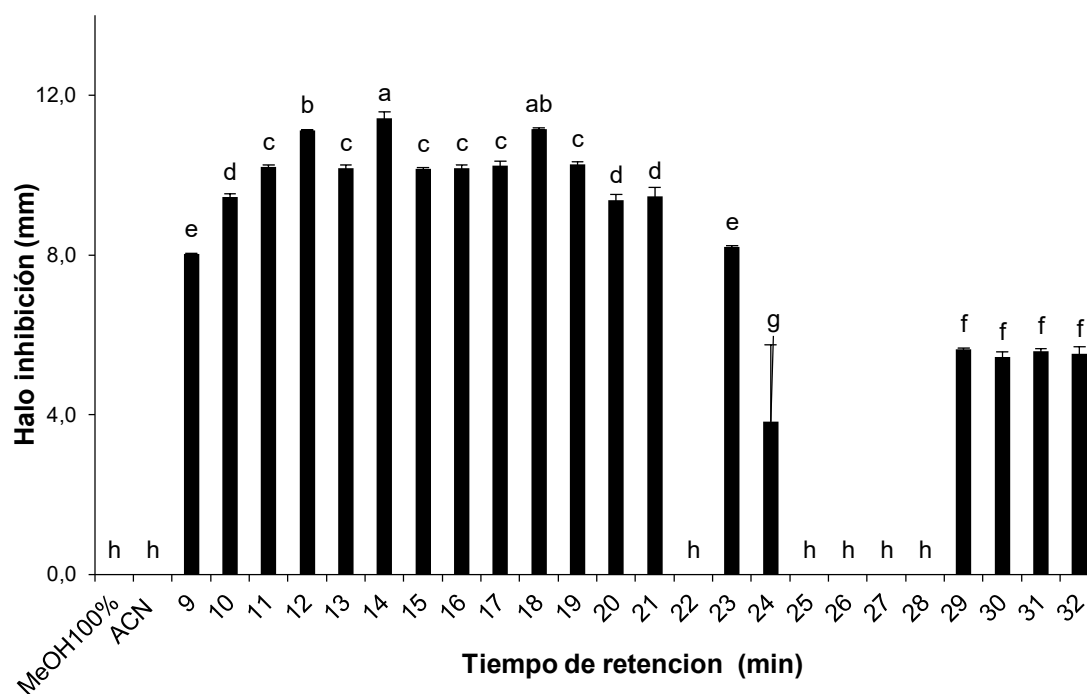
100% MeOH, 50% MeOH y 0% MeOH: fracciones obtenidas con 100% metanol, 50%, metanol y agua respectivamente. C-MeOH: Control metanol. ( $p < 2 \times 10^{-16}$ \*\*\*), n = 6.

Posteriormente la fracción 100% MeOH se purificó por HPLC encontrando el perfil cromatográfico descrito en la Figura 3. Durante la corrida se recolectaron diferentes fracciones con el fin de hallar los picos y tiempos de retención asociados a la actividad antimicrobiana contra *R. solanacearum*.



**Figura 3.** Perfil cromatográfico del HPLC de la fracción activa obtenida por SPE100% MeOH de la cepa *Bacillus* sp EA-ED0076. Condiciones de operación del HPLC:  $\lambda$  214 nm. 20  $\mu$ L de inyección (concentración 20 mg/mL), flujo 1 mL/min. 30°C, columna eclipse XDB C18 (250 x 4.6 mm 5  $\mu$ m). A: agua + 0.1% TFA. C: ACN + 0.1% TFA. Gradiente 20/100/100% B en 0/30/40 min. ↓: Picos con actividad antimicrobiana hacia *R. solanacearum*.

De las 25 fracciones recolectadas correspondientes a 29 picos del perfil cromatográfico, se encontró que el 60% de estas inhibieron a *R. solanacearum* en pruebas de difusión en pozos de agar con halos desde 3.5 mm hasta 11.4 ( $p < 2 \times 10^{-16}$ \*\*\*), entre los tiempos de retención 9 a 32 min los cuales son señalados con flechas en la Figura 4.



**Figura 4.** Actividad de fracciones recolectadas por HPLC contra *R. solanaceum*. La fracción inyectada correspondía a la fracción SPE 100% MeOH de *Bacillus* sp EA-ED0076. MeOH100%: control 1 y ACN: control 2. Los tratamientos con distintas letras difieren significativamente con respecto a los controles ( $p < 2 \times 10^{-16}$  \*\*\*) por pruebas de rangos múltiples de Tukey.

#### 4. Discusión

*Bacillus* sp. es un género de gran interés para el desarrollo de bioplaguicidas (Eilenberg *et al.*, 2001). Sin embargo, su efecto puede ser limitado debido a la dificultad de colonizar la rizosfera de las plantas. Por lo cual, la búsqueda y caracterización de compuestos producidos por bacterias es de gran importancia para el desarrollo de nuevas estrategias de control de fitopatógenos transmitidos por el suelo como *R. solanacearum*. En este estudio, se encontró una gran variedad de microorganismos antagonistas de *R. solanacearum* en condiciones *in vitro*. En particular cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Paenibacillus*., *Flavobacterium*., *Chryseibacterium*, *Delftia*., *Streptomyces*, *Serratia* y *Bacillus* fueron activas contra *R. solanacearum* a nivel *in vitro*, como se ha reportado en otros estudios (Huang *et al.*, 2013, Kheirandish y Harighi 2015, Lemessa y Zeller 2007 y Tan *et al.*, 2011). Por otro lado, las bacterias *Pseudomonas nitroreducens* y *Stenotrophomonas maltophilia* fueron activas, pero no se encontraron reportes en estudios previos. De la gran mayoría de los microorganismos evaluados en estudios previos, se ha determinado un potencial antagónico contra los agentes fitopatógenos pero en

algunos casos se desconoce el modo de acción desarrollado y cuáles son los metabolitos responsables de dicha actividad (Shields *et al.*, 2019). Por tal motivo, este estudio presenta un análisis de mayor profundidad sobre los metabolitos responsables de la actividad de los microorganismos potenciales contra *R. solanacearum*.

Entre las cepas encontradas se destacó el género *Bacillus* sp., el cual se ha reportado como agente de control biológico para manejo integrado de plagas y enfermedades (Pandin *et al.*, 2017, Villegas-escobar *et al.*, 2018). En este estudio se detectaron metabolitos bioactivos de la cepa *Bacillus* sp. EA-ED0076 contra *R. solanacearum*, los cuales produjeron halos de inhibición significativos respecto a otras cepas y a los controles de los diferentes experimentos; así como la capacidad de producir compuestos potenciales para el control del patógeno en diferentes medios de cultivos como BG, TSB y medio limitado en carbono. La evaluación de diferentes medios para la producción de estos compuestos es importante debido a que se ha establecido que el medio de cultivo es determinante en la síntesis de metabolitos y mecanismos de supervivencia para las bacterias. Esto debido a que la transcripción de genes específicos puede ser modificada de acuerdo a las condiciones de su entorno y los nutrientes circundantes, lo que da como resultado la modificación y la acción de las moléculas (Phulara *et al.*, 2019).

También se detectó que la cepa *Bacillus* sp. EA-ED0076 posee la capacidad intrínseca de producir metabolitos en ausencia y presencia del patógeno, lo cual se evidenció en pruebas con membranas y SLC; por el contrario, las cepas *Paenibacillus* sp. EA-ED0523 y *Staphylococcus* sp. EA-ED-0524 no sintetizaron metabolitos cuando fueron cultivadas 72 h antes del contacto con el patógeno, sugiriendo que la producción de estos metabolitos podría estar regulada por la interacción patógeno-bacteria. Este hallazgo es de gran importancia, debido a que existe un gran interés en desarrollar nuevas estrategias que aumenten el número y la diversidad de los metabolitos secretados por los microorganismos (Traxler *et al.* 2013). Dentro de estas estrategias se han determinado algunos mecanismos que podrían ser responsables de la supresión del patógeno observada en las interacciones bacterianas: como la interferencia con el sistema de detección de *quórum sensing* u otras vías de transducción de señales involucradas en la regulación de la producción de antibióticos (Venturi y Subramoni 2009); así como la elicitación biótica inducida por células muertas o extractos de las mismas para inducir la producción de compuestos antibióticos (Luti y Mavituna 2011).

Traxler *et al.* (2013) reportó que interacciones interespecie con *Streptomyces coelicolor* al cultivarse en cocultivos con especies diferentes de bacterias, dio lugar a cambios drásticos en la producción de sus metabolitos en relación con los resultados cuando las bacterias se cultivaron como cultivos puros; considerando

que las interacciones pueden influir en la producción de estas moléculas. Otros estudios mencionan la importancia de las interacciones bacterianas interespecíficas para generar cambios fenotípicos entre los microorganismos involucrados ó para desencadenar la producción de antibióticos o enzimas extracelulares relacionadas a la competencia (Garbeva y de Boer 2009, Seyedsayamdost *et al.*, 2012).

En este estudio se determinó que los metabolitos de *Bacillus* sp. EA-ED0076, producidos en las diferentes evaluaciones, fueron estables a cambios fisicoquímicos, lo que sugiere que estas moléculas no son de carácter proteico y su bioactividad no se ve deteriorada por condiciones adversas. Estos resultados son consistentes con los reportados por Romero *et al.*, (2007) donde menciona que los SLC de *B. subtilis* son estables a temperaturas entre 50 y 100°C, así como a la degradación por proteinasa K, sin embargo cuando estos SLC fueron tratados a pH extremadamente ácido, se precipitaron perdiendo su actividad antifúngica, pero esta se recuperó una vez se restituyó a su pH inicial. Esto podría indicar el carácter anfílico de los compuestos obtenidos en el cultivo microbiano. La estabilidad de los compuestos a los factores fisicoquímicos evaluados no sólo es un indicio de la naturaleza de los compuestos en evaluación, sino que además se convierten en una característica positiva en el momento de aplicar estos tratamientos para el control de patógenos de forma edáfica.

En esta investigación se evaluó además el efecto de los compuestos producidos por el *Bacillus* potencial sobre la cinética de crecimiento de *R. solanacearum* en el tiempo a nivel de microcosmos. Para esta etapa de evaluación se aplicó el SLC producido por *Bacillus* sp. EA-ED0076 en el suelo a las 18 h después de la inoculación del patógeno en el suelo y se determinó que esta aplicación afectó de manera significativa el crecimiento del patógeno en la fase exponencial, a partir de 5 horas después de la adición del tratamiento a los microcosmos. La población de *R. solanacearum* no se redujo un 100% después de aplicado el tratamiento, posiblemente debido a que *Ralstonia* es una bacteria fitopatógena con varios estilos de vida en el suelo que facultan la capacidad de residir por largos periodos de tiempo en condiciones de limitación extendida de nutrientes (no sólo en suelo, también en aguas y arvenses), se ha establecido que posee hábitos endofúngales y tiene diversos mecanismos de supervivencia (Spraker *et al.*, 2016, Álvarez, López y Biosca 2008). Sin embargo, la capacidad bioactiva de los metabolitos producidos por *Bacillus* sp. EA-ED0076 logró controlar su crecimiento, por lo cual, en un futuro sería interesante determinar si la población remanente de *R. solanacearum* en el suelo luego de ser tratado con SLC, tiene la capacidad infectiva en plantas de banano.

Es necesario realizar la caracterización bioquímica y la identificación de moléculas para cada especie del grupo operacional *Bacillus* sp., con el fin de determinar el tipo

de moléculas activas y su mecanismo de acción contra cada patógeno. Se estableció que los metabolitos activos de *Bacillus* sp. EA-ED0076 tenían capacidad inhibitoria cuando fueron separados por cromatografía SPE<sub>C18</sub> en una fracción metanólica de 100%, lo que sugiere que estos compuestos son hidrofóbicos o anfifílicos y posiblemente sean lipopéptidos, compuestos altamente caracterizados en este género microbiano. Peláez (2006) menciona que la porción hidrófoba de los lipopéptidos está compuesta por ácidos grasos (saturados, insaturados o hidroxilados), mientras que la parte hidrófila se compone generalmente de péptidos. Las diferencias en estos compuestos dependen de la secuencia de aminoácidos y la ramificación de ácidos grasos, criterios que permiten la clasificación en tres familias surfactinas, iturinas y fengicinas (Romero *et al.* 2007). Se ha reportado que moléculas bioactivas contra fitopatógenos de tipo lipopéptidos como las fengicinas y surfactinas producidas por *B. subtilis*, fueron eluidas en acetoniitrilo 100% en separación por columna C18, al igual que los compuestos de la cepa *B. amyloliquefacies* EA-CB959 antagonista de *R. solanacearum* mostrando la capacidad inhibitoria por parte de lipopéptidos en fracciones metanólicas del 100 y 80% (Villegas-Escobar *et al.*, 2013, Villegas-escobar *et al.* 2018). Adicionalmente, se encontró que la mayoría de compuestos del SLC *Bacillus* sp. EA-ED0076 arrojados en el perfil cromatográfico en la purificación por RP-HPLC, tenían la capacidad de inhibir a *R. solanacearum* a nivel *in vitro*, estos resultados indican que esta cepa es productora de moléculas potencialmente activas contra *R. solanacearum*. No obstante, la identificación estructural por espectrometría de masas no se ha llevado a cabo y es el próximo paso en un camino para la determinación específica de los metabolitos activos contra este fitopatógeno.

## 5. Conclusiones

Una de las principales razones para la identificación y bioprospección de las moléculas producidas por este género, se debe a que la mayoría de los estudios se han enfocado en la acción de los microorganismos, más no en la producción de sus moléculas bioactivas para el tratamiento de patógenos (Compant *et al.*, 2005), esto es aún más importante si se tiene en cuenta que muchas enfermedades fitopatógenas afectan a los órganos subterráneos que generalmente están fuera del alcance de los tratamientos plaguicidas (Diallo *et al.*, 2011). En este sentido se logró la elucidación de las moléculas responsable de inhibir a *R. solanacearum* a nivel de microcosmos, así como la caracterización de las propiedades fisicoquímicas del SLC de *Bacillus* sp. EA-ED0076 siendo estables en su actividad. También se determinó el potencial de esta cepa para la producción de metabolitos bioactivos en diferentes medios de cultivo y técnicas biotecnológicas, lo que concluye que *R. solanacearum* es altamente sensible a las moléculas sintetizadas por esta cepa, las

cuales podrían ser candidatas para su identificación estructural y posibles tratamientos para reducir los tiempos de cuarentena en suelos contaminados.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad EAFIT, a la Asociación nacional de Bananeros de Colombia (AUGURA) y Colciencias por el apoyo financiero de este proyecto a partir del contrato FP44842-473-2016. Esta investigación fue posible gracias a los contratos de suscripción número 166 y 139 con el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial en las categorías "Contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados para la investigación científica y contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados para fines comerciales respectivamente".

## Referencias

- Álvarez, B., López, M. M., & Biosca, E. G. (2008). Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology*, *154*(11), 3590–3598. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019448-0>
- Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1713*(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
- Barbosa, T. M., Serra, C. R., Ragione, R. M. La, Woodward, M. J., & Henriques, A. O. (2000). Screening for Lund Cancer. *New England Journal of Medicine*, *343*(22), 1267–1633. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.968>
- Béchet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclère, V., ... Jacques, P. (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *95*(3), 593–600. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4181-2>
- Bhunchoth, A., Phironrit, N., Leksomboon, C., Chatchawankanphanich, O., Kotera, S., Narulita, E., ... Yamada, T. (2015). Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*, *118*(4), 1023–1033. <https://doi.org/10.1111/jam.12763>
- Brötz, H., Bierbaum, G., Reynolds, P. E., & Sahl, H. G. (1997). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *European Journal of Biochemistry*, *246*(1), 193–199. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00193.x>
- Chang, Y. C., Reddy, M. V., Umemoto, H., Sato, Y., Kang, M. H., Yajima, Y., &

- Kikuchi, S. (2015). Bio-augmentation of cupriavidus sp. CY-1 into 2,4-D contaminated soil: Microbial community analysis by culture dependent and independent techniques. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145057>
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., ... Borriss, R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, *140*(1–2), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2003). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard. In *Clsi* (Vol. 23, pp. 1–58). <https://doi.org/M02-A11>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Christophe, C., & Barka, Ait, E. (2005). PAS 100:2011 Specification for Composted Materials. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 1–68. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951>
- Denny, T. P. (2006). Plant pathogenic. *Group*, 573–644.
- Diallo, S., Crépin, A., Barbey, C., Orange, N., Burini, J. F., & Latour, X. (2011). Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, *75*(3), 351–364. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01023.x>
- Digonnet, C., Martinez, Y., Denancé, N., Chasseray, M., Dabos, P., Ranocha, P., ... Goffner, D. (2012). Deciphering the route of *Ralstonia solanacearum* colonization in *Arabidopsis thaliana* roots during a compatible interaction: Focus at the plant cell wall. *Planta*, *236*(5), 1419–1431. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1694-y>
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology. *Forum American Bar Association*, (1), 387–400.
- Fegan, M., & Prior, P. (2014). How Complex is the “ *Ralstonia Solanacearum* Species Complex How Complex is the “ *Ralstonia solanacearum* Species Complex ,” (September).
- Gamliel, A., Austerweil, M., & Kritzman, G. (2000). Non-chemical approach to soilborne pest management - Organic amendments. *Crop Protection*, *19*(8–10), 847–853. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00112-5)
- Garbeva, P., & de Boer, W. (2009). Inter-specific interactions between carbon-limited soil bacteria affect behavior and gene expression. *Microbial Ecology*, *58*(1), 36–46. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9502-3>
- González-Jaramillo, L. M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Villegas-Escobar, V., & Ortiz, A. (2017). Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *156*, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.021>
- Huang, J., Wei, Z., Tan, S., Mei, X., Yin, S., Shen, Q., & Xu, Y. (2013). The

rhizosphere soil of diseased tomato plants as a source for novel microorganisms to control bacterial wilt. *Applied Soil Ecology*, 72, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.017>

- Kakuhenzire, R., Lemaga, B., Manzi, G., Hakiza, J. J., Kakuhenzire, R., & Kanzikwera, R. (2011). The effect of crop rotation on bacterial wilt incidence and potato tuber yield. *African Crop Science Journal*, 9(1). <https://doi.org/10.4314/acsj.v9i1.27647>
- Kheirandish, Z., & Harighi, B. (2015). Evaluation of bacterial antagonists of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato. *Biological Control*, 86, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.007>
- Krober, M., Wibberg, D., Grosch, R., Eikmeyer, F., Verwaaijen, B., Chowdhury, S. P., ... Schuluter, A. (2014). Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 5(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00252>
- Lee, S. G., & Chang, H. C. (2018). Purification and characterization of mejucin, a new bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* SN7. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.044>
- Lemessa, F., & Zeller, W. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control*, 42(3), 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.014>
- Luti, K. J. K., & Mavituna, F. (2011). Elicitation of *Streptomyces coelicolor* with dead cells of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* in a bioreactor increases production of undecylprodigiosin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2), 461–466. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3032-2>
- Mao, L., Jiang, H., Wang, Q., Yan, D., & Cao, A. (2017). Efficacy of soil fumigation with dazomet for controlling ginger bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in China. *Crop Protection*, 100, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.06.013>
- Mora, I., Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2015). Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. *PLoS ONE*, 10(5), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127738>
- Moszer, I., Louis M. Jones, Sandrine, M., Farby, C., & Danchin, A. (2002). SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 62–65. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.62>
- Nanjundan, J., Ramasamy, R., Uthandi, S., & Ponnusamy, M. (2019). Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. *Microbial Pathogenesis*, 128(May 2018), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.037>



- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., ... Thonart, P. (2007). Brief report Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants, 9, 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Pandin, C., Le Coq, D., Canette, A., Aymerich, S., & Briandet, R. (2017). Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microbial Biotechnology*, 10(4), 719–734. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12693>
- Peláez, F. (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.010>
- Phulara, S. C., Chaturvedi, P., Chaurasia, D., Diwan, B., & Gupta, P. (2019). Modulation of culture medium confers high-specificity production of isopentenol in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(4), 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.002>
- Posada, L. F., Ramírez, M., Ochoa-Gómez, N., Cuellar-Gaviria, T. Z., Argel-Roldan, L. E., Ramírez, C. A., & Villegas-Escobar, V. (2016). Bioprospecting of aerobic endospore-forming bacteria with biotechnological potential for growth promotion of banana plants. *Scientia Horticulturae*, 212, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.040>
- Posada U., L. F. (2017). Promoción de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* EA-CB0575, colonización rizosférica y potencial genómico y bioquímico, 204. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/57419/>
- Ramesh, R., & Phadke, G. S. (2012). Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Crop Protection*, 37, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.008>
- Restrepo, J. A. Á., Gaviria, P. A. R., Montoya, M. M., Biología, L. De, Ciencias, F. De, & Medellín, S. (2008). Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* agroecosistemas bananeros de Colombia en, 33, 197–203.
- Řezanka, T., Palyzová, A., Faltýšková, H., & Sigler, K. (2018). *Siderophores: Amazing Metabolites of Microorganisms. Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 60). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00005-X>
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J.-W., Arrebola, E., ... Pérez-García, A. (2007). The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430–440. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-4-0430>

- Savitri, I., Hermansyah, H., Sahlan, M., Yuliani, H., Perdani, M. S., Wijanarko, A., & Manurung, M. (2018). Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. *Energy Procedia*, *153*, 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.043>
- Schönfeld, J., Gelsomino, A., Overbeek, L. S., Gorissen, A., Smalla, K., & Elsas, J. D. (2003). Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, *43*(1), 63–74. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01046.x/full>
- Seyedsayamdost, M. R., Traxler, M. F., Clardy, J., & Kolter, R. (2012). *Old meets new: Using interspecies interactions to detect secondary metabolite production in actinomycetes*. *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 517). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404634-4.00005-X>
- Shields, M. W., Johnson, A. C., Pandey, S., Cullen, R., González-Chang, M., Wratten, S. D., & Gurr, G. M. (2019). History, current situation and challenges for conservation biological control. *Biological Control*, *131*(August 2018), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.12.010>
- Sierra-Zapata, L., Romero-Tabarez, M., & Nat, R. (2018). *Bacillus* sp. strains and their inducible in vitro antagonism: A biochemical and molecular study, (May).
- Singh, A., Chaudhary, S., Shankar, A., & Prasad, V. (2018). *Polyketide and Its Derivatives. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63503-7.00013-9>
- Spraker, J. E., Sanchez, L. M., Lowe, T. M., Dorrestein, P. C., & Keller, N. P. (2016). *Ralstonia solanacearum* lipopeptide induces chlamyospore development in fungi and facilitates bacterial entry into fungal tissues. *ISME Journal*, *10*(9). <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.32>
- Staskawicz, B. J., Mudgett, M. B., Dangl, J. L., & Galan, J. E. (2001). Common and Contrasting Themes of Plant and Animal Diseases 10.1126/science.1062013. *Science*, *292*(5525), 2285–2289. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/292/5525/2285>
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, *56*(4), 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Tan, H., Zhou, S., Deng, Z., He, M., & Cao, L. (2011). Ribosomal-sequence-directed selection for endophytic streptomycete strains antagonistic to *Ralstonia solanacearum* to control tomato bacterial wilt. *Biological Control*, *59*(2), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.07.018>
- Thunell, R. C., Locke, S. M., & Williams, D. F. (1988). © 198 8 Nature Publishing Group. *Nature*, *334*, 601–604.

- Traxler, M. F., Watrous, J. D., Alexandrov, T., Dorrestein, P. C., & Kolter, R. (2013). Interspecies Interactions Stimulate Diversification of the Streptomyces. *MBio*, 4(4), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00459-13.Editor>
- Turner, M., Jauneau, A., Genin, S., Tavella, M.-J., Vailleau, F., Gentzbittel, L., & Jardinaud, M.-F. (2009). Dissection of Bacterial Wilt on *Medicago truncatula* Revealed Two Type III Secretion System Effectors Acting on Root Infection Process and Disease Development. *Plant Physiology*, 150(4), 1713–1722. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141523>
- Venturi, V., & Subramoni, S. (2009). Future research trends in the major chemical language of bacteria. *HFSP Journal*, 3(2), 105–116. <https://doi.org/10.2976/1.3065673>
- Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J. J., Argel, L. E., Orduz Peralta, S., & Romero-Tabarez, M. (2013). Fengycin C produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of Natural Products*, 76(4), 503–509. <https://doi.org/10.1021/np300574v>
- Villegas-escobar, V., González-jaramillo, L. M., Ramírez, M., Natalia, R., Sierrazapata, L., Orduz, S., & Romero-tabarez, M. (2018). Lipopeptides from *Bacillus* sp . EA-CB0959 : Active metabolites responsible for in vitro and in vivo control of *Ralstonia solanacearum*. *Biological Control*, 125(June), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.06.005>
- Wang, X., & Liang, G. (2014). Control Efficacy of an Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain BZ6-1 against Peanut Bacterial Wilt , *Ralstonia solanacearum*, 2014.
- Zheng, D., Zeng, Z., Xue, B., Deng, Y., Sun, M., Tang, Y. J., & Ruan, L. (2018). *Bacillus thuringiensis* produces the lipopeptide thumolycin to antagonize microbes and nematodes. *Microbiological Research*, 215(December 2017), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.004>