

Evaluación del efecto del tiempo de incubación y el tipo de sustrato sobre la producción de compuestos antifúngicos por fermentación sumergida usando un aislado nativo del género *Bacillus*

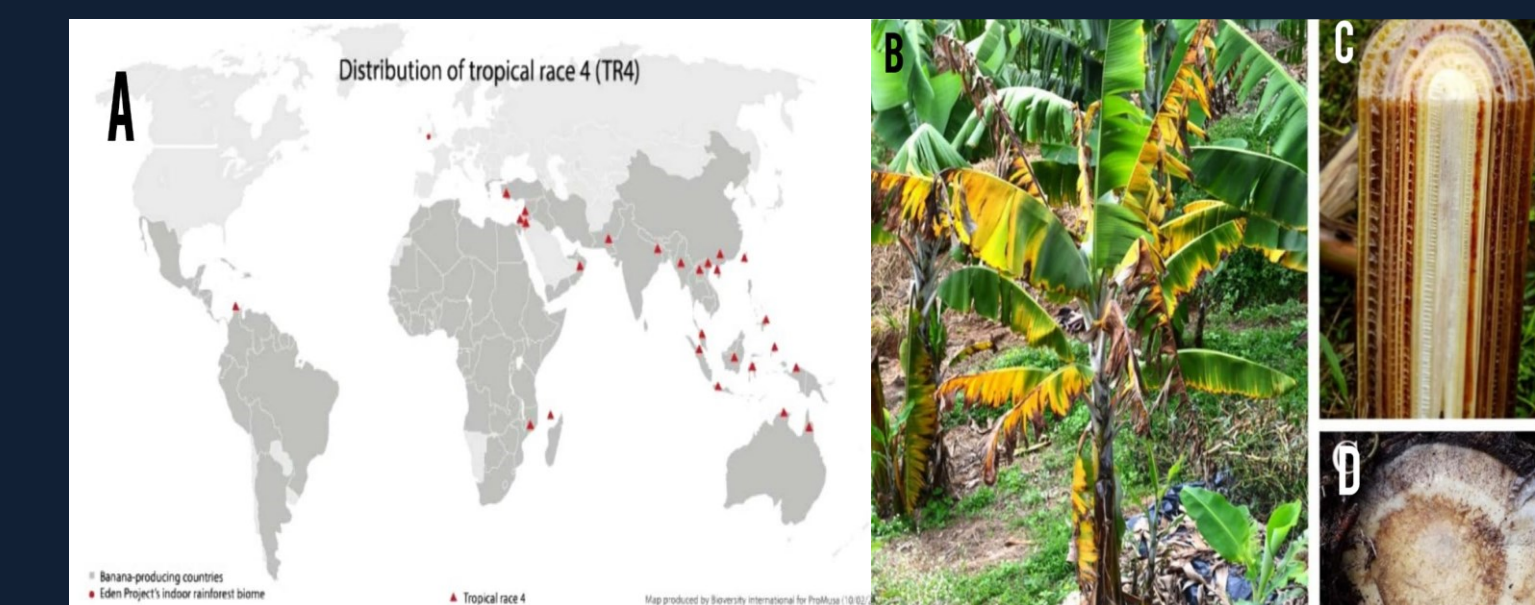
Samuel Alcaraz, Santiago Cardona, Carolina Gallego, Juan Camilo García, Estefanía Londoño, Valentina Martínez, Daniel Molina, Angie Ramírez, Julieta Vargas, Michel Vásquez, Diana Velasco, Gloria Zapata, José Gregorio Martínez, Susana Ochoa, Víctor Osorio*.

* Autor de correspondencia: victor.osorio@colmayor.edu.co

Cursos: Microbiología II, Ingeniería de Bioprocesos y Diseño Experimental. Facultad de Ciencias de la Salud. I.U. Colegio Mayor de Antioquia.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos antifúngicos son utilizados como estrategia para combatir enfermedades causadas por hongos en animales, humanos y plantas. Un hongo importante en agricultura es *Fusarium*, el cual causa grandes pérdidas en cultivos como el banano en Colombia y el mundo.



https://www.comunidadandina.org/StaticFiles/202072181721Guia%20Andina%20Final.pdf
Figura 1: A: Distribución de *Fusarium* TR4 en el mundo. B: Síntomas externos del hongo. C-D: Síntomas internos del hongo.

El empleo de compuestos antifúngicos producidos por bacterias, como *Bacillus* es una estrategia prometedora para controlar hongos fitopatógenos. La producción de estos compuestos está influenciada por el tiempo de incubación y las fuentes de carbono utilizadas.

Dado que *Bacillus* es un género diverso que se encuentra en diversos entornos, el aislamiento de bacterias con actividad antifúngica a partir del suelo se erige como una alternativa efectiva en comparación con el uso de fungicidas convencionales en la industria.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto del tiempo y el tipo de sustrato sobre la producción de compuestos antifúngicos por fermentación sumergida usando un aislado nativo del género *Bacillus*.

Específicos

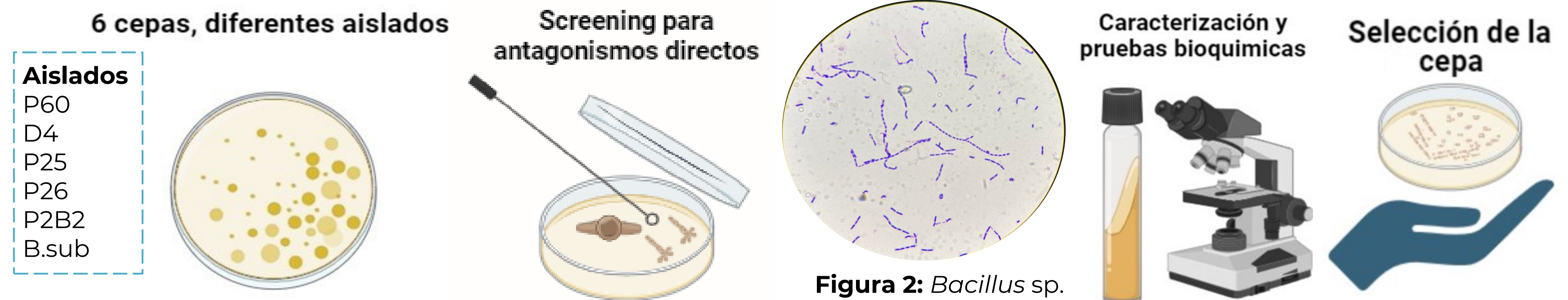
1. Caracterizar mediante pruebas bioquímicas cepas de *Bacillus* sp. con potencial antifúngico aisladas a partir de muestras de suelo.
2. Determinar el efecto del tiempo sobre el crecimiento y la producción de compuestos antifúngicos en fermentaciones en Erlenmeyer usando un aislado nativo del género *Bacillus*.
3. Identificar el efecto del tipo de sustrato sobre el crecimiento y la producción de compuestos antifúngicos en fermentaciones con un aislado consistente con *Bacillus* sp.

Bibliografía

- Agronegocios. (2021, 30 de noviembre). Identificaron un nuevo brote del *Fusarium* Raza 4 Tropical ubicado en el Magdalena. Agronegocios. <https://www.agronegocios.co/agricultura/identificaron-un-nuevo-brote-del-fusarium-raza-4-tropical-ubicado-en-el-magdalena-3633223>
- Coronel Rojas, N. A. (2018). Análisis de los patrones de producción de lipopéptidos antifúngicos de *Bacillus Subtilis* Ctpx 52-1 durante diferentes etapas de crecimiento [Tesis de pregrado, Universidad de las Américas]. Repositorio Institucional UDLA.
- Rentería Martínez, M. E., Guerra-Camacho, M. A., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S. F., Meza-Moller, A. del C., & Guzmán-Ortiz, J. M. (2019). Descripción y comparación entre morfotipos de *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* y *F. oxysporum* patógenos en sandía cultivada en Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1), 16-34.
- Sarti, G. C., & Miyazaki, S. S. (2013). Actividad antifúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. *Agrociencia*, 47(4), 373-383.
- Villa, P., Alfonso, I., Rivero, M. J., & González, G. (2007). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* bioantagonistas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 41(1), 52-56.

METODOLOGÍA

1. Selección y caracterización de microorganismos

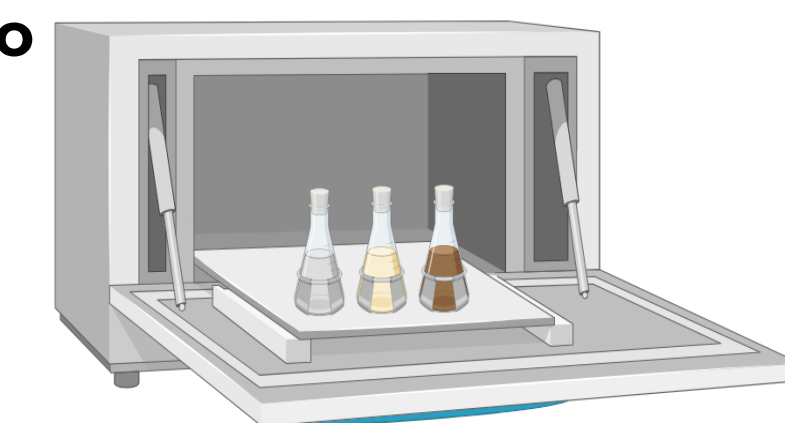
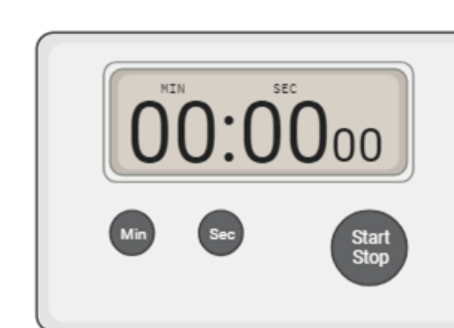


2. Preparación de medios



3. Montaje en Erlenmeyer

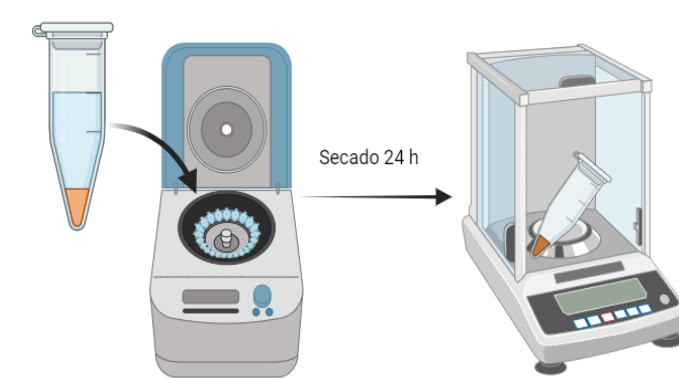
- Tiempo
- Fuentes de carbono



Cada tratamiento se realizó por triplicado. Se recolectaron muestras a las 24, 72 y 120 horas. Se mantuvieron los cultivos a **37 °C** con agitación de **150 rpm**.

4. Pruebas analíticas

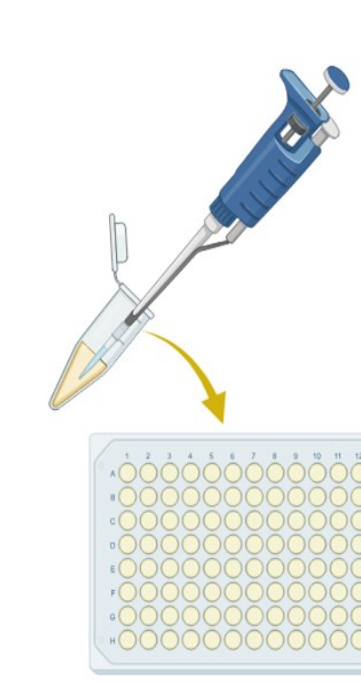
4.1. Determinación de biomasa



1. 1 mL de cada medio en tubos Eppendorf pesados.
2. Centrifugación a 12000 rpm/5 min.
3. Secado del precipitado durante 24 horas.
4. Pesaje del material seco.

4.2. Actividad Antifúngica

Actividad antifúngica en placas de 96 pozos. Se inoculan 10 uL de sobrenadante a un pozo con 90 uL de medio Sabouraud con $\sim 1 \times 10^5$ mL de *Fusarium* sp.



5. Análisis estadístico

En software: SPSS. ANOVA, pruebas no paramétricas y Tukey. Comparación de medias y medianas para seleccionar el mejor tratamiento.



<https://acortar.link/V4anqi>

RESULTADOS

Caracterización de aislados nativos

- Bacilos Gram positivos, esporulados
 - Colonias blancas – cremosas
 - **Positivos para:** TSI, Catalasa, Citrato, SIM, Fermentación Glucosa, Hidrólisis almidón, VP
 - **Negativos para:** Reducción nitratos y nitritos, Oxidasa, Lisina, Rojo de Metilo.
- P60 fue el único aislado Manitol negativo y Mossel positivo:**
Bacillus cereus

Antagonismos directos para selección del aislado

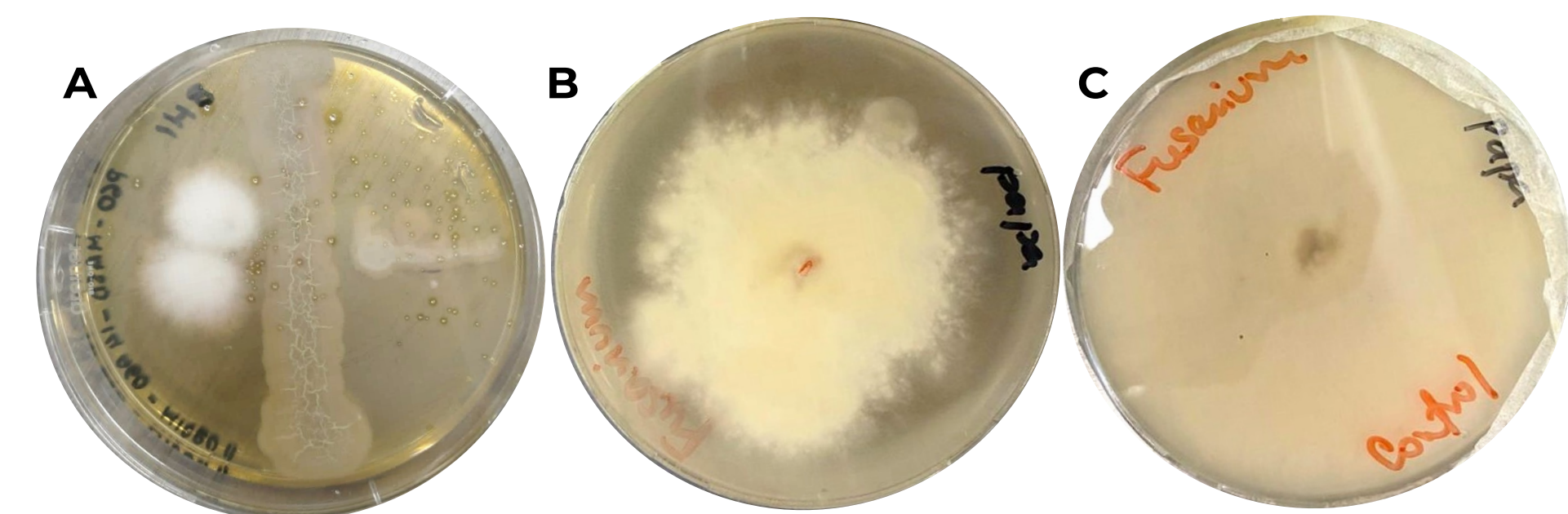


Figura 3: A: Antagonismo inicial entre P60 y *Fusarium* sp. B: Inhibición de *Fusarium* sp. por compuestos volátiles de *Bacillus cereus* P60 C: Control *Fusarium* sp.

Determinación de biomasa

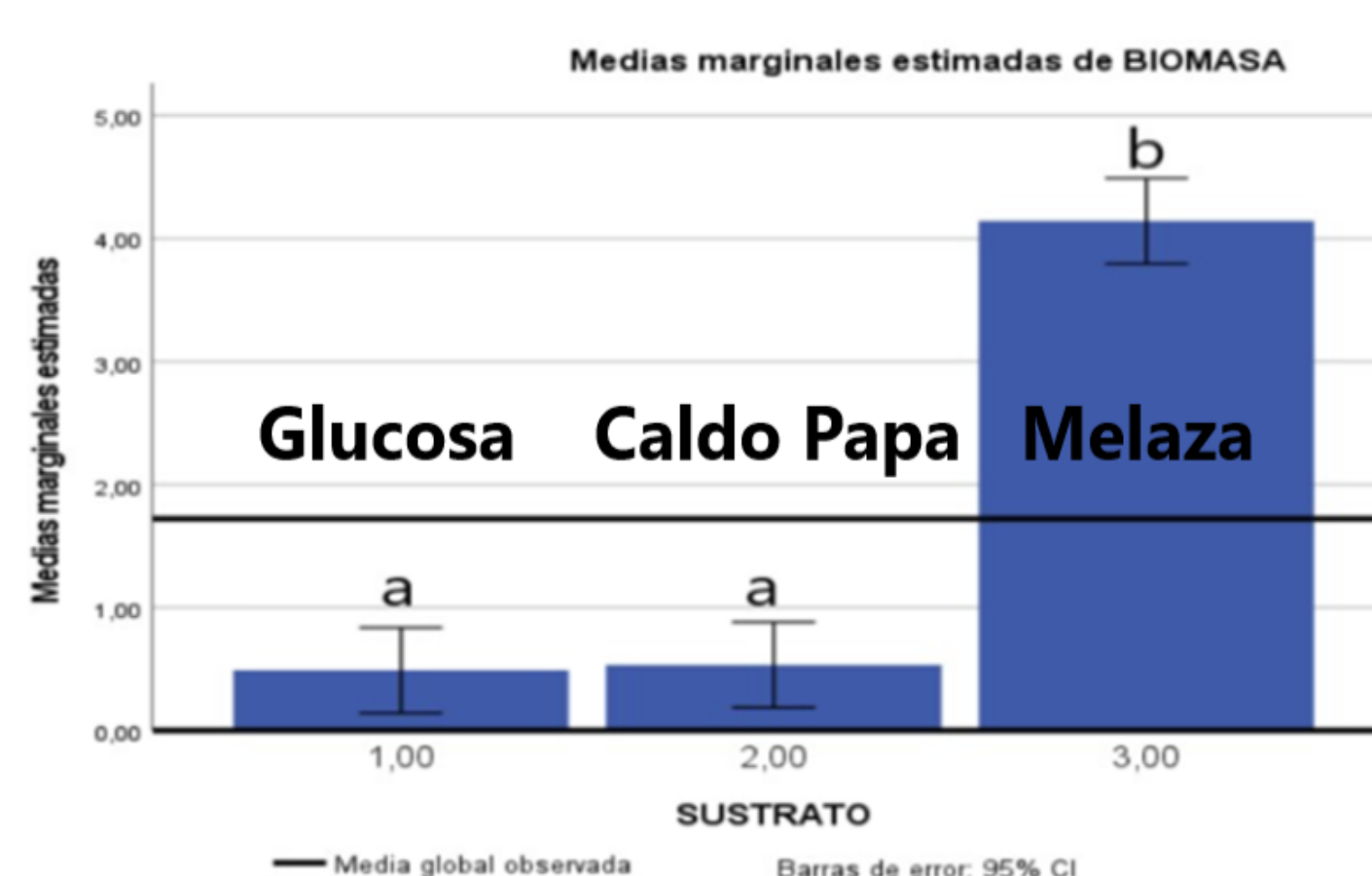


Figura 4: Concentración de biomasa por tipo de sustrato. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p < 0,05$)

Actividad antifúngica

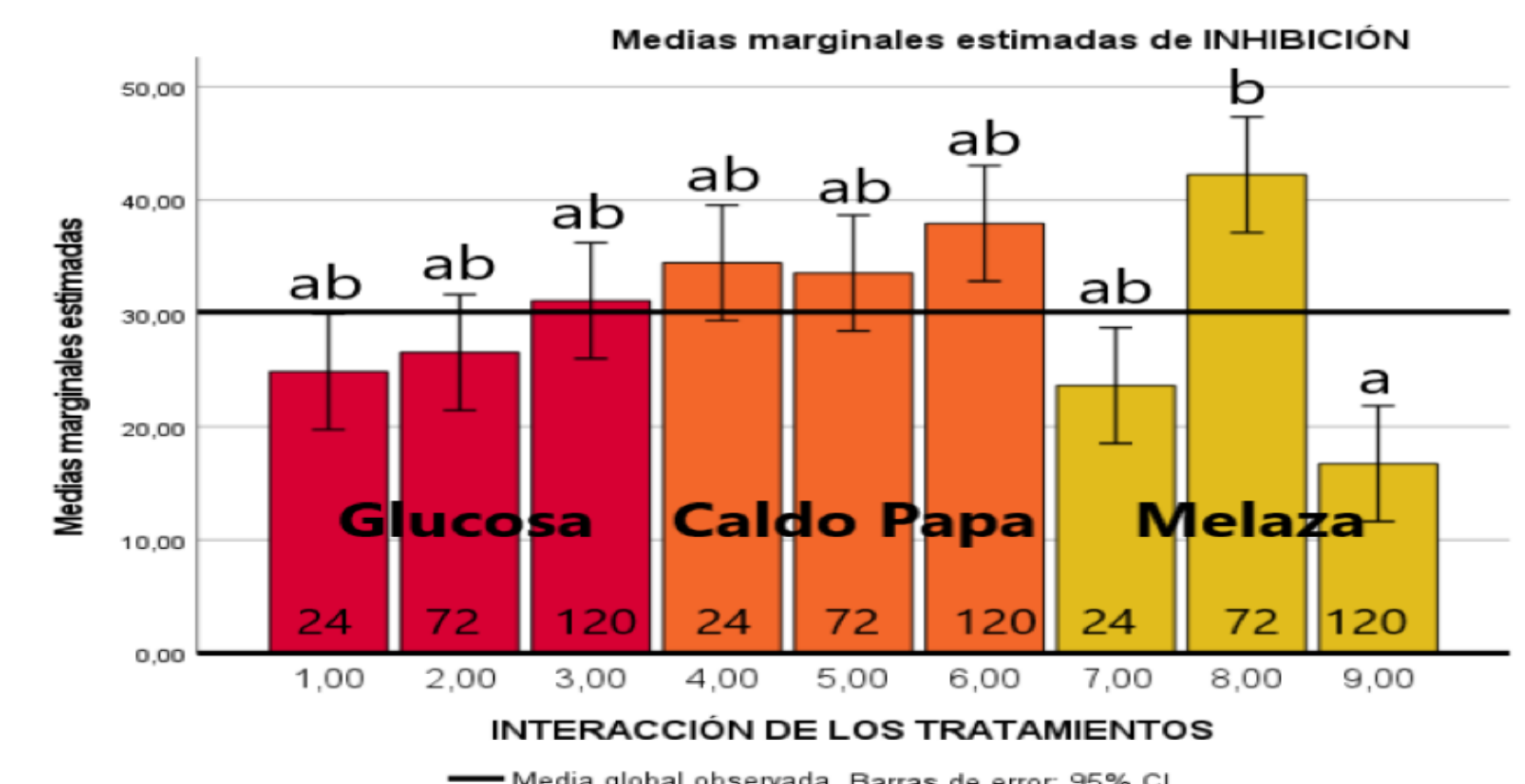


Figura 5: Inhibición de *Fusarium* sp. por tratamientos de interacción. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

DISCUSIÓN

Este estudio confirma los resultados de Coronel Rojas, (2018), que la melaza es una fuente de carbono eficiente para la producción de antifúngicos por *Bacillus* sp. debido a su riqueza en nutrientes y azúcares. De igual forma se confirma que una incubación por 72 horas es adecuada para la producción de estos compuestos lo que podría estar vinculado con la fase estacionaria del crecimiento de *Bacillus*, en la que comienza a generar diversos metabolitos secundarios.

CONCLUSIONES

- El aislado nativo consistente con *Bacillus cereus* posee actividad antifúngica contra *Fusarium* sp.
- El tiempo no tuvo un efecto significativo en la producción de biomasa
- El tiempo de incubación y el sustrato afectan la producción de compuestos antifúngicos.
- La mejor actividad antifúngica se da a las 72 horas usando melaza como fuente de carbono