

Efecto del método de siembra in vitro sobre la actividad fungistática de *Weissella confusa*

^{1*}Liliana Serna-Cock., ²Leidy J. Valencia-Hernández., ³Karina López-López.,
⁴Eyder D. Gómez-López

^{1* y 2} Grupo de Investigación bacterias ácido lácticas y sus aplicaciones biotecnológicas industriales. ³ Grupo de investigación IPMA Interacción Planta Microorganismo Ambiente. ⁴ Grupo de Investigación en Agroecología. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Calle 32 No. 12 - 00 Vía Candelaria, Colombia. Autor para correspondencia: * lserna@unal.edu.co.

Palabras clave: Fungicidas, *Weissella confusa*, bactericidas, bacterias ácido lácticas.

Actualmente hay interés en el uso de bacterias ácidolácticas (BAL) como controladores biológicos, debido a que además de producir compuestos antimicrobianos, también son capaces de producir metabolitos secundarios antifúngicos. Se ha encontrado actividad anti-microbiana, fungistática y fungicida de BAL del género *Weissella* (Mauch et al., 2010), sin embargo, no se reporta un método de siembra idóneo para cuantificar la actividad fungistática de estas bacterias contra hongos fitopatógenos. Por lo anterior, en esta investigación se evaluaron in vitro, los efectos del método de siembra y la distancia de siembra sobre la actividad fungistática de *Weissella confusa* contra *Fusarium solani*.

Metodología

Microorganismos, suspensión micelial y condiciones de fermentación. Para medir la actividad fungistática se utilizó la cepa *F. solani* aislada de pitahaya amarilla afectada con podredumbre basal en estudios de Parra et al. (2012 n.p.). La BAL, *W. confusa*, se aisló en estudios previos de Serna-Cock et al. (2010). *Fusarium solani* se multiplicó a 25°C por siete días en agar papa dextrosa (PDA) y *W. confusa* en sustrato De-Man Rogosa y Sharpe (MRS) a 33°C por 24 horas. A partir del cultivo en caja de *F. solani* se hizo una suspensión de conidios en agua estéril de una concentración de 8 x 10⁵ conidios/ml. Para la producción de *W. confusa* se fermentaron en discontinuo con empleo de sustrato MRS, volumen de trabajo de 200 ml y agitación elipsoidal a 100 r.p.m. por 4 horas a 33°C. Las fermentaciones se ajustaron a pH 6 y se usó NaOH 1M. Se utilizó 10% de inóculo con respecto al volumen del sustrato.

Determinación de la actividad fungistática. La actividad fungistática se evaluó utilizando dos métodos para la siembra de *F. solani* y tres distancias de siembra entre la bacteria y el hongo. Los métodos de siembra fueron rayado con asa y difusión en disco de papel filtro y las distancias de siembra entre *W. confusa* y *F. solani* fueron 1, 2.4 cm y 4.4 cm. Para la siembra de *W. confusa* se tomaron en forma aseptica discos de papel filtro de 5 mm de diámetro, los cuales se impregnaron con 60 ml del sustrato de fermentación, que presentaban concentración de 10⁹ microorganismos por mililitro. Los discos se inocularon en placas de Petri que contenían agar PDA. Para ambos métodos de siembra se inocularon 30 ml de suspensión de conidios, donde para el rayado con asa se hizo inoculación directa con micropipeta y para difusión en disco papel filtro se siguió la metodología descrita para *W. confusa*. Posteriormente las cajas se incubaron a 33°C por 48 horas, seguida por una incubación a 25°C por cinco días. La actividad fungistática se midió mediante la ecuación siguiente para calcular el porcentaje de reducción del área de crecimiento de *F. solani* (%R).

$$\%R = (apc - apt) / (apc) * 100$$

donde, *apc*: es el área promedio del control (mm), *apt*: el área promedio del tratamiento (mm).

Ánálisis estadístico. Se utilizó un diseño factorial de 2 x 3 completamente al azar, con dos repeticiones. Los factores fueron: (1) tipo de siembra, con dos niveles, rayado con asa y disco papel filtro; y (2) distancia entre *W. confusa* y *F. solani*, con tres niveles: 1, 2.4 y 4.4 cm. La variable de respuesta fue la actividad fungistática. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico SAS versión 9.13 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). La comparación entre promedios se llevó a cabo a través de la prueba Tukey con una probabilidad de P < 0.05.

Resultados

En la Foto 1 aparece la actividad fungistática de *W. confusa* contra *F. solani* con las técnicas rayado con asa y difusión en disco papel filtro, respectivamente. La mayor actividad fungistática se obtuvo con la técnica difusión en disco papel filtro a una distancia de siembra de 2.4 cm. Estas observaciones son acordes con los estudios hechos por Mauch et al. (2010) quienes probaron la actividad antifúngica de 129 bacterias ácidolácticas contra especies de *Fusarium*. El método de siembra afectó ($P<0.05$) la actividad fungistática de *W. confusa* contra *F. solani*. También se encontraron diferencias ($P<0.05$) sobre la actividad fungistática de *W. confusa* debido a las distancias de siembra. La interacción método de siembra x distancia ($P<0.05$) tuvo un efecto significativo sobre la variable respuesta.

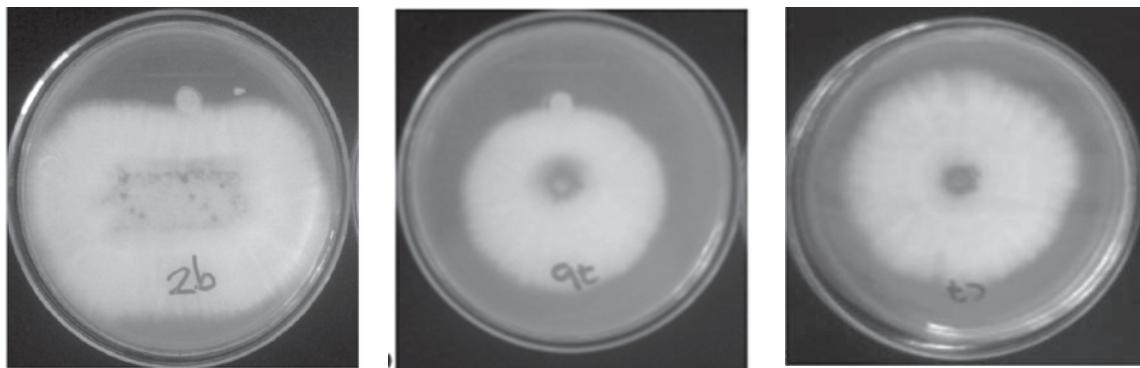


Foto 1. Actividad fungistática de *W. confusa* contra *F. solani* (a) Con la técnica rayado con asa, (b) Difusión en disco papel filtro, (c) Control con la técnica en disco papel filtro a una distancia de siembra de 2.4 cm.

Conclusión

Los resultados sugieren que una forma idónea de medir la actividad fungistática es la siembra realizada en disco papel filtro y a distancia de 2.4 cm, en la cual es posible cuantificar la mayor actividad fungistática. Sin embargo, es necesario utilizar tecnologías más precisas para la cuantificación de la actividad fungistática, como lo es el análisis de imágenes digitales, que permite medir la dimensión fractal de las hifas y analizar morfométricamente el crecimiento de los fitopatógenos, después de haber sido expuestos a la bacteria ácido láctica.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Colciencias por el financiamiento de esta investigación.

Referencias

- Ndagano, D.; Lamoureux, T.; Dortu, C.; Vandermoten, S.; y Thonart P. 2011. Antifungal Activity of 2 Lactic Acid Bacteria of the *Weissella* Genus Isolated from Food. *J Food Sci.* 76 (6):305 - 311.
- Mauch, A.; Dal Bello, F.; Coffey, A.; y Arend, E. K. 2010. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *Int. J. Food Microbiol.* 141 (1-2):116 - 121.
- Parra Sánchez, E.; Caetano, C. M.; Gómez, y López E. D. 2012. Caracterización morfológica y molecular de la principal limitante fitopatológica de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) y sus potenciales controladores. En imprenta.
- Serna Cock, L.; Valencia Hernández, L. J.; y Campos Gaona, R. 2010. Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 55:55 - 65.