

Aislamiento y caracterización de bacterias antagonistas y sus metabolitos para el control de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)

Oswaldo Díaz, Yonis Hernández* y Carolina Flores

¹Instituto de Botánica Agrícola, Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Maracay 2101. Aragua Venezuela

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo buscar alternativas para el manejo de la “quemazón de los cereales”, producida por *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, con bacterias obtenidas a partir de muestras de suelo, raíces y hojas, colectadas en plantaciones de maíz, ubicadas en El Asentamiento Campesino Mucura II del municipio Zamora, estado Aragua. De 20 muestras procesadas, fueron seleccionadas 28 colonias, tomando como criterio la capacidad de crecimiento e inhibición de otras colonias en el medio. Para la confrontación *in vitro* con *A. avenae* subsp. *avenae* se utilizaron los medios de cultivo agar nutritivo (AN) y B de King (BK). Para obtener los metabolitos bacterianos, se utilizaron tres aislamientos, tres medios líquidos y dos tiempos de incubación. Las pruebas de eficacia de los metabolitos obtenidos se realizaron en los medios AN y BK. Los aislamientos fueron caracterizados por pruebas culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Solo 10 aislamientos identificados como S12M, R10M, H2.1M, S10M, S3M, R3M, H1M, H2M, S1.1M, y H1.2M, resultaron con capacidad antagonista a *A. avenae* subsp. *avenae*. El mejor medio y tiempo de incubación para la extracción de los metabolitos fue BK y 24 horas. Por las características fenotípicas, los aislamientos S1.1M, H1M, S10M, H1.2M, H2.1M y R10M, fueron ubicados en el género *Pseudomonas* del grupo fluorescente, S3M y S12M en *Bacillus* y H2M en *Pantoea* pero R3M no pudo ser identificado. Las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* fueron los más eficaces como antagonistas.

Palabras clave: Control bacterial, *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* sp, *Pantoea*

Isolation and characterization of antagonistic bacteria and their metabolites for controlling the *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in maize (*Zea mays* L.)

ABSTRACT

This research was conducted to look for alternatives for the management of the “burning of cereals”, produced by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. The bacteria was obtained from soil, root and leaves samples, collected in corn plantations located in the Múcura II Peasant Settlement, Zamora municipality, Aragua state. Twenty samples were processed, twenty eithg colonies were selected, taking the growth and inhibition capacity of other colonies in the media a criteria. For the *in vitro* confrontation with *A. avenae* subsp. *avenae* culture media nutrient agar (AN) and B of King (BK) were used. Three isolates, three liquids media and two incubation times were used

*Autor de correspondencia: Yonis Hernández

E-mail: yonisbact@gmail.com

to obtain bacterial metabolites. The effectiveness of the obtained metabolites tests were performed in the AN and BK media. The isolates were characterized by cultural, morphological, physiological, and biochemical tests. Only 10 isolates identified as S12M, R10M, H2.1M, S10M, S3M, R3M, H1M, H2M, S1.1M, and H1.2M, were antagonistic ability to *A. avenae* subsp. *avenae*. The best media and incubation time for the extraction of metabolites was BK and 24 hours. By phenotypic characteristics, the isolates S1.1M, H1M, S10M, H1.2M, H2.1M and R10M, were placed in the genus *Pseudomonas* fluorescent group, S3M and S12M in *Bacillus* and H2M in *Pantoea* but R3M could not be identified. The bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Bacillus* were most effective as antagonists.

Key words: Bacterial control, *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* sp, *Pantoea*

INTRODUCCIÓN

Trujillo y Hernández (1992) realizaron el primer señalamiento de la quemazón de los cereales, causada por *Pseudomonas avenae*, ahora *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Schaad *et al.*, 2008) en Venezuela, en muestras de maíz, provenientes de los estados Monagas y Yaracuy y posteriormente, se detectó en los estados Aragua y Guárico, afectando a sorgo y falso Jonson (Hernández *et al.*, 1989; Trujillo y Hernández, 1992). Cuando afecta al maíz su producción es nula, ya que afecta la parte superior de las plantas, y las mazorcas se pudren. También se producen manchas en las hojas que pueden ser elípticas u oblongas, y estrías necróticas que coalescen y forman áreas necróticas extensas que abarcan en algunos casos, todo el ancho de las hojas o porciones de ellas, ocasionando pérdidas considerables del área fotosintética (Trujillo y Hernández, 1992). Además, es una bacteria que puede ser llevada en la semilla, constituyéndose en fuente de inóculo primario en el campo. Esta bacteria se ha señalado en diferentes partes del mundo afectando no sólo a maíz, sino también a otras especies de gramíneas como el arroz (*Oryza sativa* L.) (Song *et al.*, 2004), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Hussnain *et al.*, 2011) y ornamentales (Seijo, 2011). En Venezuela se ha detectado en maíz dentado (Hernández y Trujillo, 2001; Trujillo y Hernández, 1992).

La agricultura del siglo XX se caracterizó por el uso indiscriminado de biocidas y de una agricultura intensiva que afectaron los ciclos biogeoquímicos del suelo y del ambiente, ocasionando erosión y baja productividad de los mismos. En informe de la FAO (2005) y de la ONU (2017), se señala que el historial agrícola arrastra consigo el peso de las equivocaciones

derivadas de la previa falta de conocimientos sobre la toxicidad de los plaguicidas, su persistencia en suelos y el agua, su acumulación a través de la cadena alimentaria y sus efectos en las especies. Parte del costo de estos errores se observan en la mortalidad humana, en el daño a ecosistemas y en el aumento de la resistencia a los plaguicidas. Por ejemplo, hasta ese momento se conocen más de 450 especies nocivas de artrópodos que han desarrollado resistencia a uno o más plaguicidas a causa de sus reiteradas aplicaciones, así como patógenos causantes de enfermedades en las plantas (FAO, 2005; ONU, 2017). Por lo tanto en los últimos años se ha prestado atención al estudio de nuevas tecnologías que posibiliten el uso de prácticas de producción agrícola sustentables, especialmente las referidas al control biológico. Por todo lo antes expuesto, el objetivo general de esta investigación fue el de obtener bacterias antagonistas y sus metabolitos bacterianos para su potencial uso en el control de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* en el cultivo de Maíz (*Zea mays* L.).

METODOLOGIA

Muestreo de campo. Para la obtención de posibles aislamientos antagonistas, se realizó un muestreo en siembras de maíz ubicados en el Asentamiento Campesino Mucura II, municipio Zamora, estado Aragua. Se recolectaron muestras de hojas, raíces y suelo adyacente a la misma. Para la muestra de tejido vegetal se tomaron tres hojas por planta que no presentaban síntomas visibles de alguna patología, a una altura de un metro aproximadamente. Las muestras de las raíces fueron tomadas de aquellas que estaban a partir de 10 cc de profundidad y las de suelo 15 cm por debajo del cuello de la planta. Todas las muestras fueron trasladadas al laboratorio en cavas y procesadas para los respectivos aislamientos. Fueron procesadas ocho muestras de suelo, seis de

raíces y seis de hojas para un total de 20 muestras.

Aislamiento de posibles bacterias antagonistas

En el procesamiento de las muestras, se siguió la metodología descrita por Gomes *et al.* (2005), con algunas modificaciones. Para las muestras de suelo y raíces, se preparó solución salina al 0.85% de Cloruro de sodio y medio de cultivos BK con cicloheximide (para inhibir el crecimiento de hongos), según recetas descritas (Schaad *et al.*, 2001). Las raíces fueron pesadas y lavadas con hipoclorito de sodio al 3% por 2 min, enjuagadas varias veces con agua destilada y secada con papel absorbente, un gramo fue colocado en un mortero esterilizado con 10 ml de solución salina para luego macerarlas. De las muestras de suelo se pesó un gramo que se colocó en un beaker con 10 ml de solución salina, agitándose suavemente. De las soluciones obtenidas, se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . Con una pipeta se tomó 0,1 ml, se colocó en el centro de la placa con medio BK, y se diseminó con una varilla. Las placas fueron etiquetadas y mantenidas en condiciones de laboratorio durante 24 a 48 horas. Al crecimiento de las colonias aisladas, se repitieron para obtener los cultivos puros.

Para las muestras de hojas, se tomaron fragmentos de las mismas que fueron lavadas con agua destilada, maceradas en morteros estériles con 5 ml de solución salina. A partir de la suspensión obtenida se realizaron diluciones en serie hasta 10^{-4} . Se tomó 0,1 ml de las suspensiones 10^{-2} y 10^{-3} y se diseminaron en placas con los medios de cultivo B de King (BK) y agar nutritivo (AN), realizando siembra por extensión en superficie. Después de 24 a 48 horas de incubación en condiciones de laboratorio, se seleccionaron colonias aisladas que presentaron características diferentes, para luego replicarlas y obtener cultivos puros.

A cada aislamiento se le asignó una denominación dependiendo de donde fueron obtenidas, S para las de suelo, H para hojas, y R para raíz, el número de bacteria aislada y todas con la terminación M, por ser el cultivo maíz. Por ejemplo, la bacteria S3M, es la bacteria número 3 aislada, proveniente de muestras de suelo.

Patógenos. Se utilizó un aislamiento liofilizado de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* de la Colección de Bacterias Fitopatógenas de la Sección

de Fitopatología, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, definido con el código 201 de dicha colección. Para comprobar la viabilidad se tomaron viales conservados en freezer a -20°C , a las cuales les fue agregado 1 ml de solución salina, luego se tomó una porción con un anillo de platino y se realizó un estriado sencillo sobre placas con medio de cultivo Agar carbonato de calcio-levadura (YCA). Las placas se incubaron en condiciones de laboratorio realizándose observaciones diariamente. Una vez crecidas, las colonias fueron replicadas nuevamente en medio de cultivos AN y YCA. Para comprobar la patogenicidad de la bacteria, se inocularon plantas sanas de maíz, aspejando sobre las hojas, una suspensión ajustada a una concentración de 10^8 UFC, luego se introdujeron en una cámara húmeda por 24 horas. Al observar los síntomas se hizo el reaislamiento sembrando en medio YCA para verificar que se trataba del mismo patógeno inoculado.

Prueba de confrontación *in vitro*

Los diferentes aislamientos seleccionados de las muestras procesadas, fueron confrontados con *A. avenae* subsp. *avenae*. El procedimiento fue el de Gómez *et al.* (2005).

- a. **Preparación de las bacterias seleccionadas para pruebas de antagonismo.** Con los aislamientos obtenidos y la bacteria *A. avenae* subsp. *avenae*, de 48 horas de crecimiento sobre medio AN y BK, se prepararon suspensiones de cada uno, ajustándolas a una concentración de 10^8 cel/ml con el tubo N°2 de la escala Mc. Farland (Barret, 1975).
- b. **Con la bacteria *A. avenae* subsp. *avenae*,** se realizó una siembra por extensión en superficie con $100\ \mu\text{l}$ de la suspensión en placas con medio de BK y AN. Con cultivos puros de los aislamientos obtenidos, fueron humedecidos discos de papel filtro esterilizado de 6 mm de diámetro, con $10\ \mu\text{l}$ de la suspensión los cuales se dejaron secar por 10 minutos en la cámara de flujo laminar en placas petri.
- c. **Confrontación.** Los discos impregnados con los posibles antagonistas a probar, fueron colocados sobre el medio de cultivo que contenía al patógeno a razón de 5 discos por cada placa y de forma equidistante (Lorian, 1980). Las placas

fueron colocadas en condiciones de laboratorio (Temperatura promedio de ± 24 °C), realizando las observaciones a las 48 horas. Los halos de inhibición de crecimiento de *A. avenae* subsp. *avenae*, fueron medidos con una regla graduada, desde el borde del disco hasta el extremo del halo. Los ensayos fueron hechos bajo un diseño completamente aleatorizado con 5 repeticiones, en el cual cada disco correspondió a una unidad experimental.

Extracción de metabolitos bacterianos

Para esta prueba fueron seleccionados los aislamientos R10M, S10M y S12M, las dos primeras por ser bacterias Gram negativas del género *Pseudomonas* fluorescentes, por proceder de muestras distintas, y por producir los mayores halos de inhibición *in vitro* sobre *A. avenae* subsp. *avenae*; el tercero por ser Gram positivo del género *Bacillus*, y el que produjo mayor halo de este género.

Se probaron tres tipos de medios líquidos: caldo nutritivo (CN), B de King (BK) y extracto de malta (YMG); dos tiempos de incubación de la bacteria: 24 horas y 5 días. El procedimiento fue el siguiente; se prepararon los medios de cultivos CN (5 gr de extracto de levadura por 1 L agua destilada), BK (1,5 g Sulfato de Potasio Dibásico, 1,5 g Sulfato de Magnesio, 15 g Peptona, 15 ml Glicerol por 1 L agua destilada) (Schaad *et al.*, 2001) y YMG (4 g levadura, 10 g Extracto de malta, 4 g Dextrosa en 1 l. agua destilada), (Powell *et al.*, 2000); se dispensaron 250 ml de cada medio y esterilizaron en autoclave por 20' a 15 lbs de presión. Con los cultivos puros de los aislamientos seleccionados de 48 h de crecimiento sobre medio AN o BK, se realizaron suspensiones bacterianas ajustadas a una concentración de 10^8 cel/ml comparándolo con el tubo N° 2 de la escala Mc. Farland (Barret, 1975). Seguidamente, se agregó 100 μ l de la suspensión bacteriana a cada frasco con cada tipo de medio y se colocó sobre un agitador, por 24 horas y 5 días respectivamente. Una vez concluido el tiempo de incubación, los cultivos fueron centrifugados dos veces en una ultracentrífuga marca Beekman XL-90 Class S, la primera por 15 min a 10000 RPM, luego el sobrenadante separado se centrifugó por 10 min a 18000 RPM, para separar al máximo las células bacterianas del medio líquido con los metabolitos bacterianos. El sobrenadante se liofilizó en un liofilizador marca LABCOMCO,

durante 8 horas a -40 °C y luego almacenado a -20 °C hasta su uso.

Prueba de eficacia *in vitro* de los metabolitos obtenidos

Se utilizaron dos tipos de medios (AN y BK) con discos de papel de filtro. El procedimiento fue el siguiente:

Los metabolitos extraídos y liofilizados fueron diluidos en 200 μ l de agua destilada estéril, se agitó el vial para mezclar bien. Con una pinza se colocaron 10 discos de papel filtro esterilizado de 5 mm de diámetro, sobre una placa Petri estéril, y se humedecieron con 15 μ l del metabolito. Seguidamente, 100 μ l de *A. avenae* subsp. *avenae*, fue sembrada por extensión en superficie en placas con medio de cultivo BK y AN, y sobre este colocados los discos con el respectivo metabolito a probar, en un total de 9 placas de AN y 9 placas BK. Las placas fueron dejadas en condiciones de laboratorio y revisadas diariamente, la presencia de halos de inhibición de crecimiento de la bacteria fue medida con una regla graduada, partiendo del borde del disco hasta donde terminara dicho halo. Estos ensayos se realizaron bajo un diseño completamente aleatorizado con 5 repeticiones, cada disco correspondió a una unidad experimental.

Análisis Estadístico. Se comprobaron los supuestos de normalidad y luego los análisis de varianza de todos los resultados, y pruebas de medias según Tukey para las confrontaciones en medio semisólido. Todos estos análisis se realizaron con el programa estadístico SAS.

Caracterización de los aislamientos

Todos los aislamientos bacterianos fueron caracterizados, usando pruebas culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas según Schaad *et al.*, (2001), Manual de Bergey (Holt *et al.*, 1994), Janse (2005), para determinar a nivel de "genero" o posibles especies de los aislamientos en estudio. La caracterización cultural a las colonias, fue realizada observando con una lupa estereoscópica, la forma, borde, relieve, y color en el medio AN. Las pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas fueron: tinción de rojo Congo, KOH al 3%; catalasa; producción de H₂S; crecimiento a 20% de NaCl; hidrólisis del almidón; fluorescencia en medio B de King; crecimiento y producción de ácidos a partir de carbohidratos como L-Arabinosa y trehalosa;

licuefacción de la gelatina; reducción de nitratos; crecimiento a 41°C; reacción hipersensitiva en hojas de tabaco; actividad pectolítica; Arginina dihidrolasa; requerimientos de oxígeno, a través de las pruebas de Hugh y Leifson y medio de tioglicolato; Oxidasa, y producción de Levan .

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento de posibles bacterias antagonistas

En las placas de AN y BK, con las muestras procesadas, se observó el crecimiento de una diversidad de colonias, abundantes tanto en las muestras de suelo y raíces así como en aquellas provenientes de hojas. Se obtuvieron cultivos puros de 28 colonias tomando en consideración su abundancia y mayor capacidad de crecimiento en el medio de cultivo e inhibición de crecimiento de otras colonias, posteriormente fueron seleccionados 10. Cuatro de los aislamientos eran de suelo, 4 de hojas y 2 de raíces, identificados como S12M, S10M, S3M, S1.1M, R10M, R3M, H1.2M, H1M, H2M, H1.2M. Señala Toppo (2015) que la rizosfera es considerada como el punto caliente de biodiversidad. También se ha señalado que la superficie de las hojas (filoplano) constituye otra fuente para el aislamiento de antagonistas (Zhou *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2007).

Pruebas de confrontación

De acuerdo al análisis de varianza (Cuadro 1) de los resultados obtenidos en las pruebas de confrontación hubo diferencias significativas entre los 10 aislamientos confrontados con *A. avenae* subsp. *avenae* y diferencias altamente significativas en la interacción de los aislamientos y el tipo de medio en el cual fue realizada la confrontación. De acuerdo a las pruebas de medias según Tukey, con la interacción del aislamiento y el tipo de medio, en Agar Nutritivo, se formaron tres grupos homogéneos (Cuadro 2), los aislamientos que produjeron mayores halos de inhibición fueron S10M y H1.2M, con 7,87 y 5,67 mm respectivamente. De igual forma en el medio B de King se formaron tres grupos homogéneos con producción de mayores halos de inhibición de los aislamientos S1.1M, y H2.1M, (Cuadro 2). Con la interacción bacteria-medio, se encontró, que los aislamientos S12M, R10M, H1M, y H1.2M produjeron halos de inhibición en ambos medios (Figura 1).

Cuadro 1. Análisis de Varianza para las confrontaciones de los aislamientos antagonistas a *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* en dos tipos de medio.

Fuente de Variación	Gl	SC	CM	F
Repetición	2	15.321	7.6607	
Tipo de Bacteria	9	114.317	12.7019	2.73*
Medio confrontado	1	4.267	4.2667	0.92 ns
Interacción de Bacteria por tipo de medio	9	192.733	21.4148	4.61 **
Error	38	176.519	4.6452	
Total	59	503.157		

CV 77.71

Cuadro 2. Pruebas de media de los halos de inhibición del crecimiento de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* producidos por los aislamientos provenientes de muestras de maíz sobre los medios Agar Nutritivo y B de King.

Aislamiento	Halo (mm) en medio AN	Aislamiento	Halo (mm) en medio BK
S10M	7,87 a	S1.1M	5,87 a
H1.2M	5,67 ab	H2.1M	5,60 a
S12M	3,27 bc	H1.2M	4,80 ab
H1M	2,80 bc	S12M	3,80 abc
R10M	2,53 bc	R10M	3,67 abc
R3M	2,07 bc	H1M	3,47 abc
S1.1M	0,73 c	H2M	1,67 bc
H2M	0,13 c	S3M	1,53 bc
H2.1M	0,00 c	S10M	0,00 c
S3M	0,00 c	R3M	0,00 c

Medias con letras diferentes indican en una misma columna ndican diferencias significativas ($p < 0,05$)

La inhibición del crecimiento de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* en los medios confrontados permitió inferir sobre los mecanismos de acción utilizados por los antagonistas, ya que el aislamiento H2.1M y S3M inhibieron crecimiento solo en BK por lo que se deduce que actúan principalmente por la producción de sideróforos (Neiendam *et al.*, 1998; Villas *et al.*, 2002). Los aislamientos S10M y R3M que solo inhibieron en medio agar nutritivo, probablemente su mecanismo de acción radica en la producción de algún tipo de bacteriocina o antibiótico (Durán y Cazorla, 2005); sin embargo los

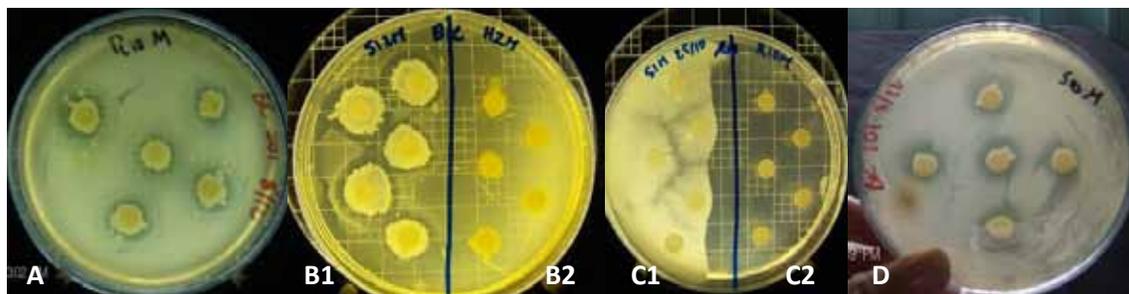


Figura 1. Halos de inhibición de crecimiento de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* *in vitro*, producidos por los aislamientos: A: R10M sobre medio BK. B1 y B2: R10M (izquierda) y H2M (derecha), sobre medio AN. C1 y C2: S12M (Izquierda) y H2M (Derecha) sobre medio BK y D: S10M sobre medio BK.

aislamientos restantes produjeron halos de inhibición en ambos tipos de medios, exhibiendo mecanismos de acción más versátiles. Se ha demostrado que las bacterias aisladas de suelo de la rizósfera, son beneficiosas para las plantas por el efecto indirecto sobre patógenos por la producción de sideróforos, 1,3 - glucanasa, antibióticos, pigmentos fluorescentes y cianuro (Pal *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2006) y directamente, en la fijación de nitrógeno (Santi *et al.*, 2013) y solubilización de nutrientes (Rodríguez y Fraga, 1999)

Pruebas de eficacia *in vitro* de los metabolitos obtenidos

En el Anavar (Cuadro 3) se encontraron diferencias altamente significativas entre los metabolitos extraídos en los tres medios de cultivos líquidos (BK, CN, YMG) y los dos tiempos de incubación (24 horas y 5 días) y los halos de inhibición del crecimiento producidos sobre *A. avenae* subsp. *avenae*. También

se encontraron diferencias significativas con respecto a los dos medios de confrontación (BK y AN). En las interacciones entre las variables, tiempo de incubación, tipo de metabolitos, y los medios de confrontación, se observaron diferencias altamente significativas.

De acuerdo a la prueba de Tukey (Cuadro 4) se formaron 7 grupos de medias. Los mejores resultados se observaron con los metabolitos extraídos en el medio BK con tiempos de incubación de 24 horas y confrontados en el mismo medio, se destacan los metabolitos de los aislamientos R10M con halos de inhibición de 6,6 mm y el del S10M en medio de BK incubados por 24 h y 5 días (Figura 2), con halos de 4,6 mm para ambos tiempos; y el del S12M en medio BK, incubado por 5 días, con un halo de inhibición de 3 mm; todos estos confrontados sobre medio BK.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Villas *et al.*, (2002), que evaluaron medios de

Cuadro 3. Análisis de varianza de la confrontación de 9 metabolitos bacterianos extraídos de CN, YMG y BK, en dos tiempos de incubación (24h y 5 días).

Fuente de Variación	Gl	SM	CM	F
Repetición	4	0,1154	0,02885	
Tiempo de Incubación	1	4,3861	4,38614	281,31**
Tipo de Metabolito	8	22,0955	2,76194	177,14**
Tipo de medio confrontado	1	1,2684	1,26839	81,35**
Interacción del tiempo de incubación y Tipo de metabolito	8	16,0130	2,00163	128,38**
Interacción del tiempo de incubación y tipo de medio confrontado	1	0,6517	0,65171	41,80**
Interacción del tipo de metabolito con el tipo de medio confrontado	8	3,8613	0,48266	30,96**
Interacción del tiempo de incubación, con el tipo de metabolito y tipo de medio confrontado	8	1,5118	0,188898	12,12*
Error	140	2,1828	0,01559	
Total	179	52,0862		

CV 10.10

Cuadro 4: Prueba de rangos múltiples según Tukey de la confrontación de 9 metabolitos bacterianos extraídos de CN, YMG y BK, en dos tiempos de incubación (24h y 5 días).

Metabolitos de los aislamientos	Medio de incubación	Tiempo de extracción			
		24 Horas		5 Días	
		Medio de confrontación		Medio de Confrontación	
		AN	BK	AN	BK
S12M	YMG	1.0 ef	1.4 de	2.0 cde	2.0 cde
S12M	CN	2.0 cde	2.0 cde	0,0 f	0,0 f
S12M	BK	3.0 cde	1.6 de	2.0 cde	3.0 c
R10M	CN	1.0 ef	2.0 cde	0,0 f	0,0 f
R10M	YMG	1.0 ef	2.0 cde	0,0 f	0,0 f
R10M	BK	2.4 cd	6.6 a	0,0 f	0,0 f
S10M	BK	1.2 e	4.6 b	2.0 cde	4.6 b
S10M	YMG	0,0 f	0,0 f	1.0 ef	0,0 f
S10M	CN	0,0 f	0,0 f	0,0 f	0,0 f

Medias con letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

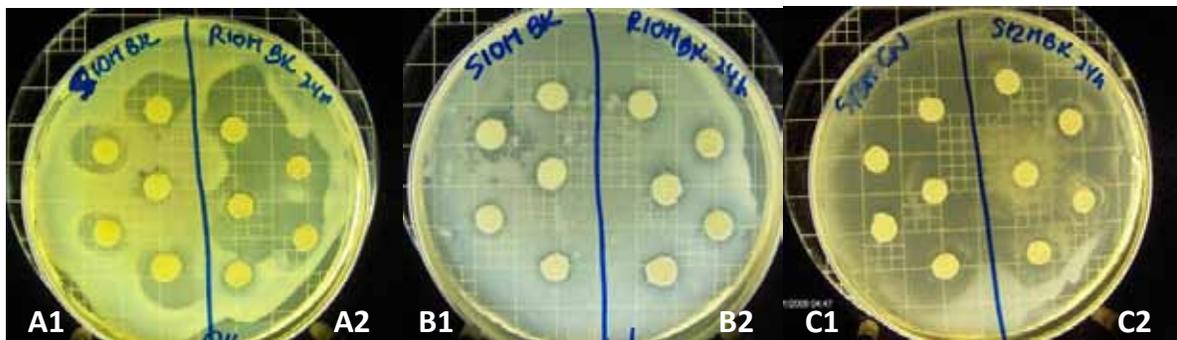


Figura 2. Halos de inhibición de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* *in vitro*, producidos por los metabolitos extraídos a las 24 horas de: A1: S10M, A2: R10M extraídos y confrontado en medio B de King. B1: S10M, B2: R10M extraído en BK y confrontado en Agar nutritivo. C1 y C2: S12M extraído en Caldo Nutritivo y confrontado en medio B de King.

cultivos y condiciones de fermentación de cepas de *Pseudomonas* sp. y encontraron mayor producción de metabolitos en las primeras 24 horas. Igualmente González *et al.*, (2007), obtuvieron metabolitos bacterianos antifúngicos de cepas de *Burkholderia cepacia* con periodos de fermentación de 24 horas.

El hecho de que los metabolitos extraídos de los diferentes aislamientos en las condiciones ya señaladas, produzcan inhibición *in vitro* de *A. avenae* subsp. *avenae*, indica que el mecanismo de acción de las bacterias antagonistas aisladas en esta investigación se debe más que al efecto de competencia de las bacterias, al efecto de los metabolitos que se excreta en el medio de cultivo. En tal sentido, varios

autores señalan (Whipps, 2001; Compant *et al.*, 2005; Duffy *et al.*, 2003; Maheshwar y Dubey, 2008) que los agentes de biocontrol, especialmente bacterias, pueden ser eficaces a través de la producción de enzimas hidrolíticas y antibióticos, además por supuesto de la colonización de nichos y la competencia por los nutrientes del hospedante, así como la inducción de mecanismos de defensa de la planta e interferencia con factores de patogenicidad. Ghai *et al.* (2007) señalan que es bien conocido que miembros del género *Bacillus* son productores de una gran variedad de antibióticos péptidos como la gramicidina S, tyrocidina y bacitracina y lipopéptidos también iturines, bacillomycinas y fengycinas que son metabolitos secundarios característicos de este

género, e igualmente en el caso de aislamientos del género *Pseudomonas*, la producción de un número de metabolitos secundarios como antibióticos, sideróforos y cianuro de hidrógeno (Ganeshan y Kumar, 2005; Moore *et al.*, 2006) .

Caracterización de los aislamientos

Las características culturales de las colonias de los aislamientos en estudio, se detallan en el Cuadro 5. El color de las colonias varió entre blanco, blanco crema y amarillas. Los aislamientos H1.2M, R10M y H2.1M, aunque provenían de muestras diferentes, como suelo y hojas tenían colonias muy similares en cuanto a color, forma, elevación, superficie y con la producción de un pigmento grisáceo en el medio.

En el estudio de las características fisiológicas y bioquímicas (Cuadro 6), se encontró que los aislamientos S1.1M, H1M, S10M, H2M, R3M, H1.2M, H2.1M Y R10M, resultaron Gram negativos, mientras que S3M y S12M, fueron Gram positivos. De los aislamientos Gram negativos, seis presentaron fluorescencia en medio BK, tal es el caso de S1.1M, H1M, S10M, H1.2M, H2.1M y R10M, lo que permite ubicarlos en el género *Pseudomonas* del grupo fluorescente (Schaad *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 2005; Janse, 2005; Moore, 2006). Los aislamientos S3M y S12M, presentaron crecimiento anaeróbico facultativo, las colonias de color blanco, oxidasa positiva y crecieron a 41°C, permitiendo inferir que pertenecen al género *Bacillus*

Cuadro 5. Características culturales en el medio Agar Nutritivo de los aislamientos antagonistas a *Acidovorax avenae*. subsp. *avenae*.

Característica de la colonia	Aislamientos									
	S10M	H1.2M	S12M	H1M	R10M	R3M	S1.1M	H2M	H2.1M	S3M
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Irregular
Elevación	Plana	elevada	Convexa	Plano	elevada	Ligeramente convexa	Plana	Plana	elevada	Elevada
Margen	Semi ondulado	Irregular	Entero	Entero	Irregular	Entero	Entero	Entero	irregular	Irregular
Superficie	Lisa	Sinuosa	Lisa	Lisa	Sinuosa	Lisa	Lisa	Concéntrico	Sinuosa	Sinuosa porosa
Color en AN	Blanco a crema	Crema con pigmento gris	crema	Blanca	Crema con pigmento gris	Blanca	Blanco crema	amarilla	Crema con pigmento gris	blanca

Cuadro 6.- Características fisiológicas y bioquímicas de los aislamientos antagonistas a *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*.

Característica	S1.1M	H1M	S10M	H2M	S3M	R3M	H1.2M	S12M	H2.1M	R10M
KOH 3 %	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Rojo Congo	BASTON	BASTON	BASTON	BASTON	BASTON	BASTON	BASTON	BASTON	BASTON	BASTON
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hugh y Leifson	+	ND	ND	+	+	+	-	ND	+	
Tioglicolato	Anaeróbico facultativo	Aeróbica	Anaeróbico facultativo	ND	Anaeróbico facultativo					
Hidrólisis	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Producción de H ₂ S	-	-	-	+	ND	-	-	-	-	-
Crecimiento 20% NaCl	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Fluorescencia en BK	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
Levan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Arginina dihidrolasa	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Pudrición de la papa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Hipersensibilidad en tabaco	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Crecimiento a 41° c	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Licuefacción de la gelatina	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
l-arabinosa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
trehalosa	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+

+: Positiva, -: Negativo, ND: No determinado

(Schaad *et al.*, 2001). Por otra parte, el aislamiento H2M, también presentó crecimiento anaeróbico facultativo, colonias de color amarillo, oxidasa negativa y crecimiento a 41°C, tales características son comunes del género *Pantoea* (Schaad *et al.*, 2001; Kado, 2006). El aislamiento R3M, presentó crecimiento anaeróbico facultativo, colonias de color blanco, oxidasa positiva, catalasa positiva, no tuvo actividad pectolítica, no causó hipersensibilidad en tabaco y creció a 41°C, sin embargo estas características no permitieron determinar a qué género pertenece este aislamiento. Vega y Fernández (2001), señalan que *Pseudomonas fluorescens* y las del género *Bacillus* son las más eficaces para controlar las enfermedades foliares y de las raíces. Ya en estudios realizados en el país, se han encontrado bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* como antagonistas a patógenos como *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Martínez, 2008), *Xanthomonas phaseoli* (Guerra, 2008; Flores *et al.*, 2009) y *Ralstonia solanacearum* (Mejías, 2010).

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio demostraron que los aislamientos bacterianos y sus metabolitos, adecuadamente seleccionados, tienen el potencial para inhibir significativamente el crecimiento de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. La eficacia de la inhibición puede ser influida por las interacciones específicas entre las cepas bacterianas (competencia, antagonismo), el medio de confrontación y en el caso de los metabolitos, el medio de extracción y periodo de incubación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barret, T.J. 1975. Preparation of bacterial vaccine. In Proceedings of the first workshop of Phytobacteriology. R.N. (Ed.). Columbia. University of Missouri. pp. 1-6.
- Brenner, D.J.; N.R. Krieg; J.T. Staley. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria Part A Introductory Assays, Springer, New York, NY, USA. 304 p.
- Compant, S.; B. Duffy; J. Nowak; C. Clément; E. Ait Barka. 2005. Appl. Environ. Microbiol. 71(9): 4951-4959.
- Duffy, B.; A. Schouten; J. M. Raaijmakers. 2003. Pathogen self defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. Annu. Rev. Phytopathol. 41: 501-538.
- Durán A.V.E.; L.F.M. Cazorla. 2005. Perspectivas del control biológico de enfermedades en plantas. En línea: <<http://www.microb35.htm>> [Consulta: 04-07-16].
- FAO 2005. Bases tecnológicas para una agricultura sostenible. En línea: <<http://www.fao.org/DOCREP/003/V4200S/V4200S00.htm#TOC>> [Consulta: 04-07-16]. <http://www.fao.org/3/V4200S/V4200S18.htm#ch12>
- Flores, C.; Y. Hernández; G. Trujillo. 2009. Control biológico *in vitro* de *Xanthomonas phaseoli* causante de la quemazón bacteriana de la caraota (*Phaseolus vulgaris*). Fitopatología Venezolana. 22 (2): 42. Memorias Congreso Venezolano de Fitopatología. Margarita. Venezuela.
- Ganeshan, G.; A.M. Kumar. 2005. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. Journal of Plant Interactions. 1(3): 123-134
- Ghai, S.; S. S. Sood; R. K. Jain. 2007. Antagonistic and antimicrobial activities of some bacterial isolates collected from soil samples. Indian Journal of Microbiology. 47: 77-80
- Gomes A. M. A.; R. L. R. Mariano; S. J. Michereff; E. B. Silveira; S. M. P. Assis. 2005. Isolamento de bactérias para teste de antagonismo. In: Ramos M. R. de L. y S. E. Barbosa Manual de práticas em Fitobacteriologia. 2ª Edición. Coordenacao: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE-Brasil. 184 p.
- González, V. M. E.; A. R. Hernández; A. L. M. Barrios; V. M. G. Velázquez; L.A N. Hernández. 2007. Efecto antagónico de un producto obtenido de *Burkholderia cepacia* Palleroni y Holmes contra *Capnodium* spp. en plántulas de café (*Coffea canephora*) crecidas *in vitro* e *in vivo*. Revista de Fitopatología Mexicana. 25(2): 120-126.
- Guerra, R. A. 2008. Evaluación de aislamientos de rizobacterias como posibles agentes de control biológico de la bacteria *Xanthomonas phaseoli* en caraota (*Phaseolus vulgaris*). Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay. 54 p.

- Hernández-Lauzardo, A.N.; S. Bautista-Baños; M.G. Velázquez-del Valle; A. Hernández-Rodríguez, 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 66-74.
- Hernández, Y.; G.E. Trujillo. 2001. Detección de bacterias fitopatógenas en semillas de maíz (*Zea mays* L.). *Interciencia*. 26(3):108-112.
- Hernández, Y.; Trujillo G.E.; M.J. Garrido. 1989. Plántulas de maíz (*Zea mays*) afectadas por bacteriosis. *Fitopatol. Venez.* 2:42 (Resumen).
- Holt, J. G.; N. R. Krieg; P. H. A. Sneath; J.T. Staley; S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9th edition. Williams & Wilkins Eds. Baltimore, Maryland USA. 787 pp.
- Hussain S. Z.; M. I. Haque; S. M. Mughal; K. N. Shah; A. Irfan; S. Afghan; A. Shahzad; A. Batool; P. Khanum; K. Hussain; K. Nawaz; M. N. Hassan; F. Y. Hafeez. 2011. Isolation and biochemical characterizations of the bacteria (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*) associated with red stripe disease of sugarcane. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(37): pp. 7191-7197. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>. DOI: 10.5897/AJB11.953. ISSN 1684-5315 © 2011 Academic Journals
- Janse, J.D. 2005. *Phytopathology. Principles and practice*. CABI Publishing, Cambridge, USA. 360 p.
- Kado, C. 2006. *Erwinia and Related Genera*. In: Dworkin, M.; S. Falkow; E. Rosenberg; K.-H. Schleifer; E. Stackebrandt (Eds). *Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Third Edition.. Springer Science+Business Media, Inc. New York. 6: 443-450.
- Lorian, V. 1980. *Antibiotics in laboratory medicine*. New York. Department of Patology Albert Einstein College of Medicine. 432 p.
- Martínez, E. 2008. Selección in vitro de aislamientos bacterianos con capacidad antagónica contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 75 p.
- Mejías, R. 2010. Uso de bacterias antagonistas para el control de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* Smith en el cultivo de tomate. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 56 p.
- Moore, E. R. B.; B. J. Tindall; V. A. P. Martins Dos Santos; D. H. Pieper; J. L. Ramos; N. J. Palleroni. 2006. *Nonmedical: Pseudomonas* In: Dworkin, M.; S. Falkow; E. Rosenberg; K.-H. Schleifer; E. Stackebrandt (Eds). *Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Third Edition. Springer Science+Business Media, Inc. New York. 6: 646-703
- Neiendam, N. M.; J. Sørensen; J. Fels; H. C. Pedersen. 1998. Secondary Metabolite- and Endochitinase-Dependent Antagonism toward Plant-Pathogenic Microfungi of *Pseudomonas fluorescens* Isolates from Sugar Beet Rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563-3569.
- ONU. 2017. Informe de la Relatora Especial sobre el derecho a la alimentación. A/HRC/34/48. Disponible en: <https://www.refworld.org/cgi-bin/texis/vtx/rwmain/opendocpdf.pdf?reldoc=y&docid=58ad94864>
- Maheshwar, DK.; R.C. Dubey. 2008. *Potential Microorganisms for Sustainable Agriculture: A Techno-Commercial*. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi, India.
- Powell, J. F.; J. M. Vargas; M. G. Fair; A. R. Detweiler; A. Chandra. 2000. Management of Dollar Spot on Creeping Bentgrass with Metabolites of *Pseudomonas aureofaciens* (TX-1). *Plant. Dis.* 84: 19-24.
- Rodríguez, H.; R. Fraga. 1999. Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion. *Journal of Biotechnology Advances.* 17: 319-339.
- Santi, C; D. Bogusz; C. Franche. 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany.* 111: 743-767
- Schaad, N. W. 2001. Initial Identification of common genera. In: Schaad N. W.; J. B. Jones; W. Chun (Eds). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition. APS PRESS. St Paul, Minnesota. 371 p.

- Schaad, N.; E. Postnikova; A. Sechler; L. E. Claflin; A. M. Vidaver; J. B. Jones; I.V. Agarkova; A. Ignatov; E. Dickstein; B. A. Ramundo. 2008. Reclassification of Subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb.nov., *A. citrulli* Schaad *et al.*, 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 31: 434–446
- Seijo, T.E.; N.A. Peres. 2011. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causing bacterial leaf stripe of *Strelitzia nicolai*. *Plant Dis.* 95: 1474.2.
- Song, W.Y.; H.M. Kim; C.Y. Hwang; N.W. Schaad. 2004. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. *J. Phytopathol.* 152: 667–676.
- Toppo, S.R.; U.C. Naik. 2015. Isolation and Characterization of Bacterial Antagonist to Plant Pathogenic Fungi (*Fusarium* spp.) from Agro Based Area of Bilaspur. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*(Online) www.arcjournals.org.
- Trujillo, G.; Hernández. 1992. Bacteriosis en maíz (*Zea mays* L.) causada por *Pseudomonas avenae*. *Agronomía Trop.* 42(5-6): 239-247
- Vega, L.; O. Fernández. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 62* pp. 96 - 100.
- Villa, P.; Ma. E. Díaz de V.; M. Stefanova; G. Michelena. 2002. Proceso Biotecnológico para la producción de un fungicida a partir de *Pseudomonas* sp. Cepa PSS. Con fines fitosanitarios. En: *Innovación de tecnologías ecológicas para el agro en América latina. Resultado del primer concurso latinoamericano. RAP-AL/ RAAA, Lima, Perú.* 65 p.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp Bot* 52:487–511
- Zhou, T.; J. Northover; K.E. Schneider. 1999. Biological control of postharvest diseases of peach with phyllosphere isolates of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* 21: 375-381.