

EVALUACIÓN *In vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS.

In vitro EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Lactobacillus casei*, var. *rhamnosus* ON PHYTOPATHOGENIC FUNGI.

John R Barrios^{1*}, Guillermo Castilla², Paula Upegui²

Resumen

Introducción: La agricultura ecológica en los últimos años se ha posicionado como una de las alternativas para la producción sostenible de alimentos inocuos para el consumidor final, la preservación de la biodiversidad y la reducción del impacto ambiental. Sin embargo, en Colombia los avances logrados en esta área son insipientes, principalmente en el tema de protección de cultivos. **Objetivo General:** Evaluar la actividad antifúngica de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* en condiciones *in vitro* sobre hongos fitopatógenos. **Metodología:** Se realizó un diseño experimental, empleando la cepa de *L. casei* var. *rhamnosus* a partir del producto liofilizado Liolactil®. La activación se realizó mediante calentamiento hasta una temperatura de 30°C en un medio líquido de pre-enriquecimiento constituido por leche descremada al 10% y se incubó a 35±2°C por 24 horas en oscuridad. Posteriormente, se cultivó en agar MRS para el aislamiento selectivo y determinación de sus características microbiológica fenotípicas. Para optimizar su crecimiento y promover la producción de metabolitos secundarios de la fermentación, se empleó como sustrato alternativo Lactosuero. Finalmente, a partir de una suspensión de 10⁸ UFC/mL de *L. casei* var. *rhamnosus* se realizaron pruebas de inhibición antagónica mediante la técnica Igarashi, enfrentando la cepa de *L. casei* var. *rhamnosus* frente a *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp. **Resultados:** Se obtuvo crecimiento bacteriano y activación metabólica a las 18 horas de fermentación empleando como sustrato alternativo Lactosuero. La suspensión bacteriana de *Lactobacillus* demostró en el ensayo de inhibición efecto fungicida frente a los tres hongos fitopatógenos evaluados. **Conclusiones:** *L. casei* var. *rhamnosus*, bajo las condiciones experimentales, presentó un potencial efecto antagónico sobre hongos fitopatógenos de importancia en la conservación de cultivos.

Palabras claves: *Lactobacillus*; fermentación, lactosuero, control biológico

© 2016 Barrios et al. Este es un artículo Open Access distribuido bajo la licencia CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, su distribución se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

¹ Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Regional Bolívar - Centro Agroempresarial y Minero (CAYMBOL), Grupo de Investigación GIBIOMAS. Dirección: Ternera Km. 1 vía Turbaco, Cartagena, Colombia.

² Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Regional Bolívar - Centro Agroempresarial y Minero (CAYMBOL). Cartagena, Colombia.

* Autor de Correspondencia: Correo electrónico: jbarrios@sena.edu.co.

Abstract

Introduction: The organic farming in recent years has been positioned as one of the alternatives for the sustainable production of food safe for the final consumer, the preservation of biodiversity and the reduction of environmental impact. However, in Colombia the advances made in this area are insipient, mainly in the field of crop protection. **General objective:** To evaluate the antifungal activity of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* *in vitro* conditions on phytopathogenic fungi. **Methodology:** An experimental design was carried out using the *L. casei* var. *rhamnosus* from the lyophilized product Liolactil®. Activation was performed by heating to a temperature of 30 ° C in a liquid pre-enrichment medium consisting of 10% skim milk and incubated at 35 ± 2 ° C for 24 hours in the dark. Subsequently, it was cultured on MRS agar for selective isolation and determination of its phenotypic microbiological characteristics. To optimize its growth and to promote the production of secondary metabolites of the fermentation, it was used as alternative substrate the whey. Finally, from a suspension of 10⁸ CFU / mL of *L. casei* var. *rhamnosus*, antagonistic inhibition tests were carried out using the Igarashi technique, against *L. casei* var. *rhamnosus* against *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. **Results:** Bacterial growth and metabolic activation were obtained at 18 hours of fermentation using as alternative substrate the whey. The bacterial suspension of *Lactobacillus* showed in the fungicide inhibition test against the three phytopathogenic fungi evaluated. **Conclusions:** *L. casei* var. *rhamnosus*, under experimental conditions, presented a potential antagonistic effect on phytopathogenic fungi of importance in the conservation of crops.

Key words: *Lactobacillus*; Fermentation, whey, biological control

© 2016 Barrios *et al.* This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). Commercial use of the original work of the possible derivative works is not allowed, its distribution must be done with a license equal to that which regulates the original work.

Recibido para publicación: 25 de Agosto, 2016 - Aceptado para publicación: 14 de Diciembre, 2016

Introducción

En Colombia la producción Agrícola es uno de los renglones productivos de gran importancia, desarrollando un papel preponderante en el crecimiento económico por sus aportes en la producción de alimentos, materias primas, generación de empleo y divisas y sus eslabonamientos con otros sectores en función de las cadenas alimentarias (Bonilla, Peinado, Urdaneta, & Carrascal, 2000; Buitrago Gómez & Gómez García, 2007).

Necesariamente la agricultura requiere de la implementación de técnicas de protección de cultivos contra plagas y enfermedades, recurriendo al uso de agroquímicos de síntesis química. Según el Ministerio de Medio Ambiente entre 2004 y 2007, se encontró que las ventas de fungicidas en polvo alcanzaron la cifra de 335.753.108 Kilogramos mostrando un incremento del 174% y de fungicidas líquidos las ventas ascendieron a 107.681.225 Litros con un incremento de 243%, cifras significativas que nos permite inferir la magnitud del impacto ambiental que esta actividad ha ocasionado en

todas las regiones agrícolas del país (Bonilla *et al.*, 2000).

Una de las alternativas que se presentan para disminuir los impactos ambientales generados por la industria de los agroquímicos es la agricultura ecológica, pero en el país aún es insipiente y en el campo de la protección de cultivo no ha logrado consolidar una propuesta que demuestre la misma eficiencia que los productos de síntesis química. Es por ello que se requiere aumentar los esfuerzos por encontrar desarrollos tecnológicos que permita el logro de productos naturales que contribuyan a la protección de cultivos y muy especialmente al control de patógenos.

Con el propósito de aportar a la obtención de productos ecológicos para la agricultura se formuló la presente investigación desarrollada en los laboratorios de Biotecnología del Centro Agroempresarial y Minero del SENA Bolívar, mediante la cual se evaluó el crecimiento de *L. casei* var. *rhamnosus* en un medio de cultivo alternativo Lactosuero en Biorreactores artesanales y su actividad inhibidora *in vitro* sobre hongos fitopatógenos.

Metodología

Diseño de estudio

Para el desarrollo de la investigación se planteó un diseño experimental, se controlaron las variables cuantitativas correspondientes a concentración del sustrato, pH temperatura, tiempo de incubación y concentración del inóculo. En el montaje del bioensayo de antagonismo, las variables evaluadas corresponden a concentración del inóculo, temperatura, tiempo de incubación y medio de cultivo. El microorganismo evaluado con la posible actividad controladora fue *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* y los fitopatógenos son *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp.

Microorganismos

La cepa utilizada fue el co-cultivo liofilizado de *L. casei* var. *rhamnosus* obtenida a partir del producto comercial Liolactil®. La activación se realizó mediante calentamiento hasta una temperatura de 30°C en un medio líquido de pre-enriquecimiento constituido por leche descremada al 10% y dos sobres de Liolactil por litro, la suspensión se incubó a 35±2°C por 24 horas en oscuridad. Posteriormente, para el aislamiento selectivo y determinación de sus características microbiológicas fenotípicas (Vidal, 2006), se cultivó en agar M.R.S (Man, Rogosa y Sharpe®) preparado con las proporciones como se presenta en la Tabla 1. Este cultivo fue usado posteriormente como inóculo para los ensayos de fermentación.

Fermentación y sustrato

Para optimizar el crecimiento de *L. casei* var. *rhamnosus* y promover la producción de metabolitos secundarios fermentación, se empleó como sustrato alternativo lactosuero (suero lácteo). Este suero se sometió a esterilización en autoclave a una presión de 0,1 MPa, temperatura de 120 °C y un tiempo de 15 min. Los ensayos de fermentación para la generación de biomasa y producción metabólica, se llevó a cabo en un biorreactor construido para este estudio, con diseño cilíndrico, agitadores en acero inoxidable, tapas herméticas y orificio para la salida de gases y obtención de muestras con control de abertura (Ver Figura1).

Tabla-1: Composición y preparación del Agar M.R.S.

Cantidad para preparar 1 Litro de Agar Rogosa	
Ingrediente	Cantidad
Tween 80	1 ml.
Citrato de Amonio	2 gr.
Acetato Sódico	5 gr.
Sulfato de Magnesio	0,1 gr.
Agar Bacteriológico	12 gr.
Peptona	12 gr.
Extracto de carne	5 gr.
Extracto de Levadura	5 gr.
Di hidrógeno fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)	2 gr.

Con el fin de establecer las mejores condiciones para la producción metabólica por las bacterias en los ensayos de fermentación, se aplicó el siguiente protocolo de trabajo: A partir de una suspensión bacteriana al 10% vol. (preinoculo activado), se inició el proceso de fermentación en el biorreactor en condiciones de oscuridad, agitación aprox. 110 rpm.

Se continuó con la determinación de la cinética de crecimiento evaluando muestras cada 2 horas, para registrar pH, temperatura y concentración del inóculo por dilución hasta 10⁻⁹. La siembra se realizó en agar selectivo M.R.S (Man, Rogosa y Sharpe®) e incubó a 35±2°C por 24 horas en condiciones de anaerobios y oscuridad, para su posterior enumeración y caracterización microbiológica.

Evaluación de la Actividad Antifúngica

A partir del lactosuero se tomó un inóculo de suspensión bacteriana en concentración de 10⁸ UFC/ml de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*, para los ensayos de inhibición antagónica de acuerdo con las recomendaciones de Igarashi *et al.*, (1997), frente a tres hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp., proporcionadas por el cepario del laboratorio de biotecnología del Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Regional Bolívar - Centro Agroempresarial y Minero (CAYMBOL).

Las pruebas se realizaron en medio Agar Nutritivo (Merck®), Agar Sabouraud (Merck®), Agar M.R.S (Man, Rogosa y Sharpe®). El procedimiento consiste en tomar una caja de petri, dividirla en 4/4 y cultivar por siembra masiva con un asa redonda a tres (3) centímetros del borde formando un cuadrante el microorganismo con la potencial actividad de biocontrolador en este caso *L. casei* var. *rhamnosus* y finalmente se siembra por punción en el centro el fitopatógeno. Para validar la actividad antagonista se tuvo en cuenta como punto de corte el crecimiento del fitopatógeno, que debía ser menor o igual a 1cm (Igarashi et al., 1997; Márquez, Martínez, & Franco, 2002; Suárez-Contreras, 2016).

Validación de los resultados

Para garantizar la validez de los resultados se tuvo en cuenta los parámetros de desempeño de la norma NTC ISO/IEC 17025:2005, en ese caso para todos los medios de cultivo, una vez preparados una muestra de cada lote se llevó a incubación, sin siembra previa a 37°C por 24 horas, las cuales fueron revisadas a las 24 horas sin obtener crecimiento microbiano, de esta forma se descartó la contaminación de los mismos. Así mismo para verificar los resultados de los ensayos de antagonismo, se realizó la siembra de los hongos evaluados en los tres medios como control.

Resultados

El protocolo propuesto para la recuperación de la cepa del co-cultivo liofilizado de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* obtenida a partir del producto comercial Liolactil® (Ver Figura 2a,2b y 2c), demostró ser apropiado en condiciones de laboratorio, la implementación de la etapa de pre-enriquecimiento en caldo líquido, constituido por leche descremada al 10%, potenció la actividad metabólica bacteriana al proporcionar recursos nutricionales que favorecieron su crecimiento en el agar selectivo M.R.S (Man, Rogosa y Sharpe®) y su caracterización macroscópica (Ver Figura 3a y 3b).

A partir de este cultivo se tomó como inóculo una suspensión bacteriana al 10% para los ensayos de fermentación se empleó lactosuero como sustrato alternativo para la reacción en un biorreactor artesanal, encontrando que las mejores condiciones para la producción metabólica bacteriana estimada a partir de la concentración de biomasa de 10^8 UFC/mL (Ver Figura 4), corresponde a 14 horas de fermentación, Temperatura de 25, 7 °C, pH= 4,5 y agitación aproximada a 110 rpm en condiciones de oscuridad (Ver Tabla 2).

La siembra de los hongos en los medios de cultivo Nutritivo (Merck®), Sabouraud (Merck®) y M.R.S (Man, Rogosa y Sharpe®), como control de crecimiento para validar posteriormente los resultados obtenidos en los ensayos de antagonismo (Ver Tabla 3 y 4).

Los resultados obtenidos en los ensayos de antagonismo in vitro entre *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* frente a *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*, con la técnica de Igarashi se observó un halo de inhibición del crecimiento en los tres hongos fitopatógenos menor a 1 cm frente a la siembra de la cepa de *L. casei* var. *rhamnosus* (Ver Figura 5,6 y 7).



Figura-1: Diseño de Biorreactor artesanal.

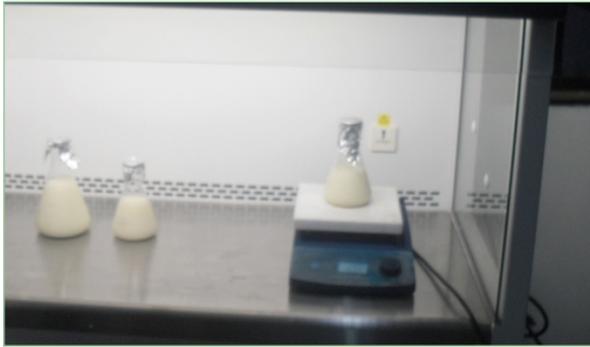


Figura-2a, 2b, 2c: Proceso de activación de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*.

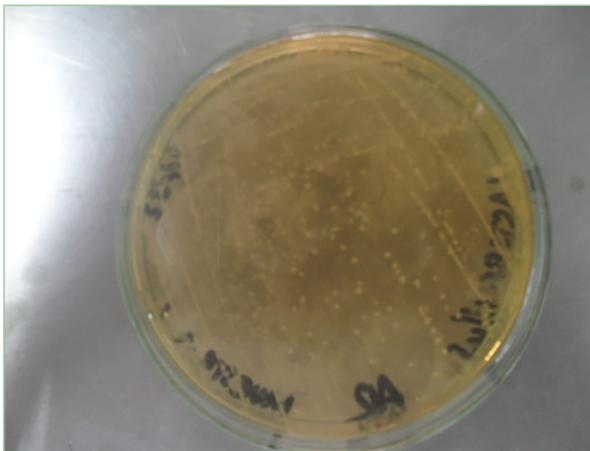


Figura-3a: Crecimiento de colonias de *L. casei* en medio de cultivo agar M.R.S (Man, Rogosa y Sharpe®).

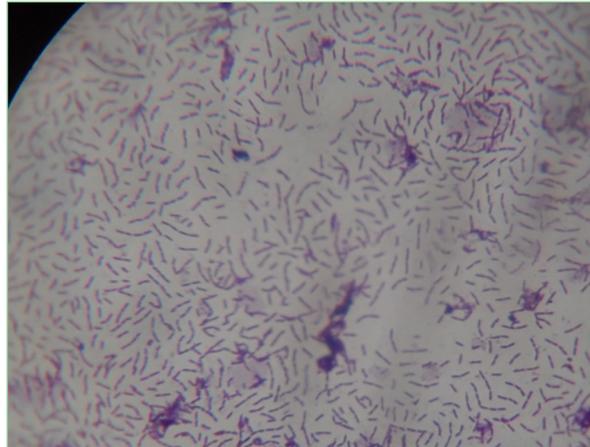


Figura-3b: Características morfológicas microscópicas.

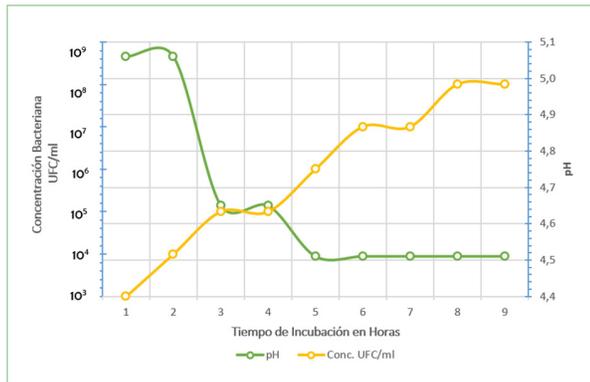


Figura-4: Curva de crecimiento bacteriano de *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* en biorreactor con sustrato alternativo de lactosuero a una velocidad de agitación de 300 rpm.

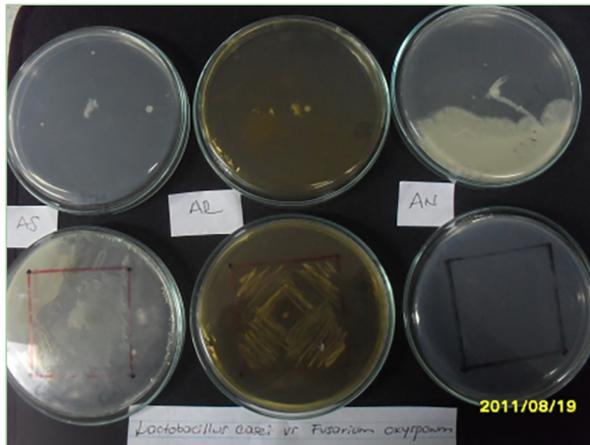


Figura-5: Bioensayo de antagonismo entre *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* y *Fusarium oxysporum*.

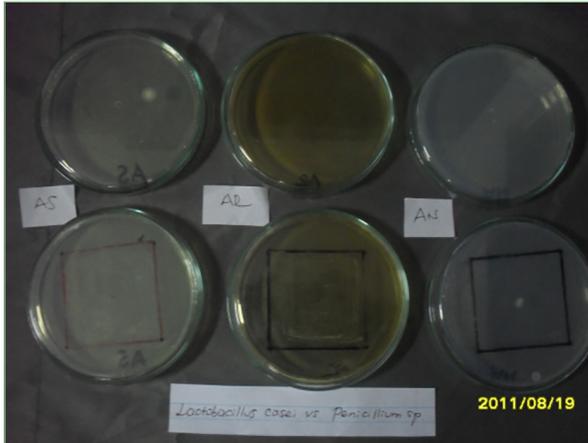


Figura-6: Bioensayo de antagonismo entre *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* y *Penicillium* sp.

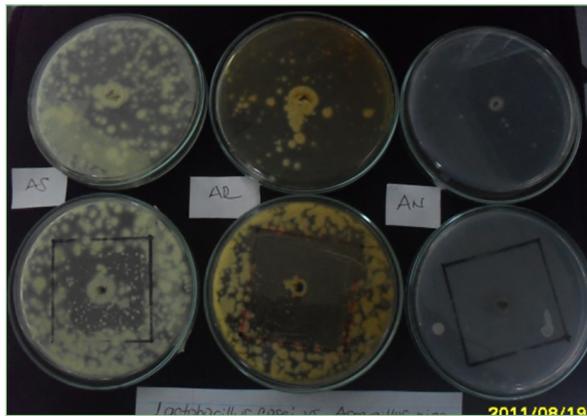


Figura-7: Bioensayo de antagonismo entre *L. casei* var. *rhamnosus* y *Aspergillus niger*.

Tabla-2: Cinética de crecimiento bacteriano a diferente Temperatura, pH y tiempo.

Muestra	Tiempo Horas	Concentración UFC/ml	T °C	pH
1	0	10 ³	26	5,06
2	2	10 ⁴	26,5	5,06
3	4	10 ⁵	26,5	4,65
4	6	10 ⁵	26,2	4,65
5	8	10 ⁶	27,7	4,51
6	10	10 ⁷	26,7	4,51
7	12	10 ⁷	27,2	4,51
8	14	10 ⁸	25,6	4,51
9	16	10 ⁸	25,7	4,51

Tabla-3: Evaluación del crecimiento, sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo utilizados para los bioensayos de antagonismo frente a Fitopatógenos.

Fitopatógeno	Medio	Crecimiento
<i>Fusarium oxysporum</i>	AS	Normal
	AN	Limitado
	AR	Limitado
<i>Penicillium</i> sp.	AS	Normal
	AN	Sin crecimiento
	AR	Sin crecimiento
<i>Aspergillus niger</i>	AR	Abundante
	AN	Limitado
	AR	Normal

Tabla-4: Inhibición del crecimiento de fitopatógenos en los bioensayos de antagonismo in vitro entre *L. casei* var. *rhamnosus* frente a *F. oxysporum*, *A. niger* y *Penicillium* sp., con la técnica de Igarashi.

Medio de cultivo	Inhibición de <i>Fusarium Oxysporum</i>		Inhibición de <i>Penicillium</i> sp.		Inhibición de <i>Aspergillus niger</i>	
	Sí	No	Sí	No	Sí	No
AS	X	-	X	-	X	-
AN	X	-	-	-	X	-
AR	X	-	-	-	X	-

Discusión

El uso de lactosuero como sustrato alternativo para la producción de metabolitos secundarios durante la fermentación, demostró su potencial para optimizar el crecimiento de *L. casei* var. *rhamnosus*, alcanzando una concentración a las 14 horas de 10⁸ UFC/mL, valoración cuantitativa mínima para la producción de un bioinsumo; Rojas et al., (2015) con el fin de optimizar las condiciones adecuadas de crecimiento del *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* para la producción de ácido láctico, utilizando como sustrato alternativo lactosuero, mediante fermentación controlando durante el experimento las variables la concentración del inóculo y temperatura, el tiempo máximo fue 72 horas, obteniendo ácido láctico con un 78,0% de pureza (36,7

g/L), lo que demuestra que el lactosuero es un sustrato alternativo para potenciar la actividad metabólica bacteriana; sin embargo, debe ser suplementado con el fin de aportar a las bacterias los nutrientes del que carece el lactosuero y que son fundamentales para su crecimiento y desarrollo. Además, la utilización del lactosuero con fines biotecnológicos, constituye una alternativa a bajo costo adecuada para el manejo residual de este subproducto del sector lácteo en el departamento de Bolívar.

En los bioensayos de antagonismo realizados con *L. casei* var. *rhamnosus*, se observó un halo de inhibición mayor a 1 cm, frente a los tres hongos fitopatógenos, de acuerdo con estudios realizados, posiblemente el efecto inhibidor sea debido a la acción de los metabolitos secundarios liberados en el proceso de fermentación (Lipińska *et al.*, 2016; Tropcheva, Nikolova, Evstatieva, & Danova, 2014). De igual forma también se ha documentado la actividad biológica en el control de fitopatógenos y como precursor del crecimiento (Lagunas-Lagunas *et al.*, 2001). De igual manera Ramírez-Muñoz (2010) realizó un trabajo de tesis aislando cepas de *Lactobacillus* sp. a partir de productos lácteos artesanales y evaluó la capacidad antagonista *in vitro* empleando el método de Ritter, en este trabajo logró aislar seis cepas del genero *Lactobacillus* sp. de las cuales ninguna de ellas mostró efecto antagonista importante contra las cepas evaluadas, estos resultados nos indican que es necesario seguir evaluando para llegar a conclusiones más aproximadas, sin embargo una diferencia puede estar en los metabolitos secundarios generados por *L. casei* var. *rhamnosus* que pueden ser los que aportan al efecto antagonista, este aspecto debe ser evaluado en próximos trabajos.

Conclusiones

El lactosuero es un medio alternativo que permite la producción de biomasa de *L. casei*, var. *rhamnosus*, en condiciones de fermentación utilizando un biorreactor artesanal, se alcanzó a las 14 horas concentración de 10^8 UFC/ml. En condiciones de laboratorio se demostró el efecto antagonista de *L. casei*, var. *rhamnosus* inhibiendo el crecimiento de *F. oxysporum*, *A. niger* y *Penicillium* sp. Se recomienda, realizar pruebas con un mayor número de hongos fitopatógenos y realizar las pruebas de campo para determinar la concentración de aplicación.

Referencias

- Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Uso aparente de plaguicidas en Colombia durante los años 2004 – 2007. Bogotá D.C.
- Bonilla A. Juan P. *et al.*, Informe Nacional sobre el Uso y Manejo de Plaguicidas en Colombia, Tendiente a Identificar y Proponer Alternativas para Reducir el Escorrimento de Plaguicidas al Mar Caribe. Ministerio de Medio Ambiente. 2000
- Laguna L Josefa *et al.*, *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo en Jitomate. *Lycopersicon sculentum* Mill. Revista Mexicana de Fitopatología. Volumen 19 No 1. 2001. P 57 – 65
- Santoyo G. *et al.*, Papel de los sideróforos en la actividad antagonista de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. Revista Terra Latino Americana.
- Ramos P. Valentina. Desarrollo de un proceso biotecnológico a partir de extractos bacterianos para el control de bacterias fitopatógenas. UAAAN, Buenavista Saltillo COAH. Mexico. 44p/27cm.
- Maldonado M Ignacio, Cordero R Jesus D, Figueroa L. Alejandro M. Búsqueda de bacterias benéficas para el control de fusariosis en Maíz. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), unidad Sinaloa, del Instituto Politécnico Nacional. Fundación Produce.
- Hoyos Carvajal, Liliana M. *et al.*, Enfermedades de plantas: control biológico. Editorial: Ecoe Ediciones. 234 p. Colombia. 2011. eISBN: 9781449278489.
- Cepero, María Caridad Restrepo, Silvia Franco, Ana Esperanza. Biología de hongos. Editorial: Universidad de los Andes. Colombia. 2012. 522 p. eISBN: 9789586957946 .
- Samaniego Fernández, Luz Sosa del Castillo, Maryla. *Lactobacillus* spp.: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Editorial: Editorial Universitaria. Cuba. 2007. 21p.
- González Villa, Rolando. Diseño de un proceso continuo para la obtención de lactoproteínas a partir del suero dulce de quesería utilizando bioreactores. Editorial: El Cid Editor - Biotecnología . Argentina. 2007. 44 p.
- Rodríguez, Aida T. Morales, Daysi Ramírez, M. A. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. Cultivos Tropicales. Editorial: Editorial Universitaria . Cuba. 2007. Vol. 21 Nro. 2. 2000. P5.
- Rojas, A.M.; Montaña, L.P.; Bastidas, M.J. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Rev. Colomb. Quim. 2015, 44 (3), 5-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55604>