

Lactobacillus* sp. obtenidas de *Tetragonisca angustula* frente a *Fusarium poae* y *Fusarium chlamydosporum

Lactobacillus sp. obtained from *Tetragonisca angustula* against *Fusarium poae* and *Fusarium chlamydosporum*

María José Cabana¹*, José José¹, Ricardo Manuel Castro¹,
Marcelo Benítez Ahrendts¹

RESUMEN

Fusarium poae y *Fusarium chlamydosporum*, generadores de micotoxinas y causantes de la pudrición en raíces y tallos de plantas de importancia agrícola, son un gran problema mundial. *Tetragonisca angustula*, una abeja nativa sin aguijón, produce mieles con actividad antifúngica y antibacteriana. En este estudio se aisló y evaluó el efecto inhibitorio de bacterias lácticas provenientes de mieles de esa especie de abeja frente a *F. poae* y *F. chlamydosporum*. Se obtuvieron 8 colonias de *Lactobacillus* sp. (LB1, LB2, LB3, LB4, LB5, LB6, LB7, LB8), las cuales presentaron diferentes comportamientos antagonísticos frente a los hongos patógenos. La bacteria láctica LB4 mostró un efecto controlador total para ambos hongos y fue seleccionada como un futuro controlador biológico.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, inhibición, biocontrolador, hongos patógenos.

ABSTRACT

Fusarium poae and *Fusarium chlamydosporum* are mycotoxin generators, and the reason for root and stem rotting of agriculturally important plants; making them a major global problem. *Tetragonisca angustula*, a native stingless bee, produces kinds of honey with antifungal and antibacterial activity. In this study, the inhibitory effect of lactic bacteria from the honey of this bee species was isolated and evaluated against *F. poae* and *F. chlamydosporum*; where 8 colonies of *Lactobacillus* sp. (LB1, LB2, LB3, LB4, LB5, LB6, LB7, LB8) presented different antagonistic behaviors against pathogenic fungi. Lactic bacteria LB4 presenting a total controlling effect for both fungi, thus being selected as a future biological controller.

Keywords: lactic acid bacteria, inhibition, bio controller, pathogenic fungi.

Introducción

Fusarium sp. genera diferentes enzimas hidrolíticas, que degradan la pared celular y son importantes en la patogenicidad (Pekkarinen *et al.*, 2003). Algunas especies de *Fusarium* sp. se caracterizan por producir toxinas en cereales como trigo, cebada, avena (Schwarz, 2003). *F. Poae* es un hongo que se asocia a la producción de micotoxinas y afecta tanto a los humanos como a los animales (Stenglein, 2009).

F. chlamydosporum es causante del tizón de pata de canguro (*Anigozanthos* ssp), del damping off en plantas de té y de la podredumbre del tallo de la ocrea (Palmero *et al.*, 2008). Genera la toxina

T-2 en el maíz blanco y otros tricotecenos del grupo A (Carrillo *et al.*, 2001).

Una alternativa frente a estas enfermedades es la aplicación de bacterias lácticas, que generan productos bioactivos, proporcionando beneficios antimicrobianos (Aween *et al.*, 2012).

Las bacterias ácido lácticas se caracterizan por ser Gram positivas, no esporuladas, anaeróbicas o facultativas aeróbicas, catalasa negativa. (Quinto *et al.*, 2014). La microbiota de las colonias de las abejas presenta un gran reservorio de bacterias lácticas, empleadas para diversos propósitos (Ramos *et al.*, 2019).

La abeja nativa sin aguijón, *Tetragonisca angustula*, se encuentra distribuida desde el sur

¹ Universidad Nacional de Jujuy, Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza, Argentina.

*Autor por correspondencia: mariajosecabanv@gmail.com

de México hasta Argentina (Yáñez-Ordóñez *et al.*, 2008). La práctica de meliponicultura se lleva a cabo desde la época precolombina, y su miel es utilizada por sus propiedades etnofarmacológicas (Cortopassi *et al.*, 2006). Trabajos recientes establecieron su acción antimicrobiana (Zamora *et al.*, 2017).

Este trabajo tiene como objetivo aislar y evaluar el efecto inhibitor de bacterias lácticas provenientes de mieles de *T. angustula* frente a *F. poae* y *F. chlamydosporum*.

Materiales y métodos

Obtención de muestra

La muestra de miel se obtuvo del meliponario que se encuentra en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias-Unju.

Aislamiento de bacterias ácido lácticas de la miel de melipona

La muestra de miel se diluyó en 1:10 ml de agua peptonada y se incubó a 30 °C por 24 horas. Transcurrido este periodo se sembró en caldo MRS a 37 °C en microaerofilia por 24 h. Posteriormente se realizó el aislamiento en medio MRS sólido en las condiciones detalladas anteriormente. De todos los aislamientos se obtuvieron colonias de bacterias con características macroscópicas y microscópicas del género *Lactobacillus* sp. (Kandler *et al.*, 1994).

Selección de bacterias con efecto inhibitorio sobre *Fusarium poae* y *Fusarium chlamydosporum*

F. poae y *F. chlamydosporum* se obtuvieron del cepario del laboratorio de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias-Unju.

Las colonias de lactobacilos seleccionadas se enfrentaron con las cepas de *F. poae* y *F. chlamydosporum*. Se agregaron 20 µl de cultivo de bacterias ajustadas a una concentración de 1.6 10⁹ UFC/ml en medio Agar Sabouraud, donde se sembró un explante de cada especie de hongo. Se realizaron cinco repeticiones de cada una de ellas. Se incubaron a 27 °C por 7 días. Transcurrido este período se realizó la medición del crecimiento fúngico.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se empleó el programa INFOSTAD, aplicando un diseño complementario aleatorio, con comparación de medias con el test de Tuckey.

Resultados

Se seleccionaron 8 colonias fenotípicas correspondientes al género *Lactobacillus* sp., identificadas como LB1, LB2, LB3, LB4, LB5, LB6, LB7, LB8. Se registraron los promedios de crecimiento de los controles de *F. poae* y *F. chlamydosporum*, y de las inhibiciones generadas por las bacterias lácticas (Tabla 1).

Tabla 1. Promedios del efecto inhibitorio de las bacterias lácticas obtenidas de la miel de *T. angustula* frente a las colonias de *F. poae* y *F. chlamydosporum*.

Muestras	Promedio de crecimiento de colonias de <i>F. poae</i> (mm)	Promedio crecimiento de colonias de <i>F. chlamydosporum</i> (mm)
Testigo	86 ± 0,77	85,74 ± 0,68
LB1	83,9 ± 1,38	83,44 ± 0,68
LB2	26,84 ± 1,34	23,52 ± 0,58
LB3	22,08 ± 0,85	18,62 ± 0,98
LB4	0	0
LB5	26,82 ± 1,10	25,64 ± 0,61
LB6	23,94 ± 1,31	23,58 ± 0,54
LB7	23,86 ± 0,57	23,98 ± 0,45
LB8	20,78 ± 1,13	17,58 ± 2,64

En el efecto inhibitor se destacaron las cepas LB3, LB4, LB6 y LB7, LB8 para *F. poae* y LB3, LB4 y LB8, contra *F. chlamydosporum*.

Al realizar el análisis estadístico se obtuvo una diferencia significativa con un p valor < 0,0001 entre los tratamientos y los hongos patógenos. Para *F. poae*, el análisis estadístico de las medias mostró que no se presentaron diferencias significativas del efecto inhibitor entre las cepas LB7 y LB6 y entre LB5 y LB2, que redujeron el crecimiento del hongo, observándose presencia de conidios. Se evidenciaron diferencias significativas entre las medias de las cepas LB3, LB4 y LB8, las cuales mostraron mejor efecto antagonico. Sin embargo, el mayor poder inhibitorio lo presentó la cepa LB4, con un control total sobre del hongo (Figura 1).

En lo que respecta a *F. chlamydosporum*, el análisis estadístico de las medias de las diversas bacterias lácticas no registró diferencias significativas entre las cepas LB7, LB6, LB5, LB2 y entre LB8 y LB3, que lograron detener el crecimiento del hongo, pero mostraron desarrollo de

conidios. Se destacó LB4, con un efecto antagonico total sobre el hongo (Figura 2).

Discusión

Las pruebas de inhibiciones realizadas con las diferentes colonias de bacterias lácticas mostraron en su mayoría efecto antagonico frente a las cepas de hongos patógenos. Esto concuerda con lo expuesto por Schillinger *et al.*, 2010, quienes expresaron que las bacterias lácticas presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento de diversos hongos toxicogénicos.

El análisis estadístico de las medias de las bacterias lácticas mostró igualdad en el efecto antagonico de algunas de ellas y diferencias entre otras, lo cual se relacionó con la presencia de metabolitos secundarios que contenía cada una de las colonias bacterianas. Se vinculó la inhibición a los compuestos que presentaron las bacterias como moléculas de bajo peso molecular, donde se encontró ácido orgánico, reuterina, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos, y compuestos fenólicos, entre otros (Bartkiene *et al.*,

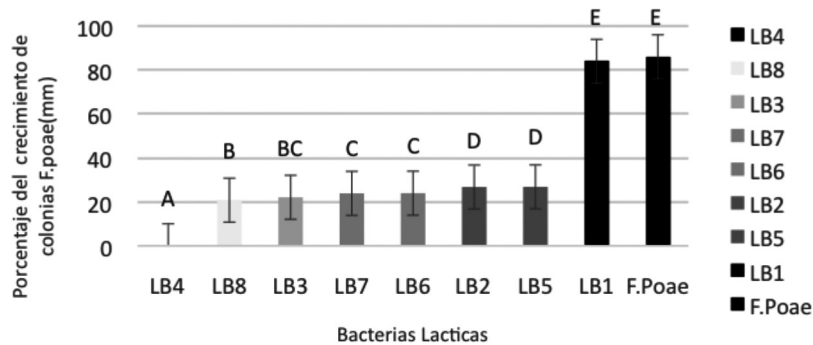


Figura 1. Efecto antagonico de las bacterias lácticas obtenidas de la miel de *T. angustula* contra *F. poae*.

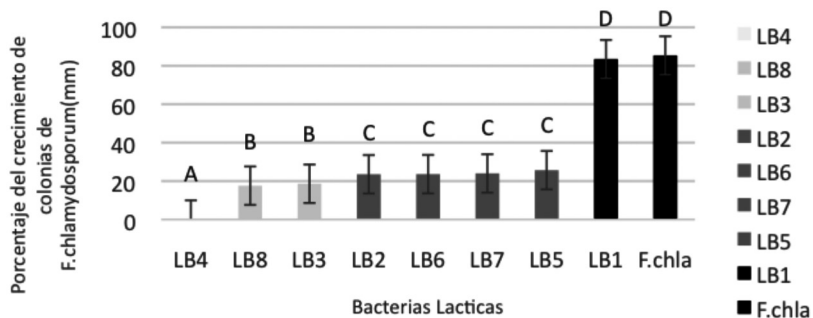


Figura 2. Efecto antagonico de bacterias lácticas provenientes de la miel de *T. angustula* frente a *F. chlamydosporum*.

2018), dependiendo de la variabilidad de la bacteria y las concentraciones de micotoxinas que tuvieron los hongos (Franco *et al.*, 2011).

El comportamiento producido por la bacteria LB4 se relacionó con lo expuesto por Luz *et al.*, 2020, quienes señalaron que algunas bacterias lácticas generaron biocomplejos con una variedad de metabolitos como proteínas, péptidos, y ácidos orgánicos, que actuaron como compuestos antimicóticos. Esto ocasionaría la inhibición total de los hongos patógenos, por parte de LB4.

Conclusión

Este estudio demostró el efecto inhibitorio de bacterias lácticas provenientes de mieles de *Tetragonisca angustula* frente a *F. poae* y *F. chlamydosporum*. La bacteria láctica LB4 generó la inhibición total de ambos hongos y fue seleccionada como un futuro controlador biológico. Por ello se debe continuar con las investigaciones para establecer la interacción con las plantas afectadas por estas especies.

Literatura citada

- Aween, M.M.; Hassan, Z.; Muhialdin, B.J.; Eljamel, Y.A.; AlMabrok, A.S.W.; Lani, M.N.
2012. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey marketed in Malaysia against selected multiple antibiotic resistant (MAR) gram-positive bacteria. *J. Food Sci.*, 77: 364-371.
- Bartkiene, E.; Bartkevics, V.; Lele, V.; Pugajeva, I.; Zavistanaviciute, P.; Mickiene, R.; Zadeike, D.; Juodeikiene, G.
2018. A concept of mould spoilage prevention and acrylamide reduction in wheat bread: Application of lactobacilli in combination with a cranberry coating. *Food Control*, 91: 284-293.
- Carrillo, L.; Gómez Molina, S.E.; Benítez Ahrendts, M.R.
2001. Especies de *Fusarium* Toxicogénicas en sorgo de grano. *Boletín Micológico*, 16: 15-18.
- Cortopassi Laurino, M.; Imperatriz Fonseca, V.L.; Roubik, D.W.; Dollin, A.
2006. Heard T *et al.* Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, 37: 275-292.
- Franco, T.S.; García, S.; Hirooka, E.Y.; Ono, Y.S.; Dos Santos, J.S.
2011. Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *J. Appl Microbiol*, 111: 739-748.
- Kandler, O.; Weiss, N.
1994. Regular Nonsporing GramPositive Rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9^{na} Ed. The Williams and Wilkins C. Baltimore. 209-1234.
- Luz, C.; Izzo, L.; Ritieni, A.; Mañes, J.; Meca, G.
2020. Antifungal and antimycotoxigenic activity of hydrolyzed goat whey on *Penicillium* spp: An application as biopreservation agent in pita bread. *LWT*, 118: 108717.
- Palmero, D.; Cara de M.; Iglesias C.; Santos M.; Diezma F.; Lomas, T.; Tello, J.C.
2008. Evaluación del poder patógeno de especies de *Fusarium* aisladas de aguas de cauces fluviales y fondos marinos de España sobre cuatro especies vegetales. *Bol. San Ver. Plagas*, 34: 399-414.
- Pekkarinen, A.I.; Sarlin, T.H.; Laitila A.T.; Haikara, A.I.; Jones, B.L.
2003. *Fusarium* species synthesize alkaline proteinases in infested barley. *J. Cereal Sci.*, 37: 349-356.
- Quinto, E.J.; Jiménez, P.; Caro, I.; Tejero, J.; Mateo, J.; Girbes, T.
2014. Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food Nutr Sci* 5, 1765-1775.
- Ramos, O.Y.; Basualdo, M.; Libonatti, C.; Vega, M.C.
2019. Current status and application of lactic acid bacteria in animal production systems with a focus on bacteria from honey bee colonies. *Journal of Applied Microbiology*, 128: 1248-1260.
- Schillinger, U.; Villarreal, J.V.
2010. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control*, 21: 107-111.
- Schwarz, P.B.
2003. Impact of *Fusarium* head blight on malting and brewing quality of barley. In Leonard, K.J., Bushnell, W.R. (Eds.). *Fusarium. Head Blight of Wheat and Barley*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA. Pp. 395-419.
- Stenglein, S.A.
2009. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *J. Plant Pathol.* 91: 25-36.
- Yáñez-Ordóñez, O.; Trujano Ortega, M., Llorente Bousquets, J.
2008. Patrones de distribución de las especies de la tribu meliponini (*Hymenoptera: Apoidea: Apidae*) en México. *Interciencia*, 33: 41-45.
- Zamora, L.G.; Beukelman, C.J.; Van den Berg, A.J.; Aerts, P.C.; Quarles Van Ufford, H.C.
2017. An insight into the antibiofilm properties of Costa Rican stingless bee honeys. *J. Wound Care*, 26: 168-177.