

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS CRUDOS DE *Bacillus subtilis* CONTRA FITOPATÓGENOS DE SOJA (*Glycine max*) Y EFECTO DE SU COINOCULACIÓN CON *Bradyrhizobium japonicum*

Bacillus subtilis CRUDE EXTRACTS WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST SOYBEAN (*Glycine max*) PHYTOPATHOGENS AND *Bradyrhizobium japonicum* COINOCULATION EFFECT

Gabriela C. Sarti, Silvia S. Miyazaki*

Área de Agroalimentos. Departamento de Biología, Aplicada y Alimentos. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Avenida San Martín 4453. C1417. (miyazaki@agro.uba.ar).

RESUMEN

Entre los microorganismos causantes de enfermedades pre y post cosecha en los cultivos de soja (*Glycine max*) están las especies fúngicas *Fusarium solani* y *Pythium* sp. Cuatro cepas del género *Bacillus* (*B. subtilis* ATCC6633, *B. amylolyticus*, *B. subtilis* var. *natto*, *B. subtilis* var. *natto domesticado*) se probaron para evaluar su respuesta inhibitoria en los hongos fitopatógenos mencionados. Los tratamientos de inoculación fueron: 1) semillas inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* y 2) semillas coinoculadas con *B. japonicum* y *B. subtilis*. Las plantas crecieron en cámara de cultivo termostatazada a 30 ± 1 °C, humedad relativa 60 % y fotoperíodo 16/8 luz-oscuridad durante 35 d. Los datos se analizaron mediante ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las pruebas *in vitro* de la cepa *B. subtilis* ATCC6633 redujeron el crecimiento micelial de *Fusarium solani* (50 %) y *Pythium* sp. (47 %) respecto a los testigos. La coinoculación de *B. japonicum* y *B. subtilis* estimuló el crecimiento de la planta completa en 125 %, parte aérea 100 %, raíz 235 %, número de hojas 20 % y número de nódulos 88 % respecto al testigo. La cepa de *B. subtilis* ATCC6633 sintetizó metabolitos de naturaleza proteínica y otros con capacidad biosurfactante. Cuando la bacteria se cultivó en medio mínimo salino, glicerol 1 % y concentraciones de ácido L-glutámico entre 40 y 55 mM, se obtuvo la concentración mayor de metabolitos de naturaleza proteínica ($35 \mu\text{g}$ proteína mL^{-1}) y la mayor formación de biopelícula. La formación de la biopelícula, la presencia de biosurfactantes y la liberación de metabolitos antifúngicos, posicionan a esta bacteria en una situación competitivamente ventajosa en relación al resto de la microbiota de la rizósfera en la planta de soja.

ABSTRACT

Fungal species *Fusarium solani* and *Pythium* sp. are among the microorganisms causing diseases in pre and post harvest crop soybean (*Glycine max*). Four strains of the genus *Bacillus* (*B. subtilis* ATCC6633, *B. amylolyticus*, *B. subtilis* var. *natto*, *B. subtilis* var. *natto domesticated*) were tested to evaluate the inhibitory response of them on the phytopathogenic fungi previously mentioned. The inoculation treatments were 1) seeds inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*, and 2) seeds coinoculated with *B. japonicum* and *B. subtilis*. Plants were grown in a thermostated culture chamber at 30 ± 1 °C, 60 % relative humidity and 16/8 light-dark photoperiod for 35 d. Data were analyzed by ANOVA and means were compared by applying the Tukey test ($p \leq 0.05$). The *in vitro* assays of the strain *B. subtilis* ATCC6633 reduced the mycelial growth of *Fusarium solani* (50 %) and *Pythium* sp. (47 %) compared to controls. The coinoculation of *B. japonicum* and *B. subtilis* stimulated the growth of the whole plant by 125 %, 100 % aerial part, 235 % root, 20 % number of leaves, and 88 % nodule number compared to control. The strain *B. subtilis* ATCC6633 synthesized metabolites of proteinaceous nature and others with biosurfactant capacity. When the bacteria were grown in minimal saline medium, glycerol 1 % and concentrations of L-glutamic acid between 40 and 55 mM, the highest concentration of proteinaceous metabolites ($35 \mu\text{g}$ protein mL^{-1}) was obtained and increased biofilm formation. Biofilm formation, the presence of biosurfactants and the release of antifungal metabolites positioned this bacterium in a situation competitively advantageous compared to the rest of the microbiota of the rhizosphere in the soybean plant.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2012. Aprobado: marzo, 2013.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 47: 373-383. 2013.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Fusarium solani*, *Pythium*, *Glycine max.*, antifungal, coinoculation.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, *Fusarium solani*, *Pythium*, *Glycine max.*, antifúngico, coinoculación.

INTRODUCCIÓN

La demanda global de alimentos ha cambiado en los últimos 62 años al casi triplicarse la población mundial de 2500 millones en 1950 a 7000 millones en el 2012. Este problema aumentará ya que se proyecta un aumento de 38 % de la población mundial para el 2050. Este factor impulsa la demanda de alimentos como la soja (*Glycine max*) y sus derivados. Así, en Argentina, la superficie ocupada con este cultivo disminuyó la diversidad productiva y desplazó al girasol (*Helianthus annuus*), maíz (*Zea mays*), algodón (*Gossypium hirsutum*), arroz (*Oryza sativa*) y sorgo (*Sorghum vulgare*). Actualmente es el tercer país productor de aceite y harina de soja en el mundo y el primer exportador de aceite y harinas de girasol y soja (Satorre, 2003; Villela *et al.*, 2009).

La soja produce semillas con alto contenido proteínico y la práctica de cultivo para lograrlo es la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno, en la cual intervienen microorganismos de los géneros *Bradyrhizobium* o *Sinorhizobium*. El sistema de cultivo en una vasta área de Argentina es la siembra de soja sobre soja (cultivo de siembra sin rotación), aumentando el desarrollo de las enfermedades de pre y post cosecha ("dumping-off"). El dumping off está causado por un complejo de hongos del suelo, tales como *Pythium* sp., *Phytophthora sojae*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Phomopsis* sp.

El costo de los agroquímicos y la demanda de productos libre de los mismos por los consumidores impulsó el desarrollo de nuevas tecnologías más amigables con el ambiente, como el control biológico (Compant *et al.*, 2005; Siddiqui, 2006). Entre los grupos bacterianos más estudiados como biocontroladores están las bacterias del género *Bacillus* que colonizan agua, aire y suelos. *Bacillus subtilis* no es patogénico o toxicogénico para humanos, animales o plantas, y produce moléculas bioactivas que tienen una fuerte capacidad antibiótica y antifúngica (Ongena *et al.*, 2005; Sansinenea y Ortiz, 2011). Según las condiciones de cultivo, algunos miembros de este género bacteriano producen biopelículas, las cuales representan una comunidad interdependiente y pueden estar conformadas por una sola especie o una

INTRODUCTION

The global demand for food has changed in the last 62 years as the world population has almost triplicated from 2.5 billion in 1950 to 7 billion in 2012. This problem will increase over time since the world population is estimated to increase 38 % by 2050. Because of this factor, the demand for soybean (*Glycine max*) and its derivatives has escalated; thus, in Argentina, the area occupied by soybean prevails, reducing crop diversity, especially of crops like sunflower (*Helianthus annuus*), maize (*Zea mays*), cotton (*Gossypium hirsutum*), rice (*Oryza sativa*) and sorghum (*Sorghum vulgare*). Argentina is currently the third largest producer of soybean meal and oil in the world and the largest exporter of sunflower and soybean oil and flours (Satorre, 2003; Villela *et al.*, 2009).

Soy produces seeds with high protein content and the cultivation practice to attain it is by inoculation with nitrogen-fixing bacteria, in which microorganisms of the genus *Bradyrhizobium* o *Sinorhizobium* are involved. The farming system in a vast area of Argentina is planting soybean over soybean (cropping without rotation), increasing the development of pre and post-harvest diseases ("dumping-off"). Dumping off is caused by a complex of soil fungi, such as *Pythium* sp., *Phytophthora sojae*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* and *Phomopsis* sp.

The cost of agrochemicals and the demand for chemical-free products by consumers prompted the development of new, more environmentally friendly technologies, such as biological control (Compant *et al.*, 2005; Siddiqui, 2006). Among the most studied bacterial groups as biocontrollers are the *Bacillus* genus bacteria that colonize water, air and soil. *Bacillus subtilis* is not pathogenic or toxicological to humans, animals or plants, and produces bioactive molecules that have a strong antibiotic and antifungal ability (Ongena *et al.*, 2005; Sansinenea and Ortiz, 2011). According to culture conditions, some members of this bacterial genus produce biofilms, which represent an interdependent community and may be formed by a single species or a community derived from multiple species, which can adhere to a great variety of biotic and abiotic surfaces (Rudrappa *et al.*, 2008; Monds and O'Toole, 2009). Besides the microbial mass, the biofilm is composed by a

comunidad derivada de múltiples especies, que pueden adherirse sobre una gran variedad de superficies bióticas y abióticas (Rudrappa *et al.*, 2008; Monds y O'Toole, 2009). Además de la masa microbiana, la biopelícula está constituida por una matriz de exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Stanley y Lazazerra, 2005). Esta biopelícula interviene en la inducción y la acumulación de lipopéptidos que cumplen funciones diversas; algunos poseen actividad antibacteriana y antifúngica (Rahman y Ano, 2009). Por tanto, los objetivos de este estudio fueron: 1) seleccionar una cepa bacteriana capaz de inhibir *in vitro* el desarrollo de los fitopatógenos *Fusarium solani* y *Pythium* sp. y cuya coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* no disminuya la simbiosis con la leguminosa, y 2) determinar la concentración óptima de ácido L- glutámico para producir proteínas con actividad antifúngica y formación de biopelícula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento de antibiosis

Para estos experimentos se usaron las bacterias *Bacillus subtilis* ATCC6633 (de distribución común), *Bacillus amylolyticus* FA 13, *Bacillus subtilis* var *natto* FA 23, *Bacillus subtilis* var *natto* domesticado, *Bradyrhizobium japonicum* (Rizo-liq, Rizobacter) y los hongos fitopatógenos *Fusarium solani* y *Pythium* sp. Los microorganismos son del cepario AGRAL FAUBA. Los hongos *F. solani* y *Pythium* sp. se cultivaron en medio agar papa glucosado y se extrajeron discos de 5 mm de diámetro que se colocaron en placas con agar nutritivo a 25 °C por 3 d. Después las placas fueron sembradas con una estría de los diferentes cultivos de *Bacillus* en su fase logarítmica a 45 mm de distancia del disco con el hongo en estudio. Los testigos fueron las placas no inoculadas con las bacterias. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada bacteria durante 14 d.

Experimentos de coinoculación

Preparación de los inóculos bacterianos

Bradyrhizobium japonicum creció en caldo YM (Somasegaran y Hoben, 1985) y *B. subtilis* en caldo Tripteína Soja a 30 °C, ambos con agitación a 100 rpm por 72 h. Una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹ de cada bacteria fue usada para embeber las semillas germinadas (Molla *et al.*, 2001).

matrix of exopolysaccharides, proteins and nucleic acids (Stanley and Lazazerra, 2005). This biofilm is involved in the induction and accumulation of lipopeptides, which perform different functions; some have antibacterial and antifungal activity (Rahman and Ano, 2009). Therefore, the objectives of this study were to: 1) select a bacterial strain capable of inhibiting *in vitro* the development of phytopathogenic *Fusarium solani* and *Pythium* sp. and whose coinoculation with *Bradyrhizobium japonicum* does not diminish the legume symbiosis, and 2) determine the optimal concentration of L-glutamic acid for the production of proteins with antifungal activity and biofilm formation.

MATERIALS AND METHODS

Antibiosis experiment

For these experiments, bacteria *Bacillus subtilis* ATCC6633 (common distribution), *Bacillus amylolyticus* FA 13, *Bacillus subtilis* var *natto* FA 23, *Bacillus subtilis* var *natto* domesticated, *Bradyrhizobium japonicum* (Rizo-liq, Rizobacter) and phytopathogenic fungi *Fusarium solani* and *Pythium* sp., were utilized. Microorganisms are from the AGRAL FAUBA strain collection. Fungi *F. solani* and *Pythium* sp. were cultivated on a potato dextrose agar medium, and discs 5 mm in diameter were extracted from them and placed on nutrient agar plates at 25 °C for 3 d. Then the plates were seeded with a streak of different *Bacillus* cultures in their logarithmic phase, at 45 mm from the disc with the fungus under study. Control plates were those not inoculated with bacteria. Assays were performed in triplicate for each bacterium for 14 d.

Coinoculation experiments

Preparation of bacterial inocula

Bradyrhizobium japonicum grew in YM broth (Somasegaran and Hoben, 1985) and *B. subtilis* in trypticase soy broth at 30 °C at 100 rpm for 72 h. A concentration of 1×10^8 CFU mL⁻¹ of each bacterium was used for soaking the germinated seeds (Molla *et al.*, 2001).

Culture conditions and coinoculation experiment on soybean plants

A nitrogen-free solution was used: 1 mM KH₂PO₄, K₂SO₄, 1.4 mM and CaCl₂. H₂O 1 mM; and 2 mL L⁻¹ of a medium of a

Condiciones de cultivo y experimento de coinoculación en plantas de soja

Una solución libre de nitrógeno fue usada: KH_2PO_4 1 mM, K_2SO_4 1.4 mM y $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 mM; y 2 mL L^{-1} de medio de una solución de micronutrientes conteniendo [(g L^{-1}) ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.5; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8.5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.8; H_3BO_3 0.5; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15)] y 1.7 mL de 3 μM Fe EDTA pH 6.5. El experimento se realizó en tubos (15 cm \times 2.2 cm) con una mezcla de perlita vermiculita 30:70, y en cada tubo se agregaron 20 mL de la solución anterior y se depositó en la superficie una semilla germinada por cada tubo.

Los tratamientos fueron: 1) semillas inoculadas con *B. japonicum* (10 tubos), y 2) semillas coinoculadas con *B. japonicum* y *B. subtilis* ATCC6633 (10 tubos). Las plantas crecieron 35 d en cámara de cultivo termostaticada a 30 ± 1 °C, humedad relativa 60 % y un fotoperíodo 16/8 luz-oscuridad. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento.

Medición de la actividad antifúngica de los sobrenadantes bacterianos

Bacillus subtilis ATCC6633 creció en un medio mínimo salino conteniendo K_2HPO_4 30 g, KH_2PO_4 10 g, NH_4Cl 5 g, NH_4NO_3 1 g, Na_2SO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CaCl_2 0.005 g. csp 1000 mL pH 6.8-7. Esta solución se diluyó 1:10 y se agregó EDTA (0.01g) L^{-1} , glicerol 1 % y 35 mM de ácido L-glutámico a 30 °C durante 144 h. Porciones del sobrenadante se tomaron cada 24 h, centrifugadas 10 min a 13 000 g, filtradas y liofilizadas. El residuo seco fue resuspendido en 3 mL de agua destilada para evaluar poder antifúngico. El mismo procedimiento se usó para cuantificar proteínas totales (Bradford, 1976), se usó el mismo medio salino descrito con glicerol 1 %, y diferentes concentraciones de ácido L-glutámico a 30 °C por 96 h.

Experimentos de actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los sobrenadantes bacterianos (extracto crudo libre de células) se realizó con el método de difusión en agar sobre discos de papel. El disco de agar papa glucosado (5 mm diámetro) con el hongo *F. solani* o *Pythium* sp. se colocó en el centro de placas de petri con medio agar papa glucosado. Un disco de papel filtro (10 mm diámetro) se colocó a 2 cm de cada uno de los hongos y asepticamente se impregnó en tres repeticiones con 20 μL del residuo seco resuspendido en agua destilada. Como testigo se usó papel de filtro con agua destilada estéril y las placas fueron incubadas 14 d a 25 °C.

micronutrient solution containing [(g L^{-1}) ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.5; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8.5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.8; H_3BO_3 0.5; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15)] and 1.7 mL of 3 μM Fe EDTA pH 6.5. The experiment was performed in tubes (15 cm \times 2.2 cm) with a mixture of 30:70 vermiculite perlite, and in each tube we added 20 mL of the previous solution and deposited a seed germinated for each tube on the surface.

The treatments were: 1) seeds inoculated with *B. japonicum* (10 tubes), and 2) seeds co-inoculated with *B. japonicum* and *B. subtilis* ATCC6633 (10 tubes). The plants were grown 35 d in a culture chamber thermostated at 30 ± 1 °C, 60 % relative humidity and a photoperiod 16/8 light-dark. The experiments were performed in triplicate for each treatment.

Measurement of the antifungal activity of bacterial supernatants

Bacillus subtilis ATCC6633 grew in a minimal saline medium containing K_2HPO_4 30 g, KH_2PO_4 10 g, NH_4Cl 5 g, 1 g NH_4NO_3 , 1 g Na_2SO_4 , 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g, CaCl_2 0.005g csp 1000 mL pH 6.8-7. This solution was diluted 1:10 and added EDTA (0.01g) L^{-1} , glycerol 1% and 35 mM L-glutamic acid at 30 °C for 144 h. Portions of the supernatant were taken every 24 h, centrifuged 10 min at 13 000 g, filtered and lyophilized. The dry residue was resuspended in 3 mL of distilled water for testing antifungal power. We used the same procedure for the quantification of total proteins (Bradford, 1976); the same saline medium described with 1 % glycerol was used, and varying concentrations of L-glutamic acid at 30 °C for 96 h.

Antifungal activity experiments

The antifungal activity of the bacterial supernatants (cell-free crude extract) was carried out with the agar diffusion method on paper discs. The potato dextrose agar disc (5 mm in diameter) with the fungus *F. solani* or *Pythium* sp. was placed in the center of petri dishes on potato dextrose agar medium. A disk of filter paper (10 mm in diameter) was placed at 2 cm of each of the fungi and aseptically impregnated three replicates with 20 μL of dry residue resuspended in distilled water. As control, filter paper with sterile distilled water was used; and the plates were incubated 14 d at 25 °C.

Biofilm quantification

Ninety six well plates with 24 h cultures of a minimal saline medium, 1 % glycerol and the following concentrations of

Cuantificación de la biopelícula

Las placas de 96 pocillos con cultivos de 24 h de un medio mínimo salino, glicerol 1 % y las siguientes concentraciones de ácido L-glutámico, se incubaron 24 h a 30 °C: 3.5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 mM. Después se cuantificó la biopelícula formada con la técnica de tinción con cristal violeta en microplacas (lectora BIOTEK), absorbancia a 570 nm (O'Toole y Kolter, 1998).

Poder biosurfactante de *Bacillus subtilis* ATCC 6633

La capacidad desestabilizante de las membranas biológicas se determinó usando placas de agar sangre preparadas con 5 mL de medio mínimo con glicerol y L-glutámico y 0.5 mL de sangre bovina en agar. Se realizó una estría de la bacteria sobre las placas y se incubó 48 h a 30 °C (Nakano *et al.*, 1988).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con los tratamientos: 1) semillas inoculadas con *B. japonicum*, y 2) semillas coinoculadas con *B. japonicum* y *B. subtilis*. Los resultados fueron analizados mediante ANDEVA y se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para comparar las medias de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de cepas bacterianas con actividad antifúngica contra *Fusarium solani* y *Pythium* sp.

Dos de las cuatro cepas del género *Bacillus* (Cuadro 1) redujeron ($p \leq 0.05$) el crecimiento (diámetro de la colonia) de los hongos patógenos *F. solani* y *Pythium* sp., *B. subtilis* ATCC 6633 en 50 y 47 %, y *B. subtilis* var *natto* en 31 y 23 %. Los resultados evidencian el elevado potencial de las bacterias del género *Bacillus* para el control biológico *in vitro* de numerosos hongos fitopatógenos, el cual ha sido reportado por Ongena *et al.* (2005), Wang *et al.* (2007) y Ghasemi *et al.* (2010) a través de diferentes mecanismos de biocontrol.

Efecto de la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* y *Bacillus subtilis* ATCC6633 sobre planta entera de soja, parte aérea, raíces y nodulación

La cepa *B. subtilis* ATCC6633 tiene actividad biocontroladora *in vitro* y además actuó sinérgicamente

L-glutamic acid, were incubated 24 h at 30 °C: 3.5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 mM. Then the biofilm was quantified using the technique of crystal violet staining in microplates (BIOTEK reader), absorbance at 570 nm (O'Toole and Kolter, 1998).

Bacillus subtilis ATCC 6633 biosurfactant power

The destabilizing capacity of biological membranes was determined using blood agar plates prepared with 5 mL of minimal medium with glycerol and L-glutamic acid, and 0.5 mL of bovine blood on agar. A streak of the bacteria was made on the plates and incubated during 48 h at 30 °C (Nakano *et al.*, 1988).

Experimental design and statistical analysis

We conducted a completely randomized experimental design using the following treatments: 1) seeds inoculated with *B. japonicum*, and 2) seeds co-inoculated with *B. japonicum* and *B. subtilis*. Results were analyzed with ANOVA and the Tukey's test ($p \leq 0.05$) was used to compare treatment means.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of bacterial strains with antifungal activity against *Fusarium solani* and *Pythium* sp.

Two of the four strains of genus *Bacillus* (Table 1) reduced ($p \leq 0.05$) growth (colony diameter) of fungal pathogens *F. solani* and *Pythium* sp. *B. subtilis* ATCC 6633 by 50 and 47 %, and *B. subtilis* var *natto* by 31 and 23 %. Results show the high potential of genus *Bacillus* bacteria for biological control *in vitro* of many fungal pathogens, as reported by Ongena *et al.* (2005), Wang *et al.* (2007) and Ghasemi *et al.* (2010) through different mechanisms of biocontrol.

Coinoculation effect of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus subtilis* ATCC6633 on soybean whole plant, aerial part, roots and nodulation

Strain *B. subtilis* ATCC6633 has biocontrol activity *in vitro* and acted synergistically with *Bradyrhizobium japonicum* (Figures 1 and 2). The coinoculation of *B. subtilis* with *B. japonicum* benefited infectivity of the latter, increasing the number of nodules on the roots of soybean plants. This increase favored the development of the root and aerial part of the plant, with a 125 % increase of the whole plant, above-ground part 100 %, root 235 %, and nodules 100 %.

Cuadro 1. Reducción del crecimiento de los hongos *Fusarium solani* y *Pythium* sp. por bacterias del género *Bacillus* en medio agar nutritivo a 30 °C.**Table 1. Reduced growth of fungi *Fusarium solani* and *Pythium* sp. by bacteria of the genus *Bacillus* in nutritive agar 30 °C.**

Cepas del género <i>Bacillus</i>	<i>F. solani</i>		<i>Pythium</i> sp.	
	Diámetro de crecimiento (mm)	Reducción de crecimiento (%) [†]	Diámetro de crecimiento (mm)	Reducción de crecimiento (%) [§]
<i>B. amyloolyticus</i> FA13	68±1 a [‡]	3	60±1 a	8
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	35±1 b	50	34±1 b	47
<i>B. subtilis natto</i> FA23	48±1 c	31	50±1 c	23
<i>B. subtilis var natto</i> domesticado	68±1 a	3	63±1 a	3
Testigo	70±1 a	0	65±1 a	0

[†]Con respecto al testigo ♦ With respect to the control.

[‡]Desviación estándar; medias con letra diferente son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ Standard deviation; means with different letter are statistically different ($p \leq 0.05$).

[§]Cada cifra representa el promedio de 10 repeticiones ♦ Each figure represents the average of 10 repetitions.

con *Bradyrhizobium japonicum* (Figuras 1 y 2). La coinoculación de *B. subtilis* con *B. japonicum* benefició la infectividad de esta última, aumentando el número de nódulos en las raíces de las plantas de soja. Dicho aumento favoreció el desarrollo de la parte radicular y aérea de la planta, con un aumento en el crecimiento de la planta completa 125 %, parte aérea 100 %, raíz 235 %, número de hojas 20 % y número de nódulos 88 %, respecto al testigo.

En la coinoculación de *B. japonicum* con *B. subtilis* ATCC6633 aumentó el número de nódulos y el peso de la raíz aumentó 235 %, mostrando que la coinoculación con *B. subtilis* ATCC6633 actuó también potenciando la efectividad de *B. japonicum*. En un estudio de coinoculación con diferentes *Bacillus* y *B. japonicum* 532C sobre plantas de soja en invernadero y a campo con diferentes temperaturas, la infectividad y efectividad fue sólo 34 % mayor que el testigo con respecto al número de nódulos por planta y 30 % con respecto al peso de la raíz por efecto de la presencia de *Bacillus*, y una mayor infectividad provocada por la coinoculación (Bai *et al.*, 2003). Según Correa *et al.* (2009), la coinoculación con *B. amyloliquefaciens* BN M122 sólo tiene una actividad biocontroladora contra fitopatógenos de soja y no se encontró ninguna actividad sinérgica bajo dichas condiciones de trabajo.

Poder antifúngico de los sobrenadantes bacterianos

Los metabolitos con poder antifúngico producidos por esta bacteria se extrajeron en fase acuosa y

leaf number 20 %, and number of nodules 88 % compared to the control.

In the coinoculation of *B. japonicum* with *B. subtilis* ATCC6633 the number of nodules increased and so did the root weight by 235 %, showing that

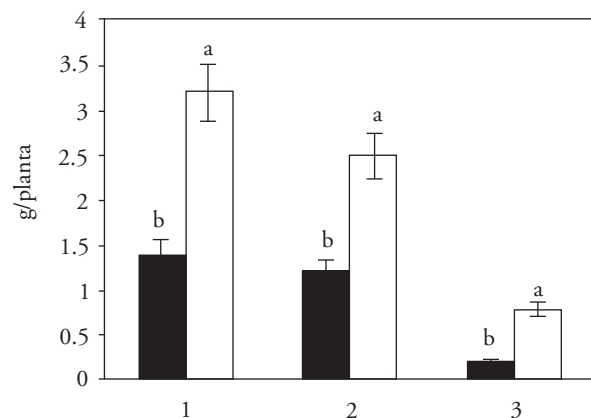


Figura 1. 1) Crecimiento de planta completa, 2) desarrollo de parte aérea, 3) desarrollo de raíces, sobre plantas de soja de 35 días (30±1 °C, humedad relativa 60 %, fotoperíodo luz/oscuridad 16/8) cuyas semillas fueron inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* (izquierda) y coinoculadas con *Bacillus subtilis* ATCC6633 (derecha). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Figure 1. 1) Whole plant growth, 2) development of aerial part, 3) development of roots, on soybean plants for 35 days (30±1 °C, relative humidity 60 %, photoperiod light/dark 16/8) whose seeds were inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* (left) and co-inoculated with *Bacillus subtilis* ATCC6633 (right). Different letters indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

no se observó actividad antifúngica en extractos no acuosos (extracciones con acetato de etilo).

La mayor inhibición del crecimiento micelial en placa de los hongos *F. solani* y *Pythium* sp. corresponde al extracto crudo (sobrenadante bacteriano) obtenido a las 96 h de cultivo. Este poder inhibitorio se correlaciona con la fase estacionaria de la curva de crecimiento del cultivo (Figura 3). Cuando el sobrenadante corresponde a cultivos de más de 120 h (fase estacionaria tardía) el desarrollo del micelio fúngico aumenta.

Gordillo *et al.* (2009) señalan que el *Bacillus* sp. IBA33 produce metabolitos activos antifúngico hasta las 72 h de cultivo; después hay sustancias inactivas aún en su fase estacionaria de crecimiento. En *Bacillus* ATCC6633 los metabolitos son activos hasta las 120 h con un pico de actividad a las 96 h; después de 120 h la bacteria inició su etapa de esporulación, orientando su metabolismo energético a tal fin y no sintetiza metabolitos antifúngicos activos.

Crecimiento y liberación de proteínas con poder antifúngico en *Bacillus subtilis*

La mayor liberación de proteínas de los cultivos en fase estacionaria se observó con las concentraciones de ácido L-glutámico de 40 a 65 mM (Figura 4). Cuando la concentración de proteínas fue mayor de 30 mg mL⁻¹ se produjo la inhibición más alta del desarrollo del micelio de *F. solani* y *Pythium* sp con radios de crecimiento fúngicos de 16 y 15 mm (Figura 5). Según Araújo *et al.* (2005), Kavita *et al.* (2005)

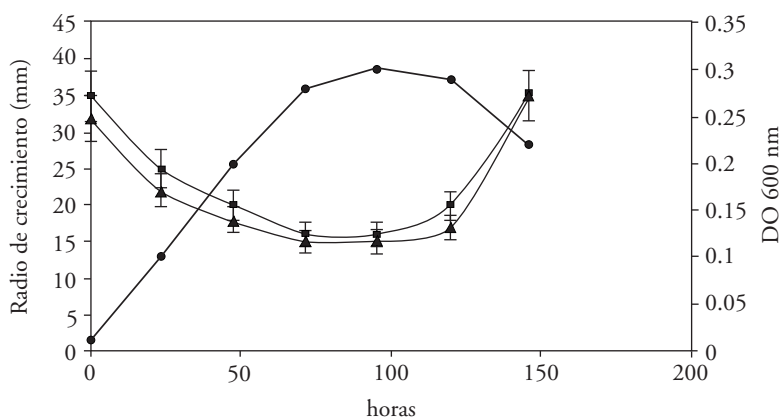


Figura 3. Crecimiento de *Bacillus subtilis* (●) y efecto inhibitorio del sobrenadante de un cultivo de *Bacillus subtilis* sobre el desarrollo de *Fusarium solani* (■) y *Pythium* sp. (▲).

Figure 3. Growth of *Bacillus subtilis* (●) and inhibitory effect of supernatant of a *Bacillus subtilis* culture on the development of *Fusarium solani* (■) and *Pythium* sp. (▲).

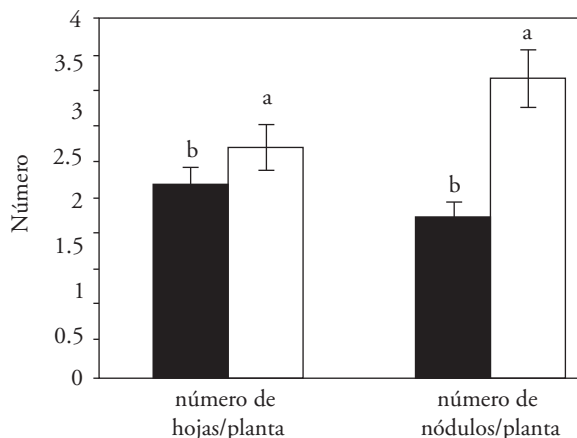


Figura 2. Número de hojas y número de nódulos en plantas de soja de 35 días (30 ± 1 °C, humedad relativa 60 %, fotoperíodo luz/oscuridad 16/8) cuyas semillas fueron inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* (izquierda) y coinoculadas con *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (derecha). Letras diferentes indican diferencia significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Number of leaves and of nodules on soybean plants after 35 days (30 ± 1 °C, relative humidity 60 %, photoperiod light/dark 16/8) whose seeds were inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* (left) and co-inoculated with *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (right). Different letters indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

coinoculation with *B. subtilis* ATCC6633 also acted enhancing the effectiveness of *B. japonicum*.

In a study of coinoculation with different *Bacillus* and *B. japonicum* 532C on soybean plants

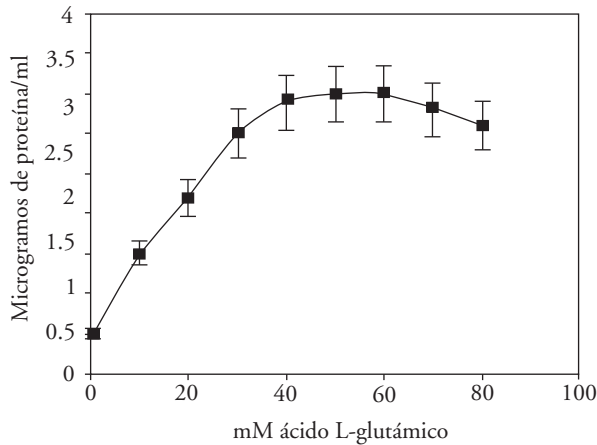


Figura 4. Liberación de proteínas en *Bacillus subtilis* crecida en medio mínimo salino, glicero 1 % y concentraciones crecientes de ácido L-glutámico (■).

Figure 4. Release of proteins in *Bacillus subtilis* grown in minimal saline medium, 1 % glycerol, and increasing concentrations of L-glutamic acid (■).

y Sun *et al.* (2006), para obtener péptidos con actividades antifúngicas contra distintos fitopatógenos las bacterias debieron crecer en medios complejos. En el presente estudio *B. subtilis* ATCC6633 sólo utilizó una única fuente carbonada de tres carbonos como glicerol y sales minerales para la síntesis de proteínas con alta actividad antifúngica, mostrando un mecanismo metabólico más complejo para la síntesis de metabolitos activos.

Concentración óptima de L-glutámico para la formación de la biopelícula en un cultivo de *Bacillus subtilis*

Concentraciones de ácido L-glutámico entre 35 y 55 mM causaron la mayor formación de biopelícula, coincidiendo con el pH final más bajo, de 5.5 (Figura 6). Valores de pH cercanos a la neutralidad conforman una película fina fácilmente disgregable (datos no mostrados).

Morikawa *et al.* (2006) utilizaron como fuente carbonada glicerol y ácido L- glutámico, debieron incorporar sales de manganeso en el medio de cultivo para obtener la biopelícula y no consideraron la regulación de pH. En *B. subtilis* ATCC6633 el control del pH fue un factor crucial para la producción de una biopelícula estable y no fue necesario incorporar sales de manganeso u otro catión para la formación

in greenhouse and field conditions at different temperatures, infectivity and effectiveness were only 34 % higher than the control with respect to the number of nodules per plant, and 30 % in relation to the root weight due to the presence of *Bacillus* and greater infectivity induced by coinoculation (Bai *et al.*, 2003). Correa *et al.* (2009) show that coinoculation with *B. amyloliquefaciens* BN M122 has only a biocontrol activity against pathogens of soybean and found no synergistic activity under these conditions.

Antifungal power of bacterial supernatants

The antifungal metabolites produced by this bacterium were extracted in the aqueous phase and no antifungal activity was observed in non-aqueous extracts (ethyl acetate extractions).

The greatest inhibition of mycelial growth in *F. solani* and *Pythium* sp fungi plate corresponds to crude extract (bacterial supernatant) obtained after 96 h of cultivation. This inhibitory power correlates with the stationary phase of the culture growth curve (Figure 3). When the supernatant contains cultures over 120 h (late stationary phase), the development of fungal mycelium increases.

Gordillo *et al.* (2009) point out *Bacillus* sp. IBA33 produces antifungal active metabolites up to 72 h of

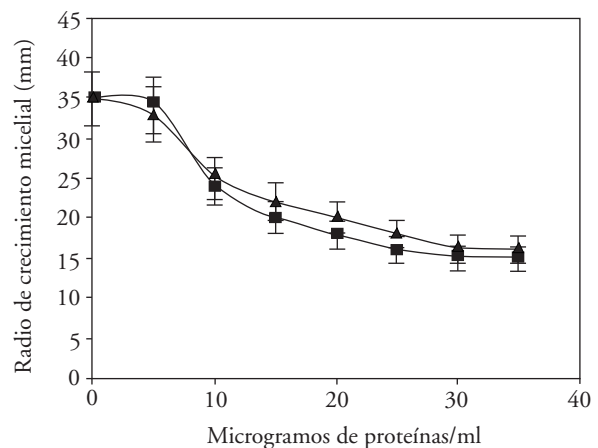


Figura 5. Inhibición del crecimiento del micelio de *Fusarium solani* (▲) y *Pythium* sp. (■) por el método de difusión en agar en discos de papel.

Figure 5. Growth inhibition of *Fusarium solani* (■) and *Pythium* sp. (▲) mycelium by the agar diffusion method on paper discs.

de la misma, lo cual indicaría que las enzimas involucradas no son metalo dependientes.

Capacidad de *Bacillus subtilis* como desestabilizante de membranas biológicas

Bacillus subtilis ATCC6633 liberó moléculas con capacidad hemolítica, lo cual fue evidente por la destrucción del grupo hemo y consecuente desaparición del color rojo característico de la hemoglobina de los glóbulos rojos en el medio de cultivo (el cual contenía sangre bovina) (Figura 7). Esto sugiere que se liberaron sustancias con propiedades biosurfactantes que acompañaron a la formación de una biopelícula gruesa. La cepa *B. subtilis* 168 cultivada en medio estático produce una biopelícula delgada y frágil y al incorporar los genes que sintetizan lipopéptidos con propiedades surfactantes y antibióticas, la bacteria transformada *B. subtilis* RM/iSd16 produce una biopelícula más gruesa (Rahman *et al.*, 2007). Esto indica que la formación de biosurfactantes en *B. subtilis* 168 RM/iSd16 y en *B. subtilis* ATCC6633 estaría comprometida en la arquitectura de la biopelícula.

CONCLUSIONES

La coinoculación de *Bacillus subtilis* ATCC6633 con la cepa *Bradyrhizobium japonicum* aumentó su infectividad y efectividad, sin interferir en el proceso de fijación biológica de nitrógeno en plantas de soja (*Glycine max*) cultivadas *in vitro*. *Bacillus subtilis* ATCC6633 en experimento de antibiosis presentó actividad antifúngica contra los fitopatógenos *Fusarium solani* y *Phytilium* sp. Estos hongos proliferan en los cultivares de soja por la implementación del sistema de cultivo de siembra sin rotación.

En el extracto crudo proveniente de un medio mínimo salino cuya única fuente carbonada fue glicerol 1%, la óptima producción de moléculas proteicas con actividad antifúngica y formación de biopelícula se logró ajustando la concentración del aminoácido L-glutámico entre 40 y 55 mM.

En *Bacillus subtilis* ATCC6633, la presencia de biosurfactantes estaría involucrada en la formación de una biopelícula gruesa y estable lo cual, junto con la liberación de moléculas proteicas antifúngicas posicionan a esta bacteria en una situación ventajosa en relación a la competencia que existe en la microbiota del suelo.

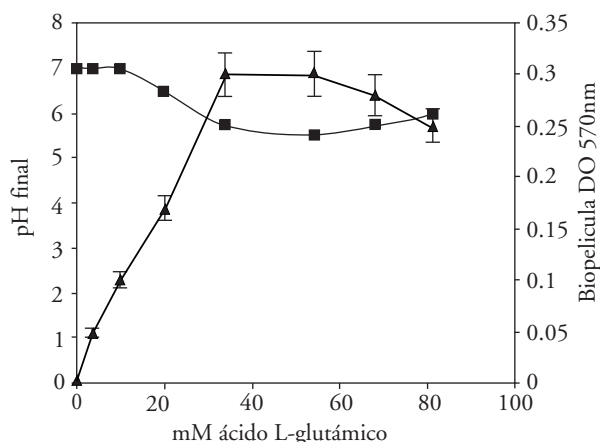


Figura 6. Formación de biopelícula (▲) en medio mínimo salino, glicerol 1 % y concentraciones crecientes de ácido L-glutámico, y pH final (■) del cultivo.

Figure 6. Biofilm formation (▲) in minimal saline medium, glycerol 1 % and increasing concentrations of L-glutamic acid, and culture final pH (■).

culture after which they obtain inactive substances even in the stationary growth phase. In the case of *Bacillus* ATCC6633, metabolites are active up to 120 h with a peak of activity at 96 h; after 120 h the bacterium began its sporulation stage, directing its energy metabolism to that purpose and without synthesizing active antifungal metabolites.

Growth and release of antifungal power proteins in *Bacillus subtilis*

The largest release of proteins from stationary phase cultures was observed with concentrations of L-glutamic acid from 40 to 65 mM (Figure 4). When the protein concentration was greater than 30 mg mL⁻¹ the highest inhibition of *F. solani* and *Pythium* sp mycelial growth was found, with fungal growth ratios of 16 and 15 mm (Figure 5). According to Araujo *et al.* (2005), Kavita *et al.* (2005) y Sun *et al.* (2006), to obtain peptides with antifungal activities against various phytopathogens bacteria must grow in complex media. In the present study, *B. subtilis* ATCC6633 only used a single carbon source of three carbons such as glycerol and mineral salts for the synthesis of proteins with high antifungal activity, showing a more complex metabolic mechanism for the synthesis of active metabolites.

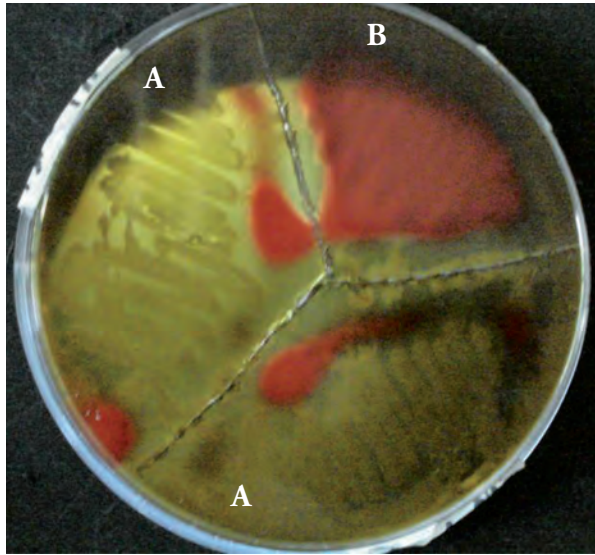


Figura 7. A, *Bacillus subtilis* cultivado en agar más sangre bovina. B (testigo negativo), Agar más un suplemento con sangre bovina.

Figure 7. A, *Bacillus subtilis* cultivated in agar plus bovine blood. B (negative control), Agar plus a supplement with bovine blood.

LITERATURA CITADA

- Araújo, F. F., A. A. Henning, and M. Hungria. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their affects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. 2005. World J. Microbiol. Biotechnol. 21:1639-1645.
- Bai, Y., X. Zhou, and D. L. Smith. 2003. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. Crop Sci. 43:1774-1781.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical Biochem. 72:248-254.
- Compant, S., D. Brion, J. Nowak, C. Clément, and E. A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant disease: Principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71:4951-4959.
- Correa, O. S., M. S. Montecchia, M. F. Berti, M. C. Fernández Ferrari, N. L. Pucheu, N. L. Kerber, and A. F. García. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BN M122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. Appl. Soil Ecol. 41:185-194.
- Ghasemi, S., G. Almadian, N. Jelodar, H. Rahimian, S. Ghandili, A. Dehestani, and P. Shariati. 2010. Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary report. World J. Microbiol. Biotechnol. 26:1437-1443.
- Gordillo, M., A. Navarro, L. Benitez, M. Torres, and M. Maldonado. 2009. Preliminary study and improve the production of metabolites with antifungal activity by a *Bacillus* sp strain IBA 33. Microbiol. Insight.2:15-24.

Optimum concentration of L-glutamic acid for the formation of biofilm on a *Bacillus subtilis* culture

Concentrations of L-glutamic acid between 35 and 55 mM caused most biofilm formation, coinciding with the lowest final pH of 5.5 (Figure 6). Near neutrality pH values formed a thin film easily strippable (data not shown).

Morikawa *et al.* (2006) used glycerol and L-glutamic acid as carbon source; they added manganese salts to the culture medium to obtain the biofilm and did not consider pH regulation. In *B. subtilis* ATCC6633 pH control was a crucial factor for the production of a stable biofilm; it was not necessary to incorporate manganese salts or other cation for forming the biofilm, which indicates that the enzymes involved are not metal dependent.

Capacity of *Bacillus subtilis* to destabilize biological membranes

Bacillus subtilis ATCC6633 released hemolytic capacity molecules, which was evident in the destruction of heme and the subsequent disappearance of the red color, characteristic of hemoglobin in red blood cells in the culture medium (which contained bovine blood) (Figure 7). This suggests the release of biosurfactant substances that accompanied the formation of a thick biofilm. Strain *B. subtilis* 168 grown in a static medium produces a thin and fragile biofilm and by incorporating genes synthesizing lipopeptides with surfactant and antibiotic properties, the transformed bacterium *B. subtilis* RM/iSd16 produces a thicker biofilm (Rahman *et al.*, 2007). This indicates that the formation of biosurfactants in *B. subtilis* 168 RM/iSd16 and *B. subtilis* ATCC6633 would be involved in the architecture of the biofilm.

CONCLUSIONS

The coinoculation of *Bacillus subtilis* ATCC6633 with the strain *Bradyrhizobium japonicum* increased infectivity and effectiveness, without interfering in the process of biological nitrogen fixation in soybean plants (*Glycine max*) grown *in vitro*. *Bacillus subtilis* ATCC6633 showed in antibiosis assays antifungal activity against phytopathogenic *Fusarium solani*

- Kavita, S., S. Senthilkumar, S. Gnanamanickam, M. Inayathullah, and R. Jayakumar. 2005. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. *Process Biochem.* 40:3236-3243.
- Leclère, V., M. Bechet, A. Adam, J.S.Guez, B. Wathelet, M. Ongena, P. Thonart, F. Gancel, and M.Chollet-Imbert. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (8): 4577-4584.
- Molla, A. H., Z. H. Shamsuddin, M. S. Halimi, M. Morziah, and A. B. Puteh. 2001. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean coinoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biol. Biochem.* 33:457-463.
- Monds, R. D., and G. A. O'Toole. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* 17(2):73-87.
- Morikawa, M., S. Kagihiro, M. Haruki, K. Takano, S. Branda, R. Kolter, and S. Kanaya. 2006. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces α -polyglutamate. *Microbiology* 152: 2801-2807.
- Nakano, M. M., M. A. Marahiel, and P. Zuber. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170:5662-5668.
- Ongena, M., P. Jaques, Y. Toure, J. Destain, A. Jabrane, and P. Thonart. 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:29-38.
- O'Toole, G. A., and R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS 365 proceeds via multiple convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28(3):449-461.
- Rahman, M. S., T. Ano, and M. Shoda. 2007. Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* 127:503-507.
- Rahman, M. S., and T. Ano. 2009. Production characteristics of lipopeptide antibiotics in biofilm fermentation of *Bacillus subtilis*. *J. Environ. Sci.* 21(Suppl. 1): S36-S39.
- Rudrappa, T., M. L. Biedrzycki, and H. P. Bais. 2008. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64. 153-166.
- Sansinenea, E., and A. Ortiz. 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol. Lett.* 33:1523-1538.
- Satorre, E. 2003. *El Libro de la Soja*. SEMA. Buenos Aires. Argentina. 264 p.
- Siddiqui, Z. A. 2006. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. (@ book) Springer. 313 p.
- and *Phytium* sp. These fungi proliferate in soybean cultivars due to the implementation of the seed culture system without rotation.
- In the crude extract coming from a minimum saline medium whose sole carbon source was glycerol 1%, the optimal production of protein molecules with antifungal activity and biofilm formation was obtained by adjusting the concentration of the L-glutamic amino acid between 40 and 55 mM.
- In *Bacillus subtilis* ATCC6633, the presence of biosurfactants could be involved in the formation of a thick and stable biofilm which, along with the release of antifungal protein molecules, place this bacterium in an advantageous position in relation to the existing competition in the soil microbiota.

—End of the English version—



- Somasegaran, P., and H. Hoben. 1985. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. University of Hawaii. 273 p.
- Sosa López A., V. Pozos, y D. Torres. 2005. Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola*. Año 32. N°3. La Habana. Cuba.
- Stanley, N., and B. Lazazerra. 2005. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect polyglutamic acid production and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 57:1143-1158.
- Sun, L., Z. Lu, X. Bie, F. Lu, and S. Yang. 2006. Isolation and characterization of a coproducer of fengycins and surfactins endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. 2006. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22:1259-1266.
- Villela, F., S. Senesi, E. Dulce, R. Pérez San Martín, y M. Darziano. 2009. *El Sistema de Agronegocios de la Soja en la Argentina, su Cadena y Prospectiva al 2020*. Editorial Horizonte A. Buenos Aires. Argentina. 340 p.
- Wang, J., J. Liu, H. Chen, and J. Yao. 2007. Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:889-894.