

PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE *Bacillus subtilis* SOBRE HONGOS TRANSPORTADOS POR HORMIGAS INVASORAS DE COLMENAS APÍCOLAS

BACILLUS SUBTILIS INHIBITION TESTS ON FUNGUS TRANSPORTED BY INVASIVE ANTS FROM HONEY BEE HIVES

Ruiz, G. B.^{1,2*}; Retamoso R. M.^{1,2}; Benítez Ahrendts M.^{1,2}

RESUMEN

Las hormigas son visitantes comunes de las colmenas de abejas, suelen tener microorganismos adheridos a sus cutículas. La humedad y la estabilidad de la temperatura, las predisponen a infecciones, pudiendo diseminar los agentes patógenos en la colmena. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antagonístico de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a los hongos *Aspergillus* sección *nigri* y *Penicillium* serie *chrysogenum* aislados de las cutículas de hormigas establecidas en colmenas de *Apis mellifera* L. Para ello se recolectaron hormigas del interior de colmenas de un apiario de la localidad de Rio Blanco, las cuales fueron suspendidas en solución de peptona al 10%. Se sembraron alícuotas de la solución sobre agar Malta e incubaron a 27°C durante 7 días, siendo luego enfrentadas con la bacteria. Se tomó la medición del diámetro de crecimiento de las colonias de los hongos en presencia del antagonista a los 5, 10 y 15 días de incubación. Se calculó el porcentaje de inhibición obteniendo para *Aspergillus* sección *nigri* menos del 50% y para *Penicillium* serie *chrysogenum* promedios mayores al 70%. Destacando que a partir del día 15 de incubación se observaron mayores porcentajes de inhibición de los hongos. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre las muestras testigos y la de los hongos enfrentados con la bacteria *Bacillus subtilis* presenta actividad antifúngica frente a los hongos en estudio, controlando efectos negativos en la producción de las abejas como en las propias hormigas.

Palabras clave: Apicultura. *Apis mellifera* L. *Aspergillus* sección *nigri*. *Penicillium* serie *chrysogenum*.

SUMMARY

Ants are common visitors to bee hives, often having microorganisms attached to their cuticles. Humidity and temperature stability predispose them to infections, being able to spread pathogens in the hive. The objective of this study was to evaluate the antagonistic effect of *Bacillus subtilis* bacteria against fungi *Aspergillus* section *nigri* and *Penicillium* series *chrysogenum* isolated from ants cuticles established in *Apis mellifera* L.hives. For this, ants species inside hives were collected from an apiary in Rio Blanco town, which were suspended in 10% peptone solution. Aliquots of the solution were sown in Malta agar and incubated at 27° C for 7 days, and then confronted with the bacteria. The measurement of the growth diameter of fungal colonies was taken in the presence of the antagonist at 5, 10 and 15 days of

1-INECOA-CONICET. Avenida Bolivia 1239. San Salvador de Jujuy, Jujuy-Argentina. C.P. 4400. 2-Laboratorio de Microbiología y Sanidad Apícola. Facultad de Ciencias Agrarias-UNJu. Alberdi 47. San Salvador de Jujuy, Jujuy-Argentina. C.P. 4400

*Autor de contacto e-mail: giselaruiz574@gmail.com

incubation. The inhibition percentage was calculated obtaining for *Aspergillus* section *nigri* less than 50% and for *Penicillium* series *chrysogenum* averages higher than 70%. Highlighting as of the 15th day of incubation, greater percentages of fungal inhibition were observed. Statistical analysis showed significant differences between the witnesses samples witnesses and fungi faced with the *Bacillus subtilis* bacteria has antifungal activity in the presence of fungi under study, controlling negative effects on bees production as well as on ants themselves.

Keywords: *Apis mellifera* L. Beekeeping. *Aspergillus* section *nigri*. *Penicillium chrysogenum* series.

INTRODUCCIÓN

Aunque la apicultura argentina es la más importante y desarrollada en Sudamérica, en nuestra región predomina la actividad artesanal, que tiene en cuenta el aspecto sanitario de los colmenares; que incide en la producción y la comercialización de la miel (Benítez Ahrendts et al., 2015). Las hormigas son los insectos sociales más diversos y exitosos (Ríos-Casanova 2014). Son organismos conspicuos de la mayoría de los ecosistemas terrestres, los cuales han alcanzado su mayor diversidad y biomasa en los trópicos, colonizan fácilmente ambientes humanos (Vásquez-Bolaños 2015). Suelen entrar en las colmenas para alimentarse de la miel o las crías (Dewey, 2000), o bien establecen sitios de anidación entre las cubiertas interior y exterior de las colmenas o en las trampas de polen, aunque en general no provoquen daños económicos importantes (Ruiz et al., 2018). Las hormigas suelen tener hongos y bacterias adheridos a sus cutículas, y las condiciones ambientales en el interior de sus nidos, como la humedad y la estabilidad de la temperatura, las predisponen a infecciones pudiendo diseminar los agentes patógenos que afectan a otros insectos (Oi y Pereira, 1993).

Las bacterias del género *Bacillus* ejercen una actividad antagonista frente a los hongos mediante la producción de lipopéptidos, excreción de enzimas líticas como quitinasas y competencia por el espacio y los nutrientes (Rodas-Junco y otros, 2009; Zhang et al., 2010). Es el grupo bacteriano más utilizado para el control de patógenos del suelo y de raíces (Killani et al., 2011).

Así mismo *Bacillus subtilis* es un biocontrolador con amplio espectro antibiótico; los metabolitos que producen son supresores efectivos de algunos

patógenos de plantas como *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria*, y *Verticillium* (Ariza et al., 2012). Además, son productores de compuestos como la surfactina, fengicina, iturina A, B, y C, micosubtilinas, y bacilomicinas, biosurfactantes activos de membrana con potentes actividades antimicrobianas. La surfactina exhibe funciones antimicrobianas, anti-tumorales y anti-virales e inhibe la formación de biopelículas de otras bacterias (Ariza et al., 2012).

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto antagonista de *Bacillus subtilis* frente a cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* aislados de las cutículas de hormigas presentes dentro de colmenas de *Apis mellifera* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La localidad de Río Blanco pertenece a la región de los valles templados de la provincia de Jujuy. El clima es subtropical serrano; templado, con estación seca. El verano es moderadamente cálido y el invierno fresco. Las precipitaciones están concentradas en el verano (Buitrago, 1999). Esta región ocupa las zonas llanas y cerros bajos del sudeste de la provincia, formando amplios ecotonos o zonas de transición con las selvas de las yungas. La vegetación natural comprende un bosque transicional yungas-chaco (Cabrera, 1982).

Aislamiento de microorganismos

Se recolectaron hormigas del interior de cuatro colmenas (techos, entretapas, alzas, cámara de cría y piso) pertenecientes a la Cooperativa de Productores

Apícolas de Jujuy Ltda. El material fue transportado en frascos estériles para la identificación y posterior aislamiento de microorganismos. Se suspendieron los ejemplares de hormigas en una solución de peptona al 10%, la que fue agitada en vortex por algunos minutos antes de sembrar alícuotas sobre agar nutritivo y agar extracto de malta, los que fueron incubados a 30°C por 48 horas y a 27°C durante 7 días, respectivamente.

Bacillus subtilis se identificó a partir de diferentes pruebas bioquímicas realizadas y determinadas con el Manual Bergeys de Determinación bacteriológica, 9° Edición (Williams & Wilkins, 1994) y claves para la identificación de cepas de *Bacillus* (Slepecky & Heemphill, 2006).

Las colonias de *Aspergillus* y *Penicillium* fueron identificadas con el apoyo de claves específicas (Carrillo 2003, Pitt y Hocking 2009).

Evaluación de la actividad inhibitoria

Se colocó 1 mL de una suspensión de 106 esporas fúngicas en 9 mL de agua destilada y se cultivaron sobre agar extracto de malta, enfrentándolos con un cultivo de *Bacillus subtilis* de la colección de la cátedra de Microbiología Agrícola, FCA, UNJu. El ensayo se realizó por triplicado. Las placas sembradas se incubaron a 28°C y posteriormente se compararon con los cultivos testigo. La actividad antagónica se determinó midiendo el diámetro de las colonias fúngicas en presencia de la cepa bacteriana a los 5, 10 y 15 días. Como control negativo se utilizó el cultivo de las cepas fúngicas puras. Con las mediciones obtenidas, se procedió al cálculo del porcentaje de inhibición, mediante la siguiente ecuación: $I = [(C-T) / C] * 100$

siendo: I la inhibición %, C el diámetro de las colonias testigo y T el de las colonias tratadas (Zamora Natera y otros, 2005).

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de comparación de media utilizando el test de Tukey para las variables en estudio utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2015).

RESULTADOS

Los ejemplares de las hormigas fueron identificados como *Campionotus mus* y *Linepithema humile*, de las cuales se obtuvieron colonias pertenecientes a *Bacillus subtilis*, *Penicillium* serie *chrysogenum* y *Aspergillus* sección *nigri*, de acuerdo a las características morfológicas y las pruebas fisiológicas.

Los porcentajes de inhibición obtenidos fueron menores al 50% en *Aspergillus* sección *nigri* y mayores al 70% en *Penicillium* serie *chrysogenum*, a partir de los 15 días de incubación se observaron mayores porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos empleados. De acuerdo al test de Tukey ambas pruebas presentaron diferencias significativas entre el testigo y el hongo enfrentado con la cepa de *Bacillus subtilis*.

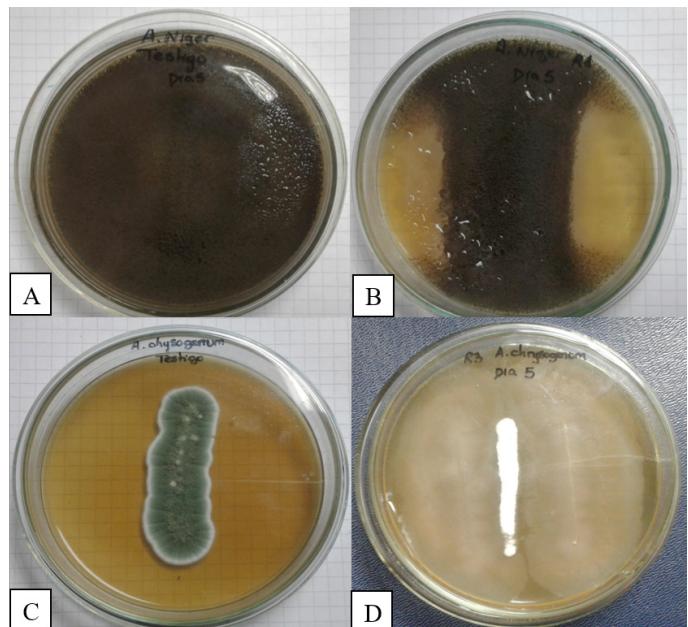


Figura 1.
 (A)Testigo *Aspergillus* sección *nigri*;
 (B) Inhibición de *Aspergillus* sección *nigri* frente a *Bacillus subtilis* a los 5 días de incubación;
 (C) Testigo *Penicillium* serie *chrysogenum*;
 (D) Inhibición de *Penicillium* serie *chrysogenum* frente a *Bacillus subtilis* a los 5 de incubación.

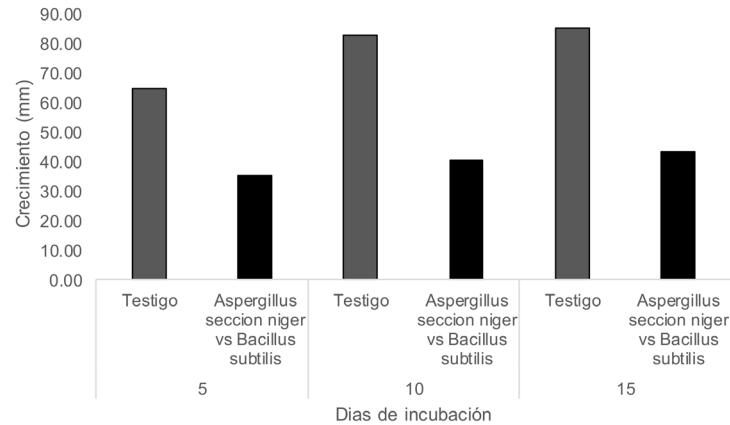


Figura 2. Inhibición del crecimiento (mm) de *Aspergillus* sección nigri frente a *Bacillus subtilis* a los 5, 10 y 15 días de incubación.

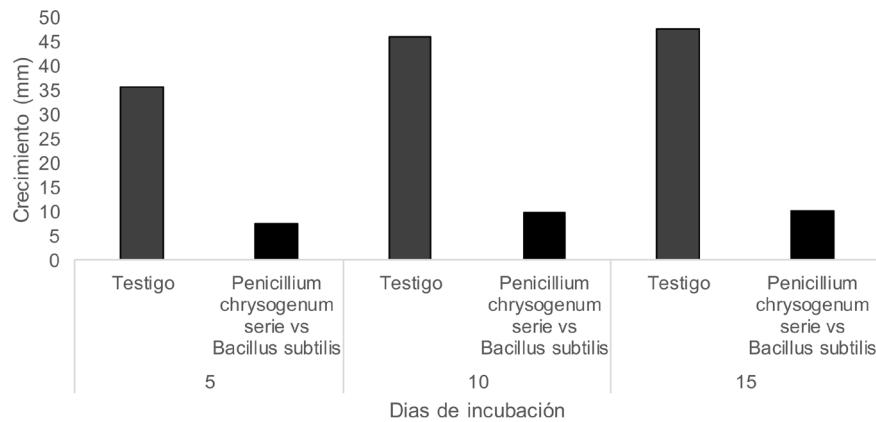


Figura 3. Inhibición del crecimiento (mm) de *Penicillium* serie chrysogenum frente a *Bacillus subtilis* a los 5, 10 y 15 días de incubación.

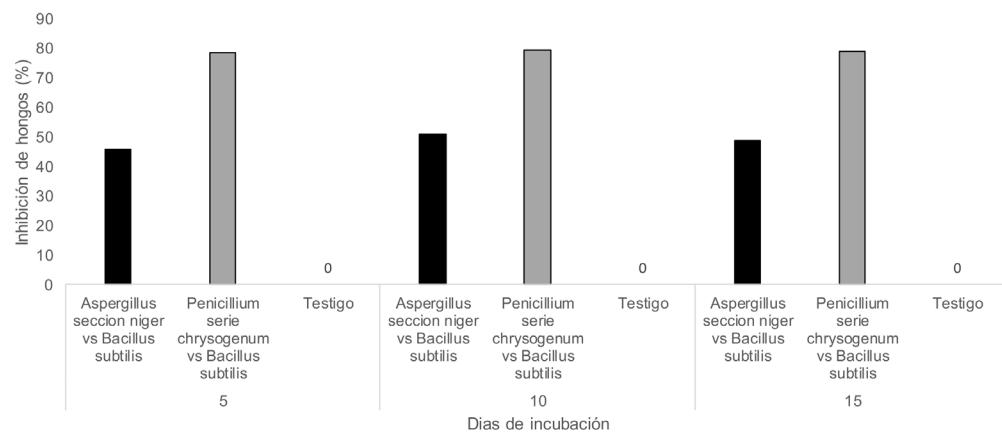


Figura 4. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *Aspergillus* sección nigri y *Penicillium* serie chrysogenum frente a *Bacillus subtilis* a los 5, 10 y 15 días de incubación.

DISCUSIÓN

La aspergilosis o “cría de piedra” es una enfermedad, que afecta a las abejas adultas y las crías, producida por varias especies del género *Aspergillus*, con mayor frecuencia *A. flavus*, *A. niger* y *A. fumigatus*. También es bastante común encontrar *Penicillium* en las colmenas (Lorenzo, 2010). *Bacillus subtilis* ejercen un efecto antagónico sobre estos hongos, lo que resulta de importancia en la prevención de enfermedades, pues presentan una alta velocidad de crecimiento que les permite alcanzar rápidamente el estado estacionario y comenzar a producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica de algunos patógenos (Sosa Pech et al., 2012; Tejera et al., 2012). Principalmente la respuesta de antagonismo de la bacteria está asociada con la síntesis de lipopéptidos como iturina, surfactina, fengicina y bacilomina (Ariza et al., 2012).

CONCLUSIÓN

Se determinó el efecto antagónico de *Bacillus subtilis* frente a cepas de *Aspergillus* y *Penicillium*, transportados por las hormigas invasoras. *B. subtilis* actúa como supresor efectivo de patógenos de importancia en la sanidad de las colmenas. Dicha acción puede ser aprovechada como forma de control biológico de hongos patógenos potencialmente perjudiciales para la actividad apícola. Por lo que se sugiere continuar el estudio de los metabolitos producidos por *Bacillus subtilis* para su aplicación en la actividad apícola.

BIBLIOGRAFÍA

Ariza, Y., Sánchez, L. 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Nova. vol.10(18), 149-155.

Benítez Ahrendts, M.R., Cabana, M.J., Cruz, M.S., Tejerina, M. y Verrastro E. 2015. Guía Teórico-Práctica Para Pequeños Productores Apícolas. ISBN 978-987-33-8418-9. Edición por autores pp. 24.

Bergey's Manual of systematic bacteriology. Ninth Edition. 1994. Williams and Wilkins, 787 pp.

Buitrago, L.G. 1999. El Clima de la Provincia de

Jujuy. Facultad de Ciencias Agrarias-UNJu. 2da Edición. ISBN: 950-721-114-4. pp. 23-28.

Cabrera, A. 1982. Vegetación de la Provincia de Jujuy. Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, tomo 36, pp. 21-26.

Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina, 118.

Dewey, M.C. 2000. Pests of Honey Bees. MAAREC (Mid Atlantic Apicultural Research & Extension Consortium), University of Delaware. pp. 2.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., Robledo, C.W. 2015. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Killani, A.S., Abaidoo, R.C., Akintokun, A.K., Abiala, M.A. 2011. Antagonistic effect of indigenous *Bacillus subtilis* on root-/soilborne fungal pathogens of cowpea. Researcher 3 (3): 11-18.

Lorenzo, J.D. 2010. Guía de Sanidad Apícola. Managua-Nicaragua. pp. 37.

Oi D, Pereira R. 1993. Ant behavior and microbial pathogens (Hymenoptera: Formicidae). Florida Entomologist. 76: 63-74.

Pitt, J., Hocking, A. 2009. Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>.

Ríos-Casanova, L. 2014. Biodiversidad de hormigas en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 85: 392-398. DOI: 10.7550/rmb.32519.

Rodas-Junco, B.A., Magaña-Sevilla HF, Tun-Suárez JM, Reyes-Ramírez A. 2009. Antifungal activity in vitro of native *Bacillus* sp. strains against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Research Journal of Biological Sciences. 4(9):985-989.

Ruiz, G.B., Benítez Ahrendts, M. 2018. Registro de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) presentes en apiarios de *Apis mellifera* de los valles templados de la provincia de Jujuy-Argentina. Journal of the

Selva Andina Research Society. 9 (2):113-119.

Slepecky, R.A., Hemphill, E. 2006. The genus *Bacillus*-non medical. Prokaryotes 4:530-562. DOI: 10.1007/0-387-30744-3_16.

Sosa Pech, M., Ruiz, E., Mejía, M., Reyes, A., Cristóbak, J., Valencia, A., Gutierrez, O. 2012. Actividad antagónica in vitro de aislados de la clase Bacilli de la península de Yucatán contra cuatro hongos fitopatógenos. Universidad y Ciencia 28(3):279-284.

Tejera, B., Heydrich, M., Rojas, M. 2012. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa L.*) Rev. Protección Vegetal 2: 117-122.

Vásquez-Bolaños, M. 2015. Taxonomía de Formicidae (Hymenoptera) para México. Métodos en Ecología y Sistemática. 10 (1): 1-53.

Zamora Natera, J.F., Bernal Alcocer, A., Ruiz López, M., Soto Hernández, M., Escalante Estrada, A., Vibrans Lindemann, H. 2005. Perfil de Alcaloides de Semillas de *Lupinus exaltatus Zucc.* (Fabaceae) y la Evaluación Antifúngica del Extracto Alcaloideo y Lupanina contra Fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología; 23(2), 124-129.

Zhang, D.J., Liu, R.F., Li, Y.G., Tao, L.M., Tai, L. 2010. Two new antifungal lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 58(12): 1630-1634.