

ANTAGONISMO *in vitro* DE *Bacillus* spp SOBRE HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.)

¹Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Grupo PROINBIO, Calceta, Ecuador.

Diana Carolina Cedeño Alcívar¹, Lenin Antonio Vera Macías¹, Wilson Paúl Cedeño Guzmán¹, Sergio Miguel Vélez Zambrano¹

Dirección de contacto: carolina71992@gmail.com

El objetivo de esta investigación fue controlar en condiciones *in vitro*, el crecimiento de hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao mediante la aplicación de *Bacillus* spp. Los aislados fúngicos se obtuvieron a partir de muestras de granos de cacao provenientes de cuatro centros de acopio de la parroquia Calceta del cantón Bolívar. Se aislaron, purificaron e identificaron morfológicamente mediante técnica de cámara húmeda y preparación de láminas con azul de lactofenol respectivamente. Las cepas de *Bacillus* spp se tomaron del cepario del laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL, se emplearon cepas de *B. subtilis* y una de *B. licheniformis* que se aplicaron en dosis de 100 y 200 μ L en cada variante. El experimento se condujo con un Diseño Completamente al Azar y cinco réplicas. Los ensayos de antagonismo *in vitro* se realizaron en cajas de Petri de 90 x 16 mm con medio PDA ajustado a un pH de 7 y autoclavado a 15 psi/15 min. Se identificaron cuatro cepas de hongos, siendo tres de *Aspergillus* y una de *Penicillium* spp. Las cepas que presentaron mayor porcentaje de inhibición fueron *B. subtilis* sobre el aislado de *Aspergillus* spp, y *B. licheniformis* sobre el aislado de *Penicillium* spp independientemente de la dosis de aplicación. Se concluye que las cepas de *B. subtilis* y *B. licheniformis* son microorganismos promisorios para el control de hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao.

PALABRAS CLAVE: OTA, poscosecha de cacao, aislamiento, enfrentamiento dual, microorganismos, inhibición.

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador existen 150.337 productores de cacao distribuidos en 56387 hectáreas (ha) (Mar, 2018). Los cantones Bolívar, Chone, Portoviejo, Junín y Tosagua pertenecientes a la provincia de Manabí contribuyen con 2115 ha de este cultivo. La corporación Fortaleza del Valle ubicada en Calceta, cantón Bolívar acopia actualmente alrededor de 600 t/año con aproximadamente 961 productores distribuidos en los cantones mencionados.

La producción que llega a los centros de acopio es sometida a varios procesos que consisten en la recepción del cacao en baba, fermentación, secado, preselección del grano seco y almacenamiento. La fermentación tiene una duración de 5-7 días (Hii, Law, Cloke y Suzannah, 2009). La primera etapa de la producción de chocolate consiste en una fermentación microbiana natural de la pulpa pectinácea que rodea los granos (Schwan y Wheals, 2004). Los microorganismos que intervienen en el proceso fermentativo se desarrollan en sucesión: primero levaduras, luego bacterias lácticas, seguidas por acéticas y, finalmente, por esporulados aeróbicos (Cascante, García y Marín, 1991).

Los hongos filamentosos crecen en la etapa final de la fermentación del cacao produciendo Ocratoxina A (OTA). Las OTA causan efectos nefrotóxicos, inmunosupresores, carcinogénicos y teratogénicos en el ser humano (Ravelo, Armendáriz, Gutiérrez, y Hardisson, 2011), específicamente el género *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius* son productores de OTA en el cacao (World Health Organization [WHO] y Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer [IARC], 1993).

Toaza (2012) encontró contaminación por Ocratoxina A con niveles de 10 µg/kg en muestras de cacao en las provincias de Esmeraldas, El Oro, Los Ríos y Guayas, evidenciando la presencia de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Epicoccum* y *Alternaria* como principales causantes de estas toxinas.

Los granos contaminados por estos microorganismos, inciden en el aspecto visible de las almendras presentando características físicas defectuosas asociadas a granos mohosos y sabores indeseables que llegan hasta el chocolate, una alternativa en el campo agroindustrial para la reducción e inhibición de estos agentes patógenos es el control con las bacterias del género *Bacillus* spp como antagonista. Con los antecedentes anteriormente citados se planteó el siguiente objetivo: Controlar en condiciones *in vitro*, el crecimiento de hongos filamentosos asociados a la fermentación del cacao mediante la aplicación de *Bacillus* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

Este estudio se realizó en cuatro centros de acopio de cacao de la parroquia de Calceta y en el laboratorio de Biología Molecular ubicado en la carrera de Medicina Veterinaria de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López [ESPAM MFL], ubicada en el sitio El Limón, parroquia Calceta, cantón Bolívar, provincia de Manabí.

Delineamiento experimental

Se empleó un Diseño Completamente al Azar [DCA] con arreglo factorial a*b, con 12 tratamientos y 5 réplicas.

Manejo del experimento

1. Obtención y aislamiento de los aislados fúngicos

Para la obtención de los aislados fúngicos se utilizaron recipientes plásticos previamente esterilizados para someter a las almendras de cacao a cámara húmeda, culminado este procedimiento se realizó el aislamiento el cual consistió en extraer una parte de estructuras fúngicas con una aguja estéril y se sembraron en medio PDA.

2. Identificación morfológica

La identificación morfológica se realizó revisando las características macro y microscópicas de los hongos crecidos en las cajas de Petri, como características macroscópicas se observaron forma, crecimiento, color, textura del anverso y reverso de las colonias y las características microscópicas observadas fueron vesículas, conidios y conidióforos.

3. Ensayos de antagonismo *in vitro*.

El enfrentamiento de antagonismo tuvo una duración de 72 horas a partir de la siembra, este consistió en inocular la cepa bacteriana en PDA y posteriormente se colocó un disco de aislado fúngico previamente reactivo.

Análisis estadístico

Los datos de la variable respuesta se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis y para el tratamiento de los datos se utilizó el software estadístico *Infostat* versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 20 aislados fúngicos de los cuatro centros de acopio de la parroquia Calceta del cantón Bolívar, los cuales presentaron estructuras fúngicas similares. El aislado fúngico CF1.1 (1) y CE1.1(1) presentaron características macro y microscópicas semejantes, incluyendo en el anverso coloración verde con borde blanco y textura algodonosa elevada, y en el reverso coloración blanco amarillento, microscópicamente presentaron conidióforo liso, vesícula globosa, sobre la vesícula formación de métulas, sobre las métulas formaciones de fiálides y abundantes conidios formados sobre las fiálides.

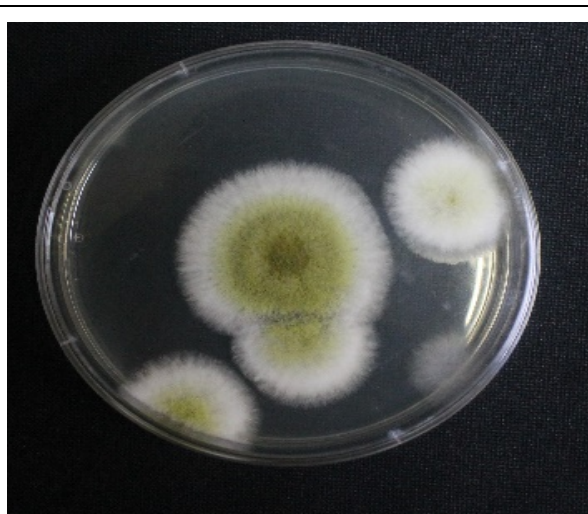


Foto 1. Anverso de los aislados fúngicos CF1.1(1) y CE1.1(1).

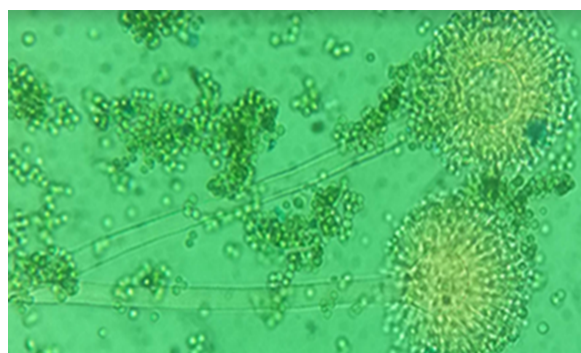


Foto 2. Características microscópicas de los aislados CF1.1(1) y CE1.1(1).

El aislado CE1.2(1) presentó en el anverso una colonia de color negro, con textura algodonosa y en el reverso una coloración blanco pálido, microscópicamente mostró un conidióforo liso y conidios globosos ligeramente rugosos con coloraciones marrones.

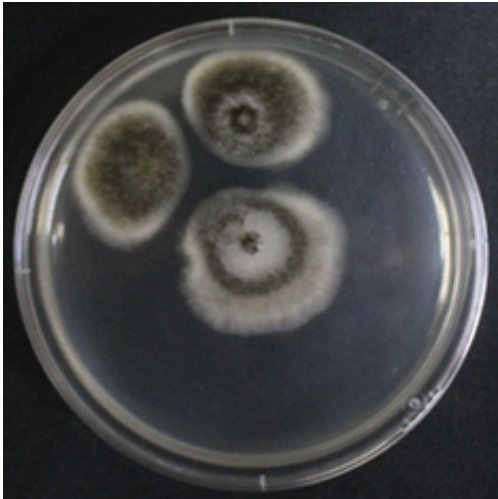


Foto 3. Anverso del aislado fúngico CE1.2(1).

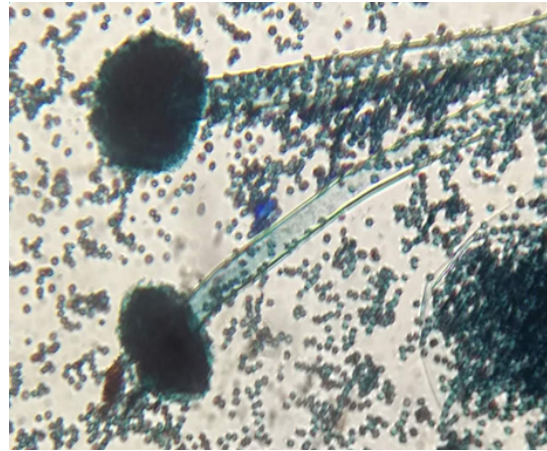


Foto 4. Características microscópicas del aislado CE1.2(1).

El aislado fúngico CH1.2(1) presentó una colonia de color gris verde olivo con bordes blancos y textura densa cremosa en el anverso y el reverso una coloración blanco pálido con centro amarillo, microscópicamente mostró un conidióforo liso con ramificaciones, métulas formadas sobre las ramificaciones del conidióforo, fiálides formadas sobre las métulas y microconidios simples formados en las métulas.



Foto 5. Anverso del aislado fúngico CH1.2(2).

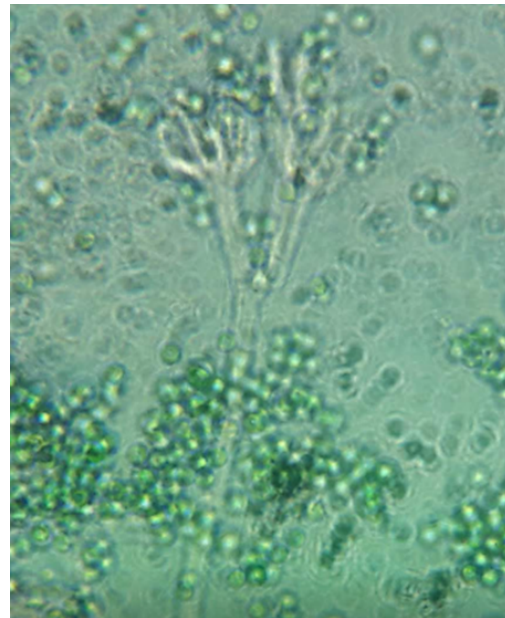


Foto 6. Características microscópicas del aislado CH1.2(2).

Los aislados fúngicos encontrados pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, debido a que presentaron características morfológicas iguales a lo establecido por Samson et al. (2014) y Seifert, Morgan, Gams y Kendrick (2011) quienes indican que *Aspergillus* spp producen conidios además de las típicas cabezas conidiales y *Penicillium* spp presentan cabezas biseriadas más grandes y mótulas ramificadas, dando una apariencia similar a un cepillo (un *penicilo*).

FV	Aislados fúngicos				
	Tratamientos	<i>Aspergillus</i> spp [CF1.1(1)]	<i>Aspergillus</i> spp [CE1.1(1)]	<i>Aspergillus</i> spp [CE1.2(1)]	<i>Penicillium</i> spp [CH1.2(2)]
T1		25,91 c	54,18	61,40	46,16 cd
T2		62,44 ab	51,82	39,25	56,88 cd
T3		67,39 ab	32,00	42,51	70,60 abcd
T4		49,13 bc	39,46	60,59	60,46 cd
T5		44,96 bc	50,91	73,62	65,43 bcd
T6		44,96 bc	51,27	69,22	42,38 d
T7		61,39 ab	54,55	66,78	71,39 abcd
T8		48,09 bc	50,54	58,31	76,16 abc
T9		74,43 a	59,09	66,29	61,66 abcd
T10		74,43 a	66,36	62,54	79,14 ab
T11		56,96 abc	58,55	69,22	72,39 abc
T12		69,22 ab	68,73	75,73	81,52 a
p-valor		0,0093	0,6928	0,3781	0,0239

Medias dentro de columnas con letras distintas, difieren significativamente de acuerdo con la prueba no paramétrica al 5% de probabilidades de error.

Los T8 y T9 tuvieron mayor porcentaje de inhibición sobre el aislado CF1.1(1) de *Aspergillus* spp y el T12 tuvo el 81,52% de inhibición sobre el aislado CH1.2(2) de *Penicillium* spp.

Los resultados encontrados son similares a los reportados por Palumbo, Baker y Mahoney (2006) quienes demostraron que *Bacillus* spp inhibieron entre un 22–73% el crecimiento de *Aspergillus flavus*, debido a la capacidad de las cepas bacterianas para producir enzimas hidrolíticas que ocasionaron actividades de degradación en la pared de la quitina de los hongos, según Sadfi et al. (2002) las enzimas que ocasionan este fenómeno son las quitinasas, así como también la β -1,3-glucanasa y las proteasas (Li et al., 2016).

Sukkasem et al., (2018) aseveran que *B. licheniformis* exhiben actividad antifúngica y presentan la producción de forlantibiótico y 2,3-butanediol, compuestos que degradan la membrana citoplasmática de los hongos.

Los tratamientos que no mostraron inhibición sobre los aislados CE1.1(1) y CE1.2(1) de *Aspergillus* spp es debido según Astorga et al. (2013) a que los hongos poseen una estructura celular rígida compuesta por polisacáridos y proteínas, entre los polisacáridos destacan la quitina, glucano y manano o galactomanano.

CONCLUSIONES

Las características morfológicas de los aislados fúngicos de los granos de cacao se asocian a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Las cepas bacterianas *B. subtilis* spp tienen efecto de inhibición del 74,43 y la cepa *B. licheniformis* 76,96%, sobre los aislados CF1.1(1) y CH1.2(2) de *Aspergillus* y *Penicillium* spp respectivamente. Los aislados fúngicos CE1.1(1) y CE1.2(1) de *Aspergillus* spp no fueron controlados por ninguna de las cepas bacterianas aplicadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Astorga, K., Zúñiga, C., & Rivera W. (2014). Aislamiento e identificación de patógenos de la estirpe silvestre del ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Tecnología en Marcha*, 27(1), 77-84. doi: 10.18845/tm.v27i1.1698.
- Cascante, M., García, V., & Marín, G. (1991). Identificación de hongos filamentosos y levaduras aislados durante la fermentación de almendras de cacao (*Theobroma cacao*) en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 15(1-2), 177-180. Recuperado de: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v15n1-2_177.pdf.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial biotechnology*, 8(2), 281-295. doi: 10.1111/1751-7915.12238.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., & Guo, J. H. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental microbiology*, 15(3), 848-864. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x.
- Chitarra, G., Breeuwer, P., Nout, R., Van Aelst, A., Van Aelst, F., & Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10–20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 159-166. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12534806>.
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., Gonzalez, L., Casanoves, F., Tablada, M. & Robledo, C. (1998). Estadística y Biometría y de Diseño de Experimentos de la Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC). *InfoStat software estadístico*. Recuperado el 10 de noviembre de 2018 de <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=34>.
- Gutiérrez, S. (2017). *Efecto simbiótico a base de Sacchromyces cerevisiae y Bacillus subtilis sobre parámetros zootécnicos en pollos COBB 500* (Tesis de pregrado). Recuperada de Repositorio.espam.edu.ec: <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/>.
- Hii, C. L., Law, C. L., Cloke, M., & Suzannah, S. (2009). Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosystems engineering*, 102(2), 153-161. doi: doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2008.10.007.
- Mar, R. (2018). Los productores reciben mejor precio por el cacao. *El Telégrafo*. Recuperado el 20 October 2018 de: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/productores-precio-cacao-ecuador>.

- Palumbo, J. D., Baker, J. L., & Mahoney, N. E. (2006). Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microbial ecology*, 52(1), 45-52.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78-82.
- Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A., & Hardisson De la Torre, A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1215-1226. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000600004.
- Sadfi, N., Cherif, M., Hajlaoui, M. R., Boudabbous, A., & Belanger, R. (2002). Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Annals of microbiology*, 52(3), 323-338. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/237788248_Isolation_and_partial_purification_of_antifungal_metabolites_produced_by_Bacillus_cereus.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., ... & Varga, J. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173.
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 205-221. doi: 10.1080/10408690490464104.
- Seifert, K., Morgan, G., Gams, W. & Kendrick, B. (2011). The genera of hyphomycetes. CBS Biodiversity Series 10.
- Sukkasem, P., Kurniawan, A., Kao, T. C., & Chuang, H. W. (2018). A multifaceted rhizobacterium *Bacillus licheniformis* functions as a fungal antagonist and a promoter of plant growth and abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 155, 541-551. doi: doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.005.
- The University of Adelaide. (2019). *Aspergillus*. Mycology Online. Recuperado 4 mayo 2019, de <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptihttps://search.adelaide.edu.au/s/search.html?collection=uoa-search&q=PENICILLIUM>
- World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer. (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 56. doi: doi.org/10.1002/food.1994038033.