

Comunicación química entre comunidades microbianas

María Guadalupe Basurto Cadena*, María Guadalupe Loa Palacios*,
Manuel Vázquez Arista*, Mercedes G. López Pérez**

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) la presencia de compuestos volátiles y su posible relación con el control biológico de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*. La comunicación microbiana por medio de estos químicos volátiles es común, se reconoce como Quorum Sensing y permite que los microorganismos lleven a cabo diferentes reacciones entre ellos. Bajo las condiciones del presente trabajo se determinó que *B. subtilis* es capaz de producir compuestos volátiles similares a *R. solani* y *F. verticillioides*, además de liberar trimetilamina como posible autoinductor para que se inicie la producción de compuestos difusibles en el medio para realizar el control biológico.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the presence of volatile compounds by GC-MS and its possible relationship with *B. subtilis* biological control on *R. solani* and *F. verticillioides*. Communication among microorganisms is common; it is called Quorum Sensing, and determines their subsequent behavior. Under the experimental conditions *B. subtilis* was able to produce the same volatile compounds than *R. solani* and *F. verticillioides* as well as trimethylamine, which could be the trigger for the production of diffusible compounds by the bacterium to perform the biological control.

Recibido: 30 de mayo de 2011
Aceptado: 8 de agosto de 2011

INTRODUCCIÓN

La capacidad de algunas bacterias para comunicarse con otras que se encuentran en su entorno se lleva a cabo por un proceso análogo a la comunicación celular hormonal de pluricelulares eucariontes conocida con el nombre de Quorum Sensing, en donde las células son capaces de detectarse unas a otras y desencadenar acciones concertadas. Las moléculas señal, análogas a hormonas, reciben el nombre de autoinductoras (Felderle and Bassler, 2003).

Las células bacterianas sintetizan enzimas autoinductor sintetizadas que producen y liberan moléculas autoinductoras al medio donde se difunden y se acumulan. El Quorum Sensing permite a una población bacteriana controlar su densidad celular en fase de crecimiento por quimiotaxis, detectando la concentración de estas moléculas autoinductoras. De hecho, la concentración de dichas moléculas en el medio aumenta conforme lo hace la población que las libera. Cuando la concentración de las moléculas autoinductoras alcanza un determinado umbral o *quorum*, las bacterias pueden estar seguras que forman un grupo numeroso y cambian repentinamente su comportamiento asocial por uno visiblemente comunitario. La naturaleza de las moléculas autoinductoras conocidas varía en función de los grupos bacterianos (Pappas *et al.*, 2004).

Por otro lado, los compuestos volátiles orgánicos son químicos de bajo peso molecular, alta presión de vapor y baja solubilidad en agua, características que los hacen ser volátiles; mientras que, los compuestos orgánicos volátiles producidos por microorganismos son alcoholes, aldehídos, cetonas, aminas, terpenos, hidrocarburos aromáticos y clorados, y compuestos azufrados de bajo peso molecular, los cuales son producidos durante su metabolismo primario y secundario (Elgaali *et al.*, 2002)

Palabras clave:

Compuestos volátiles; trimetilamina; GC-MS; *B. subtilis*; control biológico.

Keywords:

Volatile compounds; trimethylamine; GC-MS; *B. subtilis*; biological control.

*Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Irapuato, Gto., México, C.P. 36500, Tel y Fax: (462)6242484 y (462)6245215, Correo electrónico: cadenag51@hotmail.com

**Departamento de Biotecnología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav)-Unidad Irapuato. Km 9.6 Libramiento Norte Irapuato-León, Irapuato, Gto. México, C. P. 36500, Tel. (462)6239600, Fax (462)6245846.

Finalmente, algunos de los avances científicos y tecnológicos que se emplean en la actualidad para controlar plagas en la agricultura son: la mejora genética de semillas, la mecanización agrícola y el control biológico aplicado a cultivos comerciales. Hongos como *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp., son ejemplos claros de hongos fitopatógenos que poseen un amplio rango hospedero, incluyendo algunos cultivos de importancia, como papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), trigo (*Triticum sativum*), maíz (*Zea Mays*) y lenteja (*Lens culinaris*) entre otros (Basurto-Cadena, 2006).

En Irapuato, Gto., México, se aisló de la rizósfera, de plantas sanas, del cultivo de fresa una cepa bacteriana de *Bacillus subtilis* 21 (bacteria Gram +) y de plantas enfermas, del mismo cultivo, dos hongos fitopatógenos, *R. solani* y *F. verticillioides*. Esta bacteria, *in vitro* y en invernadero, comprobó ser eficiente para el control biológico contra estos hongos fitopatógenos (Basurto-Cadena, 2006).

En otro estudio, *B. subtilis* 21 demostró, *in vitro*, la presencia de una sustancia difusible por parte de la bacteria, la cual inhibió el crecimiento de estos hongos patógenos y por microscopía electrónica de barrido se puso de manifiesto el tipo de alteraciones morfológicas que sufrieron estos hongos (Basurto-Cadena *et al.*, 2010).

Dubey and Ben-Yehuda (2011), demostraron que la bacteria *Bacillus subtilis* pueden formar nanotubos para la comunicación intercelular. A través de dichos nanotubos se pueden transportar moléculas tan grandes como proteínas o ácidos nucleicos. Dichos nanotubos pueden ser realizados con otras especies bacterianas, tanto Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, o Gram negativas como *Escherichia coli*.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de compuestos volátiles producidos por *B. subtilis* 21, *R. solani* y *F. verticillioides* en papa dextrosa agar (PDA) y con esto tratar de explicar su papel en el control biológico de estos hongos fitopatógenos por la cepa bacteriana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Cepa de *Bacillus subtilis* 21. Aislada de la rizósfera de fresas sanas de diferentes campos de cultivo, pertenece al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Alimentos de la División de Ciencias de la

Vida, Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato y se mantuvo en PDA a 28 °C.

Cepas de *Fusarium verticillioides* y *Rhizoctonia solani*. Aisladas de la rizósfera de fresas marchitas de los mismos campos de cultivo donde se aisló la cepa bacteriana No. 21, pertenecen al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Alimentos de la División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato y se mantuvieron en PDA a 28 °C.

Metodología

Preparación de las cámaras de liberación de compuestos volátiles

Antes de determinar los compuestos volátiles, las cámaras para la acumulación de estos químicos, tanto del material biológico y no biológico se prepararon como sigue:

- B. subtilis* 21, se sembró en cajas Petri de vidrio en PDA a 28 ± 2 °C por 24 horas, se sustituyó la tapa original por otra base sellando posteriormente con papel parafilm.
- F. verticillioides*, se sembró en cajas Petri de vidrio en PDA a 28 ± 2 °C por 72 horas para alcanzar un crecimiento radial de ≈ 3 cm y nuevamente se sustituyó la tapa por otra base y se selló con papel parafilm. El mismo procedimiento se siguió con *R. solani*, dejando incubar por 120 horas para alcanzar el mismo crecimiento radial.
- Bases de cajas Petri de vidrio con PDA, las que se sellaron con papel parafilm.
- Bases de cajas Petri de vidrio sin medio de cultivo y selladas con papel parafilm.

Determinación de compuestos volátiles

Se determinó la presencia de compuestos volátiles por medio de inyección directa al equipo de CG-MS utilizando una fibra de color gris compuesta por una mezcla de tres adsorbentes, Divinilbenceno (DVB), Carboxeno y Polidimetilsiloxano (PDMS), de carácter no polar. Dicha fibra se colocó en un cartucho para Microextracción en Fase Sólida (SPME) 57330-U, de uso manual y cuya punta se introdujo en las cámaras preparadas para la liberación de los compuestos volátiles. Ahí las muestras se dejaron en reposo a una temperatura de 30 °C por 4 horas, durante este tiempo las moléculas volátiles en el espacio de cabeza de las cámaras fueron adsorbidas por la fibra (1 h de adsorción). Después se

extrajo el cartucho de la cámara y se colocó en el puerto de inyección del cromatógrafo que se operó en un intervalo de 230 °C a 270 °C (30 seg de desorción). Los compuestos volátiles se determinaron analizando los tiempos de retención que presentaban dichos compuestos. Todos los resultados se llevaron a cabo con un umbral de detección de 11 (Th=11).

RESULTADOS

Material no biológico

La tabla 1 muestra los compuestos volátiles detectados en las cámaras formadas por las cajas Petri sin y con PDA.

Tabla 1.

Compuestos volátiles en el material no biológico

Compuesto	Tiempo de Retención (seg)	Caja sin PDA	Caja con PDA
1,2 butanona 3 hidroxil	5.075	-	+
1 propanol 2,2 dimetil	10.088	-	+
Butilhidroxil tolueno	22.614-22.620	+	+

Notación: + = presencia de compuesto volátil; - = ausencia de compuesto volátil

Material biológico

En la tabla 2 aparecen los compuestos volátiles detectados en las cámaras formadas por la presencia de *F. verticillioides*, *R. solani* y *B. subtilis* 21 en PDA.

Tabla 2.

Compuestos volátiles en el material biológico

Compuesto	Tiempo de retención (seg)	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Bacillus subtilis</i> 21
1, 2 butanona 3 hidroxil	5.080-5.084	+	+	+
1 butanol 2 metil	10.076-10.079	+	-	+
1 propanol 2, 2 dimetil	10.091	-	+	-
2 penteno 2, 4 dimetil	10.299-10.322	-	+	+
Butilhidroxil tolueno	22.614-22.637	+	+	+
Trimetilamina	7.511	-	-	+

Notación: + = presencia de compuesto volátil; - = ausencia de compuesto volátil

DISCUSIÓN

Bajo las condiciones del presente trabajo, el butilhidroxil tolueno (BHT) se presentó en todas las cámaras de liberación de compuestos volátiles por lo que se infiere que este químico volátil es liberado por el papel parafilm usado para sellar la unión entre las bases de las cajas Petri de vidrio (tabla 1 y tabla 2).

Los compuestos volátiles liberados por el medio de cultivo PDA, además del BHT, fueron la 1, 2 butanona 3 hidroxil y el 1 propanol 2, 2 dimetil (tabla 1).

En cuanto al material biológico, para *R. solani*, además de los químicos volátiles mencionados en el material no biológico (1, 2 butanona 3 hidroxil; 1 propanol 2, 2 dimetil; y BHT), apareció el 2 penteno 2, 4 dimetil, el cual puede ser producto metabólico de este hongo fitopatígeno (tabla 2).

Para *F. verticillioides*, se detectaron los compuestos volátiles 1, 2 butanona 3 hidroxil; BHT; y el 1 butanol 2 metil, este último puede ser también producto metabólico del hongo fitopatígeno (tabla 2).

Finalmente, en la cámara con *B. subtilis* 21 se encontró BHT del papel parafilm; el 1, 2 butanona 3 hidroxil del PDA; el 2 penteno 2, 4 dimetil detectado con *R. solani* y el 1 butanol 2 metil con *F. verticillioides*, pero además apareció la trimetilamina, el cual apareció después de la 1, 2 butanona 3 hidroxil supuestamente del PDA y antes de los volátiles producto del metabolismo de los hongos fitopatígenos (tabla 2).

CONCLUSIONES

De acuerdo a lo anterior, *R. solani* y *F. verticillioides*, al metabolizar el mismo medio de cultivo (PDA), liberan como metabolitos secundarios diferentes compuestos volátiles (2 penteno 2, 4 dimetil y 1 butanol 2 metil respectivamente), mientras que *B. subtilis*, que inhibe *in vitro* y en invernadero el crecimiento de estos hongos (Basurto-Cadena, 2006), libera los mismos químicos volátiles que los hongos fitopatígenos más la trimetilamina. Esto hace suponer que *B. subtilis* puede coexistir con *R. solani* y *F. verticillioides* en un mismo hábitat (por ejemplo, la rizósfera), a través de los nanotubos encontrados por Dubey y Ben-Yehuda (2011). Sin embargo, cuando la concentración de *B. subtilis* en el medio se incrementa, la trimetilamina, que es un compuesto que presenta un olor fuertemente desagradable: olor

a pescado cuando se encuentra en concentraciones bajas y olor amoniacal a concentraciones altas (López-Grimau y Gutiérrez, 2005), también se incrementa, pudiendo ser el inicio del control biológico de estos hongos fitopatógenos y/o pudiera ser que, la trimetilamina, sea utilizada como autoinductor por *B. subtilis* para que se dispare la producción de otros compuestos químicos no volátiles, sino difusibles, en el medio (Basurto-Cadena *et al.*, 2010) y así, esta bacteria pudiera llevar a cabo el control biológico de *R. solani* y *F. verticillioides* a través de compuestos volátiles y no volátiles. Por otro lado, es posible que *B. subtilis* tenga la capacidad de producir compuestos volátiles que comparta con otros hongos fitopatógenos diferentes a *R. solani* y *F. verticillioides* para interactuar a través de los ya mencionados nanotubos y que, una vez más, sea la trimetilamina el iniciador y/o el autoinductor para producir otros compuestos con los que pueda inhibir su crecimiento. Sin embargo, la trimetilamina es solo un candidato de compuestos volátiles que pudieran estar relacionados con la inhibición de hongos fitopatógenos, por lo que es necesario continuar con este tipo de trabajos para determinar que otros compuestos volátiles pudieran estar involucrados en el proceso del control biológico.

REFERENCIAS

- Basurto-Cadena M. G. L. (2006). *Control biológico de hongos fitopatógenos en fresa con bacterias antagonistas en México*. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Basurto-Cadena M. G. L., Font San Ambrosio M. I., García-Jiménez J., Vázquez-Arista M. (2010). Cambios en la Estructura Celular durante la Actividad Antagónica de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*. *Revista Acta Microscópica*, 19(2):138-144.
- Dubey G. P. and Ben-Yehuda S. (2011). Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 144 (4), 590-600.
- Elgaali H., Hamilton-Kemp T. R., Newman M. C., Collins R. W., Yu K. and Archibold D.D. (2002). Comparison of long-chain alcohols and other volatile compounds emitted from food-borne and related Gram positive and Gram negative bacteria. *J. Basic Microbiol.*42(6):373-80.
- Federle, M. J. and B. L. Bassler.(2003). Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Investig.*112:1291-1299.
- López-Grimau V. y Gutiérrez M. C.(2005). Detección por GC-MS de trimetilamina como causa del mal olor. *Boletín Intexter* (U.P.C.), n°. 128, 39-44.
- Pappas, K. M., C. L. Weingart, and S. C. Winans.(2004). Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signalling. *Mol. Microbiol.* 53:755-769.