

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LEVADURAS KILLER FRENTE A HONGOS DEL GÉNERO *Aspergillus* SECCIÓN *nigri*

I.J. Gutiérrez-Martínez ^a, L.M. Nieto-Ojeda ^a, M.P. Sangorrín ^b, M. Elizondo-Zertuche ^c, R. Treviño-Rangel ^c, G.M. González ^c, E.R. Robledo-Leal^a.

^a Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Nuevo León. ^b Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras, Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas, Universidad Nacional del Comahue, Facultad de Ingeniería, Neuquén, Argentina. ^c Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. *isischepino@gmail.com

RESUMEN:

Una batería de 50 cepas de levaduras obtenidas de diversas fuentes naturales fue evaluada para detectar su fenotipo killer, probando cada cepa contra las 49 restantes. Se encontraron 25 cepas killer, que fueron probadas de forma cualitativa contra 10 cepas de *Aspergillus* sección *nigri*, depositando alícuotas de 15µl de 10⁵ células/mL en agar PDA previamente embebido con una concentración de 10⁵ conidias/mL. Las placas se incubaron por 5 días a 25°C. Las cepas de levadura que inhibieron a 5 o más cepas de *Aspergillus*, fueron seleccionadas para establecer el porcentaje de reducción de crecimiento radial de dichos mohos. Para esto, se inocularon placas de PDA con las cepas de *Aspergillus* en el centro, flanqueadas por 2 estrías lineales paralelas de cada levadura. Después de incubar se midieron los diámetros coloniales en 2 ejes, incluyendo al control, para calcular la reducción de crecimiento en términos de porcentaje. El promedio de reducción varió entre 28 a 44%, siendo la levadura 1025 la más efectiva. La cepa M4 fue la que resultó con una menor inhibición, mientras que la cepa 117 fue la más susceptible. Esto demuestra el potencial de las levaduras killer en el biocontrol de alimentos en poscosecha.

ABSTRACT:

A battery of 50 yeast isolates obtained from diverse natural sources was evaluated in order to detect the killer activity, testing each isolate against the other 49. 25 killer yeast were detected, which were assayed qualitatively against 10 isolates of *Aspergillus* section *nigri*, by placing 15µl drops of a 10⁵ cels/mL yeast suspension onto PDA plates containing a concentration of 10⁵ conidia/mL. Plates were incubated at 25°C for 5 days. Killer yeasts that inhibited 5 or more mold isolates were selected to establish the percentage of radial growth in the *Aspergilli*. Accordingly, PDA plates were inoculated with the molds at the center, flanked by 2 smears of each yeast. After incubation, colonial diameters were measured in two axis, including the control, to calculate the radial growth reduction in terms of percentage. The mean reduction resulted in a range of 28 to 44% with yeast 1025 being the most effective. Isolates M4 and 117 were the most resistant and susceptible isolates respectively. This shows the potential of killer yeast as biological control agents during postharvest.

Palabras clave: *Aspergillus*, Biocontrol, Levaduras killer

Keywords: *Aspergillus*, Biological control, killer yeast.

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* son agentes fitopatógenos importantes, que atacan a distintos cultivos como lo son el mango, maíz y cebolla, entre otros, que son productos de gran importancia en nuestro país. La SAGARPA

reporto en el año 2013 que México fue el mayor exportador de mango a nivel mundial, mientras que en el año 2014 el SIAP reporto que en México se produjeron más de 37 millones de toneladas de maíz y en el mismo año se produjeron 1,400 toneladas de cebolla en México.

En distintos trabajos se menciona que cepas de levaduras aisladas de distintos ambientes presentan actividad antagónica contra hongos de la sección *nigri* del género *Aspergillus* como *Bleve, et al.*, (2006) que encontraron levaduras de los géneros *Metschnikowia*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces* y *Candida* que presentaron actividad antagónica contra *A. niger*. La importancia de encontrar alternativas para el biocontrol de hongos del género *Aspergillus* repercute en una gran variedad de industrias, por ejemplo *Cubaiu, et al.*, (2012), realizaron un estudio seleccionaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para inhibir el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus ochraceus* durante el proceso de almacenamiento de uva y la producción de vino obteniendo como resultados que las cepas seleccionadas inhibían el crecimiento de *A. carbonarius* y *A. ochraceus*. Existen tratamientos que usan dos alternativas para obtener un beneficio mayor como en el trabajo realizado por *Tripathi et al.* (2013), donde usaron quitosano a distintas concentraciones que fue añadido a una suspensión de células de *Debaryomyces hansenii* de 10^6 UFC/mL y observaron que esta combinación aumentaba significativamente la eficacia de *D. hansenii* en el control de daños causados por *A. niger* en mango.

Como se mencionó anteriormente los hongos del género *Aspergillus* son causantes de una gran variedad de daños en distintas industrias alimentarias por lo que encontrar una alternativa para su biocontrol tiene una gran relevancia. El uso de microorganismos como levaduras para el biocontrol de estos hongos es una gran alternativa ya que su producción es relativamente simple y hay mucho que aún no se ha probado por lo que el campo de investigación es muy amplio. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antagónica de levaduras killer sobre cepas de *Aspergillus* sección *nigri* y así poder emplearlas para el biocontrol en distintas industrias y en el campo ya sea en la etapa de precosecha, cosecha o poscosecha.

Al inicio del trabajo se probaron 50 cepas de las cuales solo 25 se usaron para la etapa de ensayos cualitativos contra los hongos filamentosos, ya que fueron las que presentaron actividad killer. En la segunda etapa se probaron las 25 cepas de levaduras contra 10 de hongos filamentosos, de esta etapa solo quedaron 12 cepas para probar en la etapa siguiente que fueron las que presentaron antagonismo contra 5 o más cepas de hongos. Finalmente se probaron las 12 cepas contra las 10 cepas de hongos para evaluar su actividad antagónica reflejada en el porcentaje de reducción radial de la colonia obteniendo que 5 cepas de levaduras inhibieron en promedio más de 35% el crecimiento de los hongos, siendo la 1025 la más efectiva con un promedio de 43%. La cepa M4 de hongo fue la menos susceptible ya que solo fue inhibida en un 27%.

Por los resultados obtenidos podemos decir que las levaduras son una alternativa con un gran potencial antagónico contra hongos de la sección *nigri* del género

Aspergillus pero se ocupan más trabajos para encontrar cepas con un mayor potencial antagónico.

Materiales y métodos

Se realizaron ensayos para determinar la presencia de fenotipo killer en 50 levaduras pertenecientes al cepario del laboratorio. Se usó agar YPD-MB acidificado para estos ensayos, el cual fue inoculado con una cepa de levadura a una concentración de 10^6 células/mL que serviría de césped y que actuaría como susceptible. Se dividieron las 49 cepas restantes en 5 placas con este agar inoculado y se sembraron por estría simple, estas cepas fueron probadas para observar la presencia de fenotipo killer. Cada una de las 50 cepas se probó como susceptible contra las otras 49 cepas restantes. Las placas se incubaron a 25°C por 48 horas. La presencia de fenotipo killer se evidencia por la presencia un halo de inhibición rodeado por un precipitado de color azul.

Para la segunda etapa solo se usaron las 25 cepas de levaduras que presentaron fenotipo killer. Se usaron 10 cepas de hongos pertenecientes a la sección *nigri* del género *Aspergillus* obtenidas del cepario del laboratorio. Para esta etapa se usó medio PDA acidificado. Las placas de PDA se inocularon con una suspensión de conidias para tener un césped uniforme y que al final quedarán con una concentración de 10^5 conidias/mL. Las 25 cepas de levaduras se repartieron en 4 placas con césped se usaron en alícuotas a más de 10^5 células/mL y se colocaron 15 µl de estas alícuotas en las placas inoculadas con conidias. Las placas se incubaron por 5 días a 25°C. Se tomaron como positivas las cepas que presentaron un halo de inhibición alrededor del lugar donde se colocó el inóculo de la levadura. Pero solo se usaron en la siguiente etapa las cepas que inhibieron 5 o más cepas de hongos

En la última etapa solo se usaron 12 levaduras, las cuales se seleccionaron por presentar un efecto inhibitorio contra 5 o más cepas de hongos usadas en este trabajo. Se utilizaron nuevamente placas con medio PDA acidificado las cuales se sembraron en el centro con un hongo por placa, las levaduras fueron sembradas en estría simple dos veces en forma paralela separadas por 2.5cm del lugar donde se sembró el hongo. Los controles utilizados fueron placas que solo se sembraron con el hongo al centro, todas placas se incubaron a 25°C por 5 días y después de este tiempo se midió el tamaño de la colonia en milímetros al largo y ancho. Para los resultados se sumaron ambas mediciones y se promediaron todas las repeticiones. El porcentaje de reducción se obtuvo con la relación entre el crecimiento de la placa control, el cual se tomó como 100%, y el crecimiento de cada placa donde se sembraron las placas obteniendo así el porcentaje de reducción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el primer ensayo se probaron 50 cepas de levaduras las cuales fueron probadas para evaluar si presentaban o no el fenotipo killer, las cepas se tomaron como positivas si presentaban un halo de inhibición, los halos variaban de tamaño y en algunos se podía observar con claridad el precipitado azul al borde del mismo, mientras que en otros el precipitado azul no era muy evidente o no se observó. De

estas 50 cepas 25 resultaron positivas por lo que se usaron en las pruebas cuantitativas contra las 10 cepas de hongos filamentosos, esto se hizo para probar cuales cepas presentaban una actividad antagónica. Para este caso se tomaron como positivas aquellas levaduras que presentaran un halo de inhibición, independientemente del tamaño de este. En algunos casos se observó que el conjunto de varias cepas de levaduras o algunas solas provocaban una disminución de la conidiación y de la pigmentación oscura de los hongos, se tomó nota de esto ya que la disminución de ambas características es algo favorable para el biocontrol de este grupo de hongos. Para la siguiente etapa de ensayos se tomaron las cepas de levaduras que habían inhibido a 5 o más cepas de hongos, esto para tener cepas con un espectro de acción más amplio. En la última etapa solo se evaluaron 12 cepas de levaduras contra las 10 cepas de hongos, se midió el ancho y largo de las colonias de los hongos de las placas control las cuales se tomaron como el 100% en cuanto al crecimiento y son con las que se comparó las placas donde se sembraron las levaduras y el hongo. Una vez teniendo las mediciones se sacó el porcentaje de reducción del crecimiento radial para cada placa comparada con su control y se promedió con las repeticiones de cada placa. En la tabla I se pueden observar los resultados de la última etapa de ensayos.

Tabla I. Porcentaje de reducción de crecimiento radial, efecto inhibitorio de las cepas de levadura contra los hongos filamentosos											
Cepas de levaduras	Cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>nigri</i>										Promedio de reducción
	A-21	48	49	117	129	M1	M2	M3	M4	M5	
RT3	30.2	44.5	59.7	29.5	32.6	50.2	24.8	27.6	14.6	44.8	35.85
M4	29.8	43.6	50.2	40.8	30.4	24.9	27.9	29.8	21.8	27.3	32.65
FCBB6	31.1	27.1	30.0	32.0	19.9	34.8	24.2	27.6	21.1	33.1	28.10
FCB5	44.6	36.9	37.7	71.2	21.4	43.4	35.6	37.7	20.7	31.3	38.05
FCB9	32.9	30.8	33.9	54.5	28.6	24.3	30.1	25.2	34.4	42.6	33.73
FCB10	42.2	24.4	32.9	46.1	31.2	27.4	23.6	26.4	35.0	27.3	31.64
FCB10AM	27.0	32.6	27.8	28.3	39.5	41.0	29.2	24.6	28.6	28.7	30.73
1250	33.7	43.8	37.5	31.2	47.3	51.0	35.8	35.6	38.2	34.2	38.81
1127	35.8	51.7	42.5	30.1	37.5	33.7	54.9	39.8	28.6	32.7	38.72
1025	48.8	49.7	57.5	47.5	43.9	36.1	44.8	36.6	30.4	43.0	43.82
1027	39.6	39.2	29.0	38.8	36.1	28.8	28.8	27.1	28.9	22.1	31.85
1153	33.7	35.1	30.5	30.4	26.7	23.6	31.9	26.8	26.4	16.5	28.17

De estas últimas pruebas se obtuvo que el rango de reducción promedio del crecimiento vario de entre 28% a 44%. La cepa de levadura 1025 presentó 43.8% de reducción en el crecimiento de la colonia siendo la que presento el efecto antagónico mayor, mientras que las cepas RT3, FCB5, 1127 y 1250 redujeron el crecimiento entre un 35% y 40%, mientras que las cepas FCBB6 y 1153 fueron las que tuvieron una menor actividad. La reducción del crecimiento de forma individual muestra resultados más variados ya que en algunos casos se observó una reducción mayor al 70% y en algunos fue menor al 15%, esto puede deberse a que las cepas presentan diferentes tipos de acción o bien producen distintas sustancias que

provocan la inhibición del crecimiento, esto por parte de las levaduras, por el lado de las cepas de hongos puede deberse a factores como la resistencia al tipo de sustancias producidas por las levaduras o bien que poseen mecanismos para no ser afectados por estas sustancias como puede ser el caso en de la melalina que es un factor de resistencia que poseen los hongos pertenecientes a la sección *nigri* del género *Aspergillus*, esta es la razón por la que durante los ensayos se tomó nota de que cepas de levaduras provocaban una reducción en la pigmentación de los hongos, comparando las cepas que presentaron mayor reducción con las que presentaban poco o mucha reducción de la pigmentación se observó que en muchos casos este fenómeno se relacionaba con colonias más pequeñas, mientras que en otras la colonia crecía de forma normal. La cepa de hongo filamentoso M4 fue la que resulto con una menor inhibición en su crecimiento por lo que es la menos susceptible, mientras que la cepa 117 resulto la que mayor vio afectado su crecimiento y fue una en las que se repitió con mayor frecuencia la falta de pigmentación.

BIBLIOGRAFÍA

- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014. Estadísticas de Producción para el Año Agrícola 2014. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [Online]. Disponible en: www.siap.gob.mx/index (Consulta Octubre, 2015).
- SAGARPA 2014, México, el mayor exportador de mango; en 2013 se incrementaron las ventas internaciones del fruto en 16 por ciento, [Online]. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B289.aspx> (Consulta Octubre, 2015).
- Bleve G, Grieco F, Cozzi G, Logrieco A, Visconti A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*. 108:204-209.
- Cubaiu L, Abbas H, Dobson ADW, Budroni M, Migheli Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strain Inhibits Growth and Decreases Ochratoxin A Biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins*. 4(12) 1468-1481.
- Tripathi A, Sharma N, Sharma V, Alam A. (2013). Control of *Aspergillus niger* (L.)Van Tieghem in Mango: A Fruit Utilizing Combination of Yeast and Chitosan (A Soft Fungicide). *International Journal of Horticultural & Crop Science Research*. 3:43-49.