

INFLUENCIA DEL PH Y LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE LAS FITOTOXINAS PRODUCIDAS POR LA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PSS. EVALUACIÓN DE SU EFECTIVIDAD EN EL CONTROL DE MALEZAS

María E. Díaz de Villegas Díaz de Villegas,¹ Antonio Bell García,¹ Beatriz Altuna Seijas,¹ Marcos A. González Sosa,¹ Ricardo García Castillo,² Ermenegildo Paredes Rodríguez,² Ricardo Gallardo Iglesias,¹ Esmérída Torres Castañeda¹ y Mailing Carbonero González¹

¹ Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, Ciudad de La Habana, c.e.: mariaelena.diaz@icidca.edu.cu

² Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, c.e.: nhernandez@inisav.cu

RESUMEN

El control biológico de malezas mediante la aplicación de bioherbicidas constituidos por las fitotoxinas producidas por microorganismos es una alternativa que resulta promisorio por las posibilidades que tiene de incluirse en el manejo integrado de malezas. Diversos factores medioambientales afectan la producción de fitotoxinas por cepas del género *Pseudomonas*, entre los que se encuentran el pH y la temperatura del cultivo. La evaluación de estos parámetros en la producción de las fitotoxinas producidas por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS durante el cultivo líquido en fermentadores de 5 L muestran que la mejor variante en el pH es cuando se ajusta a 7 al inicio del cultivo y después se deja libre, mientras que la producción de fitotoxinas fue máxima a 30°C. La evaluación de la efectividad in vitro del bioherbicida a una concentración de fitotoxinas de 45 mg/mL sobre la germinación de diferentes semillas de malezas ocasionó la necrosis o el desarrollo atrofiado de las radículas que emergieron, y mostró un comportamiento similar al producido por los herbicidas de tipo hormonal. En tratamientos con aplicación al suelo en condiciones controladas en macetas después de la siembra de semillas de malezas no se observaron efectos sobre la germinación y brotación de las plántulas. Aplicaciones foliares mostraron resultados notables con diferencia en cuanto al comportamiento sobre las distintas especies. Las dicotiledóneas (*Amaranthus dubius*, *Bidens pilosa*, *Euphorbia hirta*, *Dichrostachys cinerea*, *Parthenium hysterophorus*) han sido más sensibles que las gramíneas.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, pH, temperatura, bioherbicida, malezas

ABSTRACT

Biological control of weeds through the application of bioherbicides constituted by phytotoxins produced by microorganisms is a promising alternative due to the possibility to being included in integrated weeds management. Different environmental factors affect phytotoxins production by strains of genus *Pseudomonas*, pH and temperature of the culture are among them. The evaluation of these parameters in the production of *Pseudomonas aeruginosa* PSS phytotoxins during liquid culture in 5 L fermentors, showed the best results when pH was adjusted at the beginning of the culture and then it leaves free, while the temperature was at 30°C. The evaluation of the effectiveness in vitro of the bioherbicide with a concentration of 45 mg/mL in the germination of different weeds seeds, caused necrosis or atrophied development of emerged radicles and show a similar behaviour as hormonal herbicides. Treatments of soil application in greenhouse after sowing seeds weeds were not effective over germination and plant sprout. Foliar treatment showed difference between weeds species. Dicotyledonous (*Amaranthus dubius*, *Bidens pilosa*, *Euphorbia hirta*, *Dichrostachys cinerea*, *Parthenium hysterophorus*,) were more sensible than grasses.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, pH, temperature, bioherbicide, weeds

INTRODUCCIÓN

Los bajos rendimientos en los cultivos con la consiguiente afectación en la alimentación de la población debido a las plagas, enfermedades y malezas que los

atacan, han dado lugar a la búsqueda de alternativas para su mejoramiento, por lo que se producen actualmente profundas transformaciones que contrastan con

el modelo clásico de la agricultura moderna y convencional. Entre sus elementos esenciales se encuentran el uso de la fertilización orgánica y biofertilización, así como el manejo integrado de plagas con énfasis en el control biológico.

Existe una variedad de microorganismos, entre los que se encuentran hongos y bacterias patógenos de plantas, que reciben considerable atención con el fin de utilizarlos, junto a las fitotoxinas que ellos producen, como herbicidas biológicos [Duke y Abbas, 1994; Duke *et al.*, 1991]. En muchos aspectos los patógenos de plantas ejercen el mismo efecto sobre las malezas que las fitotoxinas producidas por ellos, por lo que potencialmente pueden emplearse como herbicidas uno u otro; sin embargo, las toxinas ofrecen un espectro de acción más amplio que el patógeno que las produce, lo que resulta de gran interés dada la necesidad de eliminar arvenses que atacan los cultivos [Abbas y Duke, 1995; Kremer, 1998].

Entre los microorganismos que pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las plantas indeseables e impedir la germinación de las semillas y/o su desarrollo mediante la producción de fitotoxinas, están las del género *Pseudomonas* [Bender *et al.*, 1999].

La producción de bioherbicidas constituidos por las fitotoxinas producidas por cepas de *Pseudomonas* ofrece una alternativa para su aplicación en el manejo integrado de malezas. Resultados preliminares han mostrado que la *Pseudomonas aeruginosa* PSS produce metabolitos fitotóxicos en cultivos líquidos promisorios para el control de malezas [Díaz de Villegas *et al.*, 2002].

Entre los factores medioambientales que influyen en la producción de fitotoxinas por vía biotecnológica se encuentran el pH y la temperatura. Se ha reportado que este último parámetro tiene gran importancia en la síntesis de las fitotoxinas producidas por diferentes cepas de *Pseudomonas syringae* [Rohde *et al.*, 1998], y específicamente en la coronatina producida por la *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* PG4180, que tiene su máxima producción a 18°C, mientras que a 30°C prácticamente no la produce, lo que se corresponde con la temperatura a la cual se presentan los síntomas de la enfermedad en el campo [Bender *et al.*, 1999].

En este trabajo se presentan los resultados al estudiar la influencia del pH y la temperatura sobre la producción de las fitotoxinas producidas por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS en cultivo líquido, y la evaluación de su efectividad sobre malezas que atacan cultivos de interés económico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se empleó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PSS de la colección de cultivos del ICIDCA aislada del suelo, cuyo cultivo liofilizado reconstituido se inoculó en medio sólido King B [King *et al.*, 1954] y se incubó durante 24 h a 30°C. El caldo semilla se preparó por medio de la inoculación de 200 mL del medio King B contenidos en erlenmeyers de 500 mL, con el cultivo proveniente de la superficie de la placa, el que se mantuvo durante 8 h a 30°C en una zaranda rotatoria (175 r.min⁻¹). El inóculo se obtuvo al añadir a 250 mL de medio King B este caldo semilla, en una relación de inoculación de 1/10 durante 16 h a 30°C en una zaranda rotatoria (175 r.min⁻¹). Los fermentadores de 5 L, que contenían 2,5 L de medio optimizado con glicerina como fuente de carbono, urea y fosfato de amonio como fuente de nitrógeno, fueron inoculados con 250 mL de este inóculo.

El comportamiento del pH durante el cultivo se estudió por triplicado bajo las siguientes condiciones:

- pH ajustado a 7 al inicio del cultivo y después se dejó libre.
- pH ajustado a 7 durante toda la fermentación.
- pH ajustado a 8 durante toda la fermentación.

Las temperaturas estudiadas fueron 30, 35 y 40°C. La agitación se estableció a 250 rpm y la aireación a 0,2 vvm durante 24 h.

Procedimiento experimental

El crecimiento celular se estimó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro PM 2A. Estudios previos realizados indican que las fitotoxinas producidas por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS son de naturaleza peptídica [Díaz de Villegas *et al.*, 2002], por lo que la concentración de fitotoxinas se expresa como miligramo por mililitro de proteína, determinación realizada a los sobrenadantes libres de células (SLC) por el método del microbiuret [Frankhauser, 2004].

Determinación de la actividad fitotóxica *in vitro*

La actividad fitotóxica, expresada como por ciento de inhibición del tamaño de la radícula (% ITR), se les determinó a los SLC por pruebas de semillas de lechugas en placas Petri, en las que se colocaron diez semillas sobre papel de filtro Whatman no. 4 humedecido con la solución del producto, se dejaron germinar a tem-

peratura ambiente durante cuatro días, al cabo de los cuales se midió la longitud de la radícula, y se comparó con el testigo puesto a germinar solo en agua.

Evaluación de la efectividad biológica en condiciones controladas

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Herbología del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. En ellos se evaluó el efecto *in vitro* del bioherbicida con una concentración de fitotoxinas de

45 mg/mL, sobre la germinación de diferentes semillas en placas de Petri de 14 cm de diámetro, a temperatura ambiente entre 24-30°C; además del efecto del producto sobre semillas del suelo y el follaje de plántula, que se realizó en pruebas con macetas plásticas de 12 cm de diámetro rellenas de suelo ferralítico rojo, donde se sembraron semillas de malezas para realizar aplicaciones posteriores del producto por evaluar, tanto al suelo como al follaje de malezas emergidas. Las malezas evaluadas fueron:

Maleza	Nombre vulgar
<i>Amaranthus dubius</i> Mart.	Bledo
<i>Bidens pilosa</i> Lin.	Romerillo
<i>Euphorbia heterophylla</i> L.	Lechosa
<i>Euphorbia hirta</i> Lin.	Lechera
<i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link.	Arrocillo
<i>Eleusine indica</i> L.	Pata de gallina
<i>Dichrostachys cinerea</i> (L.) Wight & Arn.	Marabú
<i>Parthenium hysterophorus</i> L.	Escoba amarga
<i>Oxalis</i> spp.	Trébol

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Fig. 1* se presenta la producción de fitotoxinas y el crecimiento celular a los pH estudiados. Los mayores niveles de fitotoxina (6,31 mg/mL) se alcanzaron cuando se ajustó el pH a 7 al inicio, y después se dejó libre, para un pH de 6,7 al final del cultivo. Tanto a los pH 7 y 8 la producción de fitotoxina disminuyó, aunque fue más drástica a pH 8, con una reducción de 72% comparada con la concentración obtenida a pH 7. Estos resultados difieren de lo reportado por Palmer y Bender (1993) en la producción de la

fitotoxina coronatina a partir de la *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* PG 4180, los que no obtuvieron efectos significativos en la producción de coronatina, en un rango de pH entre 6,5-7,8.

Respecto al crecimiento celular, como se aprecia en la *Fig. 1*, los resultados son muy similares en las tres variantes estudiadas, lo que se corresponde con lo reportado por Palmer y Bender (1993), quienes no obtuvieron cambios significativos en el crecimiento celular en un rango de pH entre 6,5-7,8.

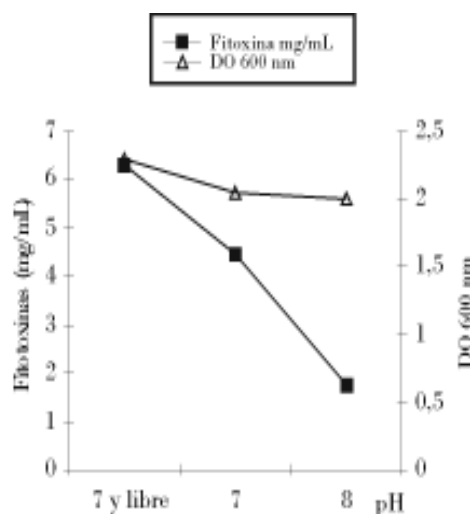


Figura 1. Producción de fitotoxinas y crecimiento celular de la *Pseudomonas aeruginosa* PSSa diferentes pH del cultivo.

La Fig. 2 presenta la actividad fitotóxica mostrada por los SLC obtenidos durante el cultivo de la *Pseudomonas aeruginosa* PSS a los diferentes pH. Estos resultados se corresponden con los que aparecen en la Fig. 1, ya

que coincide la mayor actividad fitotóxica en la variante donde se ajusta el pH al inicio y después se deja libre, aunque con el ajuste de pH a 7 se obtienen también actividades superiores a 30% de ITR.

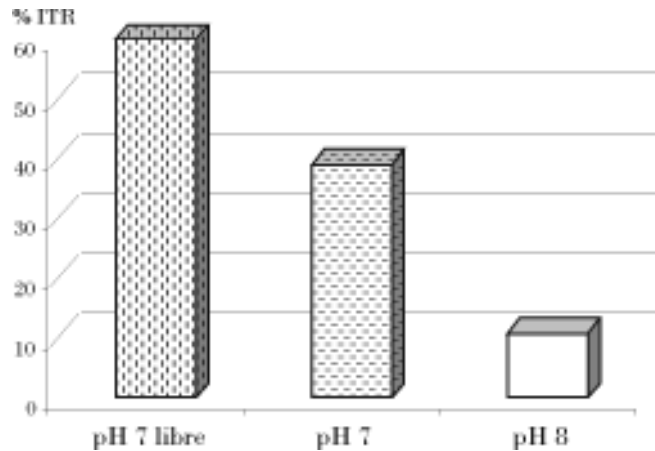


Figura 2. Actividad fitotóxica *in vitro* sobre semillas de lechuga expresada como inhibición del tamaño de la radícula de las fitotoxinas producidas por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS a diferentes pH del cultivo.

La influencia de la temperatura durante el cultivo sobre el crecimiento celular y la producción de fitotoxina, ajustando el pH al inicio y después libre, se presenta en la Fig. 3. La temperatura es un factor importante para el crecimiento celular. Se reporta que en general todas las especies de *Pseudomonas* spp. crecen bien a temperaturas entre 28 y 30°C [Todar, 2004]. En rela-

ción con la producción de fitotoxinas, algunos autores la correlacionan con la temperatura óptima del patógeno en el campo [Bender *et al.*, 1999; Palmer, 1995], por lo que en el caso de un microorganismo que sea de clima frío, como es la *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, la mayor producción de fitotoxinas es a 18°C y mínima a 30°C [Palmer y Bender, 1993].

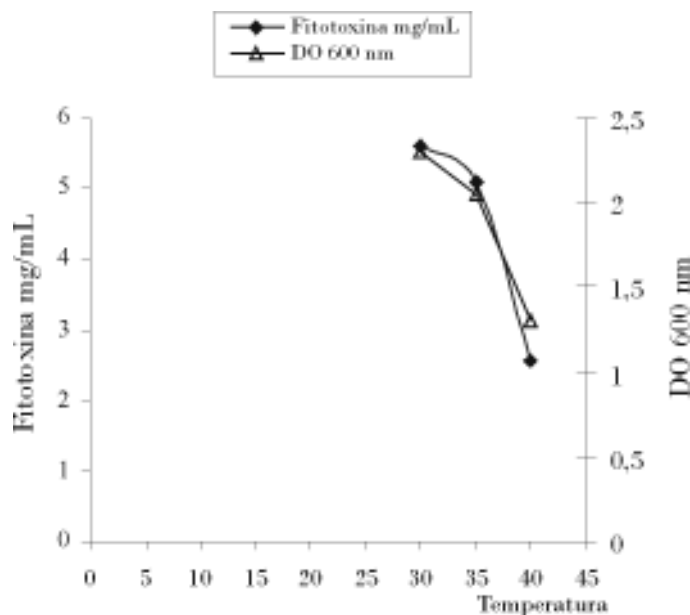


Figura 3. Producción de fitotoxinas y crecimiento celular de la *Pseudomonas aeruginosa* PSS a diferentes temperaturas, y pH ajustado al inicio y después libre.

Los resultados en este trabajo (Fig. 3) muestran que la producción de fitotoxina por la *Pseudomonas aeruginosa* PSS, que es un microorganismo aislado de suelo cubano donde el clima es tropical, fue máxima a 30°C, lo que coincide con el mayor crecimiento celular. A mayores temperaturas –35 y 40°C–, tanto la concentración de fitotoxina alcanzada como el crecimiento celular fue mucho menor, presumiblemente debido a la disminu-

ción del crecimiento celular a estas temperaturas, ya que la síntesis de fitotoxinas y el crecimiento celular tienen un comportamiento asociado, como se puede apreciar en la Fig. 4, donde aparece la cinética de síntesis de fitotoxina y el crecimiento celular a la temperatura de 30°C y pH 7 ajustado al inicio y después libre. La velocidad específica de crecimiento máxima alcanzada (μ) fue de 0,73 h⁻¹ bajo las condiciones antes descritas.

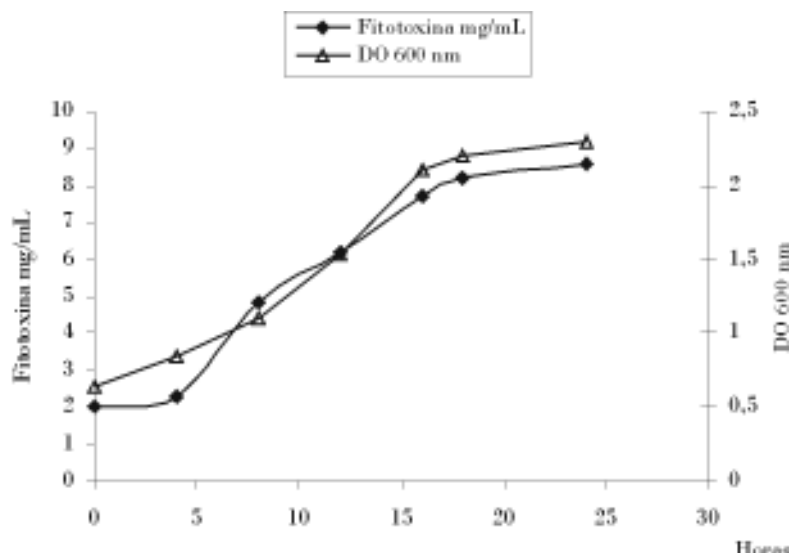


Figura 4. Cinética de la producción de fitotoxina y crecimiento celular a pH 7 y libre y 30°C de temperatura de la *Pseudomonas aeruginosa* PSS.

Evaluación de la efectividad del bioherbicida sobre malezas

Al evaluar el efecto inhibitorio del crecimiento de la radícula de las semillas se observó que el bioherbicida ocasionó la necrosis o el desarrollo atrofiado de las

radículas que emergieron, mientras que los testigos presentaron un crecimiento y desarrollo normales (Fig. 5). Este comportamiento es similar al producido por los herbicidas de tipo hormonal, que atrofan el crecimiento y desarrollo de la radícula cuando no lo inhiben completamente.

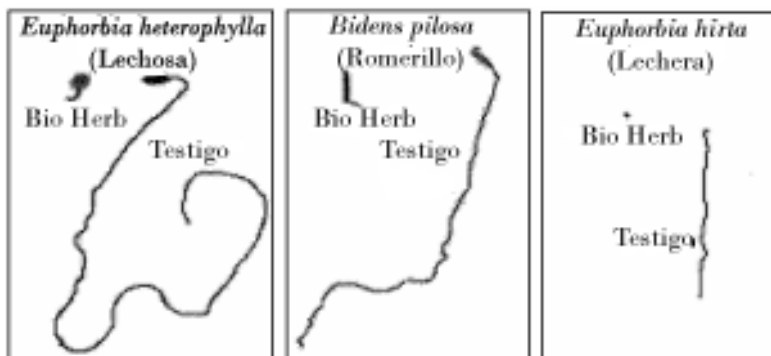


Figura 5. Efecto del bioherbicida sobre la germinación de las semillas de malezas en condiciones de laboratorio.

En la *Tabla 1* se muestran los resultados de esta prueba. El bioherbicida presentó buena actividad en semillas de malezas

dicotiledóneas (*A. dubius*, *B. pilosa*, *E. hirta* y *E. heterophylla*), y muy poca en monocotiledóneas (*E. colonum*).

Tabla 1. Efectividad del bioherbicida sobre la germinación de las semillas en placas Petri

Malezas	Semillas germinadas		Características	
	Bioherbicida	Testigo	Bioherbicida	Testigo
<i>A. dubius</i>	1	11	Crecimiento atrofiado	Desarrollo normal
<i>B. pilosa</i>	0	18	–	Desarrollo normal
<i>E. hirta</i>	0	12	–	Desarrollo normal
<i>E. heterophylla</i>	1	12	Crecimiento atrofiado	Desarrollo normal
<i>E. colonum</i>	7	8	Crecimiento normal	Desarrollo normal

En otro ensayo *in vitro* sobre especies de malezas muy invasivas se obtuvo un alto efecto depresivo sobre la germinación de las semillas (*Tabla 2*). El bioherbicida causó una inhibición total, sin siquiera la emisión de alguna radícula atrofiada.

En tratamientos con aplicación al suelo, después de la siembra de semillas de malezas no se observaron efectos sobre la germinación y brotación de las plántulas

(*Tabla 3*). El efecto de inhibición de la germinación y de la radícula observado *in vitro* pudiera estar dado por su acción de contacto directo con la testa y el embrión de las semillas, lo que no ocurre en las aplicaciones de preemergencia, pues estas están a distintas profundidades de la superficie en que se aplica el producto, además de que debe tenerse en cuenta la posible interacción de los microorganismos del suelo que actúan en la degradación de los productos en contacto con él.

Tabla 2. Efecto del bioherbicida sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de la radícula en placas Petri

Malezas	No. de semillas germinadas		Longitud de radícula (mm)	
	Bioherbicida	Testigo	Bioherbicida	Testigo
<i>B. pilosa</i>	0	38	0	25,2
<i>E. colonum</i>	0	16	0	26,5
<i>A. dubius</i>	0	11	0	17,1
<i>D. cinerea</i>	0	16	0	–
<i>P. hysterophorus</i>	0	10	0	–

Tabla 3. Efecto del bioherbicida sobre la brotación de las malezas en pots con suelo

Malezas	Malezas a los quince días de la aplicación	
	Bioherbicida	Testigo
<i>B. pilosa</i>	24	25
<i>D. cinerea</i>	8	7
<i>P. hysterophorus</i>	7	6
<i>E. colonum</i>	12	11
<i>A. dubius</i>	25	26

Las aplicaciones al follaje de las malezas crecidas en los pots mostraron resultados notables. Cuando el producto fue asperjado al follaje de *A. dubius*, se produjo una afectación ligera a partir de concentraciones de 50%, y una mortalidad del total de la maleza cuando se aplicó en forma pura. El efecto sobre los bordes fue más pronunciado en esta especie que en otra, con

presencia de necrosis a partir de las 24 h de la aplicación. Al aplicar sobre el follaje de *D. cinerea* (marabú) se observó una depresión del desarrollo y crecimiento de las plántulas, sin que el hecho de que esta haya sido ligera deje de indicar una interesante acción reductora del crecimiento de esta maleza tan perjudicial (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del bioherbicida sobre el follaje de las malezas

Malezas	Bioherbicida (50%)	Bioherbicida (100%)	Testigo
<i>A. dubius</i>	Daño en los bordes	Necrosis total	Sin síntomas
<i>D. cinerea</i>	—	Ligera afectación del crecimiento	Sin síntomas
<i>E. indica</i>	—	Necrosis ligera en los bordes	Sin síntomas
<i>P. oleracea</i>	—	Daño ligero en los bordes	Sin síntomas
<i>Oxalis</i> spp.	—	Necrosis ligera en los bordes	Sin síntomas

En tratamientos del producto puro al ciento por ciento, sobre malezas de dos a cuatro hojas, solo se observó una ligera quemazón en el borde de las hojas de *E. indica*, *P. oleracea* y *Oxalis* spp. (Tabla 4). Estos efectos diferenciados podrían ser muestras de determinada especificidad en la acción del producto, bien por la estructura de la hoja o por su fisiología y protección superficial.

En otra prueba de aplicación foliar sobre *E. indica* y *A. dubius* se pudo apreciar un fuerte efecto en la dicotiledónea, con necrosis total de las plántulas a las 24 h de la aplicación, mientras que fue ligero en la gramínea, lo que corrobora la selectividad en la acción del producto sobre el follaje (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto del bioherbicida sobre el follaje de las malezas *A. dubius* y *E. indica*

Malezas	Bioherbicida	Testigo
<i>A. dubius</i>	Necrosis total	Sin síntomas
<i>E. indica</i>	Daño ligero	Sin síntomas

CONCLUSIONES

- La mayor producción de fitotoxinas y actividad fitotóxica se producen cuando se ajusta el pH a 7 al inicio del cultivo y después se deja libre.
- A 30°C de temperatura se produce la mayor producción de fitotoxinas.
- El producto evaluado presentó efectividad sobre la germinación y el desarrollo de las semillas *in vitro*.
- No se observaron efectos de acción preemergente cuando se ha aplicado al suelo infestado con semillas de malezas.
- El bioherbicida produjo daños foliares sobre distintas especies. Las dicotiledóneas, y sobre todo *A. dubius*, han sido más sensibles que las gramíneas.

REFERENCIAS

- Abbas, H. K.; S. O. Duke: «Phytotoxins from Plant Pathogens As Potential Herbicides», *J. Toxicol- Toxin Review*, 14:523-543, 1995.
- Bender, C. L.; F. Alarcón-Chaidez; D. C. Gross: «*Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases», *Microbiol. Mol. Rev.*, 63:266-292, 1999.
- Díaz de Villegas, María Elena; L. Béress; A. Bell; R. Gallardo; E. Torres: «Producción y separación de fitotoxinas a partir de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PSS con potencialidades como bioherbicida». Memorias XIII Congreso Científico, INCA, BF-P.12, La Habana, noviembre 2002.
- Duke, S. O.; H. K. Abbas; C. D. Boyette; M. Gohbara: «Microbial Compounds with the Potential of Herbicidal Use». Brighton Crop Protection Conference, *Weeds*, 1:155-164, 1991.
- Duke, S. O.; H. K. Abbas: «Natural Products with Potential Use As Herbicides», *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 582:348-362, 1994.
- Frankhauser, B. D.: *Protein Assay by Microbiuret Standardization*, DBF's Hopkins Notebook III, 2004.

- King, E. O.; M. K. Ward; D. E. Raney: «Two Simple Media for the Demonstration of Pyocyanin and Fluorescin», *J. Lab. Clin. Med.*, 44:301-307, 1954.
- Kremer, R. J.: «Microbial Interactions with Weed Seeds and Seedling and Its Potential for Weed Management», *Integrated Weed and Soil Management*, Sleeping Bear Press, 1998.
- Palmer, D.; C. Bender: «Effects of Environmental and Nutritional Factors on Production of the Polyketide Phytotoxin Coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *Glycineat*», *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:1619-1626, 1993.
- Rohde B. H.; B. Pohlack; M. S. Ullrich: «Occurrence of Thermoregulation of Genes Involved in Coronatine Biosynthesis Among Various *Pseudomonas syringae* Strains», *J. Basic Microbiol.*, 38:41-50, 1998.
- Todar, K.: «Pseudomonas and Its Relatives. Todar's Online Textbook of Bacteriology», www.textbookofbacteriology.net, 2004.