

Acción inhibitoria de una cepa de *Zymomonas mobilis mobilis* aislada de caña de azúcar sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal de la cancrrosis de los cítricos

María E. Romero*, Jacqueline Ramallo** y L. Daniel Ploper**

RESUMEN

Zymomonas mobilis mobilis (*Zm*) produce factores antimicrobianos que actúan sobre un amplio espectro de microorganismos patógenos para el hombre, animales y plantas. Un problema importante a resolver en los tratamientos con antimicrobianos, es el desarrollo de resistencia a compuestos empleados actualmente, no siendo las bacterias fitopatógenas una excepción. En el presente trabajo, se realizaron ensayos de antagonismo con células (pruebas de estrías cruzadas) y sobrenadantes concentrados (Sc) (por difusión en agar) preparados a partir de cultivos de *Zm* (aislada de jugo de caña de azúcar producido en Tucumán), frente a la bacteria causal de la cancrrosis: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Se evaluaron aislamientos de *Xcc* sensibles (*Xc*) y resistentes (*Xcr*) a compuestos a base de cobre. Los resultados obtenidos mostraron que la bacteria testigo fue inhibida totalmente por las células de *Zm*, ejerciendo un efecto bactericida. En los ensayos de difusión en el agar se observó que tanto *Xc*, como *Xcr* fueron sensibles al Sc de *Zm*. Se sabe, por estudios anteriores, que los metabolitos de *Zymomonas* tienen un efecto deletéreo en la membrana celular de *E. coli* AB1133, inhibiéndose la respiración de la bacteria inmediatamente de agregado Sc (60 UA). En el presente trabajo, se observó el mismo efecto: inhibición total de la respiración en *Xc*, luego del agregado del Sc (60 UA). Por lo observado, se deduce que el blanco de acción de los metabolitos antimicrobianos de Sc en *Xc*, sería el mismo que el de *E. coli* AB1133. Con los resultados obtenidos se considera de interés encarar el estudio de los compuestos de *Zm* para ser empleados en el control de enfermedades que afectan los cultivos de valor económico de la región, como es el caso de la cancrrosis, como así también profundizar acerca de la acción de dichos metabolitos en la membrana de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Palabras clave: control biológico, factores antimicrobianos, bacterias fitopatógenas.

ABSTRACT

Inhibition of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causal agent of citrus canker, by a strain of *Zymomonas mobilis mobilis* isolated from sugarcane

Zymomonas mobilis mobilis (*Zm*) produces antimicrobial factors, which have an effect on a wide range of microorganisms pathogenic to man, animals, and plants. An important problem to solve with antimicrobial treatments is the development of resistance in these microorganisms, including phytopathogenic bacteria, to the currently used active ingredients. In this study, antagonism tests with cells (cross-streaking) and cell-free culture supernatants (CCS) (agar diffusion test) from *Zm* cultures, isolated from sugarcane juice in Tucumán, were carried out, measuring activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*), the causal agent of citrus canker. *Xcc* isolates sensitive (*Xc*) and resistant (*Xcr*) to copper pesticides were included in these tests. Results showed that indicator bacteria were completely inhibited by *Zm* cells, which had a bactericide effect. Both *Xc* and *Xcr* were sensitive to CCS in the agar diffusion method. Previous studies had revealed the deleterious effects of metabolites from *Zm* on cell membranes of *E. coli* AB1133, inhibiting the respiration of the bacteria immediately after CCS addition. On the basis of these results, the effects of CCS on *Xcc* respiration were studied, verifying a similar response. This would indicate that the site of action of these antimicrobial compounds is also located at the cell membrane of the bacteria under study. Based on these results, additional studies are suggested to evaluate *Zm*-derived products on the control of diseases that affect economically important crops, such as citrus canker.

Key words: biological control, antimicrobial factors, phytopathogenic bacteria.

*Facultad de Bioquímica y Farmacia (UNT). meromero@eeaoc.org.ar

**Sección Fitopatología, EEAOC.

INTRODUCCIÓN

En comunicaciones anteriores se observó que tanto los cultivos de una cepa de *Zymomonas mobilis mobilis* (*Zm*) aislada de jugo de caña de azúcar, como los sobrenadantes concentrados estériles (*Sc*) obtenidos de dichos cultivos, ejercían un notable efecto inhibitorio sobre un amplio espectro de microorganismos, entre ellos varios patógenos de vegetales de interés económico (Romero y Callieri, 2000; Romero, 2003; Romero *et al.*, 2004, 2005 y 2006).

Uno de los problemas que se presenta en el tratamiento de enfermedades con antimicrobianos es la aparición de resistencia a los compuestos empleados, generalmente por selección de los componentes poblacionales no sensibles. Tal es el caso del uso de compuestos cúpricos para el tratamiento de la canchosis de los cítricos (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) y de otras enfermedades (Adaskaveg y Hine, 1985; Bender *et al.*, 1990; Cooksey *et al.*, 1990; Jain, 1990; Rodrigues, 2000; Canteros, 2000).

Por lo tanto, resulta de interés la posibilidad de utilizar un nuevo agente para el manejo integrado de dichas enfermedades.

El objetivo del presente trabajo es: 1) analizar el efecto antagónico de *Zymomonas* y/o sus metabolitos sobre el desarrollo de dos cepas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: una sensible al oxiclورو de cobre (*Xc*) y la otra resistente (*Xcr*) y 2) determinar el blanco de acción de dichos metabolitos sobre el patógeno en estudio.

Cabe mencionar que *Zymomonas* está actualmente catalogada como GRAS ("Generally Regarded As Safe") (Varsaki *et al.*, 1998). Además, la cepa que se utiliza en este trabajo fue aislada de jugo de caña de azúcar (Rodríguez y Callieri, 1986), de manera que forma parte de la microflora de cultivos. Estas circunstancias conllevan la posibilidad de su uso a campo, sin consecuencias adversas ni cuestionamientos fundamentados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos

1.1. *Zymomonas mobilis mobilis* (*Zm*), aislada de jugo de caña de azúcar en Tucumán (Rodríguez y Callieri, 1986) conservada a 4°C y mantenida por repiques sucesivos en MEGI.

1.2. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xc*), provista por la Sección Fitopatología de la Estación Experimental Agroindustrial "Obispo Colombres" (EEAOC). Conservada a 4°C y mantenida en "buffer" fosfato salino a temperatura ambiente.

1.3. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, resistente al oxiclورو de cobre (3 g/l) (*Xcr*). Conservada a 4°C y mantenida en "buffer" fosfato salino a temperatura ambiente.

1.4. *Escherichia coli* AB1133, no patógena, resistente a la estreptomycin (75 µg/ml), provista por

Escherichia coli Genetic Stock Center (USA). Conservada a 4°C y mantenida por punción en medio LB (agar blando).

2. Medios de cultivo

2.1. Medio estándar líquido (MEGI). En g/l: glucosa, 50; extracto de levadura, 10; KH₂PO₄, 1; (NH₄)₂SO₄, 1; MgSO₄ .7 H₂O, 1.

2.2. "Buffer" fosfato salino. En g/l: K₂HPO₄, 1,07; KH₂PO₄, 0,44; ClNa, 8,18; pH 7.

2.3. Medio Luria Bertani (LB). En g/l: extracto de levadura, 5; peptona, 10; NaCl, 10. pH 7,4.

2.4. Agar nutritivo suplementado (ANS). En g/l: agar nutritivo de laboratorios Britania, 31; glucosa, 30; extracto de levadura, 10. pH 7,3.

2.5. Caldo nutritivo suplementado (CNS). En g/l: caldo nutritivo de laboratorios Britania, 8; glucosa, 10; cloruro de sodio 8. pH 6,9.

3. Determinación de la actividad antimicrobiana

Se utilizó la técnica de las estrías cruzadas, para la cual se prepararon placas de Petri con medio ANS. Se trazó una estría diametral de aproximadamente 5 mm de ancho, con un cultivo de *Zm* de 12 h en MEGI. Se incubó 24 h a 30°C, para permitir la producción y difusión de los eventuales metabolitos antimicrobianos de *Zm*. Se procedió entonces a trazar estrías perpendiculares a la de *Zm* con cultivos frescos de *Xc*, *Xcr* y *E. coli* AB1133. Como controles se sembraron todas las cepas utilizadas, en placas con ANS. Los resultados se observaron a partir de las 18 h de incubación a 28-30°C. Los ensayos se realizaron por triplicado, cuatro veces.

4. Sobrenadantes concentrados (Sc) a partir de cultivos de *Zymomonas*

Se preparó un inóculo de *Zm* en 1000 ml de MEGI a 30°C, hasta fase de crecimiento exponencial (1-1,5 g/l peso seco). Las células se separaron por centrifugación a 13.000 g, resuspendidas en 100 ml de MEGI fresco y sembradas en 4000 ml de MEGI e incubadas 48 h a 30°C. El sobrenadante obtenido por centrifugación fue reducido a un volumen de 20 ml por evaporación, tratado con metanol a 4°C (1:3 v/v) y conservado a -20°C durante 16 h. Luego de centrifugar a 23.500 g, 15 min, el metanol fue evaporado en un rotavap a 70°C. La fracción acuosa obtenida fue liofilizada hasta sequedad y resuspendida en 20 ml de agua bidestilada.

5. Determinación del título de la actividad antimicrobiana de Sc

Método de las diluciones sucesivas

Se determinó el título de la actividad antimicrobiana de Sc por la técnica de difusión en agar (Toba *et al.*, 1991; Jiménez Díaz *et al.*, 1993), empleando *E. coli* AB1133 como cepa testigo. Para ello se prepararon placas de Petri con 16 ml de medio LB agarizado sobre el que se agrega-

ron 3 ml de agar blando (0,6% p/v) inoculado con 30 μ l de una suspensión de *E. coli* AB1133, en medio LB, de manera de obtener una concentración celular final de aproximadamente 1×10^6 UFC/ml. Se practicaron orificios de 5 mm de diámetro con un sacabocados estéril y en cada uno de ellos se colocaron 50 μ l de las diluciones sucesivas de Sc. Las placas se dejaron a temperatura ambiente 30 minutos para permitir la difusión de los eventuales principios activos contenidos en el Sc y luego se incubaron 18 h a 37°C. Se midieron los halos de inhibición y se tomó como valor la media resultante de medir los diámetros en cuatro direcciones distintas. Se define la unidad de actividad (UA) como la recíproca de la mayor dilución que produce un halo de inhibición bien definido. Para expresar el título se lleva este valor a UA/ml.

La esterilidad de Sc se comprobó sembrando 100 μ l del mismo en MEGI e incubando 72 h a 28-30°C.

6. Actividad del Sc sobre el desarrollo de *Xc* y *Xcr*

Se utilizó la técnica de difusión en agar, ya descrita para la determinación del título de la actividad antimicrobiana de Sc. En las cajas de Petri se colocó AN y el agar blando fue inoculado con suspensiones de *Xc* y *Xcr* en una concentración final de 1×10^6 UFC/ml. Se ensayaron: 1) Sc (120 y 60 UA/ml) y 2) soluciones de oxícloruro de cobre (2 y 3 g/l) y oxícloruro de cobre (3 g/l) combinado con mancozeb (2 g/l) (productos químicos que se utilizan para combatir la canchosis en quintas de plantas cítricas). Como control negativo se usó agua. Se incubó de 24 a 48

h a 28°C. Los ensayos se realizaron por triplicado, cuatro veces, realizándose una observación cualitativa de los resultados. Asimismo, se midieron los halos de inhibición y se tomó como valor la media resultante de medir los diámetros en cuatro direcciones distintas.

7. Medición del consumo de oxígeno

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Rintoul *et al.* (2001). El agregado de un volumen de Sc, con una actividad de 60 UA, a un cultivo de *E. coli* AB1133 de 16 h en LB se hizo a los cinco minutos y las mediciones se llevaron a cabo durante 12 minutos. Al cultivo de *Xc* de 72 h en CNS se agregaron un volumen de Sc, con actividad de 20 UA a los ocho minutos y un volumen con 60 UA a los 21 minutos. Para realizar esta experiencia se utilizó un oxígrafo Wilson equipado con un electrodo tipo Clark, en un vaso cerrado de 2 ml, con agitación, a 30°C para *Xc* y 37°C para *E. coli* AB 1133. Se graficó el promedio de las mediciones del O₂ residual en los cultivos de las bacterias testigo sin y con el agregado de Sc. Se determinó el porcentaje de inhibición del consumo de oxígeno en *Xc* para las actividades ensayadas (20 y 60 UA).

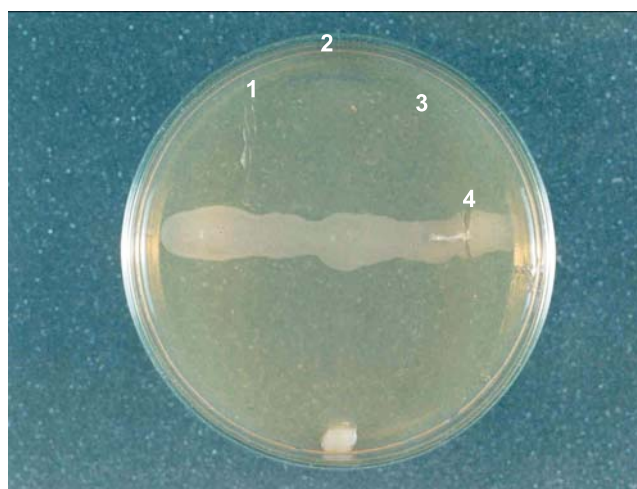
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 demuestra claramente que tanto las dos cepas de *Xanthomonas* en estudio como *E. coli* AB1133 se desarrollaron perfectamente en medio ANS. Por el contrario, en la placa de ensayo en la que se sembró previa-



Placa control

1. *E. coli* AB1133.
2. *X. citri* subsp. *citri*.
3. *X. citri* subsp. *citri* resistente al cobre.



Placa de ensayo

1. *E. coli* Ab1133.
2. *X. citri* subsp. *citri*.
3. *X. citri* subsp. *citri* resistente al cobre.
4. *Z. mobilis mobilis*.

Figura 1. Actividad antimicrobiana de *Zymomonas mobilis mobilis* sobre microorganismos testigo por el método de las estrias cruzadas.

mente *Zm*, a las 18 h de incubación se observó una total inhibición de las cepas en estudio, inhibición que se mantuvo luego de 23 días de incubación a 28°C.

Para comprobar si es necesaria la presencia de células viables de *Zm* para que se ejerza inhibición, se realizaron ensayos con Sc estéril obtenido a partir de cultivos de la misma por medio de la técnica de difusión en agar.

El título del Sc fue 120 UA/ml, comprobándose su esterilidad luego de incubado 72 h a 28-30°C, ya que no se observó el desarrollo de *Zm* cuando fue sembrado en MEGI.

En las Figuras 2 y 3 se exponen los resultados obtenidos, los que indican que en todos los casos se produjo inhibición, existiendo una relación directa entre esta y el grado de dilución del Sc (UA/ml). Cabe destacar el efecto ejercido sobre *Xcr*, resistente al oxiclورو de cobre.



Figura 2. Sensibilidad de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* frente a Sc y oxiclورو de cobre.

El oxiclورو de cobre combinado con mancozeb constituye un fungicida que combina las propiedades de

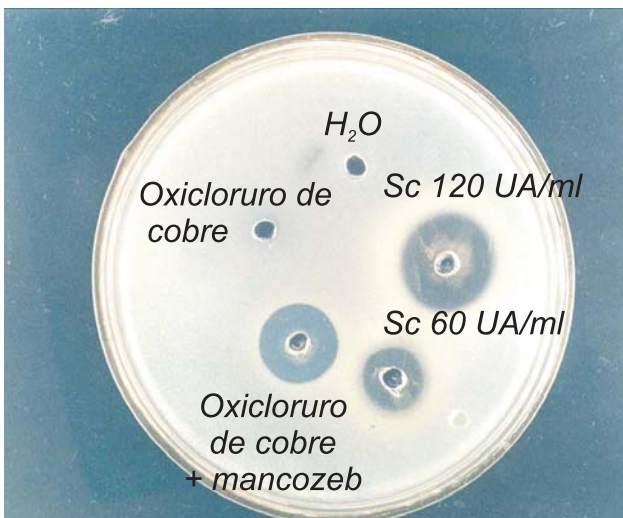


Figura 3. Sensibilidad de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (resistente al oxiclورو de cobre) frente al oxiclورو de cobre combinado con mancozeb.

ambos compuestos para lograr la prevención y el control de un amplio espectro de enfermedades de frutales y hortalizas, mejorando la eficiencia que se obtiene cuando se utilizan solos ambos fungicidas (CASAFE, 2007). En la Figura 3 se observa que *X. citri* subsp. *citri* resistente al oxiclورو de cobre solo, es sensible al oxiclورو de cobre combinado con mancozeb.

En la lucha contra las enfermedades causadas por microorganismos, es de suma utilidad establecer cuál es el mecanismo de acción y el blanco de ataque de los productos utilizados. El ión cúprico, presente en el oxiclورو de cobre, reacciona con las enzimas del patógeno, provocando la desnaturalización de las proteínas. Se han sugerido varios mecanismos para explicar la resistencia de bacterias fitopatógenas al cobre, de los cuales uno de ellos sería el control de la entrada del compuesto químico al interior de la célula: el ión cúprico podría permanecer, en consecuencia, inactivo en el espacio periplásmico (Cooksey, 1993). Varios fungicidas y antibióticos han sido utilizados para el control de cepas resistentes. En particular, el fungicida mancozeb ha sido muy empleado en mezclas con compuestos cúpricos, para el control de *Xanthomonas* spp. en campo (Marco y Stall, 1983; Pereira et al., 1981).

En trabajos anteriores (Romero et al., 2004) se vio que los compuestos antimicrobianos presentes en el Sc de *Zymomonas mobilis* tienen, como blanco de acción, a la membrana celular de *E. coli* AB1133, ya que la inhibición de la bacteria (muerte celular) ocurría en todas las fases de su desarrollo, sin ocasionar la lisis de la misma. Asimismo se observó, mediante la determinación del consumo de oxígeno, que este era inhibido en un 100% inmediatamente luego de la adición de 60 UA de Sc. En el caso de *X. citri* subsp. *citri* se observó un efecto similar en cuanto a la inhibición de la respiración de la misma (Figura 4a y 4b), ya que los resultados obtenidos muestran una disminución de un 70% de la respiración con 20 UA de Sc y una inhibición total con 60 UA de Sc (Figura 5), por lo que se infiere que los metabolitos antimicrobianos de *Zm* tienen, como blanco de acción, a la membrana de la bacteria, efecto similar al observado en *E. coli* AB1133.

CONCLUSIONES

- 1.- En este trabajo se demostró el efecto antagónico de *Zymomonas mobilis*, aislada de jugo de caña de azúcar, tanto con cultivo de la bacteria, como en sobrenadantes concentrados libres de ella. De acuerdo a la bibliografía consultada, la actividad antimicrobiana de *Zymomonas* sólo se observaba cuando se utilizaban cultivos tempranos de la misma.
- 2.- Dos cepas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, ambas causantes de canchrosis y una de ellas resistente al oxiclورو de cobre, se mostraron sensibles al efecto germicida tanto de cultivos de la cepa en estudio, como de sobrenadantes concentrados estériles obtenidos de los mismos.

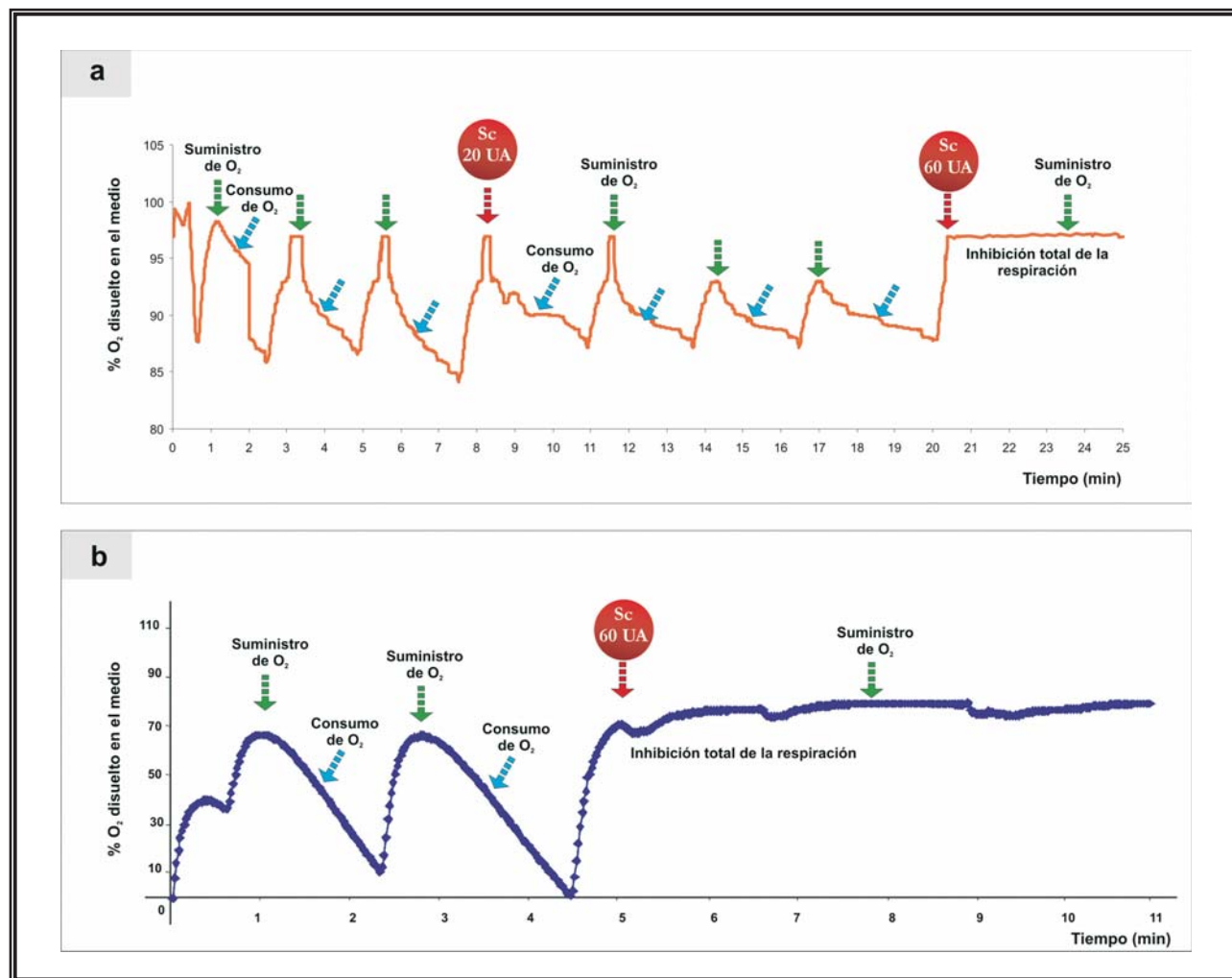


Figura 4. a) Consumo de oxígeno de un cultivo de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; b) consumo de oxígeno de un cultivo de *E. coli* AB1133, sin y con el agregado de Sc.

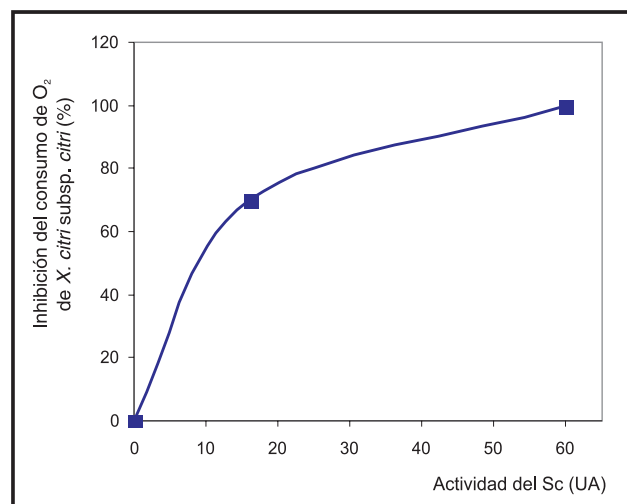


Figura 5. Efecto de Sc en el consumo de oxígeno en un cultivo de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

3.- El probable blanco de ataque es la membrana celular, ya que se observó la inhibición total de la respiración en las bacterias ensayadas con el agregado de 60 UA en Sc.

4.- *Zymomonas* está clasificada como GRAS. Esta apatogenicidad y los resultados aquí expuestos abren la posibilidad de utilizar cultivos de la bacteria, como los sobrenadantes concentrados obtenidos de ellos, para ser empleados en el manejo integrado de la cancrrosis de los cítricos, como así también de otros fitopatógenos.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Adaskaveg, J. E. and R. B. Hine. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot pepper. *Plant Disease* 69 (11): 993-996.
- Bender, C. L.; D. K. Malvick; K. E. Conway; S. George and P. Pratt. 1990. Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 56 (1): 170-175.
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). 2007. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina, vol. 2, 13. ed. Buenos Aires, Argentina.

- Canteros, B. I. 2000.** Citrus canker in Argentina: control, eradication, and current management. En: Abstracts of International Citrus Canker Research Workshop, Fort Pierce, Florida, USA, pp. 12-13.
- Cooksey, D. A. 1993.** Copper uptake and resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* 7 (1): 1-5.
- Cooksey, D. A.; H. R. Azad; J. S. Cha and C. K. Lim. 1990.** Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic species from tomato. *Appl. and Environ. Microbiol.* 56 (2): 431-435.
- Jain, R. K. 1990.** Copper-resistant microorganisms and their role in the environment. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* 6 (4): 356-365.
- Jiménez Díaz, R.; R. M. Ríos Sánchez; M. Desmazeaud; J. L. Ruiz Barba and J. C. Piard. 1993.** Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. and Environ. Microbiol.* 59 (5): 1416-1424.
- Marco, G. M. and R. E. Stall. 1983.** Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* 67 (7): 779-781.
- Pereira, A. L. G.; C. A. Campacci e D. A. Oliveira. 1981.** Cancro cítrico: seleção e eficiencia de defensivos agrícolas em ensaio preliminar de campo. *O Biológico* 47 (10): 265-287.
- Rintoul, M. R.; B. F. Arcuri; R. A. Salomón; R. N. Farías and R. D. Morero. 2001.** The antibacterial actino of microcin J25: evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella newport*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 265-270.
- Rodrigues, L. S. 2000.** Estudo da sensibilidade ao cobre em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.
- Rodríguez, E. and D. A. Callieri. 1986.** High yield conversion of sucrose into ethanol by a flocculent *Zymomonas* sp. flocculent isolated from sugar cane juice. *Biotechnol. Lett.* 8 (10): 745-748.
- Romero, M. E. 2003.** Estudio de la actividad antimicrobiana de *Zymomonas mobilis*. Tesis doctoral inédita. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT.
- Romero, M. E. y D. A. Callieri. 2000.** Capacidad antimicrobiana de *Zymomonas mobilis mobilis*. En: Memorias del Simposium Internacional de Biotecnología UPIBI - IPN 2000, México D. F., México, pp. 155.
- Romero, M. E.; J. Ramallo; D. A. Callieri y L. D. Ploper. 2004.** Estudio preliminar del modo de acción de compuestos antimicrobianos de *Zymomonas mobilis*: proyección. En: Libro de resúmenes [CD]. Congreso Latinoamericano de Microbiología, 17, Congreso Argentino de Microbiología, 10. Buenos Aires, Argentina.
- Romero, M. E.; J. Ramallo; G. Fogliata y L. D. Ploper. 2006.** Actividad antimicrobiana de *Zymomonas mobilis* frente a *Penicillium digitatum*, agente causal del moho verde de los cítricos. Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán, 23. Tafí del Valle, Tucumán, Argentina.
- Romero, M. E.; J. Ramallo y L. D. Ploper. 2005.** Sensibilidad de diferentes cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* frente a compuestos antimicrobianos producidos por *Zymomonas*. En: Libro de Resúmenes del Congreso Latinoamericano de Fitopatología, 13; Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos, 3, Carlos Paz, Córdoba, Argentina, pp. 219.
- Toba, T.; E. Yoshioka and T. Itoh. 1991.** Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Lett. in Appl. Microbiol.* 12: 228-231.
- Varsaki, A.; A. S. Afendra; G. Vartholomatos; G. Tegos and C. Drinas. 1998.** Production of ice nuclei from two recombinant *Zymomonas mobilis* strains employing the ina Z gene of *Pseudomonas syringae*. *Biotechnol. Lett.* 20 (7): 647-651.