

Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola

✉ Teresa de los M Orberá¹, Manuel de Jesús Serrat¹, Eduardo Ortega²

¹ Facultad de Ciencias Naturales,
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente
Ave. Patricio Lumumba s/n, CP 90500, Santiago de Cuba, Cuba

² Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, UH
Calle 25, entre J e I, Vedado, CP 10400, La Habana, Cuba
✉ torbera@cebi.uo.edu.cu; torbera@gmail.com

RESUMEN

El impacto negativo de los hongos y oomycetes fitopatógenos es una amenaza importante para la seguridad alimentaria en varios países. El control de tales microorganismos se dificulta por su mutabilidad genotípica y espaciotemporal y su capacidad adaptativa, que les permite desarrollar variedades resistentes a plaguicidas. Las estrategias en ese sentido incluyen el control biológico con el empleo de microorganismos enemigos naturales, como las rizobacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. La especie *Bacillus subtilis* se puede utilizar a través de la producción extracelular de antibióticos, lipopéptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas, como las quitinasas y las proteasas. En este artículo se describen las potencialidades de la cepa autóctona *Bacillus subtilis* SR/B-16, aislada a partir de rizosfera de cultivos fertilizados con substrato orgánico, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de importancia económica. La interacción *in vitro* de la cepa SR/B-16 con estos microorganismos ha evidenciado su actividad antifúngica de amplio espectro, que se expresó mediante la excreción de metabolitos causantes de alteraciones en la estructura y la ultraestructura fúngica. La bacteria SR/B-16 posee propiedades que le permiten colonizar la rizosfera, por lo que se puede utilizar como bioplaguicida y también como biofertilizante. Este microorganismo puede contribuir al crecimiento de las plantas, por el aumento de la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en los suelos agrícolas y el control de enfermedades fúngicas.

Palabras clave: *Bacillus*, antifúngicos, alteraciones morfológicas, hongos fitopatógenos

Biotecnología Aplicada 2014;31:7-12

ABSTRACT

Potential applications of *Bacillus subtilis* strain SR/B-16 for the control of phytopathogenic fungi in economically relevant crops. Countries all over the world have experienced the negative impact that phytopathogenic fungi and oomycetes have on food security. Controlling these organisms remains a daunting task due to their genetic plasticity and the large temporal and geographic variability of their populations, which enables them to evolve and develop pesticide-resistant variants despite the considerable effort spent on developing disease-resistant varieties. One strategy for the control of plant diseases is that of biological control using natural enemies of these pests, such as rhizobacteria of the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. *Bacillus subtilis*, in particular, is characterized by the extracellular secretion of a number of antibiotics, microbial lipopeptides and hydrolytic enzymes such as chitinases and proteases that can be harnessed for the control of phytopathogens. The present review describes and examines the advantages and potential applications of *B. subtilis* strain SR/B-16, originally isolated from the rhizosphere of organically farmed ornamental plants, for the biological control of fungal phytopathogens attacking commercially important crops. *In vitro* challenging of phytopathogenic fungi with SR/B-16 has demonstrated that the antifungal activity of the latter has a broad spectrum, due to the secretion of metabolites producing structural and ultrastructural changes on the fungal cell. In addition, strain SR/B-16 efficiently colonizes the rhizosphere, which confers it advantages as a potential biopesticide and biofertilizer. Therefore, this microorganism may promote plant growth both by increasing the availability of nitrogen and phosphorous in agricultural soils and by controlling fungal phytopathogens.

Keywords: *Bacillus*, antifungals, morphological alterations, phytopathogen fungi

Introducción

Cada año, el 10 % de la producción mundial de alimentos se pierde por la incidencia de las enfermedades y plagas que atacan los cultivos de interés agroalimentario: el 50 % de ellas provocadas por especies de hongos y oomicetos fitopatógenos [1, 2].

El impacto negativo de tales enfermedades en los cultivos incrementa los costos de producción agrícola, por la necesidad de implementar estrategias adicionales para el control del microorganismo patógeno y la disminución de sus efectos sobre las cosechas. Los hongos y oomicetos también generan pérdidas

poscosecha, con incidencia en el almacenamiento, la comercialización y la seguridad de los productos agrícolas [2]. Los daños se extienden a las materias primas de origen vegetal, las cuales se utilizan para la producción de alimentos, fármacos y cosméticos, entre otros fines.

Las enfermedades en las plantas constituyen una preocupación, no solo para las personas que dependen directa o indirectamente de la producción agrícola, sino también por los valores estéticos de las plantas y su contribución a la protección del medio ambiente [2].

1. Strange NR, Scott PR. Plant disease: A threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol.* 2005;43:83-116.

2. Porta-Puglia A, Vannacci G. Fungal plant diseases in Europe and in the Mediterranean Basin. In: Lal R, editor. *Agricultural Sciences.* Oxford: Eolss Publishers; 2012.

La situación se agrava en aquellos países en desarrollo en los que la alimentación básica depende de un monocultivo y carecen de recursos para garantizar la vigilancia fitosanitaria, la identificación de los agentes patógenos y su control [1].

Las enfermedades causadas por hongos y oomicetos en cultivos de interés agroalimentario van en aumento, así como los brotes emergentes y reemergentes de sus agentes causales en varias regiones del planeta [1, 3]. El control de microorganismos fitopatógenos se dificulta por la variabilidad espacio-temporal y genotípica de sus poblaciones, y porque las cepas evolucionan y desarrollan mecanismos de patogenicidad, que dan al traste con las estrategias de selección de especies resistentes a las enfermedades, que suelen durar años [1].

Entre las medidas para el control de las enfermedades en las plantas se incluyen la cuarentena, la certificación de la manipulación de semillas y material vegetal, la selección de prácticas culturales apropiadas, y el uso de variedades resistentes a enfermedades, así como de medios de control químico y biológico [2]. El control biológico de organismos fitopatógenos es una práctica 'amigable con el medio ambiente', basada en el uso de enemigos naturales de las plagas y enfermedades. Los controladores biológicos no solo actúan en la planta viva, también extienden sus efectos a la etapa poscosecha y a los productos almacenados. A diferencia de los agroquímicos, los agentes de biocontrol son biodegradables [3].

Las investigaciones destinadas al desarrollo de bioproductos para el control de enfermedades en las plantas, se encaminan a aspectos como la preservación ecológica de la interacción planta-microorganismo, las estrategias de aplicación de los inoculantes, el aislamiento de cepas nuevas y el descubrimiento de mecanismos de acción novedosos. Se enfatiza, además, en el uso de los agentes de biocontrol como parte de los programas de tratamiento integral de enfermedades y de la calidad de los suelos [4].

Los estudios con bacterias para el control biológico de enfermedades y la estimulación del crecimiento vegetal se han enfocado a especies rizosféricas, principalmente de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Los resultados con miembros del género *Pseudomonas* son numerosos; sin embargo, se conoce muy poco sobre las interacciones que establece *Bacillus* spp. y los géneros relacionados con las plantas para el control de las enfermedades [4].

Potencialidades de *Bacillus* spp. para el control biológico de organismos fitopatógenos

Las bacterias aerobias formadoras de endosporas (Bafe) de la clase *Bacilli* (*Bacillus* spp. y los géneros relacionados) actúan directamente en el enfrentamiento de organismos fitopatógenos, mediante la producción extracelular de antibióticos, toxinas, enzimas hidrolasas y lipopéptidos antimicrobianos [5, 6]. Los lipopéptidos de origen bacteriano ejercen una amplia acción antifúngica, antibacteriana y antiviral, y además constituyen moléculas efectoras que activan los mecanismos de resistencia inducida en plantas [7].

Los estudios publicados recientemente sobre las potencialidades de las bacterias de la clase *Bacilli* para

el control del crecimiento de hongos fitopatógenos, continúan haciendo referencia al aislamiento de especies del género *Bacillus* productoras de lipopéptidos, enzimas quitinasas y proteasas; entre ellas, *B. amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* [8-13], así como cepas de especies no definidas del mismo género [14]. Otros géneros de bacterias rizosféricas, entre los que predominan *Pseudomonas* y *Burkholderia*, también producen compuestos antimicrobianos de amplio espectro como pirrolnitrina, fenazina y piolutoína. Sin embargo, su eficacia en el control de enfermedades en los ecosistemas agrícolas no se ha demostrado, debido a los diversos factores bióticos y abióticos que inciden sobre la producción de antibióticos en condiciones naturales [6].

Las proteasas, las quitinasas y los lipopéptidos antimicrobianos se encuentran entre los metabolitos responsables de la actividad antifúngica y antibacteriana de cepas de *B. subtilis*. El aislado *B. subtilis* 21, procedente de rizosfera de fresa, excreta ambos tipos de compuestos, responsables de los efectos que ejerció la bacteria en el control de enfermedades causadas por diversos hongos de importancia económica, así como de bacterias patógenas asociadas con intoxicaciones alimentarias [10].

Las cepas que muestran una potente actividad antifúngica, pertenecientes a las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, deben su actividad microbiocida a la capacidad de producir tres tipos de lipopéptidos cíclicos en cantidades elevadas y homogéneas, sintetizados no ribosómicamente, pertenecientes a las familias de las iturinas, surfactinas y fengicinas. Ejemplo de ello es el aislado endofítico *B. subtilis* HC8, que inhibe el crecimiento fúngico y provoca alteraciones morfológicas en hifas procedentes de esporas pretratadas con los metabolitos excretados por la bacteria [13].

La síntesis de sustancias volátiles capaces de inhibir el crecimiento del micelio y la esporulación en hongos fitopatógenos, se describió en el aislado C9 de *B. subtilis* subsp. *subtilis*, el cual produce un esteroisómero del acetilbutanodiol, que activa los mecanismos de defensa en plantas. Este compuesto volátil se une a la molécula de ADN, inhibe la transcripción y la biosíntesis de proteínas en hongos, y afecta la germinación de las esporas y la biosíntesis de los componentes de la pared celular fúngica [12].

Los primeros bioplaguicidas elaborados con cepas de *B. subtilis* se introdujeron en el mercado en 1985 en los Estados Unidos, con las marcas comerciales Quantum®, Kodiak® y Epic®. Su aplicación para el control de microorganismos fitopatógenos que habitan en el suelo constituyó un punto de partida para ampliar la aplicación de los biopreparados elaborados con *Bacillus* spp. en cultivos de interés agroalimentario [15].

En la actualidad, los Estados Unidos de América encabeza la lista de países productores de bioplaguicidas elaborados a partir de bacterias rizosféricas, incluyendo especies del género *Bacillus*. Predominan las formulaciones producidas a partir de *Bacillus pumilus* (QST 2808 Sonata™ y GB34 Yield Shield®) y *B. subtilis* GBO3 Kodiak® [15, 16]. En el año 2012 en China se registraron 18 bioproductos producidos a partir de *Bacillus* spp. [6]. La Comunidad Europea, por su parte, se ha trazado una estrategia encaminada a elevar el número de bioplaguicidas de

3. Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol*. 2004;19(10):535-44.

4. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(9):4951-9.

5. Singh PK, Chittipurna, Ashish, Sharma V, Patil PB, Korpole S. Identification, purification and characterization of lat-erosporelin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. Strain GI-9. *PLoS One*. 2012;7(3):e31498.

6. Lamsal K, Kim SW, Kim YS, Lee YS. Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of Anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on Pepper. *Mycobiology*. 2012;40(4):244-51.

7. Pal KK, McSpaden Gardener B. Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Health Instructor*. 2006; doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

8. Fernando WGD, Nakkeeran S, Zhang D. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In: Siddiqui ZA, editor. *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Dordrecht: Springer Science; 2005. p. 67-109.

9. Zhang SM, Wang YX, Meng LQ, Li J, Zhao XY, Cao X, et al. Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *Afr J Microbiol Res*. 2012;6(8):1747-55.

10. Basurto-Cadena MG, Vazquez-Arista M, García-Jiménez J, Salcedo-Hernández R, Bideshi DK, Barbosa-Carona JE. Isolation of a new Mexican strain of *Bacillus subtilis* with antifungal and antibacterial activities. *Sci World J*. 2012;2012:384978.

11. Machado AP, Anzai M, Fischman O. *Bacillus subtilis* induces morphological changes in *Fonsecaea* predosoi in "in vitro" resulting in more resistant fungal forms "in vivo". *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2010;16(4):592-8.

12. Islam MR, Jeong YT, Lee YS, Song CH. Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Microbiology*. 2012;40(1):59-66.

13. Malfanova N, Franzl L, Lugtenberg B, Chebotar V, Ongena M. Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Arch Microbiol*. 2012;194(11):893-9.

14. Martínez-Absalon SC, Orozco-Mosqueda MC, Martínez-Pacheco MM, Fariás-Rodríguez R, Govindappa M, Santoyo G. Isolation and molecular characterization of a novel strain of *Bacillus* with antifungal activity from the sorghum rhizosphere. *Gen Mol Res*. 2012;11(3):2665-73.

15. Nakkeran S, Fernando DWG, Siddiqui ZA. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In: Siddiqui ZA, editor. *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Dordrecht: Springer Science; 2005. p. 257-96.

origen microbiano disponibles en el mercado para el sector agrícola [17]. La cepa *B. amyloliquefaciens* FZB42 comercializada como inoculante por Bayer CropScience y Abitep GmbH Berlin, ofrece una elevada actividad bioprotectora en variedades de papa de diversas regiones, y contra enfermedades como el cáncer del tallo y la costra negra de la papa, entre otras [17, 18].

El desarrollo de inoculantes a partir de Bafe requiere conocimientos más amplios sobre su biodiversidad, distribución y fisiología. Las investigaciones destinadas a la selección de nuevas cepas que constituyan candidatos para la formulación de bioplaguicidas, deben estar dirigidas al estudio de las características que les permitan el establecimiento efectivo en el ambiente rizosférico. También deben enfocarse a la evaluación de los efectos que se derivan de las interacciones que establecen con los microorganismos fitopatógenos y la microflora benéfica, así como a su función en la activación de los mecanismos de resistencia a las enfermedades [19].

La percepción sobre el origen multifactorial de los mecanismos que desarrollan las bacterias asociadas a las plantas para estimular la salud vegetal es uno de los principales retos de las investigaciones actuales sobre el control biológico de agentes fitopatógenos. Este enfoque complejo y multisistémico ha estado enmascarado por innumerables investigaciones para identificar y caracterizar cada mecanismo de biocontrol. Como resultado, se han reconocido múltiples aislados microbianos, que expresan actividad antagonista *in vitro* e *in vivo*, así como metabolitos responsables de la actividad inhibitoria y mecanismos específicos para el control de agentes patógenos [20]; pero la eficacia de los biopreparados en condiciones de campo sigue siendo limitada.

***Bacillus subtilis* SR/B-16 como posible agente para el control biológico de hongos fitopatógenos**

Bacillus subtilis SR/B-16 es una cepa autóctona de la microbiota de los suelos de Cuba, que se aisló a partir de muestras de suelo rizosférico de plantas ornamentales, cultivadas en un sustrato orgánico compost con estiércol vacuno y suplementado con urea [21]. Los primeros estudios sobre SR/B-16 estuvieron dirigidos a determinar su identidad, establecida a través del análisis de las secuencias del gen que codifica el ARN ribosomal 16S. La bacteria reveló 99 % de identidad con el aislado de referencia *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* B23052 y la secuencia parcial correspondiente, que pertenece a *Bacillus subtilis* SR/B-16 (número de acceso en GenBank: HQ025917) se depositó en la base de datos del Centro Nacional de Información para la Biotecnología [22].

Las investigaciones dirigidas a evaluar las potencialidades de SR/B-16 para el control de enfermedades, mostraron la actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos procedentes de cultivos de plantas ornamentales y de bancos de semillas de caña de azúcar, pertenecientes a las especies *Curvularia lunata*, *Curvularia gudauskasii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y al género *Colletotrichum*. Ello sugirió el amplio espectro de la actividad antifúngica de la bacteria antagonista [21, 23].

Como la mayoría de las investigaciones con microrganismos destinados al control biológico de agentes patógenos en plantas [24], los intentos de dilucidar los mecanismos de biocontrol de hongos fitopatógenos del *B. subtilis* SR/B-16 fueron *ex situ*. Los resultados derivados del enfrentamiento *in vitro* de esta bacteria con hongos causantes de enfermedades en plantas, demostraron que SR/B-16 y sus metabolitos extracelulares generan alteraciones en la morfología y en la estructura del fitopatógeno *C. gudauskasii*, responsables de la inhibición del crecimiento del hongo [23]. Además se estudiaron las variaciones evidenciadas en la ultraestructura de las hifas de *C. gudauskasii* en presencia de la bacteria antagonista. Las imágenes obtenidas corroboraron las alteraciones descritas e hicieron evidentes otras como el engrosamiento y la regeneración de la pared celular de la hifa, la constricción de la hifa en la región del septo transversal y la formación de ramificaciones secundarias de la célula fúngica. La presencia de la hinchazón periódica, la torsión y la formación de bulbos en las hifas de *C. gudauskasii* se relacionó con la posible excreción por SR/B-16 de lipopéptidos con propiedades antimicrobianas, miembros de la familia de las iturinas y las fengicinas [24]. La presencia de estos compuestos en cepas de *B. subtilis* y la actividad antifúngica de la especie se reportaron con anterioridad [25]. Los lipopéptidos producidos por bacterias se unen a los filamentos de actina del citoesqueleto de la célula fúngica y provocan cambios en el patrón de crecimiento apical de las hifas, las cuales se hinchan, y por lo cual se inhibe el crecimiento del hongo [26]. El patrón de elongación apical de las hifas constituye un elemento importante en la invasión de los hongos fitopatógenos endofíticos a los tejidos de las plantas [27], de modo que su afectación disminuye la patogenicidad de estos microrganismos.

La vacuolización intensa observada en las hifas de *Curvularia* y *Fusarium* al interactuar con SR/B-16, permitió inferir la presencia de compuestos fungitóxicos en el citoplasma de los hongos fitopatógenos, los cuales procedían de la bacteria. También se corroboró la participación activa de las vacuolas en la degradación intracelular de sustancias extrañas en el citoplasma de las células eucariotas, tal como se había descrito [28]. El engrosamiento y la regeneración de la pared celular fúngica se valoró como una vía alternativa de crecimiento, desarrollada por el hongo en presencia de SR/B-16. Estas afectaciones evidenciaron el aumento de la patogenicidad, como respuesta fúngica al estrés biótico generado por la interacción con la bacteria antagonista y sus metabolitos extracelulares [24]. Un fenómeno similar se describió en cepas fitopatógenas de *F. oxysporum* y *Botrytis cinerea* en presencia de aislados antagonistas de *Pseudomonas* spp. [29]. No obstante, es preciso destacar que no todos los hongos fitopatógenos son “simples víctimas” de la actividad antagonista de los agentes de biocontrol, pues algunos pueden desarrollar numerosos mecanismos que le confieren resistencia a la bacteria antagonista; entre ellos, la inactivación de los metabolitos con efecto inhibitor y la modificación de las estructuras dianas de la toxina bacteriana [30]. Los lipopéptidos antimicrobianos son sustancias de bajo peso molecular que atraviesan fácilmente la pared celular fúngica [25]. El engrosamiento

16. do Vale M, Seldin L, de Araujo FF, de Lima R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. In: Maheshwari DK, editor. Plant growth and health promoting bacteria. Heidelberg: Springer; 2010. p. 21-43.

17. Ravensberg WJ. Experiences with biocontrol agents in Europe: Commercial and regulatory overview. In: 7th International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Program and Abstract Book; Noordwijkerhout, The Netherlands; 2006. p. 15.

18. Borris R, Bochow H, Junge H. Use of *Bacillus subtilis*/amyloliquefaciens FZB strains for plant growth promotion and biocontrol. In: 7th International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Program and Abstract Book; Noordwijkerhout, The Netherlands; 2006. p. 15.

19. Kumar A, Prakash A, Johri BN. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. In: Maheshwari DK, editor. Bacteria in agrobiology: Crop ecosystems. Berlin: Springer; 2011. p. 37-59.

20. Orberá Ratón TM, Serrat Díaz MJ, González Giro Z. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. Fitosanidad. 2009;13(2):95-100.

21. Orberá Ratón T, González Giro Z, Serrat Díaz M. 16S rDNA partial sequence from aerobic endospore forming bacteria isolated from ornamental plants rhizosphere. 2010 Aug 30 [cited 2013 Aug 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ025917>

22. Orberá Ratón T, González Giro Z, Serrat Díaz M, Rodríguez Pérez S. *In vitro* growth inhibition of *Curvularia gudauskasii* by *Bacillus subtilis*. Ann Microbiol. 2012;62:545-51.

23. Kim YC, Leveau J, McSpadden Gardener BB, Pierson EA, Pierson LS 3rd, Ryu CM. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(5):1548-55.

24. Orberá Ratón TM. Bacterias rizosféricas de la clase *Bacilli* con potencialidades para la estimulación del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos [disertación]. Oriente University; 2012.

25. Ongena M, Jacques P, Touré Y, Destain J, Jabrane A, Thonart P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. Appl Microbiol Biotechnol. 2005;69(1):29-38.

26. Deora A, Hatano E, Tahara S, Hashidoko Y. Inhibitory effects of furanone metabolites of a rhizobacterium, *Pseudomonas jessenii*, on phytopathogenic *Aphanomyces cochlioides* and *Pythium aphanidermatum*. Plant Pathol. 2010;59(1):84-99.

27. Mendgen K, Hahn M, Deising H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. Annu Rev Phytopathol. 1996;34:364-86.

28. Bolsover SR, Hyams JS, Shephard EA, White HA, Wiedemann CG, editors. Cell Biology: A short course. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.

29. Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. Microbiol Mol Biol Rev. 2011;75(4):583-609.

de la pared celular, observada en la cepa de *Curvularia gudauskasii* al interactuar con SR/B-16, pudiera ser una estrategia de modificación de estructura, que crea una barrera física limitante para la entrada de los lipopéptidos al citoplasma de la hifa.

Un elemento importante en la efectividad de los agentes de control biológico es su especificidad por el hospedero [31]. Los mecanismos de inhibición del crecimiento fúngico que mostró SR/B-16, parecen ser de naturaleza inespecífica: generan alteraciones en estructuras dianas comunes a todos los hongos filamentosos y células eucariotas, como la membrana citoplasmática, el citoesqueleto y el aparato secretor [28]. Los resultados muestran el amplio espectro antifúngico de *B. subtilis* SR/B-16, de gran valor para el control de enfermedades causadas por miembros del género *Fusarium*; específicamente por la especie *F. oxysporum*, cuyo principal factor de patogenicidad consiste en la presencia de una categoría taxonómica dentro de la especie, denominada *formae speciale* (f. sp.) [24]. Las *formae speciale* son específicas en cada especie vegetal hospedera, por lo que hay una enorme variabilidad ecofisiológica de estos microorganismos, lo que limita considerablemente su control químico y biológico [32, 33].

Los agentes de biocontrol de amplia especificidad poseen rango de hospederos, y pueden llegar a cubrir varios órdenes, clases y reinos [31]. La actividad antifúngica de SR/B-16 *in vitro* abarcó varios géneros (*Fusarium*, *Curvularia* y *Colletotrichum*) y especies del reino Fungi [34], causantes también de enfermedades en especies vegetales ubicadas en las familias *Rosidae* [35], *Asteraceae* [36], *Agavaceae* [37] y *Poaceae* [38]. Por esto, *Bacillus subtilis* SR/B-16 puede clasificarse como una especie generalista, por su especificidad hacia los agentes patógenos, razón por la que tiene ventajas como candidato para la formulación de un bioinoculante, por su efectividad, fácil producción industrial y comercialización. Los microorganismos generalistas utilizan diversas fuentes para la obtención de nutrientes y pueden afectar a una u otra especie con relativa facilidad [31]. La presencia de actividad antifúngica de amplio espectro en cepas rizosféricas de *B. subtilis* se describió recientemente [39, 40].

El principal problema para la determinación de la especificidad por el microorganismo patógeno en los agentes de biocontrol, es que la mayoría de las investigaciones han sido *in vitro*, y en ellas se han obviado dos elementos primordiales del ecosistema agrícola: las condiciones ambientales y la planta hospedera. Numerosos autores reconocen que la especificidad de los microorganismos por sus hospederos en condiciones naturales, difiere ampliamente de la observada en condiciones *in vitro* [31].

La variabilidad en la especificidad intraespecie de los agentes de biocontrol por su especie blanco es un fenómeno frecuente [31]. Por ello es recomendable la selección de cepas autóctonas *in situ*, en interacción con los agentes patógenos blancos [40], pues permite demostrar las ventajas que aseguran la efectividad de la cepa aislada, como en el caso de SR/B-16. La bacteria puede eliminar hongos fitopatógenos mediante un mecanismo de competencia por los nutrientes y por la excreción de metabolitos con propiedades antifúngicas [23].

Su propiedad de formar endosporas como estructura, que le confiere resistencia ante condiciones adversas, le permite a SR/B-16 tolerar las variaciones edafoclimáticas y persistir incluso a bajas densidades poblacionales [41].

La baja especificidad por sus agentes patógenos blanco del SR/B-16 demostrada en los estudios *in vitro*, la hacen tan atractiva desde el punto de vista comercial, como los pesticidas químicos de amplio espectro. Los costos de producción de un bioinoculante a partir de esta bacteria serían más aceptables para la industria, y la facilidad de aplicación la convierten en un bioproducto deseable por los cultivadores [31], al poder incorporarla en diversos programas de tratamiento de enfermedades en cultivos de interés agroalimentario.

Las interacciones que se establecen entre los microorganismos en ambientes complejos como la rizosfera de las plantas, determinan el éxito de los inoculantes en los ecosistemas agrícolas [42]. Los agentes de control biológico pueden estar expuestos a la actividad competitiva y antagonista de la microbiota endógena, la cual puede producir la disminución de individuos, así como la afectación de la actividad fisiológica del inoculante [43]. A su vez, la introducción de microorganismos exógenos en los suelos agrícolas puede traer efectos perjudiciales para el equilibrio ecológico, y afectar las poblaciones autóctonas que ejercen efectos beneficiosos en el desarrollo de las plantas. *Bacillus subtilis* SR/B-16 *in vitro* inhibe más del 60 % del crecimiento de una amplia variedad de hongos fitopatógenos y ejerce un efecto antagonista frente a bacterias gramnegativas [22]. Además, elevados niveles del inóculo pueden favorecer el sobrecrecimiento de la población exógena, la cual compite con los microorganismos endógenos por los nutrientes, el oxígeno e incluso por el espacio [44]. Si estos elementos se combinan con características intrínsecas del microorganismo, como el amplio espectro inhibitorio de SR/B-16, sus efectos podrían dañar el ecosistema agrícola. La aplicación de esta bacteria en cultivos que se desarrollan en sustratos artificiales pobres en materia orgánica y en microflora endógena, como los agropónicos, es una estrategia que podría contribuir a prevenir esta desventaja cuando se aplica como inoculante.

Bacillus subtilis SR/B-16 también se puede utilizar en el control biológico de oomicetos: responsables de diversas enfermedades comunes y de brotes emergentes que constituyen una seria amenaza para la seguridad alimentaria en varios países [1]. La ausencia de quitina entre los componentes de la pared celular de los oomicetos, es un elemento de patogenicidad que hace ineficaz a muchas bacterias antagonistas, cuyo efecto antifúngico se basa en la producción extracelular de enzimas quitinasas. Las estructuras dianas de SR/B-16 y sus metabolitos antifúngicos (probablemente lipopéptidos) se encuentran en el interior de la célula fúngica. Ello le confiere una enorme ventaja a la bacteria para el tratamiento de las enfermedades causadas por miembros de los géneros *Phytophthora* y *Phytium*, en cultivos que constituyen alimentos básicos, como el maíz y la papa [41, 42]. Los efectos fungitóxicos de los lipopéptidos producidos por el hongo endófito *Acremonium* spp. sobre la especie

30. Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytol. 2003;157:493-502.

31. Brodeur J. Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. Evol Appl. 2012;5(5):470-80.

32. Azor M, Cano J, Gené J, Guarro J. High genetic diversity and poor *in vitro* response to antifungals of clinical strains of *Fusarium oxysporum*. J Antimicrob Chemother. 2009;63(6):1152-5.

33. Blackwell M, Spatafora JW. Fungi and Their Allies. In: Mueller GM, Bills GF, Foster M, editors. Biodiversity of Fungi: Standard Methods for Inventory and Monitoring. New York: Academic Press; 2004. p. 7-21.

34. Goody J. The culture of flowers. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.

35. Sorensen PD. Revision of the genus *Dahlia* (Compositae, *Heliantheae*-*Coreopsidinae*). Rhodora. 1969;71:309-416.

36. World Checklist of Selected Plant Families: Royal Botanic Gardens [Internet]. Richmond: Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew; c2013 [cited 2013 Aug 13]. Available from: <http://apps.kew.org/wcsp/home.do>

37. Hussain A, Khan ZI, Ghafoor MY, Ashraf M, Parveen R, Rashid MH. Sugarcane, sugar metabolism and some abiotic stresses. Inter J Agric Biol. 2004;6(4):732-42.

38. Matar SM, El-Kazzaz SA, Wagih EE, El-Diwanly AI, Moustafa HE, Abo-Zaib GA, et al. Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi. I. Biotechnology. 2009;8(1):53-61.

39. Li J, Yang Q, Zhao LH, Zhang SM, Wang YX, Zhao XY. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. J Zhejiang Univ Sci B. 2009;10(4):264-72.

40. Yacizi S, Yanar Y, Karaman I. Evaluation of bacteria for biological control of early blight disease of tomato. Afr J Biotechnol. 2011;10(9):1573-7.

41. Peterson RKD, Higley LG, editors. Biotic stress and yield loss. New York: CRC Press; 2001.

42. Lévesque CA, Brouwer H, Cano L, Hamilton JP, Holt C, Huitema E, et al. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. Genome Biol. 2010;11(7):R73.

fitopatógena *Pythium ultimum*, se demostraron en experiencias anteriores [44]. Recientemente se describió la actividad antagonista *in vitro* frente a una cepa de *Phytophthora nicotianae* causante de enfermedades en tabaco, en bacterias rizosféricas de las especies *Bacillus altitudinis*, *Bacillus licheniformis* y *Brevibacillus* spp. [45], todas portadoras de relaciones filogenéticas y fenotípicas estrechas con la especie *B. subtilis* [46], a la cual pertenece SR/B-16.

Hasta el momento, los estudios indican las posibilidades de *B. subtilis* SR/B-16 para ejercer el control biológico de enfermedades en cultivos de interés agrícola, al interferir en los elementos que conforman el triángulo de la enfermedad. Este triángulo de la enfermedad es un modelo simple que describe las interacciones entre el agente patógeno, la planta hospedera y el ambiente, las cuales son necesarias para el desarrollo de la enfermedad [41]. Las rizobacterias estimuladoras del crecimiento vegetal pueden incidir en cualquiera de estos tres elementos y afectar el desarrollo de la enfermedad infecciosa, debido a sus múltiples efectos.

Como se explicó, la bacteria SR/B-16 inhibe directamente el desarrollo de hongos fitopatógenos mediante la excreción de sustancias con propiedades antifúngicas; a su vez, favorece el desarrollo de la planta hospedera por el aumento de la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en los suelos agrícolas, mediante la degradación de urea [20] y la solubilización de fosfato de calcio [24]. Tales propiedades le permiten incrementar los nutrientes en el ambiente de los cultivos, y le confieren ventajas en el control biológico de enfermedades causadas por agentes patógenos oportunistas, asociadas a deficiencias nutricionales. Ejemplo de ello son las afectaciones causadas por el hongo *Cercospora* spp. en plantas adultas de café, las cuales surgen limitadas de nitrógeno combinado en el suelo y se pueden controlar si se incrementa la disponibilidad de este nutriente a niveles óptimos para el desarrollo de la planta [41], por medio la actividad ureolítica que poseen varias especies de bacterias rizosféricas, como SR/B-16 [20].

Otras características que muestra *B. subtilis* SR/B-16 provienen de su capacidad de excretar enzimas líticas (celulasas y pectinasas) [24] que le permiten a las poblaciones de la bacteria crecer a expensas de la descomposición de material vegetal muerto en los suelos agrícolas, y utilizar los polímeros que lo conforman como fuentes de carbono y energía [5]. En suelos agrícolas ricos en materia orgánica, como los ecosistemas artificiales creados en los organopónicos, la aplicación de formulaciones de esta bacteria puede potenciar el aumento de sus poblaciones en la zona de la rizosfera, así como sus efectos antagonistas, y contribuir al control de enfermedades y a la estimulación del crecimiento vegetal.

Proyecciones con *Bacillus subtilis* SR/B-16

Tres aspectos fundamentales quedan por revelar de la fisiología de *B. subtilis* SR/B-16: 1) sus propiedades inductoras, que le permiten el control biológico indirecto de enfermedades, mediante la activación de los mecanismos de resistencia inducida en plantas; 2) su capacidad para colonizar el ambiente rizosférico y

endofítico de los cultivos vegetales (rizocompetitividad) y 3) la efectividad *in vivo* de la bacteria en el control biológico de enfermedades, las cuales se derivan de las complejas relaciones que establece SR/B-16 con otras poblaciones microbianas que habitan en la rizosfera y con las diversas especies vegetales.

Varios autores han descrito la acción de los lipopeptidos bacterianos en la activación de los mecanismos de resistencia inducida en plantas [5]. Comentamos con anterioridad sobre la posible excreción de estos compuestos por SR/B-16, como parte de su mecanismo de interacción en condiciones *in vitro* con hongos fitopatógenos. La caracterización morfofisiológica de SR/B-16 reveló que posee propiedades que le permiten colonizar el ambiente rizosférico: su forma bacilar, su motilidad y su facilidad de formar biofilmes cuando se cultiva en un medio nutritivo [24]. Estas características le confieren a SR/B-16 una mayor tasa metabólica y velocidad de crecimiento, y facilitan su quimioatracción en el ambiente rizosférico y la posibilidad de agregarse en forma de biofilmes más complejos. La motilidad es una propiedad fisiológica que facilita la competitividad de cepas rizosféricas de *Pseudomonas* spp., en las biopelículas que forman en la rizosfera de las plantas [47]. Los biofilmes son la base de la colonización bacteriana en la zona de la rizosfera y estimulan la concentración de los metabolitos antimicrobianos excretados por las bacterias. Estos forman una barrera químico-física que limita la entrada de los agentes patógenos a los tejidos de la raíz [48].

Los estudios sobre los efectos de SR/B-16 en el control biológico de hongos fitopatógenos, solo aportan datos sobre la interacción de la bacteria y los hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro* [20, 22]. Numerosas investigaciones demuestran que el control de enfermedades surge de la interacción combinada de múltiples factores bióticos y elementos abióticos del medio [23].

La utilización de *B. subtilis* SR/B-16 y sus productos extracelulares para el desarrollo de bioinoculantes, requiere la recolección de más datos experimentales para valorar su beneficio práctico en el control biológico de enfermedades de origen fúngico, que afectan cultivos de interés agroalimentario. A su vez, el desarrollo a gran escala de un inóculo con efecto consistente y confiable en condiciones de campo, aún constituye un impedimento. Además de la selección del microorganismo adecuado y lograr las condiciones óptimas para su cultivo, deben tenerse en cuenta los soportes para su mantenimiento y liberación en el campo [49]. La capacidad que posee SR/B-16 de producir endosporas, que le confieren resistencia a diversos factores ambientales, es una enorme ventaja para la formulación, el almacenamiento, la conservación y aplicabilidad de biopreparados confeccionados a partir de esta bacteria.

Los costos derivados únicamente del uso de fungicidas para el control de enfermedades en cultivos de maíz, soya, trigo, papa, café y arroz en los Estados Unidos, superan los cinco billones de dólares [50]. Los gastos por compra de semillas y de biopesticidas se han duplicado en los últimos dos años [51]. Estos fenómenos indican la necesidad de utilizar bacterias que puedan combinar múltiples efectos para la

43. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ann Rev Microbiol.* 2009;63:541-56.

44. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(1):15-25.

45. Kamoun SA. Catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol.* 2006;44:41-60.

46. Jin F, Ding Y, Ding W, Reddy MS, Dilantha WG, Du B. Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere. *Int J Mol Sci.* 2011;12(5):3055-71.

47. Ongena M, Jaques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 2008;16(3):115-25.

48. Schmidt TR, Scott EJ II, Dyer DW. Whole-genome phylogenies of the family *Bacillaceae* and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. *BMC Genomics.* 2011;12:430-46.

49. Malusá E, Sas-Pasz L, Ciecierska J. Technologies for beneficial microorganism inocula used as biofertilizers. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:491206.

50. Chakraborty S, Tiedemann AV, Teng PS. Climate change: potential impact on plant diseases. *Environ Poll.* 2000;108(3):317-26.

51. Vurro M, Bonciani B, Vannacci G. Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: impact on agriculture and socio-economic consequences. *Food Sec.* 2010;2(2):113-32.

52. Mousa WK, Raizada MN. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Front Microbiol.* 2013;4:65.

53. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia MP. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Gen Mol Biol.* 2012; 35(4 Suppl):1044-51.

estimulación del crecimiento vegetal, como los miembros de *Bacillus* spp. [52, 53]. Las potencialidades que muestra *B. subtilis* SR/B-16 se insertan entre las acciones prioritarias encaminadas al diseño cuidadoso de

estrategias que contribuyan al incremento sostenido de los rendimientos de los cultivos y a la reducción de los costos de productividad agrícola, así como a la disminución gradual del uso de pesticidas [51].

Recibido en enero de 2013.

Aprobado en junio de 2013.

Potential applications of *Bacillus subtilis* strain SR/B-16 for the control of phytopathogenic fungi in economically relevant crops

✉ Teresa de los M Orberá¹, Manuel de Jesús Serrat¹, Eduardo Ortega²

¹ Facultad de Ciencias Naturales,
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente
Ave. Patricio Lumumba s/n, CP 90500, Santiago de Cuba, Cuba

² Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, UH
Calle 25, entre J e I, Vedado, CP 10400, La Habana, Cuba
✉ torbera@cebi.uo.edu.cu; torbera@gmail.com

ABSTRACT

Countries all over the world have experienced the negative impact that phytopathogenic fungi and oomycetes have on food security. Controlling these organisms remains a daunting task due to their genetic plasticity and the large temporal and geographic variability of their populations, which enables them to evolve and develop pesticide-resistant variants despite the considerable effort spent on developing disease-resistant varieties. One strategy for the control of plant diseases is that of biological control using natural enemies of these pests, such as rhizobacteria of the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. *Bacillus subtilis*, in particular, is characterized by the extracellular secretion of a number of antibiotics, microbial lipopeptides and hydrolytic enzymes such as chitinases and proteases that can be harnessed for the control of phytopathogens. The present review describes and examines the advantages and potential applications of *B. subtilis* strain SR/B-16, originally isolated from the rhizosphere of organically farmed ornamental plants, for the biological control of fungal phytopathogens attacking commercially important crops. *In vitro* challenging of phytopathogenic fungi with SR/B-16 has demonstrated that the antifungal activity of the latter has a broad spectrum, due to the secretion of metabolites producing structural and ultrastructural changes on the fungal cell. In addition, strain SR/B-16 efficiently colonizes the rhizosphere, which confers it advantages as a potential biopesticide and biofertilizer. Therefore, this microorganism may promote plant growth both by increasing the availability of nitrogen and phosphorous in agricultural soils and by controlling fungal phytopathogens.

Keywords: *Bacillus*, antifungals, morphological alterations, phytopathogenic fungi

Biotecnología Aplicada 2014;31:13-17

RESUMEN

Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. El impacto negativo de los hongos y oomycetes fitopatógenos es una amenaza importante para la seguridad alimentaria en varios países. El control de tales microorganismos se dificulta por su mutabilidad genotípica y espaciotemporal y su capacidad adaptativa, que les permite desarrollar variedades resistentes a plaguicidas. Las estrategias en ese sentido incluyen el control biológico con el empleo de microorganismos enemigos naturales, como las rizobacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. La especie *Bacillus subtilis* se puede utilizar a través de la producción extracelular de antibióticos, lipopéptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas, como las quitinasas y las proteasas. En este artículo se describen las potencialidades de la cepa autóctona *Bacillus subtilis* SR/B-16, aislada a partir de rizosfera de cultivos fertilizados con sustrato orgánico, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de importancia económica. La interacción *in vitro* de la cepa SR/B-16 con estos microorganismos ha evidenciado su actividad antifúngica de amplio espectro, que se expresó mediante la excreción de metabolitos causantes de alteraciones en la estructura y la ultraestructura fúngica. La bacteria SR/B-16 posee propiedades que le permiten colonizar la rizosfera, por lo que se puede utilizar como bioplaguicida y también como biofertilizante. Este microorganismo puede contribuir al crecimiento de las plantas, por el aumento de la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en los suelos agrícolas y el control de enfermedades fúngicas.

Palabras clave: *Bacillus*, antifúngicos, alteraciones morfológicas, hongos fitopatógenos

Introduction

Pests and diseases attacking economically relevant crops account for losses of approximately 10 % of the world's food production. About one half of these are caused by phytopathogenic fungi and oomycetes [1, 2].

The negative effect of these organisms on agriculture is not limited to increases in production costs deriving from the need to implement strategies for their control. It also includes post-harvest losses through their impact on the storage, marketing and sanitary

surveillance of crop foods [2] and of raw materials of plant origin used for the manufacture of foodstuffs, drugs and cosmetics, among other purposes.

Crop diseases are a problem not only in the context of commercial agriculture, but in the gardening industry as well, and pose an important obstacle to environmental protection programs [2]. The impact of phytopathogens is felt most strongly in developing countries, where alimentation often relies on the predominant consumption of a single dietary staple,

1. Strange NR, Scott PR. Plant disease: A threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol.* 2005;43:83-116.

2. Porta-Puglia A, Vannacci G. Fungal plant diseases in Europe and in the Mediterranean Basin. In: Lal R, editor. *Agricultural Sciences.* Oxford: Eolss Publishers; 2012.

and financial and material resources for phytosanitary surveillance and the control of phytopathogens are usually scarce [1].

The incidence in economically relevant crops of diseases caused by fungi and oomycetes exhibits an upward trend, and outbreaks and reinfections caused by these pests have flared in several regions around the planet [1, 3]. The control of phytopathogens, however, is not an easy task, due among other causes to the spatial, temporal and genotypic variation exhibited by the populations of these organisms and their constant change and evolution in response to the selective pressure exerted by the use of pest-resistance varieties [1].

Strategies for the control of these organisms include quarantines, the certification of seeds and plant material to be used for propagation, the implementation of appropriate culture practices, and the use of disease-resistant varieties together with chemical and biological control agents [2]. Biological control, in particular, is an environmentally friendly strategy for dealing with plant pathogens that is based on the directed application of their natural predators. One of its advantages is that it is not circumscribed to live plants, but can be extended to the post-harvest and storage stages. In addition, biocontrol agents are biodegradable, unlike most agrochemicals currently in use [3].

Research on the development of bioproducts for phytopathogen control usually takes into account a number of issues, including the ecological preservation of plant-microorganism interactions, strategies for the application of inoculants, the isolation of new strains and the dissection of novel mechanisms of action. Emphasis is also made on the use of biocontrol agents as part of integrated, multidisciplinary programs for the fight against plant diseases and the preservation and management of soil quality [4].

Studies on bacterial organisms for the biological control of plant diseases and the stimulation of plant growth have focused mainly on rhizospheric species such as those of the *Pseudomonas* and *Bacillus* genera. While published data on members of the *Pseudomonas* abound, much less is known about the interactions of plants with members of *Bacillus* spp. and related genera, as well as their relevance for pest control [4].

The potential application of *Bacillus* spp. for the biological control of phytopathogens

Aerobic spore-forming bacteria of the *Bacilli* class (*Bacillus* spp. and related genera) play a direct role in resistance to phytopathogenic organisms through the production of extracellular antimicrobial antibiotics, toxins, hydrolases and lipopeptides [5, 6]. Bacterial lipopeptides, in particular, are not only effective against a broad range of fungal, bacterial and viral species, but are known to act as effector molecules activating the mechanisms of induced resistance in their plant host [7].

Recent studies on the potential use of members of the *Bacilli* class against phytopathogenic fungi have included the isolation of *Bacillus* sp. strains secreting antifungal lipopeptides, chitinases and proteases, including representatives from *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. subtilis* [8-13] as well as from undefined

species of said genus [14]. Other genera of rhizospheric bacteria, of which *Pseudomonas* and *Burkholderia* are the main representatives, also synthesize compounds exhibiting a wide antimicrobial spectrum, such as pyrrolnitrin, phenazine and pyoluteorin, although the efficacy of the latter class of compounds in agricultural ecosystems has not been conclusively proved due to the many biotic and abiotic factors that modulate antibiotic production in natural conditions [6].

Proteases, chitinases and antimicrobial lipopeptides are among the metabolites responsible for the antifungal and antibacterial activity of *B. subtilis* strains. For instance, *B. subtilis* strain 21, an isolate from strawberry rhizosphere shown to be effective for the control of phytopathogenic fungi in economically relevant crops and pathogenic bacteria responsible for food poisoning, is known to secrete such types of compounds [10].

Many *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* strains that exhibit a strong antifungal activity owe their properties to the non-ribosomal production of high amounts of chemically homogeneous iturins, surfactins and fengycins. One example is the HC8 endophytic isolate of *B. subtilis*, which inhibits fungal growth and produces morphological deformities in hyphae grown from spores that have been pretreated with the metabolites excreted by this bacterium [13].

Isolate C9 of *B. subtilis* subsp. *subtilis* has also been shown to synthesize volatile compounds inhibiting mycelial growth and sporulation in phytopathogenic fungi, one of which is an acetylbutanediol stereoisomer that activates plant defense mechanisms. This compound binds the DNA molecule, inhibiting transcription and protein synthesis in fungi and affecting spore germination and the biosynthesis of components of the fungal cell wall [12].

The first commercially available biopesticides prepared from strains of *B. subtilis*, branded as Quantum®, Kodiak® and Epic®, appeared in the US market in 1985. Their success in the control of soil-dwelling phytopathogenic microorganisms laid the foundation for extending the application of *Bacillus*-based biopreparations to commercially important crops [15].

Currently, the US remains the market leader in the production of biopesticides based on rhizospheric bacteria, including species of the *Bacillus* genus. Most formulations are produced from *Bacillus pumilus* (QST 2808 Sonata™ and GB34 Yield Shield®) or *B. subtilis* (GBO3 Kodiak®) [15, 16]. A total of 18 bioproducts produced from *Bacillus* spp. were registered during 2012 in China [6], and the European Community has implemented a strategic plan to increase the number of available microbial pesticides for agricultural use in that market [17]. Strain FZB42 of *B. amyloliquefaciens*, marketed as inoculant by Bayer CropScience and Abitep GmbH Berlin, has been shown to be highly beneficial for a number of potato varieties from diverse regions, providing protection against pests such as potato's stem canker and black scurf, among others [17, 18].

The development of inoculants from aerobic spore-forming bacteria has pushed forward research on the biodiversity, distribution and physiology of this microbial group. Selecting new strains as candidates for

3. Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol.* 2004;19(10):535-44.

4. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(9):4951-9.

5. Singh PK, Chittipurna, Ashish, Sharma V, Patil PB, Korpole S. Identification, purification and characterization of lat-erosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. Strain GI-9. *PLoS One.* 2012;7(3):e31498.

6. Lamsal K, Kim SW, Kim YS, Lee YS. Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of Anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on Pepper. *Mycobiology.* 2012;40(4):244-51.

7. Pal KK, McSpaden Gardener B. Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Health Instructor.* 2006; doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

8. Fernando WGD, Nakkeeran S, Zhang D. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In: Siddiqui ZA, editor. *PGPR: Biocontrol and biofertilization.* Dordrecht: Springer Science; 2005. p. 67-109.

9. Zhang SM, Wang YX, Meng LQ, Li J, Zhao XY, Cao X, et al. Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6(8):1747-55.

10. Basurto-Cadena MG, Vazquez-Arista M, García-Jiménez J, Salcedo-Hernández R, Bideshi DK, Barbosa-Carona JE. Isolation of a new Mexican strain of *Bacillus subtilis* with antifungal and antibacterial activities. *Sci World J.* 2012;2012:384978.

11. Machado AP, Anzai M, Fischman O. *Bacillus subtilis* induces morphological changes in *Fonsecaea pedrosoi* in "in vitro" resulting in more resistant fungal forms "in vivo". *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2010;16(4):592-8.

12. Islam MR, Jeong YT, Lee YS, Song CH. Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Microbiology.* 2012;40(1):59-66.

13. Malfanova N, Franzl L, Lugtenberg B, Chebotar V, Ongena M. Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Arch Microbiol.* 2012;194(11):893-9.

14. Martínez-Absalon SC, Orozco-Mosqueda MC, Martínez-Pacheco MM, Farias-Rodríguez R, Govindappa M, Santoyo G. Isolation and molecular characterization of a novel strain of *Bacillus* with antifungal activity from the sorghum rhizosphere. *Gen Mol Res.* 2012;11(3):2665-73.

15. Nakkeeran S, Fernando DWG, Siddiqui ZA. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In: Siddiqui ZA, editor. *PGPR: Biocontrol and biofertilization.* Dordrecht: Springer Science; 2005. p. 257-96.

the formulation of novel biopesticides demands a thorough knowledge of the factors ensuring a successful colonization of the rhizosphere, and the implementation of efficient methodologies to evaluate the effects of the interactions these biopesticides establish not only with phytopathogenic microorganisms, but with beneficial members of the local microflora. Another issue to be taken into account is the contribution of candidate biopesticides to the induction of disease resistance mechanisms in the target crop [19].

The multifactorial nature of the mechanisms whereby plant-associated bacteria stimulate plant health is one of the difficulties associated with current research on the biological control of phytopathogenic agents, and despite growing awareness of the need for an integrated, multidisciplinary approach to this field of study, many research groups have remained focused on a single biocontrol mechanism. Although this state of affairs has yielded a large number of publications describing microbial isolates with antagonistic *in vitro* and *in vivo* activities, the metabolites responsible for these activities and even the relevant mechanisms through which they counteract specific phytopathogens [20], it has failed to produce sufficient data on the efficacy of these bio-preparations under field conditions.

***Bacillus subtilis* SR/B-16 as a potential agent for the biological control of phytopathogenic fungi**

Bacillus subtilis SR/B-16 is an autochthonous strain from the microbiota of Cuban soils that was isolated from rhizospheric samples of ornamental plants, cultured in an organic substrate of compost and livestock manure supplemented with urea [21]. Research on SR/B-16 was first addressed at its taxonomic identification by means of ribosomal 16S rRNA sequencing, and revealed an identity of 99 % between the resulting partial sequence (GenBank accession number HQ025917) and that of reference isolate B23052 of *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* [22].

Further studies aimed at dissecting whether SR/B-16 could be used as a biological control agent demonstrated that this strain exhibited *in vitro* inhibitory activity for the growth of phytopathogenic fungi of the species *Curvularia lunata*, *Curvularia gudauskasii*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* as well as members of the *Colletotrichum* genus, isolated from ornamental plants and sugar cane seed banks. These results suggested that the metabolites from this antagonist bacterium might have a broad antifungal spectrum [21, 23].

Attempts to elucidate the biocontrol mechanisms of *B. subtilis* SR/B-16 have been performed *ex situ*, as is also true of most research on microbiological control agents against phytopathogens [24]. *In vitro* challenges of phytopathogenic fungi with this bacterium demonstrated that SR/B-16 and its extracellular metabolites produce growth-inhibiting alterations in the morphology and structure of *C. gudauskasii* [23]. Ultrastructural studies of the hyphae of this pathogen in the presence of SR/B-16 evidenced changes in the width and regeneration of its cell walls, hyphal constrictions in the region of the transversal septum and the induction of secondary branching in the fungal cell.

The periodical swelling, torsion and formation of bulbs in hyphae from *C. gudauskasii* was causally linked to the excretion by SR/B-16 of antimicrobial lipopeptides of the iturin and fengycin families [24], which have previously been shown to be present in *B. subtilis* strains with antifungal activity [25]. Bacterial lipopeptides bind to actin filaments in the cytoskeleton of the target cell, producing changes in the apical growth pattern of the hyphae that ultimately result in hyphal swelling and the inhibition of fungal growth [26]. It must be stressed that the apical elongation patterns of fungal hyphae play an important role in the pathogenicity of endophytic fungi attacking plant tissues [27], representing therefore a potential target for fungal inhibition strategies.

The hyphae of *Curvularia* and *Fusarium* interacting with SR/B-16 also exhibited intense vacuolization, evidencing the presence of antifungal compounds of bacterial origin in their cytoplasm. It has been shown that vacuoles play an active role in the intracellular degradation of foreign compounds in the cytoplasm of eukaryotic cells [28]. The observed variations in the thickness and regeneration of the fungal cell wall have been interpreted as alternative growth patterns developed by the target fungi in the presence of SR/B-16. Together, these changes evidence that the pathogenicity of surviving fungi increases as part of their response to the biotic stress represented by their interaction with antagonistic bacteria and the metabolites they secrete [24]. A similar phenomenon was described for phytopathogenic strains of *F. oxysporum* and *Botrytis cinerea* when challenged with antagonistic isolates of *Pseudomonas* spp. [29]. However, it should be stressed that not every pathogenic fungus sits idly waiting to be “victimized” by a biocontrol agent, as many fungi develop counter measures conferring resistance to the antagonistic action of antagonistic bacteria, including the inactivation of inhibiting metabolites and the modifications of the structures serving as the target for these bacterial toxins [30]. Taking into account that antimicrobial peptides can easily cross the fungal cell wall thanks to their relatively low molecular weight [25], the thickening of cell walls noticed in *Curvularia gudauskasii* when interacting with SR/B-16 might represent a strategy of structural modification to create a physical barrier limiting the entry of lipopeptides into the hyphal cytoplasm.

An important element when evaluating the efficacy of biological control agents is their specificity [31]. The fungal growth inhibition mechanisms exhibited by SR/B-16 seem to be unspecific, as they target structures shared among all filamentous fungi and eukaryotic cells such as the cytoplasmic membrane, the cytoskeleton and the secretory apparatus [28]. Not surprisingly then, *B. subtilis* SR/B-16 has a wide antifungal spectrum that includes diseases caused by members of the *Fusarium* genus, such as *F. oxysporum*, whose main pathogenicity factor consists on the presence of a taxonomic category within the species, denominated *formae speciale* (f. sp.) [24]. *Formae speciale* are specific to each plant host, thereby providing these organisms with a huge potential for ecophysiological variability that limits considerably any attempts at chemical or biological control [32, 33].

16. do Vale M, Seldin L, de Araujo FF, de Lima R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. In: Maheshwari DK, editor. Plant growth and health promoting bacteria. Heidelberg: Springer; 2010. p. 21-43.

17. Ravensberg WJ. Experiences with bio-control agents in Europe: Commercial and regulatory overview. In: 7th International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Program and Abstract Book; Noordwijkerhout, The Netherlands; 2006. p. 15.

18. Borris R, Bochow H, Junge H. Use of *Bacillus subtilis*/amyloliquefaciens FZB strains for plant growth promotion and biocontrol. In: 7th International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Program and Abstract Book; Noordwijkerhout, The Netherlands; 2006. p. 15.

19. Kumar A, Prakash A, Johri BN. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. In: Maheshwari DK, editor. Bacteria in agrobiology: Crop ecosystems. Berlin: Springer; 2011. p. 37-59.

20. Orberá Ratón TM, Serrat Díaz MJ, González Giro Z. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. Fitosanidad. 2009;13(2):95-100.

21. Orberá Ratón T, González Giro Z, Serrat Díaz M. 16S rDNA partial sequence from aerobic endospore forming bacteria isolated from ornamental plants rhizosphere. 2010 Aug 30 [cited 2013 Jun 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ025917>

22. Orberá Ratón T, González Giro Z, Serrat Díaz M, Rodríguez Pérez S. *In vitro* growth inhibition of *Curvularia gudauskasii* by *Bacillus subtilis*. Ann Microbiol. 2012;62:545-51.

23. Kim YC, Leveau J, McSpadden Gardner BB, Pierson EA, Pierson LS 3rd, Ryu CM. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(5):1548-55.

24. Orberá Ratón TM. Bacterias rizosféricas de la clase *Bacilli* con potencialidades para la estimulación del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos [dissertation]. Oriente University; 2012.

25. Ongena M, Jacques P, Touré Y, Destain J, Jabrane A, Thonart P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. Appl Microbiol Biotechnol. 2005; 69(1):29-38.

26. Deora A, Hatano E, Tahara S, Hashidoko Y. Inhibitory effects of furanone metabolites of a rhizobacterium, *Pseudomonas jessenii*, on phytopathogenic *Aphanomyces cochlioides* and *Pythium aphanidermatum*. Plant Pathol. 2010;59(1):84-99.

27. Mendgen K, Hahn M, Deising H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. Annu Rev Phytopathol. 1996;34:364-86.

28. Bolsover SR, Hyams JS, Shephard EA, White HA, Wiedemann CG, editors. Cell Biology: A short course. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.

29. Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. Microbiol Mol Biol Rev. 2011;75(4):583-609.

The target spectra of biocontrol agents with broad host specificities can cover even entire orders, classes and even kingdoms [31]. In the case of SR/B-16, its antifungal activity *in vitro* encompassed several genera (*Fusarium*, *Curvularia* and *Colletotrichum*) and species of the fungal kingdom [34] that cause plant diseases among members of the *Rosidae* [35], *Asteraceae* [36], *Agavaceae* [37] and *Poaceae* [38] families. *B. subtilis* SR/B-16 can, therefore, be classified as a generalist species with a broad specificity for plant pathogens, thus representing an excellent candidate for the formulation of a bioinoculant based on its efficacy, ease of production at industrial scale and market appeal. Generalist microorganisms usually employ many different sources of nutrients and can easily switch their target host [31]. The presence of broad-spectrum antifungal activity in rhizospheric strains of *B. subtilis* has been described only recently [39, 40].

The main obstacle for determining target pathogen specificities in the case of biocontrol agents is the fact that most research on this topic has employed *in vitro* experiments, thus obviating two fundamental elements of the agricultural ecosystem: environmental conditions and the host plant. Many authors have acknowledged that the target pathogen specificities of microbial control agents under field conditions can be very different from those observed *in vitro* [31].

It is not uncommon to find variability in the target pathogen specificity of biocontrol agents, even within the same species [31]. Therefore, strong preference is given to the *in situ* selection of autochthonous strains in direct interaction with their intended targets [40] in order to maximize the efficacy of the isolated strains. Such is the case of strain SR/B-16. This bacterium can eliminate pathogenic fungi by both direct competition for nutrients in the same ecological niche and the excretion of antifungal metabolites [23]. Its ability to form endospores, which confers this strain the capacity to survive adverse environmental conditions, enables SR/B-16 to tolerate edaphoclimatic variation and even persist at low population densities [41].

Thanks to the broad specificity for target pathogens exhibited by SR/B-16 during *in vitro* studies, the commercial appeal of this candidate biopesticide equals or surpasses that of equivalent broad-range chemical formulations. From an industrial viewpoint, the production of a bioinoculant from this bacterium is more cost-effective, and the ease of application of such a product makes it appealing to the farmers [31], who can effortlessly integrate it into existing pest control programs for commercial crops.

The interactions established between different microorganisms in a complex environment such as that of the plant rhizosphere are decisive for the success of bioinoculants in agricultural ecosystems [42]. Biological control agents are exposed to competition and antagonism from the endogenous microbiota, which can dramatically diminish their population densities and affect the physiological activity of the inoculant [43]. In turn, the introduction of exogenous microorganisms to agricultural soils may damage their ecological equilibrium, affecting local microbial populations that are actually beneficial to crop production. *In vitro*, *Bacillus subtilis* SR/B-16 inhibits over 60 % of

the growth of many different phytopathogenic fungi, and exhibits an antagonist effect to Gram-negative bacteria [22]. In addition, excessive amounts of even a properly chosen inoculant may favor disproportionately the growth of this exogenous population, which competes with the endogenous microbiota for nutrients, oxygen and physical space [44]. When combined with the broad inhibitory spectrum of SR/B-16, such a combination of circumstances may damage the agricultural ecosystem. This disadvantage is minimized, however, if this bacterium is applied to crops cultured in artificial, low-organic-matter substrates poor in endogenous microflora, such as hydroponics.

B. subtilis SR/B-16 can also be employed for the biological control of oomycetes, which cause a number of very common and also emerging plant diseases constituting a serious threat to food security in several countries [1]. This is a very important finding, as the antifungal activity of many other well-known strains is based on the secretion of chitinases, making them totally ineffective against oomycetes due to the lack of chitin in the cell walls of the latter. The structures targeted by SR/B-16 and its antifungal metabolites reside within the fungal cell, conferring this bacterium a significant advantage for the treatment of diseases caused by members of the *Phytophthora* and *Pythium* genera in some very important crops, such as corn and potato [41, 42]. Previous studies have demonstrated that lipopeptides produced by the endophytic fungus *Acremonium* spp. have an antagonistic effects on *Pythium ultimum* [44], and a strain of the tobacco pathogen *Phytophthora nicotianae* was recently shown to be sensitive *in vitro* to bacteria of the species *Bacillus alitudinis*, *Bacillus licheniformis* and *Brevibacillus* spp. [45], all phylogenetically close to *B. subtilis* [46].

The data available so far indicate that *B. subtilis* SR/B-16 is an excellent candidate agent for the biological control of pests affecting commercially relevant crops, as it interferes with the elements of the disease triangle. This last is a simple model describing the interactions between pathogen, host and the environment [41]. Plant growth-promoting rhizobacteria may influence any of these three elements, thereby modulating the course of an infectious disease due to their multiple effects.

As explained above, strain SR/B-16 directly inhibits the growth of phytopathogenic fungi through the excretion of antifungal compounds, while concurrently favoring the development of the host by increasing the availability of nitrogen and phosphorous in the soil through the degradation of urea [20] and the solubilization of calcium phosphate [24]. These properties confer this bacterium an advantage in the biological control of diseases caused by opportunistic phytopathogens that are associated with nutritional deficiencies. One example is the fungus *Cercospora* spp., which attacks adult coffee plants under conditions of nitrogen limitation [41], and whose effects can be eliminated by increasing the ureolytic activity of several bacterial species of the rhizosphere, similar to SR/B-16 [20].

B. subtilis SR/B-16 also secretes lytic enzymes (cellulases and pectinases) [24] enabling this bacterium to obtain nutrients from decaying plant matter in the soil, which it uses as a source of carbon and

30. Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytol. 2003;157:493-502.

31. Brodeur J. Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. Evol Appl. 2012;5(5):470-80.

32. Azor M, Cano J, Gené J, Guarro J. High genetic diversity and poor *in vitro* response to antifungals of clinical strains of *Fusarium oxysporum*. J Antimicrob Chemother. 2009;63(6):1152-5.

33. Blackwell M, Spatafora JW. Fungi and Their Allies. In: Mueller GM, Bills GF, Foster M, editors. Biodiversity of Fungi: Standard Methods for Inventory and Monitoring. New York: Academic Press; 2004. p. 7-21.

34. Goody J. The culture of flowers. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.

35. Sorensen PD. Revision of the genus *Dahlia* (Compositae, Heliantheae-Coreopsidinae). Rhodora. 1969;71:309-416.

36. World Checklist of Selected Plant Families: Royal Botanic Gardens [Internet]. Richmond: Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew; c2013 [cited 2013 Jun 13]. Available from: <http://apps.kew.org/wcsp/home.do>

37. Hussain A, Khan ZI, Ghafoor MY, Ashraf M, Parveen R, Rashid MH. Sugar-cane, sugar metabolism and some abiotic stresses. Inter J Agric Biol. 2004;6(4):732-42.

38. Matar SM, El-Kazzaz SA, Wagih EE, El-Diwayn AI, Moustafa HE, Abo-Zaib GA, et al. Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi. I. Biotechnology. 2009;8(1):53-61.

39. Li J, Yang Q, Zhao LH, Zhang SM, Wang YX, Zhao XY. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. J Zhejiang Univ Sci B. 2009;10(4):264-72.

40. Yacizi S, Yanar Y, Karaman I. Evaluation of bacteria for biological control of early blight disease of tomato. Afr J Biotechnol. 2011;10(9):1573-7.

41. Peterson RKD, Higley LG, editors. Biotic stress and yield loss. New York: CRC Press; 2001.

42. Lévesque CA, Brouwer H, Cano L, Hamilton JP, Holt C, Huitema E, et al. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. Genome Biol. 2010;11(7):R73.

43. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Ann Rev Microbiol. 2009;63:541-56.

44. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nat Rev Microbiol. 2010;8(1):15-25.

45. Kamoun SA. Catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. Annu Rev Phytopathol. 2006;44:41-60.

46. Jin F, Ding Y, Ding W, Reddy MS, Dilantha WG, Du B. Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere. Int J Mol Sci. 2011;12(5):3055-71.

47. Ongena M, Jaques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant

energy [5]. In soils rich in organic matter, such as the artificial ecosystems created in organoponic units, the application of SR/B-16 formulations may stimulate the growth of its populations in the rhizosphere, as well as its antagonist effects, contributing to disease control and plant growth promotion.

Directions for future research on *B. subtilis* SR/B-16

Three main questions concerning the physiology of *B. subtilis* SR/B-16 remain to be addressed: 1) whether one of the mechanisms through which it exerts its biological control over phytopathogens is the stimulation of mechanisms of induced resistance in the host plant; 2) a thorough characterization of its capacity for colonizing the rhizosphere and the endophytic environment of commercial crops (rhizocompetence) and 3) the efficacy of this bacterium in the biological control of plant diseases under field conditions, where SR/B-16 establishes complex relationships to other microbial populations inhabiting the rhizosphere and many other plant species.

Bacterial lipopeptides have previously been shown to activate mechanisms of induced resistance in plants [5] and, as mentioned above, one of the possible modes of action explaining the *in vitro* effect of SR/B-16 on phytopathogenic fungi is indeed the excretion of this type of compounds. The morphophysiology of SR/B-16 enables it to colonize the rhizosphere: it is shaped as a bacillus, is motile, and forms biofilms when cultured on nutritive media [24]. These characteristics confer SR/B-16 a larger metabolic rate and growth speed, facilitating chemoattraction in the rhizospheric environment and aggregation into more complex biofilms. Motility, in particular, is a physiological attribute that enhances the competitiveness of *Pseudomonas* spp. in rhizospheric biofilms [47]. Biofilm formation is a fundamental requirement for bacterial colonization in the rhizosphere, as it increases the

concentration of antimicrobial metabolites excreted by member bacteria, forming a physical and chemical barrier to the entry of pathogens into root tissues [48].

The studies on SR/B-16 as a biological control agent for fungal plant diseases are not circumscribed to providing data on the *in vitro* interactions of this bacterium with phytopathogenic fungi [20, 22], but also illustrate how pest control depends on the simultaneous interaction of different biotic and abiotic elements in the environment [23]. Using *B. subtilis* SR/B-16 and its extracellular products for the development of bioinoculants requires more experimental data to properly assess its practical benefits in the biological control of fungal crop diseases. In addition, a large scale process for producing SR/B-16-based inoculants with a consistent and dependable effect under field conditions is yet to be developed, not to mention that the selection of the adequate microorganism and the optimization of its culture conditions must take into account the physical media to be used for their storage and release [49]. It must be noticed, nevertheless, that SR/B-16 is an endospore-forming organism, which confers it a considerable advantage for the formulation, storage, preservation and application of biopesticides manufactured from this bacterium.

The USA alone spends over 5000 million dollars each year on fungicidal compounds for corn, soy, wheat, potato, coffee and rice [50], and the expenditure on seeds and biopesticides has doubled in the last two years [51]. These facts illustrate the need to develop plant growth promotion strategies that rely not on one, but several mechanisms, as done by members of the *Bacillus* spp. genus [52, 53]. The potential advantages of *B. subtilis* SR/B-16 make it, therefore, a prime candidate for integration into prioritized actions for the careful design of strategies for increasing crop yields in a sustainable manner while decreasing agricultural production costs and gradually eliminating the use of chemical pesticides [51].

disease biocontrol. Trends Microbiol. 2008;16(3):115-25.

48. Schmidt TR, Scott EJ II, Dyer DW. Whole-genome phylogenies of the family Bacillaceae and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. BMC Genomics. 2011;12:430-46.

49. Malusá E, Sas-Paszczak L, Ciecielska J. Technologies for beneficial microorganism inocula used as biofertilizers. ScientificWorldJournal. 2012;2012:491206.

50. Chakraborty S, Tiedemann AV, Teng PS. Climate change: potential impact on plant diseases. Environ Poll. 2000;108(3):317-26.

51. Vurro M, Bonciani B, Vannacci G. Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: impact on agriculture and socio-economic consequences. Food Sec. 2010;2(2):113-32.

52. Mousa WK, Raizada MN. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. Front Microbiol. 2013;4:65.

53. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia MP. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Gen Mol Biol. 2012; 35(4 Suppl):1044-51.

Received in January, 2013.

Accepted in June, 2013.