

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BIOCONTROL DE ESPECIES DE *Bacillus* FRENTE AL HONGO FITOPATÓGENO *Penicillium expansum*

L.E. Girod¹, M.N. Morelli², R.J. Leonardi², M.V. Tschopp³

¹ Grupo de Ingeniería de Bioprocesos (GiiB), Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB), Laboratorio de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina (lucasezequieli@unl.edu.ar).

² Grupo de Ingeniería de Bioprocesos (GiiB), Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina.

³ Laboratorio de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina.

Los hongos fitopatógenos y toxicogénicos representan una problemática importante para la agricultura, ya que ocasionan pérdidas significativas en los cultivos. Frente a las limitaciones de los fungicidas químicos convencionales, la implementación de plataformas basadas en bacterias del género *Bacillus* surge como una alternativa prometedora. En este trabajo, se analizó mediante ensayos de antagonismo la capacidad de distintas cepas de *Bacillus* para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos de interés agrícola.

Palabras clave: *Bacillus*; hongos fitopatógenos; prueba de antagonismo; enfrentamientos duales.

INTRODUCCIÓN

El género *Bacillus* comprende bacterias formadoras de endosporas resistentes al calor, descritas inicialmente por Cohn en 1872. Sus miembros presentan morfología bacilar, son generalmente aerobios, aunque algunas especies pueden comportarse como anaerobias facultativas, y suelen clasificarse como Gram positivas, si bien en ciertos casos pueden presentar tinción Gram variable. Además, muchas especies poseen movilidad y una elevada capacidad de persistencia ambiental asociada a la formación de esporas. Estas bacterias pueden aislarse de diversos ambientes, incluyendo suelo, rizósfera y tejidos vegetales, así como también de alimentos, muestras clínicas y veterinarias. (Logan y De Vos, 2009).

Gracias a diversos mecanismos, directos e indirectos, presentan la capacidad de actuar como agentes de biocontrol frente a hongos fitopatógenos y toxicogénicos. Dentro de los mecanismos directos podemos encontrar la producción de metabolitos antimicrobianos, como lipopéptidos (iturinas, surfactinas, fengicinas) y sideróforos que inhiben el crecimiento de especies fúngicas como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis* o *Rhizoctonia*; la síntesis de enzimas líticas como β -1,3-glucanasa y proteasas que degradan la pared celular fúngica; la

competencia por nutrientes como el hierro; y la liberación de compuestos orgánicos volátiles con efecto fungistático (Li et al., 2023; Li et al., 2026). Indirectamente, especies como *B. subtilis* pueden inducir resistencia sistémica en plantas (ISR), activando rutas defensivas que reducen la incidencia de enfermedades y, en ciertos casos, la acumulación de micotoxinas asociadas a hongos toxicogénicos como *Aspergillus flavus* o *Fusarium graminearum*. Además, muchas cepas bacilares ejercen efectos promotores del crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas, la solubilización de nutrientes y la mitigación del estrés abiótico, que favorece de esta manera la persistencia y eficacia en condiciones de campo. Estas características hacen que las especies de *Bacillus* se conviertan en una herramienta biotecnológica clave en el manejo integrado de plagas y la reducción de riesgos por micotoxinas en sistemas agrícolas (Li et al., 2023).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antifúngica de distintas cepas de *Bacillus* de interés biotecnológico, considerando su potencial para inhibir o disminuir el crecimiento de hongos filamentosos. Como modelo fúngico se utilizó *Penicillium expansum*, un patógeno de relevancia en poscosecha, asociado principalmente al deterioro de frutas durante

el almacenamiento (Coelho et al., 2011). La capacidad antagonista in vitro fue evaluada mediante ensayos de enfrentamiento en cultivos duales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos batch de *Bacillus*.

Para estudiar la cinética de crecimiento característica de especies del género *Bacillus*, se seleccionó la cepa *B. velezensis* y se realizaron cultivos en modalidad batch. Estos ensayos tuvieron como finalidad generar información de base para una futura etapa de propagación a mayor escala, orientada a aplicaciones en campo.

Los cultivos se realizaron en frascos Schott de 2 L. El primer frasco contenía 1 L de medio líquido Luria-Bertani (LB), mientras que el segundo fue suplementado con 5 g/L de glucosa. La composición base del medio LB fue: peptona de carne (10 g/L), NaCl (10 g/L) y extracto de levadura (5 g/L). Ambos cultivos se incubaron a 30 °C bajo condiciones aeróbicas, empleando una bomba de acuario para la aireación y manteniendo agitación constante.

Para la preparación del inóculo, se transfirieron colonias de *Bacillus velezensis* obtenidas desde cultivos en placa hacia 100 mL de medio LB. El cultivo se incubó en un agitador orbital a 30 °C y 170 rpm durante 24 h. Posteriormente, el cultivo batch (contenido en frascos Schott) fue inoculado bajo condiciones de estricta asepsia utilizando un volumen de 40 mL de dicho preinóculo, lo que representó una dilución de 1/25. Previo a la transferencia, se determinó la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) del inóculo para establecer, por cálculo de dilución, la DO_{600} teórica a tiempo cero (t_0), la cual se situó en un rango de 0,035 a 0,048.

Para construir la curva de crecimiento, se realizó el seguimiento de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) en función del tiempo. Las muestras se tomaron a intervalos regulares durante las primeras horas y se realizó una medición final a las 25 h en condiciones de esterilidad. En cada punto de muestreo se obtuvieron muestras por triplicado técnico, tomando 1 mL de muestra en cada caso, las cuales fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 5 min. Luego se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 1 mL de agua destilada, con el fin de reducir posibles interferencias del medio de cultivo en la medición espectrofotométrica. Finalmente, se cuantificó la absorbancia a 600 nm, realizando diluciones en caso de ser necesario, y con los datos obtenidos se construyó la curva de crecimiento, expresada como DO_{600} en función del tiempo de cultivo.

Tratamiento de las cepas de *Bacillus* utilizadas en ensayos duales.

Las cepas de *Bacillus* utilizadas en los ensayos de antagonismo se detallan en la Tabla 1. Inicialmente, las bacterias fueron cultivadas en placas de Petri con agar nutritivo (AN), aplicando el método de cinco estrías, con el objetivo de obtener cultivos axénicos y colonias aisladas.

Una vez verificada la pureza del cultivo, se tomó una colonia bacteriana con ansa estéril y se realizó un repique en tubos Falcon de 50 mL conteniendo 5 mL de medio líquido LB. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h, con agitación constante a 130 rpm.

Finalizado el período de incubación, los tubos fueron agitados en vórtex para resuspender la biomasa celular. En condiciones de esterilidad, se tomó 1 mL de cultivo y se transfirió a tubos Eppendorf. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en agua destilada estéril, con el fin de remover componentes residuales del medio de cultivo.

Finalmente, una alícuota de la suspensión celular fue transferida a tubos conteniendo solución fisiológica estéril y se ajustó la turbidez al patrón 0,5 de la escala de McFarland, equivalente aproximadamente a 10^8 UFC/mL. Estas suspensiones bacterianas estandarizadas se utilizaron luego en los ensayos de enfrentamientos con hongos.

Tabla 1. Especies y cepas de *Bacillus* utilizadas

Especie de <i>Bacillus</i>	Cepa
<i>B. velezensis</i>	B019B
<i>B. licheniformis</i>	B254
<i>B. licheniformis</i>	B335
<i>B. paralicheniformis</i>	B344A
<i>B. licheniformis</i>	B344B
<i>B. licheniformis</i>	B346A
<i>B. licheniformis</i>	B346B
<i>B. licheniformis</i>	B349
<i>B. licheniformis</i>	B350
<i>B. paralicheniformis</i>	B354A
<i>B. paralicheniformis</i>	B354B
<i>B. paralicheniformis</i>	B361
<i>B. subtilis natto</i>	-

Tratamiento de los aislamientos fúngicos.

Los hongos se encontraban conservados en tubos que contenían medio sólido agar papa dextrosa (APD) en pico de flauta. Por método de siembra de toques se sembraron en placas de Petri que contenían medio sólido APD, realizando tres toques equidistantes entre sí. Se cultivaron durante 7 días a $25 \pm 0,5$ °C bajo ciclos alternos de luz (16 h de luz y 8 h de oscuridad).

Siembra para ensayos de dualidad.

Se prepararon placas de Petri de 90 mm de diámetro, colocando en ellas un volumen de 10 mL de medio de cultivo sólido APD. Se realizaron duplicados por cada cepa de *Bacillus* ensayada. Se marcó el centro de la placa y alrededor del mismo, a 20 mm de distancia, y equidistantes entre sí, se efectuaron 8 siembras de las suspensiones de bacterias estandarizadas, colocando 5 μ L de la misma muestra por placa. Las placas se invirtieron, quedando con la tapa hacia abajo, una vez que la suspensión bacteriana fue absorbida por el agar. Posteriormente, mediante el uso de un ansa-aguja estéril, se transfirieron discos de micelio y agar del centro de la colonia fúngica hacia el centro de nuevas placas de Petri, posicionándolos sobre una marca de referencia preestablecida. Esta manipulación se efectuó manteniendo las placas en posición basal (con la tapa hacia arriba) para evitar la dispersión aérea de los conidios. En paralelo, se dispusieron placas control inoculadas únicamente con el hongo fitopatógeno, en ausencia de *Bacillus*, bajo idénticas condiciones de incubación.

Condiciones de cultivo dual.

Para el cultivo de las placas se utilizó una temperatura de $25 \pm 0,5$ °C, bajo ciclos de luz oscuridad (16 h/8 h) por un período de 15 días en donde se realizaron las medidas pertinentes.

Medidas del crecimiento fúngico.

Con una regla milimetrada se tomaron medidas del diámetro (D) del halo formado por la colonia fúngica, a partir de dos medidas perpendiculares entre sí que atravesaban el centro de la colonia, y el valor se expresó como el promedio de ambas medidas. Estas medidas fueron tomadas a los 2, 5, 7, 9, 12 y 14 días de iniciado el experimento.

Cuantificación del grado de inhibición.

Para expresar los resultados obtenidos se utilizó una fórmula matemática que denota el porcentaje de inhibición que representa cada *Bacillus* sobre la colonia del hongo.

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \left[\frac{(D.C.C - D.C.P)}{D.C.C} \right] * 100 \quad (1)$$

Donde:

D.C.C = Diámetro (mm) de la colonia control.

D.C.P = Diámetro (mm) de la colonia fúngica en presencia de la bacteria estudiada.

Cabe aclarar que esos porcentajes máximos de inhibición no fueron todos a día 14 de iniciado el experimento, sino que fue variando dependiendo la cepa, siendo:

- A día 5: B354A y B354B.

- A día 7: B254, B344B, B346A, B346B, B350 y B361.

- A día 9: B335 y B349.

- A día 14: B019B, B344A y natto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curva de crecimiento de *B. velezensis*.

La Figura 1 muestra la evolución de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) en función del tiempo, empleada como estimador del crecimiento celular y la acumulación de biomasa de *Bacillus sp.*

Durante las primeras 5 horas, ambos cultivos presentan una fase de latencia y un inicio de fase exponencial idénticos, independientemente de la presencia de glucosa. Esto indica que en las etapas iniciales el consumo energético se sustenta principalmente sobre los componentes basales del medio LB (aminoácidos y péptidos). A partir de la hora 5, se evidencia el efecto de la fuente de carbono adicional. El cultivo suplementado con glucosa experimenta un incremento notable en la pendiente aparente de crecimiento en comparación con el medio base. Cerca de la hora 9, se observa una inflexión en las pendientes de ambas curvas. Para el medio LB base, este punto marca el inicio de la fase estacionaria (saturación), estabilizándose en una DO_{600} cercana a 2. Por el contrario, el cultivo con glucosa continúa incrementando su biomasa de manera sostenida hasta las 25 horas, alcanzando una DO_{600} final de aproximadamente 6,5, lo que representa un aumento de más de tres veces respecto al medio estándar. Este comportamiento coincide con lo descrito por Zhang et al. (2025), quienes demostraron que la optimización y suplementación de fuentes de carbono asimilables en cultivos batch de *Bacillus velezensis* es una estrategia fundamental para alcanzar altas densidades celulares con miras a su producción comercial.

La respuesta observada al agregado de glucosa aporta información preliminar para la optimización del medio de cultivo y para una potencial etapa de propagación de biomasa destinada a bioinsumos agrícolas. Sin embargo, estos resultados deben considerarse como una base inicial, que requiere ser complementada con el seguimiento de sustratos y otros parámetros de cultivo en futuros ensayos.

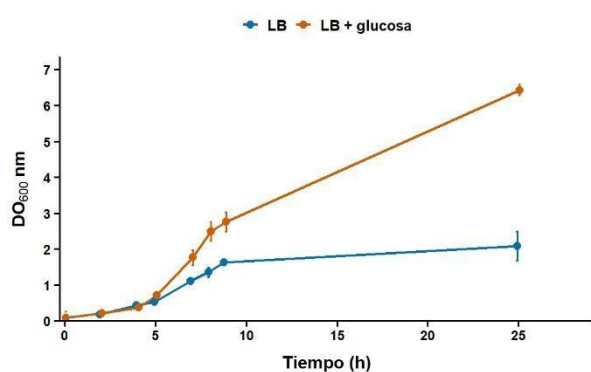


Figura 1. Curva de crecimiento microbiano.

Observación visual de los ensayos duales.

A través de una observación visual a medida que el tiempo de experimento transcurría pudimos constatar que la técnica era factible para determinar si los *Bacillus* producen o no un efecto inhibitorio sobre el hongo filamentoso al cual lo estábamos enfrentando. La metodología de siembra de los hongos resultó adecuada, no provocando una diseminación masiva de los conidios por toda la placa.

En las figuras presentadas tenemos un caso de enfrentamiento que resultó positivo para la inhibición, lo cual se puede observar al comparar las dos primeras imágenes (Figura 2). En primera instancia, tenemos la comparativa entre los controles y un enfrentamiento entre *P. expansum* con la cepa B019B, transcurridos 7 días de comenzado el ensayo (Figura 2). La otra comparativa es el mismo ensayo, pero transcurridos 14 días de haber comenzado con el mismo (Figura 3). Por último, se observa un ensayo el cual visualmente no podemos ver si ocurrió algún tipo de inhibición por parte de nuestra cepa de *Bacillus* (Figura 4).

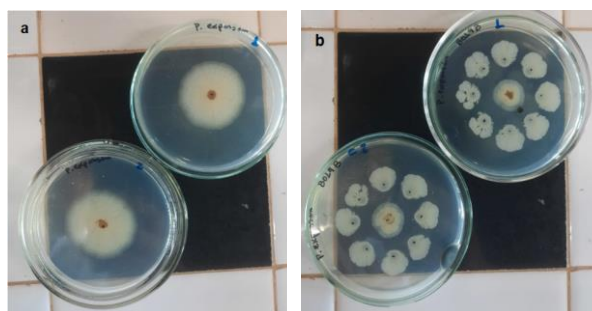


Figura 2. (a) Controles (Fecha: 08/04/26) (b) Enfrentamiento con B019B (Fecha: 08/04/26)

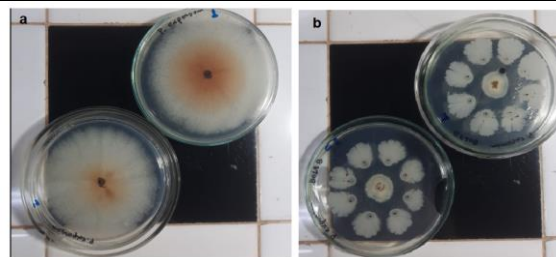


Figura 3. (a) Controles (Fecha: 15/04/26) (b) Enfrentamiento con B019B (Fecha: 15/04/26).

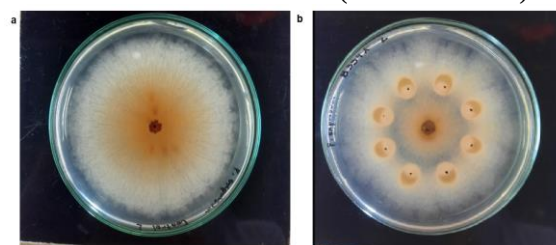


Figura 4. (a) Control (Fecha: 06/05/26). (b) Enfrentamiento con B354A (Fecha: 06/05/26).

Cálculos de inhibición.

A partir del seguimiento del diámetro de la colonia fúngica se estimó el porcentaje de inhibición asociado a cada cepa de *Bacillus*. Dado que los valores máximos no se registraron en el mismo día para todas las cepas, los resultados de la Figura 5 deben interpretarse como la inhibición máxima observada durante el ensayo y no como una comparación directa en un mismo tiempo experimental.

En este contexto, B019B fue la cepa con mayor efecto inhibitorio, alcanzando un 75 % de inhibición frente a *P. expansum*. Este marcado potencial antagonista concuerda con lo reportado por Xu et al. (2025), quienes demostraron que *Bacillus velezensis* exhibe una fuerte actividad antifúngica de amplio espectro frente a *Penicillium expansum* mediante la disrupción de la integridad de la membrana celular fúngica e inducción de apoptosis celular. B344A presentó una inhibición menor, cercana al 10 %, por lo que podría considerarse un candidato preliminar para nuevas evaluaciones. En el caso de B354B, si bien se registró un valor máximo de 41,9 %, este no fue consistente con la tendencia observada en el resto del ensayo, por lo que debería considerarse un resultado atípico hasta ser confirmado mediante nuevas repeticiones.

Los restantes valores de inhibición, si bien moderados, representan un efecto antagonista positivo que reviste interés biológico. Esta respuesta debe contextualizarse considerando que el medio de cultivo empleado favorece selectivamente el desarrollo fúngico por sobre el bacteriano. Si bien se constató la viabilidad celular de las cepas de *Bacillus*, se postula que las

limitaciones nutricionales del medio podrían condicionar o reprimir la biosíntesis y secreción de los metabolitos secundarios o enzimas con actividad antifúngica.

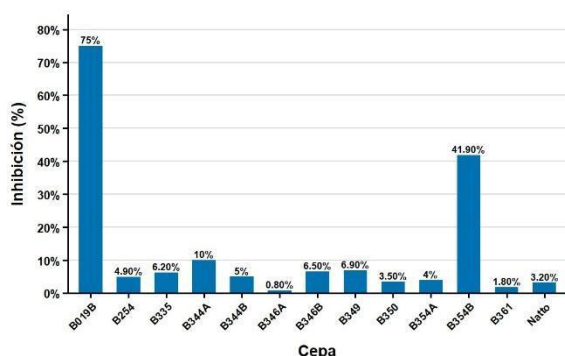


Figura 5. Inhibiciones máximas observadas en el ensayo

CONCLUSIONES

El ensayo en medios de cultivo LB y LB suplementado con glucosa, bajo condiciones de aireación y agitación constante, permitió obtener información preliminar sobre la dinámica de crecimiento de *B. velezensis*. Estos datos constituyen una base para futuros estudios de propagación y escalado, en los que será necesario incorporar el seguimiento de sustratos, la determinación de parámetros cinéticos y la evaluación de otros modos de operación, como cultivos fed-batch. Asimismo, se propone explorar medios de cultivo de bajo costo procedentes de subproductos o residuos agroindustriales.

El examen visual del cultivo dual demostró la adecuación del protocolo de siembra, el cual evitó la dispersión aérea de conidios en la superficie del medio. Para avanzar hacia condiciones más representativas de escenarios reales, se sugiere implementar medios de cultivo alternativos que emulen mejor el entorno natural de interacción entre los microorganismos y permitan evaluar el desempeño antagonista en condiciones más cercanas a las de aplicación. En este sentido, autores como Kamali et al. (2022) destacan que para comprender el verdadero potencial biocontrolador de las especies de *Bacillus* es crucial simular las condiciones de su nicho ecológico, ya que la síntesis de metabolitos secundarios clave a menudo requiere de estímulos y señales químicas presentes únicamente en entornos naturales.

En conjunto, los ensayos de antagonismo permitieron identificar a B019B, correspondiente a *Bacillus velezensis*, como el candidato más sólido para futuros estudios de biocontrol frente a *P. expansum*. Por su parte, B344A, identificado como *Bacillus paralicheniformis*, mostró actividad inhibitoria menor

y puede considerarse un candidato preliminar para nuevas evaluaciones. Dado que los ensayos fueron realizados *in vitro*, estos resultados requieren ser validados frente a otras especies de hongos filamentosos perjudiciales para cultivos agrícolas y bajo condiciones experimentales más próximas a la aplicación. Además, será necesario realizar ensayos de screening para determinar qué metabolitos o mecanismos producidos por estas cepas de *Bacillus* podrían estar involucrados en la inhibición del crecimiento fúngico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto “Desarrollo de un Bioinsumo Innovador para el Tratamiento Sostenible de Semillas de Soja, IO_200”, financiado mediante el instrumento “Proyectos de Investigación Orientada (IO) 2025, Modalidad A” de la Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTeI) de la Provincia de Santa Fe. Su aporte económico resultó fundamental para el desarrollo de las líneas de investigación vinculadas al presente trabajo.

Se agradece a la Universidad Nacional del Litoral (UNL), en especial a los Laboratorios de Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB) y de Microbiología General de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) y a todas las personas involucradas en el trabajo.

REFERENCIAS

- COELHO, A. R.; NÓBREGA, G. M. A.; PAGNOCCA, F. C.; HOFFMANN, F. L.; HARADA, K.; HIROOKA, E. Y. Avaliação do potencial antagonico de leveduras, visando biocontrole de deterioração por *Penicillium expansum*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, supl. 1, p. 1879-1892, 2011. DOI: 10.5433/1679-0359.2011v32Supl1879.
- KAMALI, M.; GUO, D.; NAEIMI, S.; AHMADI, J. Perception of Biocontrol Potential of *Bacillus inaquosorum* KR2-7 against Tomato Fusarium Wilt through Merging Genome Mining with Chemical Analysis. **Biology**, [S.L.], v. 11, n. 1, art. 137, jan. 2022. MDPI. DOI: 10.3390/biology11010137.
- LI, G.; REN, X.; GUO, C.; XU, B.; DOU, X. Interaction Between *Bacillus subtilis* and *Trichoderma citrinoviride*: Synergistic Inhibition of *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin B1 Production. **Toxins**, Basel, v. 18, n. 3, art. 119, 2026. DOI: 10.3390/toxins18030119.

LI, Y.; ZHANG, X.; HE, K.; SONG, X.; YU, J.; GUO, Z.; XU, M. Isolation and Identification of *Bacillus subtilis* LY-1 and Its Antifungal and Growth-Promoting Effects. **Plants**, Basel, v. 12, n. 24, art. 4158, 2023. DOI: 10.3390/plants12244158.

LOGAN, N. A.; DE VOS, P. Genus *Bacillus*. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2009. v. 3, p. 21-128.

XU, Y.; ZHU, H.; LIU, W.; WANG, M.; TANG, X.; MIAO, M. *Bacillus velezensis* A4 Against Fungal Pathogens via Membrane Integrity Disruption and Cellular Dysfunction in Fungal Pathogens. **Journal of Fungi**, [S.L.], v. 11, n. 12, art. 851, dec. 2025. MDPI. DOI: 10.3390/jof11120851.

ZHANG, L.; AHMAD, T.; RU, Z.; LIU, Y. Optimization of fermentation conditions for *Bacillus velezensis* strain to achieve high-cell-density culture. **Agrobiological Records**, [S.L.], v. 22, p. 89-96, 2025. DOI: 10.47278/journal.abr/2025.051.