

# MANUAL DE LABORATORIO

## AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS A PARTIR DE SUELO CON POTENCIAL ANTAGÓNICO A *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

Liliana Aragón Caballero, María del Carmen Gonzales, Ángel Alfonso Palomo Herrera

### Introducción

En el suelo existen numerosas bacterias y hongos que actúan como antagonistas naturales de fitopatógenos, es decir, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y la actividad de organismos que causan enfermedades en las plantas. Entre éstas se reportan algunas especies de bacterias del género *Pseudomonas*, conocidas por su capacidad de producir una amplia variedad de compuestos antimicrobianos antibióticos y enzimas hidrolíticas que pueden inhibir el crecimiento de los fitopatógenos. Las bacterias del género *Bacillus* reconocidas por su actividad antagónica contra fitopatógenos produciendo antibiosis, enzimas quitinolíticas y péptidos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas. Pero también hongos como *Trichoderma* o *Gliocladium*.

El cuadro 1 muestra brevemente una descripción de todos los procesos a realizar, para obtener microorganismos antagónicos (hongos y bacterias) a partir del suelo para el control de *Fusarium oxysporum* fsp. *cubense*, iniciando desde la selección de campos hasta el desarrollo de formulaciones comerciales para su uso en campo.

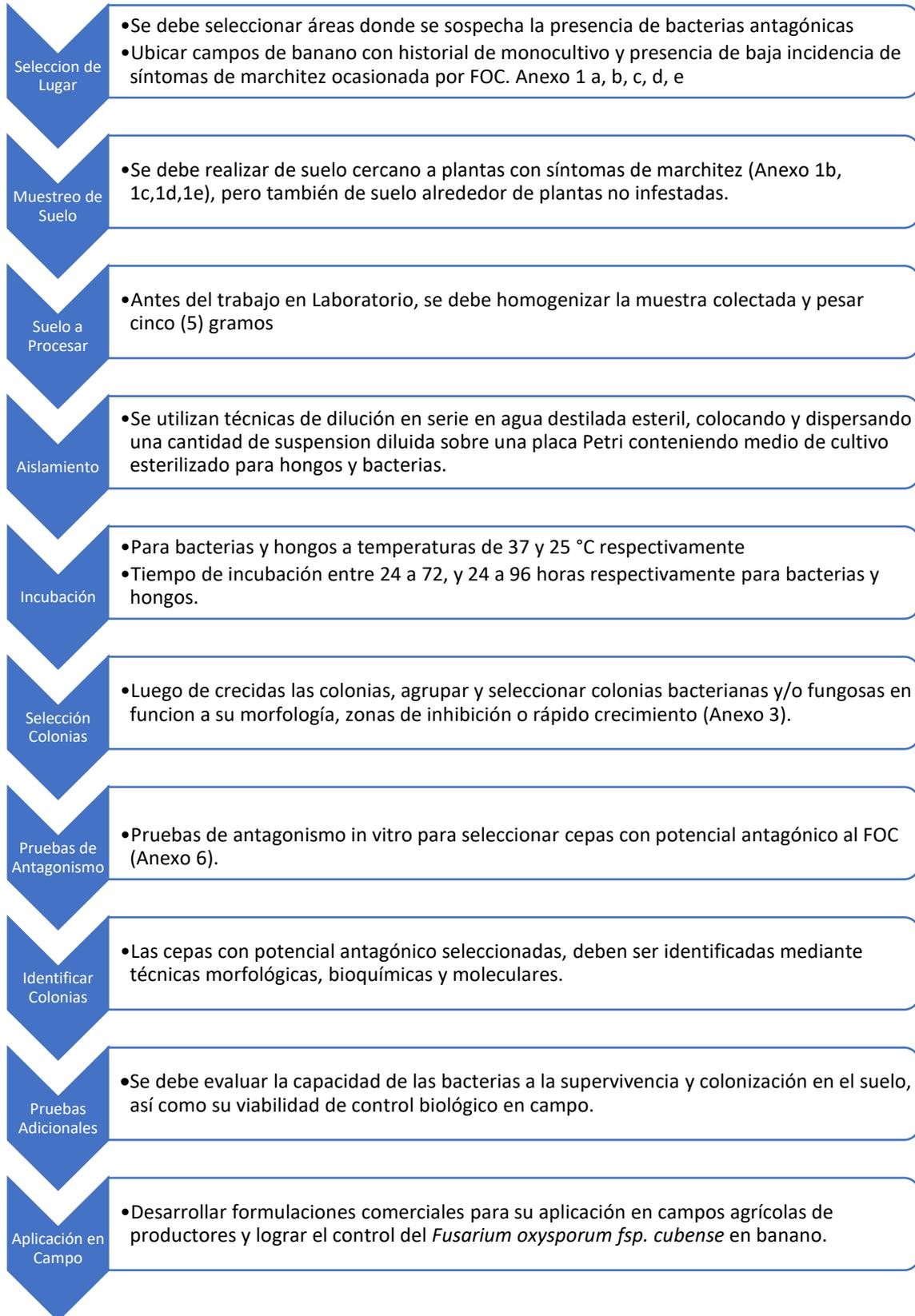
El objetivo del presente manual busca describir los procedimientos realizados en laboratorio para el aislamiento y purificación, a partir del suelo, de colonias fungosas y bacterianas antagónicas a fitopatógenos, además de su conservación para posteriormente realizar el procedimiento en las pruebas de enfrentamiento in vitro dentro del Proyecto “Establecimiento de un sistema de alerta para *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* en el cultivo de Banano y estrategias de mitigación de la enfermedad. A continuación, se describe el procedimiento:

### Procedimiento para el Aislamiento y Conservación de Hongos y Bacterias de Suelo en Laboratorio.

Las muestras de suelo obtenidas del campo y zona de interés deberán trabajarse preferiblemente después del muestreo, caso contrario se deben almacenar en refrigeración entre 4 a 6 °C, considerando que mayor tiempo de almacenamiento disminuirá las probabilidades de obtención de los microorganismos deseados.

En todo trabajo en laboratorio, debe priorizarse la asepsia en el proceso de aislamiento de microorganismos para evitar posibles contaminaciones. Se sugiere siempre considerar el uso de mandiles y guantes, así como los materiales de laboratorio a utilizar deben estar esterilizados y preferiblemente realizar la labor cerca de un mechero encendido para reducir posibles riesgos de contaminación.

## Cuadro 1: Breve descripción del desarrollo para la obtención de Bacterias y Hongos antagonísticos a *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*



## 1. Preparación de la Muestra de Suelo

Homogenizar las muestras colectadas y pesar 5 gramos para posteriormente realizar el aislamiento.

En función a la disponibilidad de materiales de laboratorio, se puede considerar menor o mayor cantidad de suelo a procesar.

Placas Petri de mayor tamaño (9 cm) requieren de mayor disponibilidad de medios de cultivo y espacio en incubadoras, pero pueden lograr obtener más colonias de microorganismos. Placas de menor tamaño (4 cm) permiten ahorro en medios de cultivo y requieren menor espacio a costa de procesar menor cantidad de muestras de suelo.

## 2. Aislamiento de microorganismos

Este procedimiento se debe realizar preferiblemente dentro de la cámara de siembra de bioseguridad biológica.

Podemos dividir este proceso en 3 etapas: Diluciones seriadas, siembras por extensión e incubación.

### *2.1. Diluciones seriadas para aislamiento de bacterias y hongos a partir de suelo*

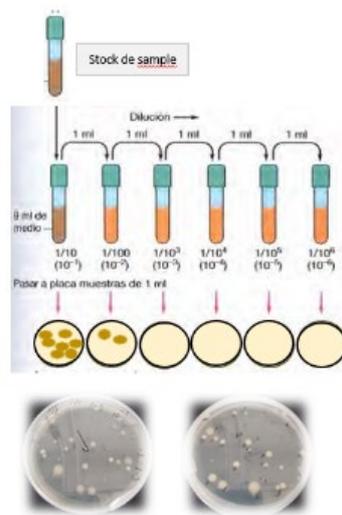
Las diluciones seriadas se realizan con el objetivo de disminuir la carga microbiana en cada dilución, de modo que podamos evitar placas de siembras con elevada carga microbiana donde no se pueden aislar, separar y sobre todo purificar las colonias. Para cada muestra procesada, se busca encontrar la mejor dilución que permita un correcto proceso de aislamiento y purificación de las colonias bacterianas del suelo. El anexo 2 muestra parte del procedimiento seguido en las diluciones seriadas

El procedimiento se describe a continuación:

- Colocar los 5 gramos de suelo en un tubo falcón estéril de 50 ml, adicionar agua estéril o solución salina hasta completar un volumen de 50 ml. A esta primera solución de suelo se denomina "Solución Stock". Agitar la solución Stock con el agitador mecánico Vortex, obteniéndose la suspensión para iniciar las soluciones seriadas.
- Transferir 1 ml (mililitro) de la solución stock (previamente agitada) a un primer tubo estéril conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, obteniendo un volumen total de 10 ml, la cual se denomina "primera suspensión". Colocar esta primera suspensión en el agitador Vortex para su correcta mezcla obteniéndose la "primera dilución Vortex" de 1/10 o  $10^{-1}$ .
- Con la primera dilución  $10^{-1}$  se repite el procedimiento anterior. Colocar 1 ml de la primera dilución en un segundo tubo falcón conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, los 10 ml de suspensión obtenida es agitada para su correcta mezcla obteniéndose la "segunda dilución" a 1/100 ó  $10^{-2}$ .

- El procedimiento realizado anteriormente se repite nuevamente con la “segunda dilución  $10^{-2}$ ”. Colocar en un tubo Falcon conteniendo 9 ml de agua destilada estéril, 10 ml de la “segunda dilución”. Agitar los 10 ml de suspensión obtenida en este proceso en el Vórtex para su correcta mezcla y obtener la tercera dilución.
- Para obtener la cuarta, quinta y demás diluciones, se debe repetir este procedimiento en forma sucesiva hasta lograr todas las diluciones deseadas. Para propósitos del proyecto se obtuvo hasta la dilución  $1/100000$  ó  $10^{-5}$ .

Se recomienda evitar el contacto manual o de implementos con los bordes de tubos o interior de tapas, porque puede generar contaminación a las posteriores diluciones. Además, no descuidar la rotulación de tubos con nombres correctos, de fácil interpretación e identificación con tinta permanente.



**Diagrama 1. Diluciones seriadas de muestras de suelo (elaboración propia)**

## 2.2. Siembra por extensión

Sembrar en placas Petri, conteniendo el medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) estéril, todas las diluciones obtenidas previamente, con la finalidad de identificar la dilución que permita obtener el mejor crecimiento de colonias y microorganismo en la cantidad adecuada para su posterior aislamiento y purificación. Demasiadas colonias en una placa, no permiten un correcto aislamiento y tampoco purificación. Pocas colonias en una placa sugieren pérdida de cepas por mucha dilución.

El procedimiento es el siguiente:

- Iniciar con el tubo Falcon de mayor dilución (para nuestro caso  $10^{-5}$ ) agitándolo en el Vortex para mantener los organismos en suspensión.

- Inmediatamente tomar 20 µl (microlitros) del tubo de mayor dilución y depositarlo en el centro de la superficie de una placa Petri conteniendo medio PDA esterilizado.
- Con la espátula de Drigalsky realizar barridos sobre la superficie del medio de cultivo, extendiendo en toda la placa la muestra diluida de 20 µl previamente depositada.
- Detener el proceso de barrido cuando se perciba que la espátula de Drigalsky no resbala con facilidad. Luego de este proceso, las placas son cerradas y selladas con parafilm y rotuladas correctamente.
- Repetir el procedimiento previamente descrito con la siguiente menor dilución, agitando en el Vórtex, depositando 20 µl en la placa conteniendo medio PDA esterilizado, realizando barridos con la espátula de Drigalsky, cerrando, sellando y rotulando las placas.
- Repetir el mismo proceso hasta lograr sembrar todas las diluciones.

Se recomienda flamear la espátula de Drigalsky, con la ayuda del mechero, entre cada proceso de siembra para cada dilución y así evitar posibles contaminaciones.

### 2.3. Incubación

Incubar las placas ya sembradas a 26°C durante 24 horas, posteriormente evaluar y observar posibles crecimientos de colonias.

Si el crecimiento de colonias es lento, dejar incubarlas hasta las 48 ó 72 horas para lograr mejor desarrollo de colonias y la aparición de nuevas colonias. Placas conteniendo mayores diluciones requieren más tiempo de incubación.

### 3. Selección, Aislamiento y Purificación de Bacterias

Posterior a la siembra y luego de incubadas durante 24 horas, realizar el monitoreo y evaluación de placas, la inspección es visual y macroscópica:

- Las colonias observadas deben estar aisladas y no mostrar contacto, unión o traslape con otras colonias bacterianas o de otros organismos como hongos.
- Observar la morfología de la colonia (anexo 3) en crecimiento y detallar sus características en:
  - Forma y apariencia (colonias arrugadas, compactas, “algodonosos”, bordes lisos, ondulados, lobuladas, etc.), tamaño (grandes o pequeñas).
  - Color (blanquecinas, cremosas, transparentes, o diversos pigmentos).
  - Elevación (planas, convexas), etc.
- Agrupar colonias semejantes, para su posterior selección y aislamiento, rotulando la parte posterior de la placa Petri.

Ya agrupadas las colonias, se siguió la técnica por agotamiento para su aislamiento y purificación.

- Con el ápice de un mondadientes (anexo 4c), previamente esterilizado, tomar pequeñas porciones de colonias bacterianas para posteriormente colocar y estriar sobre la superficie de placas Petri conteniendo medio de cultivo LB sólido y esterilizado. Este proceso se denomina la siembra de las colonias para su posterior aislamiento y purificación.
- Luego del estriado y sembrado de las placas, éstas deben ser rotuladas según los agrupamientos seleccionados, y llevados a incubar durante 24 - 48 horas a 26 °C.
- Al finalizar la incubación se obtiene colonias axénicas iguales o semejantes a la colonia inicial de cada agrupamiento donde fue obtenido. En este proceso se obtiene el aislamiento de colonias.
- A partir de colonias aisladas en placas Petri, se repite el proceso tomando con un mondadientes pequeñas porciones de colonias bacterianas y estriando sobre nuevas placas Petri conteniendo medio LB sólido esterilizado, el cual será incubado nuevamente a 26 C durante 24-48 horas. para obtener colonias aisladas y purificadas.
- Se debe evaluar las placas conteniendo colonias purificadas, observándose la homogeneidad de todas las colonias que desarrollan. En caso se encuentre una colonia NO homogénea al resto, repetir el proceso de purificación a partir de esta placa seleccionando, replicándose y estriándose en una nueva placa Petri la colonia homogénea deseada. De ser necesario debe repetirse el proceso hasta obtener todas las colonias homogéneas y puras.
- Luego de incubadas y obtenidas las colonias purificadas en la placa Petri, deben ser llevadas a 6 C para su conservación.

#### 4. Selección, Aislamiento y Purificación de Hongos

Luego de realizada las siembras por extensión en placas Petri conteniendo medio PDA, y posterior a la incubación, se debe monitorear las placas 48 a 96 horas después buscando observar el desarrollo de colonias fúngicas. El crecimiento fungoso en medio PDA toma más tiempo que el desarrollo bacteriano.

Luego de incubadas las placas conteniendo los hongos, la observación macroscópica de colonias fungosas, considerando su rápido crecimiento, color o halos de desarrollo, son sugeridos como posibles indicadores de antagonismo, agrupándose el desarrollo de colonias homogéneas y rotulándose para su identificación.

En caso se quiera obtener solamente colonias fúngicas (y no colonias bacterianas), los medios de cultivo para las siembras por extensión deben contener antibióticos para evitar o reducir el desarrollo bacteriano.

El procedimiento seguido es descrito:

- Se utilizarán placas Petri conteniendo medio de cultivo PDA esterilizado y con antibióticos.
- A partir de placas incubadas por siembra por extensión, seleccionar colonias puras que no tengan crecimiento, contacto o cercanía con colonias bacterianas u otras

colonias fúngicas. Colonias fúngicas menores a 0.5 mm son sugeridas para el aislamiento.

- Con el ápice de un mondadientes previamente esterilizado, tomar fragmentos o porciones de micelio de las colonias puras seleccionadas, para transferirlas a placas Petri conteniendo medio PDA esterilizado y con antibióticos. Se debe señalar los puntos de siembra.
- Con un mondadientes se toma porciones de micelio de la colonia y se transfiere a diversos puntos de siembra en las nuevas placas con PDA conteniendo antibióticos. Debe identificarse los puntos de siembra de los fragmentos o porciones de micelio.
- Incubar a 25 °C las placas conteniendo los puntos de siembra del hongo durante 3 a 5 días y observar posteriormente su crecimiento puro.
- En caso surjan contaminantes durante la incubación, a partir de estas placas contaminadas, repetir el procedimiento de transferir fragmentos o porciones de micelio a nuevas placas Petri conteniendo medio PDA con antibióticos, hasta obtener aislamientos puros.

## 5. Conservación y Mantenimiento de las Bacterias Puras

Luego de purificadas las colonias bacterianas, éstas deben ser conservadas. A continuación, se describe el procedimiento:

- A partir de colonias axénicas ya purificadas y con la ayuda de una pinza, sujetar un mondadientes esterilizado y coleccionar con el ápice una porción de la colonia bacteriana y transferirla a un tubo Falcon de 10 ml conteniendo 4 ml de medio LB líquido y esterilizado. El mondadientes es depositado, junto con la colonia bacteriana, dentro del tubo Falcon el cual debe ser tapado y agitado en Vortex (anexo 4a).
- El tubo conteniendo el mondadientes con porciones de colonia bacteriana es llevado a incubar dentro de una incubadora con agitador de vaivén (anexo 4b), a una temperatura de 37 °C y 150 rpm (revoluciones por minuto), durante 18 horas (16-20 horas), a fin de multiplicar las células bacterianas. La presencia de turbidez del medio LB es un indicador del crecimiento y reproducción bacteriana (Anexo 5). Durante la incubación, adicionar un tubo Falcón solo con medio líquido LB y sin inoculación de la bacteria (sin porción bacteriana en el mondadientes) debe ser colocado en la incubadora para ser usado como testigo y poder comparar turbidez, además de ser indicador del proceso de asepsia que se sigue.
- Glicerol al 50% (50 ml de glicerol más 50 ml de agua destilada) previamente preparado y homogenizado mediante agitación, y posteriormente esterilizado dos veces consecutivas debe ser utilizado para la conservación.
- En tubos crioviales estériles de 2 ml de capacidad, se debe depositar 0.5 ml del glicerol al 50% y posteriormente añadir 0.5 ml de la suspensión de bacterias luego de incubadas durante 18 horas.
- Los crioviales luego de cerrados, rotulados y sellados con parafilm para su conservación, serán llevados a refrigeración a 8 °C para ser preservados.

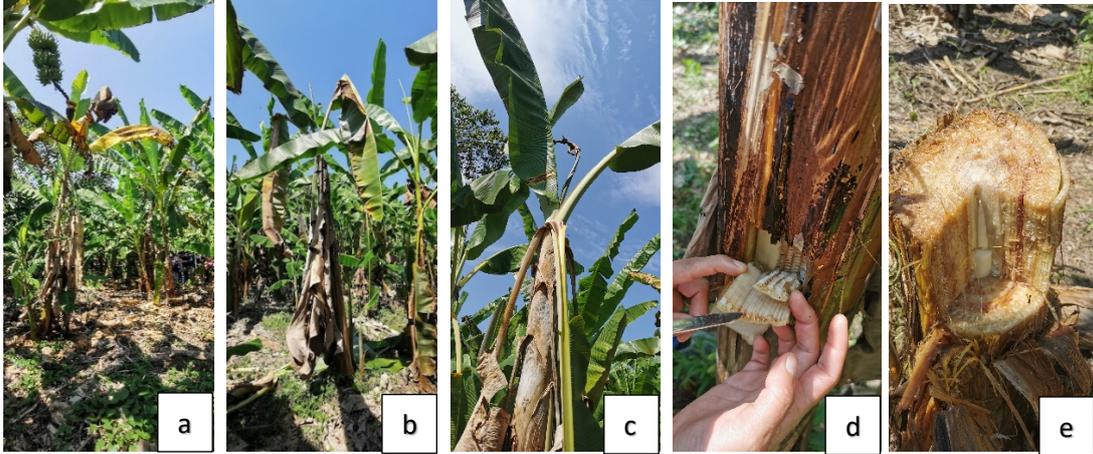
## 6. Conservación y Mantenimiento de Hongos

Luego de purificadas las colonias fungosas, éstas deben ser conservadas. El proceso se describe a continuación:

- En tubos crioviales de 2 ml de capacidad, depositar 1ml de medio PDA esterilizado con antibióticos y esperar a que solidifique.
- Hongos ya purificados contenidos en placas Petri con medio PDA esterilizado y antibióticos, son utilizadas para obtener una porción de micelio, la cual será depositadas sobre el medio de cultivo dentro de los crioviales previamente preparados.
- Los crioviales son cerrados, rotulados y sellados con parafilm para ser conservados a 8 °C.

## ANEXOS

- Anexo 1: a: Plantación de banano en Tingo María – Huánuco – Perú  
b, c: Síntomas de marchitez por *Fusarium oxysporum fsp. cubense* en banano  
d, e: Síntomas en pseudotallo de banano.



- Anexo 2: Realización de diluciones seriadas en Tubos Falcon



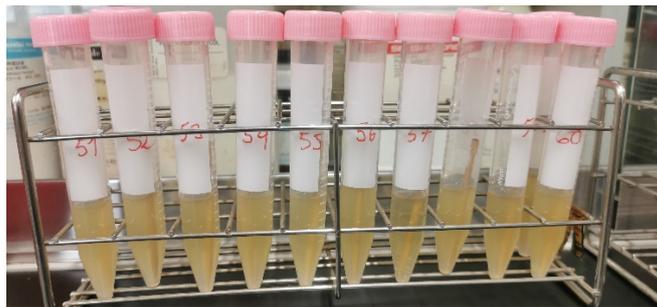
- Anexo 3: Diversas morfologías de colonias bacterianas



- Anexo 4: a. Multiplicación bacteriana en tubos Falcon para posterior conservación  
b. Incubadora de agitación para multiplicación bacteriana  
c. Colecta de porciones de colonias bacterianas



Anexo 5: Tubos Falcon luego de incubados donde se aprecia la turbidez del medio líquido



Anexo 6: Pruebas de Antagonismo in vitro para seleccionar cepas bacterianas con potencial antagonístico a *Fusarium Oxysporum fsp. cubense*

