

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION ESTUDIOS DE POST-GRADO



SUPRESION DE *Fusarium moniliforme* POR  
*Bacillus thuringiensis*

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA.

POR:

HUGO ALBERTO LUNA OLVERA

CD. UNIVERSITARIA

NOVIEMBRE DE 1998

TD  
QR82  
.B3  
L8  
c.1



1080087099

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

SUPRESION DE *Fusarium moniliforme* POR *Bacillus thuringiensis*

**TESIS**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA

POR:

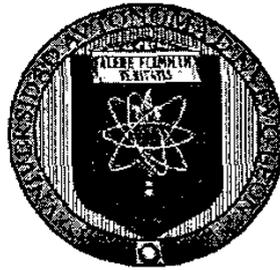
**HUGO ALBERTO LUNA OLVERA**

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MEXICO

NOVIEMBRE DE 1998



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



SUPRESION DE *Fusarium moniliforme* POR *Bacillus thuringiensis*

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

POR:

**HUGO ALBERTO LUNA OLVERA**

APROBADA  
COMISION DE TESIS

DR. LUIS J. GALAN WONG  
DIRECTOR-PRESIDENTE

DRA. KATIUSHKA AREVALO NIÑO  
SECRETARIO

DRA. LICET VILLARREAL TREVIÑO  
VOCAL

DRA. LILIA HORTENCIA MORALES RAMOS  
VOCAL

DR. BENITO PEREYRA ALFEREZ  
VOCAL

## INDICE

	Página
Abreviaturas	iii
Lista de tablas	v
Lista de figuras	vii
Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	5
Antecedentes	6
Generalidades sobre las fumonisinas.	6
Ciclo de vida de <i>F. moniliforme</i> .	8
Síntesis de toxinas.	9
Métodos de estudio.	11
Efectos toxicológicos.	13
Distribución de <i>F. moniliforme</i> .	15
Estrategias de seguridad.	17
Aspectos históricos del control biológico.	18
Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas.	20
Mecanismos de supresión de patógenos.	23
Consideraciones del mercado.	27
Material y Métodos	29
Distribución de <i>F. moniliforme</i> .	29
Muestreo de cultivos de maíz en Nuevo León.	29

Aislamiento de <i>F. moniliforme</i> .	29
Estimación del potencial toxigénico <i>In vitro</i> .	31
Detección de fumonisinas.	32
Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>F. moniliforme</i> .	33
Preparación de inóculos para ensayos de antagonismo.	35
Selección de cepas antagonistas.	35
Optimización de condiciones antagónicas.	36
Estabilidad de <i>B. thuringiensis</i> en el suelo.	37
Suelos usados.	37
Inoculación al suelo.	38
Preparación de inoculantes con cepas seleccionadas.	39
Efecto de factores ambientales del suelo sobre los inoculantes.	41
Recuperación de <i>B. thuringiensis</i> a partir de suelo Inoculado.	42
Efecto de factores bióticos del suelo sobre los inoculantes.	43
Mecanismos de contraataque por <i>B. thuringiensis</i> .	46
Producción de bacteriocinas.	46
Preparación de cepas indicadoras.	46
Bioensayos con plántulas.	47
Evaluación de variedades de maíz.	47
Supresión de la Infección causada por <i>F. moniliforme</i> .	49
Análisis de datos.	50
Resultados y Discusión	51
Criterios de aislamiento de <i>F. moniliforme</i> .	51

## Resumen

El presente trabajo involucró un estudio sobre el riesgo potencial de intoxicación en humanos por el consumo de fumonisinas producidas por *Fusarium moniliforme* en maíz cultivado en el estado de Nuevo León, con el interés final de probar como estrategia de control biológico el uso de cepas de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) capaces de suprimir las cepas toxigénicas de este hongo. Para tal propósito, 15 municipios ubicados dentro de los tres distritos de cultivo del estado, fueron visitados con el objetivo de coleccionar mazorcas de maíz de sus campos, a partir de las cuales se aislaron las cepas predominantes del hongo, a fin de determinarles el potencial toxigénico. A partir de estos estudios, se pudo conocer que las cepas que colonizan el cultivo en algunas regiones como Apodaca, son capaces de producir altas dosis de tales toxinas bajo condiciones propicias, mientras que en algunos municipios de Galeana, la toxigenidad por tales cepas resulta muy baja. En un primer intento de interaccionar 35 cepas de patógeno con 20 cepas del posible agente de control, se diseñó una metodología para que ambos entraran en contacto a través de sus células o solo sus metabolitos, resultando que la mayoría de las bacterias probadas, podían establecer relaciones antagónicas con sus contrapartes fúngicas, y algunas cepas de hongos eran particularmente sensibles al ataque bacteriano. Diversas variaciones fueron hechas para incrementar el grado de antagonismo por la bacteria, entre las que se incluyeron las densidades de inóculos, temperaturas de incubación o dosis del medio de cultivo donde estuvieron creciendo. Las cepas de *B. thuringiensis* prometedoras en esta fase, se sometieron a las pruebas típicas para el desarrollo de un inoculante, entre las que se incluye, el introducirlo al ecosistema blanco. En forma general, los factores fisicoquímicos del suelo tipo xerosol o litosol probados, no determinaron la presencia de las cepas incorporadas a tal ambiente, pero la flora nativa de los mismos demostró afectar fuertemente su establecimiento mediante fenómenos antagónicos llevados cabo principalmente por actinomocetos. No obstante lo anterior, pudo comprobarse el desarrollo de mecanismos de contraataque como la producción de bacteriocinas por parte de las cepas estudiadas como futuros inoculantes. La capacidad supresora de tales cepas (*B. t.* GM-1, GM-4, y HD-1 como referencia) fue probada mediante la técnica de invasión del mesocotilo de variedades de maíz previamente seleccionadas para tales ensayos. Los datos obtenidos, mostraron la capacidad de la cepa GM-4 para impedir en un grado aceptable, la invasión del tejido radical por el patógeno fúngico

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades fúngicas de cereales ocupan hoy en día una de las principales áreas de atención en la agricultura, debido a las significantes pérdidas que causan. Entre la gran variedad de hongos asociados a eventos patológicos que les afectan, el género *Fusarium* destaca notablemente por el daño que ocasiona cuando invade los tejidos a través de aberturas naturales o heridas (Calhoun y Park, 1964; Dubin, 1984; Mai, 1987; Thomas y Buddenhagen, 1980; Van Wyk *et al.*, 1987). Asimismo, varias de sus especies son agentes causales de severas micotoxicosis cuando contaminan los granos con sustancias de tipo tricotecenos (nivalenol, desoxinivalenol, toxina T-2) y zaelalenona (Abramson *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1990; Luo *et al.*, 1992; Neish *et al.*, 1983; Tanaka *et al.*, 1985; Tanaka *et al.*, 1988; Vensonder y Golinski, 1989).

Aunque *Fusarium moniliforme* Sheldon es uno de los patógenos más importantes del maíz, donde provoca pudriciones en tallo, raíces y mazorcas (Futrell y Kilgore, 1969; Kommendahl y Windels, 1981; Zenteno y Ulloa, 1977), la mayor preocupación acerca de este organismo radica en la posibilidad de que sus toxinas estén presentes en productos comerciales para consumo humano (Pittet *et al.*, 1992; Stack y Eppley, 1992; Sydenham *et al.*, 1991), particularmente aquéllas pertenecientes a un nuevo grupo denominado fumonisinas (Bezuidenhout *et al.*, 1988; Gelderblom *et al.*, 1988; Nelson *et al.*, 1992), mismas que se han asociado a enfermedades del hombre, como la aleucia tóxica en Rusia, la intoxicación por el "grano roñoso" en Japón y el síndrome de Kashin-Beck (Yang, 1989), además de cáncer esofágico en Sudáfrica (Marasas *et al.*, 1988a; Reeder *et al.*, 1992; Sydenham *et al.*, 1990; Van Rensburg, 1986) y China (Yoshizawa *et al.*, 1994; Zhen, 1984). También se ha establecido plenamente la participación de este fusario toxigénico en enfermedades de animales como la leucoencefalomalacia en equinos (Marasas *et al.*, 1988b; Thiel *et al.*, 1991), el edema pulmonar (Colvin y Harrison, 1992; Harrison *et al.*, 1990) y los síndromes hemorrágico, estrogénico, emético o anoréxico en porcinos

(Ross *et al.*, 1990), así como la inducción de cáncer hepático en ratas (Gelderblom *et al.*, 1991). De esta manera, el inminente riesgo de ingerir fumonisinas por el hombre o los animales, ilustra claramente la apremiante necesidad de estrategias efectivas de control para *F. moniliforme* (Nelson *et al.*, 1991). Al considerar los efectos ambientales adversos por el uso de métodos químicos o las limitaciones de la resistencia genética para contrarrestar el ataque de este patógeno (Bayeen y Elgersma, 1985; Kuc, 1983; Mesterhazy, 1985; Ponchet *et al.*, 1983), se torna evidente la importancia de explorar el potencial de los agentes biológicos (Cook y Baker, 1983; Papavizas, 1985; Powell *et al.*, 1990). A este respecto, muchas interacciones patógeno-antagonistas estudiadas extensivamente hasta la fecha, han generado resultados muy prometedores para la protección de algunos cultivos (Attafuah y Bradbury, 1989; Dahiya *et al.*, 1988; Kempf y Wolf, 1989; Kerr, 1972; Mc Loughlin *et al.*, 1992; Yuen *et al.*, 1985). Sin embargo, la información sobre el biocontrol de *F. moniliforme* es aún muy limitada (Hebbar *et al.*, 1992).

Numerosos reportes han proporcionado evidencias sobre los efectos benéficos de inocular plantas con organismos antagonistas de patógenos fúngicos (Burr *et al.*, 1978; Sakthivel y Gnanamanickam, 1987; Suslow y Schroth, 1982), quienes ejercen tan variadas estrategias de supresión, como la síntesis de sideróforos (Becker y Cook, 1988; Kloepper *et al.*, 1980; O'Gara *et al.*, 1986), antibióticos (Howell y Stipanovic, 1979; Howell y Stipanovic, 1980; Lindberg, 1981; Thomashow y Weller, 1988) y enzimas líticas (Ordentlich *et al.*, 1988; Sneh *et al.*, 1984); incluso la habilidad competitiva de tales agentes ha determinado el éxito de muchos experimentos (Lindow, 1987; Mazzola *et al.*, 1992). No obstante lo anterior, la eventual falla de los inoculantes aplicados puede provenir de la inadecuada selección de organismos capaces de sobrevivir y competir favorablemente con la microflora nativa del suelo, o por la inhabilidad de los mismos para metabolizar los exudados radicales presentes en la rizósfera de la planta inoculada (Broadbent *et al.*, 1971).

Independientemente de su ubicación taxonómica, las especies del género *Bacillus* se cuentan entre los agentes más elegibles de control biológico, debido a

cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza (Martin y Travers, 1989; Meadows *et al.*, 1992; Smith y Couche, 1991) y a la creciente lista de éxitos obtenidos en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos (Handelsman *et al.*, 1990; He *et al.*, 1994; Morgan, 1963; Osburn *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1993; Reedy y Rahe, 1989; Rytter *et al.*, 1989; Turner y Backman, 1991). Sin lugar a dudas, el organismo más exitoso en este rubro que hasta el momento se ha comercializado es *B. thuringiensis*, una bacteria que produce un cuerpo paraesporal denominado  $\delta$ -endotoxina, formada por una o varias proteínas cristal insecticida (PsCI), tóxicas para lepidópteros, dípteros, coleópteros, nemátodos y protozoarios (Smith y Couche, 1991; Vankova, 1957). Sin embargo, su potencial antifúngico es desconocido, a pesar de su especificidad, virulencia, seguridad y potencia contra organismos blanco (Gelernter y Scwab, 1992; Rowe y Margaritis, 1987) (De Barjac y Lajudie, 1974; Pendleton, 1968) y la gran diversidad de metabolitos que produce, entre los que destacan bacteriocinas, antibióticos y enzimas extracelulares como proteasas y quitinasas, elementos clave en el fenómeno de supresión de patógenos por muchos agentes biológicos. El presente trabajo abordó una investigación para determinar el potencial toxigénico de *F. moniliforme* distribuido naturalmente en maíz cultivado en los diversos distritos agrícolas del Estado de Nuevo León, con el interés de conocer la factibilidad de utilizar cepas antagonistas de *B. thuringiensis* como medio de control biológico.

## HIPOTESIS

Suponemos que se pueden aislar y seleccionar cepas de *B. thuringiensis* con capacidad de suprimir a las especies patógenas de *Fusarium* a través de su producción natural de sustancias inhibitorias del crecimiento.

## OBJETIVOS

1.- Seleccionar cepas de *B. thuringiensis* GM y HD con capacidad de interaccionar antagonicamente con cepas patógenas de *Fusarium* sp.

2.- Examinar el efecto de los metabolitos producidos por *B. thuringiensis* sobre la germinación de esporangios, elongación del tubo germinal, crecimiento de hifas y producción de biomasa por *Fusarium* sp en medio de cultivo e identificar la naturaleza química de las sustancias responsables de tal efecto

3.- Evaluar la habilidad de las cepas antagonistas de *B. thuringiensis* para desplazar de la rizósfera y rizoplano los propágulos de *Fusarium* sp al relacionarlo con el rendimiento de plantas de gramíneas.

## ANTECEDENTES

### Generalidades sobre las fumonisinas

Aunque las fumonisinas fueron descubiertas muy recientemente, la toxicidad del maíz contaminado ya había sido descrita en los Estados Unidos desde hace casi 150 años, en una enfermedad de los animales de granja conocida como "Envenenamiento con Maíz Mohoso" (Graham, 1913). Sin embargo, el agente causal resultó desconocido hasta que Sheldon, en 1904, identificó a *F. moniliforme* y lo asoció con una epidemia de esta toxicosis en caballos, vacas, mulas, cerdos y pollos en Nebraska, E.U. En 1988, Gelderblom y colaboradores identificaron químicamente, en cultivos de este hongo, una nueva clase de micotoxinas de naturaleza diéster de ácidos tricarbóxicos y polialcoholes, con actividad cancerígena, a las que denominaron fumonisinas (Fig. 1). Este informe representó un parte aguas en la investigación sobre las enfermedades humanas y animales asociadas al consumo de maíz contaminado con hongos toxigénicos. También representó el punto de partida en los esfuerzos mundiales por describir la estructura, propiedades y toxicología de estas toxinas, fomentando un renovado interés por el más importante patógeno del maíz.

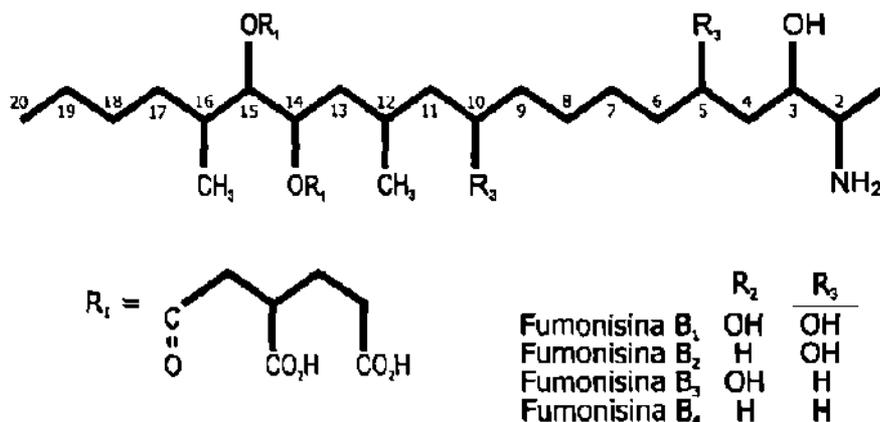


Fig. 1. Estructura química de las fumonisinas.

La producción de maíz en Norteamérica y en muchas regiones templadas del mundo parece estar estrechamente vinculada a *F. moniliforme* (con *Gibberella fujikuroi* como su estado perfecto), quien es capaz de causar daños en raíces, tallos, espigas e incluso granos almacenados. Aunque el rendimiento de este cultivo usualmente se ve poco afectado, de gran preocupación resulta la infección de mazorcas debido a la disminución en la calidad de la semilla y a la presencia potencial de fumonisinas u otras micotoxinas, situación que se complica por la frecuente ocurrencia de infecciones asintomáticas (Munkvold *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 1983). Existen al menos siete distintas poblaciones conjugantes de *G. fujikuroi* (Leslie, 1995), designadas de la "A" a la "G"; las poblaciones "A, D y E" son las más comunes en el maíz, algunas de las cuales corresponden a especies anamórficas particulares de la Sección Liseola de *Fusarium*, pero tanto la "A" como la "F" son consideradas *F. moniliforme*, en base a su morfología. Esta distinción es determinante, ya que la mayoría de las cepas que integran la población "A" son prolíficas productoras de fumonisinas, mientras que los miembros de la población "F" no las producen, o lo hacen en muy bajas concentraciones. Asimismo, muchas cepas aisladas de maíz pertenecen a la población "A", mientras que las encontradas en sorgo comúnmente son consideradas "F" (Desjardins *et al.*, 1995). La alta proporción de cepas productoras de fumonisinas entre la población "A" (Leslie *et al.*, 1995) y la alta frecuencia de maíz contaminado con las mismas, parece significar la posibilidad de que estas toxinas tengan un papel activo en la virulencia del hongo sobre la planta. Una analogía a tal hecho es representada por la similitud estructural de estos metabolitos con la toxina-AAL, factor de virulencia en *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* sobre tomate (Gilehrst *et al.*, 1992). A este respecto, experimentos realizados con plántulas de maíz y tomate, donde se agregaron a sus tejidos fumonisinas purificadas en concentraciones tan bajas como  $10^{-6}$  M, revelaron la aparición de necrosis y otros síntomas patológicos (Abbas *et al.* 1994; Lamprecht, *et al.*, 1994).

### **Ciclo de vida de *F. moniliforme***

El ciclo biológico de *F. moniliforme* es un proceso complejo (Fig. 2), ya que este hongo es un patógeno no obligado que carece de un hospedero específico. Se puede encontrar ya sea en trigo, sorgo, frijol, soya, algodón, tomate, cacahuete, plátano, pimiento verde, algunos forrajes o el maíz como su principal hospedero (Bacon y Hinton, 1996). Sus distintas fases de vida están conformadas por un estado saprofito y otro parasítico. Durante la primera etapa, *F. moniliforme* obtiene los nutrientes de los tejidos vegetales muertos, produciendo estructuras infectivas para establecer la enfermedad. En su estado parasítico, después de la extensiva colonización intracelular, destruye el tejido a expensas del cual se alimenta, liberando altas concentraciones de fumonisinas. Las enfermedades sintomáticas y la muerte de las plantas de maíz no son muy comunes durante el estado parasítico, pero sí ocurren pérdidas económicas. Aunque se sabe que este hongo sobrevive en el campo a partir de restos orgánicos del cultivo anterior, también se reconoce que se transmite a través de semillas contaminadas, pero se carece de información acerca de la relación que guarda esta forma de dispersión con la pudrición de tallos y espigas. En el suelo, *F. moniliforme* regularmente no produce clamidosporas, sino hifas de pared engrosada que aparentemente prolongan su persistencia (Nelson, 1992; Nelson *et al.*, 1983). Además, forma macroconidias y abundantes microconidias, cuyas dimensiones favorecen la distribución en los campos de maíz a través del aire y la invasión de tejidos en la planta (Foley, 1962; Kommendahl y Windels, 1981). Si bien es cierto que se cree que la fuente de tales propágulos sean los residuos agrícolas, la esporulación del hongo en la mazorca puede contribuir a la infección de los estigmas, proceso que es favorecido por la humedad generada durante las precipitaciones tardías, e incluso el estado fisiológico de tales estructuras. Los insectos también representan un papel importante en la infección del maíz, ya que las heridas que le infieren reciben inóculos microbianos arrastrados por la lluvia o el aire, e incluso las mismas plagas son capaces de actuar como vectores. De entre las que más se sospecha están el escarabajo sapo (*Glischrochilus quadrisignatus*) y el barrenador europeo (*Ostrinia nubilialis*), a partir de los cuales el hongo ha sido aislado

superficialmente; pero del último se ha obtenido una fuerte evidencia Implicatoria (Davis *et al.*, 1989).

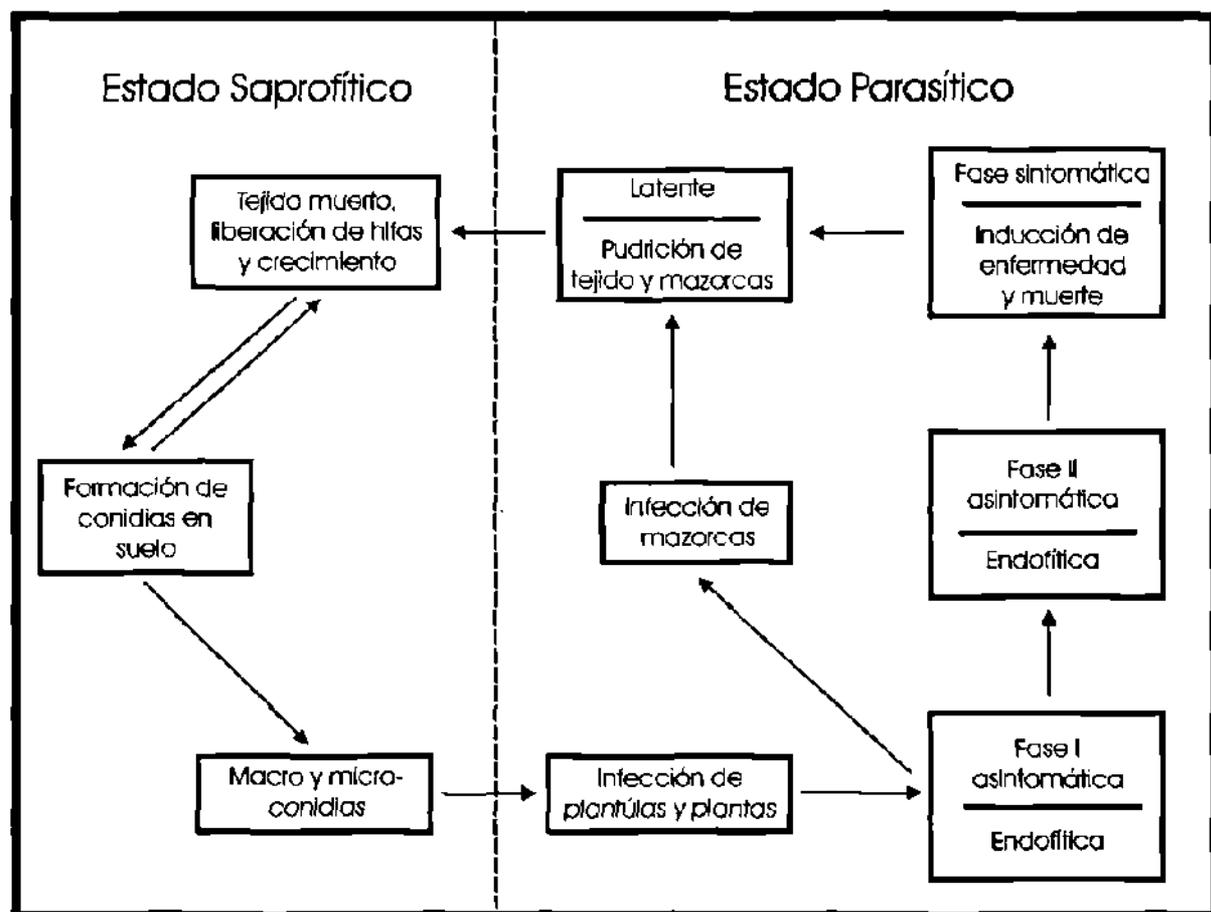


Fig.2. Ciclo de vida de *F. moniliforme*.

### Síntesis de toxinas

Las especies de *Fusarium* producen diversos metabolitos secundarios tóxicos para animales y plantas, entre los cuales se encuentran los tricotecenos (desoxinivalenol "DON", nivalenol "NIV", 15-acetil desoxinivalenol "15-ADON", 3-acetildesoxinivalenol "3-ADON", zaeralenona "ZEA", toxina T-2 y toxina HT-2 (Kim *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1991), que forman una familia de compuestos sesquiterpenos, potentes inhibidores de la enzima peptidil transferasa. Por su parte,

*F. moniliforme* y especies relacionadas con la Sección Liseola no producen tales compuestos, pero sintetizan otras micotoxinas como el ácido fusárico, fusarinas, moniliforminas, beauvericina, giberelinas y sus precursores diterpenos, además de una serie de pigmentos fitotóxicos como naptoquinonas y azantraquinonas, cuya toxicidad en células de mamíferos aún no se ha determinado. Sin embargo, las fumonisinas se consideran sus metabolitos más tóxicos (Bennett *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1992).

En 1970 se reportó por primera vez que las cepas de *F. moniliforme* aisladas de maíz en Estados Unidos, producían moniliforminas, pero las obtenidas del mijo perla en Nigeria, resultaron prominentes productoras de estas sustancias (Cole *et al.*, 1973), aunque de acuerdo con las características morfológicas, éstas últimas luego fueron ubicadas dentro de *F. nygamai*, debido a la formación de clamidosporas (Nelson *et al.*, 1983). Un estudio realizado en Africa sobre la producción de moniliformina por fusarios (Sección Liseola) y su efecto en aves, encontró 58 cepas de *F. moniliforme* tóxicas para patos de una semana de edad, de las cuales solo 13 sintetizaban la toxina *in vitro*. De Kenia y Sudáfrica se recuperaron otras 45 cepas a partir de maíz, y también fueron tóxicas para este tipo de aves, pero ninguna fue capaz de producirla bajo condiciones de laboratorio. Estudios adicionales realizados con cepas de fusarios inductores de leucoencefalomalacia, demostraron que las mismas no producían moniliforminas (Marasas *et al.*, 1986). Asimismo, se descubrió que la fusarina "C", un componente común de maíz contaminado con este hongo, era un potente agente mutagénico *in vitro* y un inhibidor de macrófagos. Los datos anteriores indujeron la realización de experimentos para determinar la actividad de esta última toxina como iniciador del cáncer en hígado, pero los resultados obtenidos han descartado esta teoría para la cepa MRC 826, considerada como hepatocarcinogénica (Nelson *et al.*, 1993).

Las fumonisinas son derivados hidrocarbonados, altamente funcionalizados, solubles en compuestos polares (agua, metanol, etanol, etc.) e insolubles en no polares (cloroformo, hexano). Se han identificado cuatro variantes de los tipos B: B<sub>1</sub>,

B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> y B<sub>4</sub> (Figura 1), de las cuales solo las primeras dos son cuantitativamente significantes en maíz contaminado (Sydenham *et al.*, 1992; Thiel *et al.*, 1992), ya que el resto se presenta en muy bajas concentraciones, naturalmente o *in vitro*. Cuando la fumonisina B<sub>1</sub> fue caracterizada químicamente como diéster de propano-1,2,3-ácido tricarboxílico, 2-amino-12,16-dimetil, 3,5,10,14,15-pentahidroxicosano, resultó ser el compuesto más comúnmente recuperado de maíz contaminado con *F. moniliforme* MRC 826. Se ha reportado que diversas fumonisinas están relacionadas con B<sub>1</sub>, entre las que destacan las toxinas homólogas B<sub>2</sub> (Bezuidenhout *et al.*, 1988) y B<sub>3</sub> (Cawood *et al.*, 1991; Plattner *et al.*, 1992). La primera carece del grupo hidroxilo en C-10 y la segunda no lo tiene en C-5. Las fumonisinas son resistentes al calor y no pueden destruirse por cocción, sin embargo, a temperaturas mayores de 150 °C por 1 h, se puede reducir en un 80 % su concentración original (Jackson *et al.*, 1996). Estas toxinas pueden resistir fermentaciones alcohólicas y procesos de calentamiento durante la fabricación de alimentos. Algunos procesos de destoxificación se han implementado con la finalidad de disminuir sus concentraciones de fumonisinas en alimentos. La amonización, un procedimiento exitoso en la disminución de aflatoxinas, ha resultado de poca eficiencia para las fumonisinas del maíz. Otros tratamientos usados incluyen hipoclorito de sodio y bases fuertes, pero los datos indican una reducción de la concentración inicial, aunque la identidad de los derivados formados y su actividad biológica se desconocen (Murphy *et al.*, 1996; Sydenham *et al.*, 1995). Incluso la nixtamalización, un proceso tradicional para la elaboración de las tortillas de maíz, también reduce por hidrólisis las concentraciones de estas toxinas, pero los compuestos derivados conservan la misma actividad biológica de las toxinas originales (Park *et al.*, 1996).

### **Métodos de estudio**

Los métodos de extracción de fumonisinas a partir de alimentos y forrajes involucran el uso de solventes polares (metanol-agua o acetónitrilo-agua), seguidos de una limpieza del material extraído mediante columnas de intercambio iónico (SAX) para el primero y fase reversa C-18 SEP-PAK para el segundo tipo de solventes. El

uso de este último método permite la detección de muy bajas concentraciones de toxinas, con un porcentaje de recuperación  $> 80\%$ , por lo cual se considera el método de elección para recuperar estas toxinas a partir de matrices naturales crudas. La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en Inglés) es una técnica altamente sensible que se basa en la derivación de grupos amino libres del compuesto blanco a productos transformados capaces de absorber longitudes de onda en el rango ultravioleta (Park, 1997). Este método emplea orto-ftaldialdehído (OPA) como agente derivatizante (Desjardins *et al.*, 1994), lo cual permite la separación de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> en un tiempo de 16 min, usando un sistema de solventes isocráticos metanol-agua y un procedimiento de extracción con intercambio iónico, para alcanzar un límite de detección de 50 ppb (Sydenham *et al.*, 1992). Sin embargo, existe inconveniencia por la inestabilidad del complejo OPA-fumonisina, al igual que del naftaleno-2-3-dicarboxialdehído o el 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano. Por su parte, la Cromatografía de Gas-Espectrometría de Masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) requiere un proceso de hidrólisis para remover los grupos carboxílicos y la derivación de los aminos para facilitar la volatilización. La ventaja del método GC-MS estriba en la simultánea cuantificación del compuesto con la determinación de su estructura molecular. Desafortunadamente, los costos de tales equipos limitan considerablemente su uso rutinario (Park, 1997).

Los métodos inmunocromatográficos desarrollados recientemente para detectar toxinas y algunos metabolitos relacionados con los alimentos, forrajes y tejidos, se basan en el empleo de anticuerpos policlonales o monoclonales y columnas de afinidad disponibles comercialmente para aislar, desde extractos acuosos, el compuesto de interés. Las fumonisinas también pueden detectarse fácilmente, incluso a niveles de  $\mu\text{g/g}$  de muestra, mediante cromatografía en placa fina (TLC por sus siglas en inglés), al combinarlas en placas de sílica gel con una amina primaria libre, contenida en reactivos como el *p*-anisaldehído o ninhidrina a para formar complejos de color (Cawood *et al.*, 1991), o mediante la emisión de fluorescencia al reaccionar con la fluorescamina (Rottinghaus, 1992). No obstante lo anterior, los límites de detección con esta técnica (50-100 ng), se ven alterados con

la interferencia causada por otros componentes en los extractos de granos, hasta alcanzar como máximo 1 mg/Kg, previa concentración del metabolito antes del análisis por TLC (Desjardins *et al.*, 1994).

### Efectos toxicológicos

La leucoencefalomalacia es una enfermedad neurológica de equinos relacionada con las fumonisinas, que se caracteriza por la necrosis del material blanco en uno de los hemisferios del cerebro. En varios experimentos donde se alimentaron caballos con maíz contaminado por cepas puras de *F. moniliforme*, o se les administró oralmente la toxina B<sub>1</sub> purificada, aquellos desarrollaron las típicas lesiones en el cerebro (Kriek *et al.*, 1981; Marasas *et al.*, 1988b). El síndrome de edema pulmonar porcino también es causado por la propagación de *F. moniliforme* en el maíz ingerido. Durante 1989 se reportaron numerosos brotes de esta enfermedad en la región central de E.U.A., y en todos los casos se implicó a *F. moniliforme* como el agente causal. Este hongo fue aislado de todas las muestras que estaban asociadas con la enfermedad y mediante cultivos *in vitro*. Los aislados producían B<sub>1</sub> en concentraciones de 900 a 2,350 µg/g y B<sub>2</sub> de 120 a 350 µg/g. Tales datos permitieron concluir que la fumonisina B<sub>1</sub> es probablemente la causa del edema pulmonar en porcinos (Nelson *et al.*, 1993a). Además, se conoce que B<sub>1</sub> es fitotóxica, ya que produce diversos síntomas en plantas, incluyendo clorosis, necrosis, achaparramiento y defoliación (Lamprecht *et al.*, 1994).

Los efectos toxicológicos de *F. moniliforme* en animales a través de la fumonisina B<sub>1</sub>, han sido estudiados extensivamente debido a los antecedentes con maíz contaminado por la cepa MRC 826 causante de leucoencefalomalacia y el síndrome hepatocarcinogénico (Alberts *et al.*, 1993; Jashiewicz *et al.*, 1987). Al investigar el efecto de la administración de B<sub>1</sub> en ratas, Voss y colaboradores (1995) encontraron que esta micotoxina es hepatotóxica en ambos sexos, ya que induce nefrosis cuando se administra en machos a dosis mayores de 15 mg/Kg y en hembras a mas de 50 mg/Kg. Asimismo, se observó la alteración del perfil esfingolípido en

hígado, riñón, suero y orina de ratas tratadas, especialmente respecto a la concentración de esfingosina libre y el incremento de la proporción esfinganina-esfingosina. La similitud estructural de las fumonisinas con los esqueletos base de los esfingolípidos, condujo a Wang y colaboradores (1991) a proponer y posteriormente demostrar que las primeras afectan el metabolismo de los segundos (Fig. 3).

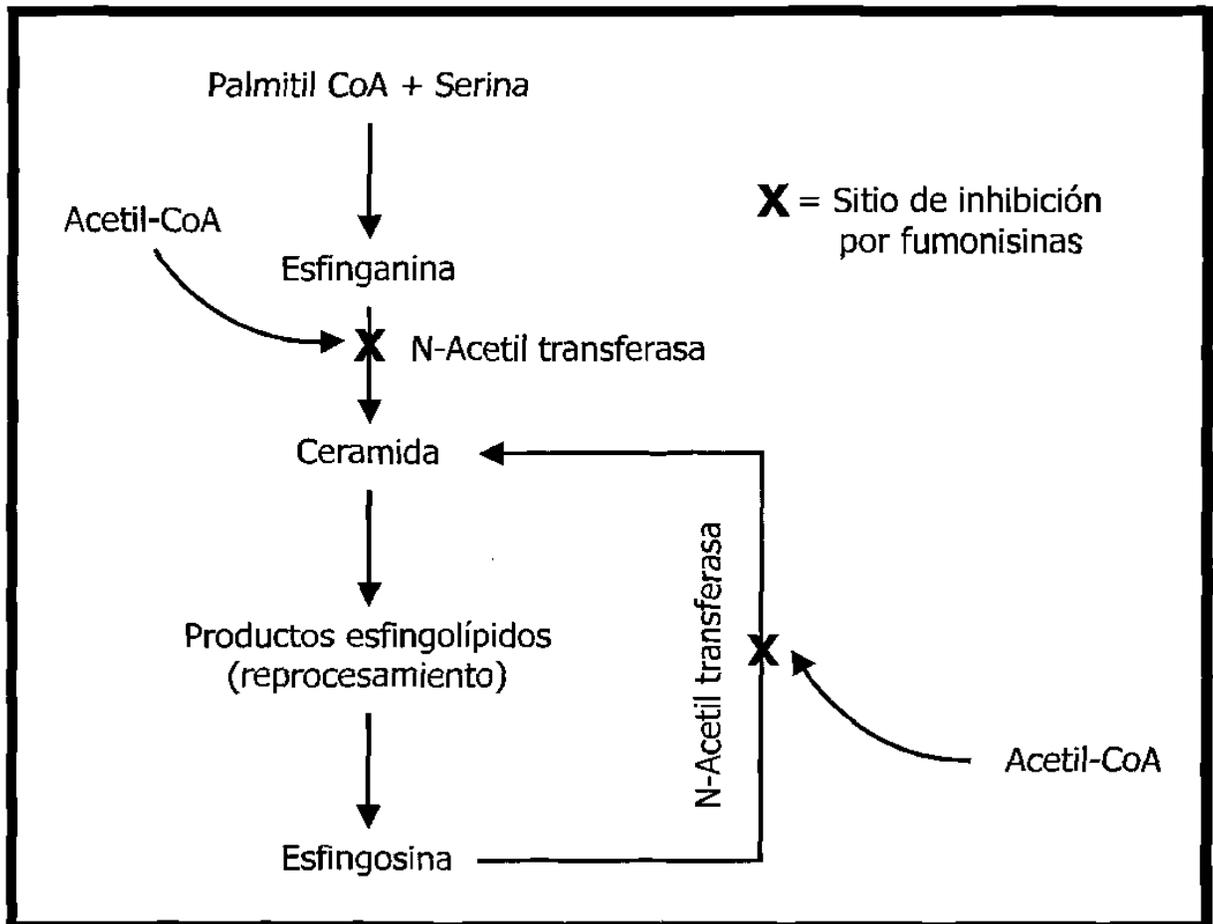


Fig.3. Sitios de inhibición de las fumonisinas en las síntesis de esfingolípidos

En cultivos celulares de hígado de rata y riñón de cerdo, las fumonisinas inhibieron la actividad de la esfingosin-N-acetil-transferasa o ceramida sintetasa (Norred *et al.*, 1992). Los esfingolípidos son componentes estructurales de las membranas eucariotas, sin embargo, cada vez existe más evidencia acerca de su

papel en la proliferación y diferenciación celular, además de la activa participación en la regulación de la apoptosis, proceso responsable de la programación de muerte celular (Merril, 1991; Tolleson *et al.* 1996). El papel de los esfingolípidos y las micotoxinas análogas de esfingolípidos en la apoptosis es un campo de investigación que está avanzando muy rápido, y cuya información seguramente aportará en corto plazo las bases patológicas de las enfermedades causadas por consumo de fumonisinas.

### **Distribución de *F. moniliforme***

Debido a que *F. moniliforme* es un habitante común de las mazorcas de maíz, no es sorprendente que las fumonisinas se hayan encontrado contaminando sus granos casi en cualquier región del mundo donde se han estudiado. Munkvold y Desjardins (1997) hicieron un análisis de datos sobre 25 estudios llevados a cabo por diferentes grupos de investigación en el mundo acerca de las concentraciones de fumonisinas presentes en maíz cultivado y alimentos para consumo humano o animal a base de este grano. Las tendencias mostraron que la mayoría de los alimentos para humanos contenían fumonisinas, aunque en concentraciones  $< 1 \mu\text{g/g}$ ; pero aquellas muestras provenientes de países como Brasil, Italia, Kenia e incluso Estados Unidos, podrían estar ocasionalmente contaminadas con valores entre 5, 10 o más  $\mu\text{g}$  de fumonisinas  $\text{B}_1/\text{g}$ , lo cual se considera significativo en comparación con los valores establecidos como seguros por la Asociación Americana de Laboratorios de Veterinaria Diagnóstica, que ha recomendado como límite;  $5 \mu\text{g/g}$  para especies de equinos,  $10 \mu\text{g/g}$  en porcinos,  $50 \mu\text{g/g}$  para el caso de ganado de engorda y pollos, mientras que en ganado lechero aún no se especifica (Miller *et al.*, 1996; Desjardins y Hohn, 1997). Dos investigaciones realizadas separadamente, donde se buscaban estas micotoxinas en muestras de alimento animal basado en maíz que provenía de regiones afectadas por leucoencefalomalacia, indicaron que el 88% de ellas contenían por lo menos  $1 \text{ mg/g}$ , pero algunas alcanzaron hasta  $330 \mu\text{g/g}$ . El siguiente grupo

más contaminado comprendió el maíz colectado en áreas con alto riesgo de cáncer esofágico en China y Sudáfrica, al mostrar una alta incidencia de B<sub>1</sub> con fluctuaciones entre 47 a 155 ug/g. Las fumonisinas son comúnmente detectadas en mazorcas asintomáticas, aunque sus niveles generalmente son mucho menores en granos de buena calidad seleccionados al azar. En mazorcas colectadas en campos de cultivo de la región central de Estados Unidos entre 1988 a 1995, se observó que aunque la fumonisina B<sub>1</sub> estaba presente con mucha frecuencia, sus concentraciones por lo regular eran bajas, con máximos de 5 a 38 y promedios de 1 a 3 ug/g de muestra.

La producción de fumonisinas *in vitro* ha sido estudiada por Alberts y colaboradores (1993), utilizando como modelo la cepa MRC 826 de *F. moniliforme*, en el interés de establecer la típica cinética de producción de su principal toxina. Los resultados revelaron que la síntesis de B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en maíz comienza al tercer día de la inoculación, y se incrementa rápidamente entre los días 4 y 13 hasta alcanzar un máximo rendimiento de 11.2 y 5.0 mg/Kg, respectivamente, al día 14. Diversos estudios llevados al cabo para demostrar la producción de fumonisinas por otras especies de *Fusarium*, han involucrado la búsqueda en cepas de *F. proliferatum*, *F. decemcellulare*, *F. sporotricoides*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. avenaceum*, *F. semitectum*, *F. camptoceras*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. scirpi*, *F. longipes*, *F. sambucinum*, *F. graminearum*, *F. reticulatum*, *F. compactum*, *F. lateritium*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum*, *F. oxysporum*, *F. napiforme* y *F. nygamai*, entre las cuales, solo la primera y la última producían estas toxinas (Nelson *et al.*, 1992). Por su parte, Nelson y colaboradores (1991), al investigar la capacidad toxigénica de *F. moniliforme* en función del área geográfica de donde fue recuperado, encontraron una enorme variación en las concentraciones de fumonisinas producidas, dependiendo del origen de la cepa, pero poca diferencia había entre cepas obtenidas de la misma área. En España (Sala *et al.*, 1994) se realizó un estudio similar con 147 cepas de *Fusarium spp* obtenidas de cereales cultivados en Cataluña. La especie predominante en estos granos fue *F. moniliforme* (87 %), pero también se encontró *F. sporotrichoides*, *F. heterosporum*, *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. anthophilum* y *F. subglutinans*. Asimismo, se determinó la habilidad *in vitro* de 133 cepas de *Fusarium*

de la sección Liseola, para producir fumonisinas en medios de cultivo a partir de maíz. Los resultados indicaron que un 33.8 % de ellas producía B<sub>1</sub>, mientras que el 18 % excretaba B<sub>2</sub>. Asimismo, *F. moniliforme* resultó ser la especie más prominente al producir este metabolito. Cuando Tseng y colaboradores (1995) trabajaron con *F. moniliforme* en Taiwan, encontraron que el 66 % de las cepas aisladas era capaz de producir fumonisinas.

Los únicos datos existentes para México acerca de la distribución de *F. moniliforme* y su toxigenicidad, provienen del estudio que realizaron Desjardins y colaboradores en 1994, quienes aislaron 34 cepas a partir muestras de maíz colectadas de cuatro campos de cultivo en el municipio de Escobedo, Nuevo León, en el interés de examinar su diversidad genética y la capacidad de producir fumonisinas. Los datos de esta investigación demostraron que entre las cepas obtenidas de *F. moniliforme* (*G. fujikuroi*) predominó la población de tipo "A", y que el homólogo de fumonisinas más frecuentemente producido por éstas bajo los sistemas de prueba en laboratorio fue B<sub>1</sub>, en concentraciones que variaron de 10 a 9,000 ug/g de maíz triturado; pero B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> también fueron detectadas en cultivos de algunas de estas. Sin embargo, en 31 de 34 extractos de cultivos, las fumonisinas totales producidas alcanzaron valores superiores a 1,000 ug/g, dato que les permitió concluir sobre la semejanza que guardaron las cepas mexicanas estudiadas con las obtenidas previamente en Estados Unidos, respecto a su alta capacidad toxigénica y el riesgo potencial que generan al contaminar el maíz cultivado en México y los productos para consumo humano a base de éste.

### **Estrategias de seguridad**

En la actualidad no existen estrategias prácticas para reducir significativamente las concentraciones de fumonisinas en el maíz, por lo cual el riesgo para la salud humana continúa siendo incierto. Aunque en este tiempo ha sido difícil asegurar la ausencia completa de fumonisinas en el maíz a través de estrategias tradicionales de control, como la selección de variedades resistentes a *F. moniliforme*, también es

muy posible que ante la carencia de tácticas como ésta, las cifras actualmente observadas hubiesen sido mucho mayores. Sin embargo, en varios países se han encontrado concentraciones muy altas de tales toxinas en maíz cultivado. A menos que ocurran retardos en la localización de genes específicos para su inclusión a modernos híbridos que resistan a *F. moniliforme*, parece que la selección tradicional de variedades va a continuar prestando su ayuda en el manejo de la calidad de este grano. Por su parte, los métodos de control biológico por exclusión competitiva de *F. moniliforme* no han sido probados como estrategia de reducción de fumonisinas, a pesar de los innumerables éxitos por el uso de agentes microbianos contra patógenos fúngicos. Por tal motivo, a continuación se mencionan diversos aspectos relacionados con este tópico.

### **Aspectos históricos del control biológico**

Básicamente el término "control biológico" involucra la disminución de un inóculo o la eliminación de una actividad causante de enfermedad por un patógeno, a través de uno o más organismos, incluyendo las plantas pero excluyendo al hombre. En una magnífica revisión de los aspectos históricos sobre el estudio de la patología de plantas, Ainsworth (1981) describe que el concepto "control biológico" fue usado inicialmente por C. F. Von Tubeuff en 1914, con una interpretación bastante amplia del control de un organismo por otro, excluyendo al hombre. También menciona que en 1874, D. Roberts acuñó la palabra "antagonismo" dentro de la microbiología, al demostrar la acción antagónica que sufría una bacteria al interactuar con cepas de *Penicillium glaucum*. Asimismo, aclara que M. C. Potter, en 1908 fue el primero en reportar la inhibición de patógenos de plantas por metabolitos de otros organismos: *Erwinia carotovora* creciendo en tejido de nabo o *Penicillium italicum* en cáscara de naranja, fueron suprimidos al interactuar con extractos de medios líquidos donde su contraparte microbiana había crecido.

En una de las clásicas revisiones de antecedentes sobre el control biológico de patógenos, Baker (1980) relata que el descubrimiento de la penicilina por Fleming,

así como su purificación y uso médico en 1939, estimularon notablemente los estudios sobre antagonismo de patógenos de plantas. De la misma forma, hace hincapie en que el primer intento de una aplicación directa ya había sido realizado por C. Hartley en 1921, quien inoculó suelos de vivero con 13 hongos antagonistas a *Phytophthora debaryanum*, en un intento por controlar el marchitamiento del cuello del tallo. Él encontró que *Phytophthora* sp inoculado en suelo no tratado, causó un 38 % de marchitamientos, mientras que en suelo esterilizado alcanzó el 100 %. Baker, también describe que en 1927, W. A. Millard y C. B. Taylor fueron más exitosos al controlar la roña común de la papa causada por *Streptomyces scabies*, al añadir *Streptomyces preacox* (un saprófito obligado) a un suelo estéril enriquecido con residuos de zacate. En este caso la población del patógeno decreció considerablemente, aun sin añadir el residuo orgánico. Incluso, analiza como G. Sanford y W. C. Bradfoot demostraron en 1931, el efecto "supresor" de 6 hongos, 15 bacterias y un actinomiceto, sobre el patógeno *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, en macetas con suelo estéril. Los cultivos filtrados de algunos de estos microorganismos también redujeron en parte la infección de plantas de varios cereales. En 1983, Cook y Baker documentan como A. W. Henry encontró en 1931, que *Fusarium graminearum* y *Helminthosporium sativum* causaban un porcentaje mucho mayor de pudrición, en el pie del tallo de plantas de trigo, cuando se plantaban en suelos estériles en contraste con tratamientos incorporados a suelos sin esterilizar. Al añadir una pequeña cantidad de suelo no estéril al esterilizado, la infección entre las plantas decreció de 47.8% a 7.8%. Este experimento constituyó la primera transferencia de la microflora antagonista para producir un suelo supresivo. Los mismos autores señalan además que, R. W. Weidling reportó por primera vez, en 1931, el uso de un antagonista productor de antibióticos, y definió el concepto "mycoparasitismo" al emplearse en el control de enfermedades de plantas causadas por *Rhizoctonia* sp. Este patógeno fue inhibido cuando *Trichoderma* sp se introdujo en semillas de cítricos acidificadas a pH de 4.0. Sin embargo, tal actividad no se manifestó en semillas sin acidificar, debido al deterioro del antibiótico gliotoxina a un pH de 6.0.

## Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas

Durante los últimos 25 años, la investigación ha ilustrado el potencial de diferentes microorganismos en el biocontrol de enfermedades de plantas. Entre las bacterias benéficas denominadas "rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas" se han reportado numerosos ejemplos para especies de los géneros *Pseudomonas* (Attafuah y Bradbury, 1989; Becker y Cook, 1988; Burr *et al.*, 1978; Buyer y Leong, 1986; Fermor y Lynch, 1988; Mc Loughlin *et al.*, 1992; Sakthivel y Gnanamanickam, 1987), *Arthrobacter* (Yuen *et al.*, 1985), *Alcaligenes* (Kloepper *et al.*, 1988), *Serratia* (Ordentrich *et al.*, 1988), *Agrobacterium* (Kerr, 1972; Vicedo *et al.*, 1993), *Erwinia* (Kempf y Wolf, 1989), *Rhizobium* (Chao, 1990) y *Bacillus* (Handelsman *et al.*, 1990; Morgan, 1963; Yuen *et al.*, 1985). Como habitantes nativos de suelo, las rizobacterias representan el tipo de inoculantes ideales, debido a su capacidad intrínseca para una rápida y efectiva colonización de las raíces. Tal atributo, *per se*, sugiere un mecanismo para prevenir la invasión por microorganismos deletéreos. Burr *et al.* (1978) reportaron significantes incrementos hasta de un 37% en el crecimiento y rendimiento de la papa, en experimentos de invernadero con cepas específicas de *Pseudomonas*. Similares resultados fueron obtenidos por Kloepper *et al.* (1980b) así como por Geels y Schippers (1983), al inocular respectivamente cultivos de papa con *Pseudomonas* fluorescentes bajo condiciones de campo y remolacha en invernadero, donde en ambos casos se logró incrementar la producción de 20 a 85%, al poder controlar enfermedades fúngicas. Van Peer y Schippers (1988) reportaron substanciales aumentos en el peso de raíz y tallo para tomate, pepino, lechuga y papa, como resultado de la bacterización con cepas de *Pseudomonas*. Las *Pseudomonas* fluorescentes también se han implicado en el control de la pudrición blanda por *Phytophthora* en cultivos de soya, en la pudrición negra de la raíz del tabaco, en la pudrición de las semillas de papa por *Erwinia carotovora*, en los diversos tipos de marchitamiento causados por *Fusarium* spp y otras enfermedades fúngicas en raíces de naranja, limón y ornamentales (Sneh *et al.*, 1984). Asimismo, se ha publicado que varias especies de *Phytium* han disminuido su capacidad infectiva al interactuar con cepas de *Pseudomonas* fluorescentes. Howell

y Stipanovic (1980) aislaron una cepa antagonista a *Phytophthora ultimum*, un importante patógeno del algodón, que permitió incrementar la sobrevivencia de plántulas hasta en un 71% en suelos infestados con el hongo. *Phytophthora* también es un reconocido patógeno de trigo, uno de los principales cultivos en el mundo, y al menos 10 especies de este hongo pueden afectar sus embriones y destruir los pelillos radiculares. A este respecto, se han aislado diversas cepas de *Pseudomonas* con capacidad de suprimir las especies de *Phytophthora* y aumentar el rendimiento de este cultivo hasta en un 26 % (Loper, 1988), similar a tratamientos con el ampliamente utilizado fungicida metalaxil.

Después de un extensivo trabajo y una serie de elegantes experimentos, Hebar y colaboradores (1992) obtuvieron cepas de *P. cepacia* antagonistas a *F. moniliforme*, las que inocularon como recubrimiento superficial a semillas de maíz (variedad GH 5006) para probar su habilidad de suprimir *in vitro* la enfermedad causada por este patógeno. Los resultados demostraron que la infección en plántulas se redujo entre el 23 al 80 %, en suelos infestados artificialmente con el hongo, a dosis de  $10^4$  UFC/g suelo. En contraste, los tratamientos con cepas de *P. fluorescens* y *Bacillus* sp. aisladas previamente de raíces de maíz, fueron menos efectivos. Con excepción de la cepa ATCC17616, todas las demás de referencia fueron incapaces de impedir el ataque de plántulas. Las cepas de *P. cepacia* inhibieron el crecimiento de diversos patógenos fúngicos de maíz, a saber, *Fusarium graminearum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemuthianum*, además de otros hongos del suelo como *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotium*. La cepa 526-7, una mutante Tn5 de la silvestre 526 (ATCC53267), resultó menos inhibitoria *in vivo*, debido a la pérdida de entre un 50 a 100 % en su actividad antagónica hacia los anteriores patógenos y a *F. moniliforme*. En una misma línea de investigación sobre el control biológico de este hongo, Rosales y Mew (1997), trabajando en Filipinas con cultivos de arroz, midieron el potencial antagonista de bacterias aisladas de agua, suelo rizosférico o plantas, con el objetivo de controlar la enfermedad denominada "bakana" causada también por *F. moniliforme* en arrozales. De las 441 cepas aisladas, 113 capaces de inhibir el crecimiento micelial del patógeno se agruparon en

3 categorías sobre la base de sus efectos en la germinación de semillas: i) aquellas que promovieron la germinación e incrementaron el vigor de las plántulas; ii) las que no tuvieron efectos sobre la germinación y iii) aquellas que fueron nocivas e inhibieron la germinación. La bacterización de semillas infectadas naturalmente, con las cepas aisladas, permitió la reducción en la incidencia del bakana y el control de esta enfermedad, desde un 0.6 al 6.8% y del 7.1 al 96.3%, respectivamente. Después de 3 años de ensayos con el patógeno y sus antagonistas, se definieron 10 cepas reductoras de la infección por bakana, de las cuales, 5 exhibieron resultados erráticos, mientras que el resto fue consistente en suprimir específicamente a los aislados de *F. moniliforme* recuperados de diversas localidades.

Entre las especies de *Bacillus* también se han documentado exitosos ejemplos del control de patógenos de plantas. Uno de los primeros datos fue aportado por Morgan en 1963, quien observó que *B. pumilis*, cultivado en agar-agua, lisó el tubo germinativo de las uredoesporas de *Puccinia recondita*, *P. graminis* f. sp. *tritici* y *P. coronata*, obteniéndose efectos similares con cultivos filtrados de esta bacteria. La aspersión de células vegetativas y esporas de este bacilo en plantas de trigo y avena, inhibieron significativamente la infección por las anteriores royas. Efectos igualmente prometedores han obtenido Rytter y colaboradores en 1987 en el control de la roya del geranio causada por *P. pelargonii-zonalis*. Ellos aislaron, a partir de hojas de geranio infectadas, tres cepas de *B. subtilis* que inhibieron la germinación de esporas y redujeron la incidencia de pústulas en plantas infectadas con la roya. En este caso, el o los factores inhibitorios de *Puccinia* sp estuvieron presentes en cultivos filtrados de las tres cepas de *Bacillus*. Uno de los sistemas más efectivos de control ha sido desarrollado desde 1990, cuando Handelsman y colaboradores aislaron una cepa de *B. cereus*, designada UW85; que redujo a 0% la mortalidad en plántulas de alfalfa, causada originalmente por *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* bajo condiciones de invernadero, e incrementó significativamente el porcentaje de germinación de semillas en el campo. También se ha mostrado que la severidad del marchitamiento causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *danthi* en plantas de clavel, se disminuye hasta en 66% cuando la cepa de *B. subtilis* A13 y *Pseudomonas* sp B10,

aisladas de un suelo supresivo para la enfermedad, se mezclaron y agregaron a macetas con suelo infestado por el hongo patógeno.

Los anteriores datos aportan una clara evidencia del fenómeno de estimulación en el crecimiento de plantas por inoculantes bacterianos, y en particular, ilustran el verdadero potencial de cepas específicas para el biocontrol de enfermedades. Sin embargo, deberá reconocerse que existen barreras que impiden el uso comercial de muchos de estos agentes biológicos. Entre los principales problemas destacan los resultados variables obtenidos en diferentes tipos de suelos y la inadecuada sobrevivencia en las semillas antes de la siembra. Actualmente resulta fácil obtener, mediante herramientas genéticas, mutantes resistentes a fungicidas con posibilidad de ser utilizados en estrategias de manejo integrado con métodos químicos, lo cual favorecería grandemente su desarrollo como agentes de control.

### **Mecanismos de supresión de patógenos**

a) Producción de sideróforos: La disponibilidad de fierro para la asimilación microbiana en el ambiente de rizósfera es extremadamente limitante, a pesar de ser el cuarto elemento químico más abundante en la superficie terrestre. En la solución acuosa del suelo, el fierro puede existir ya sea en forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) soluble o en forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) menos soluble, que predomina aproximadamente a  $10^{-18}$  M, concentración bastante baja para facilitar el crecimiento normal de los microorganismos, que requieren alrededor de  $10^{-6}$  M. Consecuentemente, para sobrevivir en este ambiente los organismos captan el hierro férrico y lo toman disponible a través de la producción de sideróforos, ligandos específicos de bajo peso molecular cuya biosíntesis es regulada por la concentración de fierro disponible. Aunque el avance científico en la década de los setenta había sugerido el involucramiento de estos compuestos en actividades inhibitorias de patógenos, la primera sustentación formal de este concepto fue publicada por Kloepper y colaboradores en 1980, quien aislaron el sideróforo de la cepa fluorescente B10 de *Pseudomonas* y demostraron que le confería capacidad de suprimir enfermedades de

plantas causadas por patógenos fúngicos. Además, los efectos inhibitorios del sideróforo purificado y de la cepa productora se inactivaron cuando el hierro se incrementó a concentraciones superiores a las normalmente encontradas en el suelo. Subsecuente evidencia genética aportada por diversos investigadores indica que las propiedades inhibitorias de ciertas pseudomonas, fueron abolidas en mutantes incapaces de producir sideróforos. En relación con lo anterior, la cepa WCS358 de *Pseudomonas* sp, mutante para la producción de sideróforos (Sid<sup>-</sup>) generada mediante el transposon Tn5, perdió su habilidad para promover el crecimiento de papa. Este reporte, publicado en 1986 (O'Gara *et al.*), fue el primero en demostrar la relación de los sideróforos con la estimulación del crecimiento de plantas bajo condiciones de campo. La carencia de hierro, promovida por la captación masiva de los sideróforos, también puede representar un mecanismo para prevenir la germinación de esporas fúngicas. Se ha observado *in vitro* una correlación directa entre la síntesis de sideróforos y la inhibición en la germinación de clamidosporas de *F. oxysporum*. Este eficiente mecanismo de consumo de hierro también puede ser un factor clave en la capacidad de las cepas productoras para colonizar eficientemente las raíces de las plantas y desplazar organismos nocivos. En la estrategia propuesta por O'Sullivan y O'Gara (1992) para la supresión de patógenos a nivel de rizósfera, el ión férrico es capturado por los sideróforos para ser translocado posteriormente a las células bacterianas productoras de los mismos, o a plantas con capacidad de asimilar el complejo sideróforo-hierro.

b) Producción de antibióticos: Esta capacidad ha sido reconocida como un importante atributo de las rizobacterias para eliminar patógenos. Uno de los reportes iniciales respecto a la significancia ecológica de los antibióticos producidos por microorganismos, fue el aportado por Pendleton en 1969, quien al estudiar la patogenicidad de *B. thuringiensis* en insectos, postuló el papel esencial de estos compuestos con la exitosa colonización del intestino de las larvas. Se ha demostrado la presencia en el suelo de diversos compuestos de naturaleza antibiótica, que incluyen fenazinas, pioluteorina, pirrolnitrina, tropolona, piocianina y 2,4 diacetilfloroglucinol (Howell y Stipanovic, 1986; Lindberg, 1981; Mazzola *et al.*, 1992;

Mc Loughlin *et al.*, 1992; Thomashow y Weller, 1988). Algunos de estos compuestos, como la tropolona, presentan amplio espectro de actividad, lo que puede resultar en una indiscriminada letalidad de la flora benéfica. Sin embargo, otros antibióticos exhiben diferentes grados de especificidad contra ciertas enfermedades en plantas inducidas por microorganismos. Howell y Stipanovic (1980) encontraron que la pisoluteorina producida por una *Pseudomonas* fluorescente, derivó en un tratamiento efectivo para proteger el cultivo de algodón contra el marchitamiento del cuello del tallo originado por *Phytophthora* sp, mientras que la pirrolnitrina sintetizada por otra cepa fue más eficiente para prevenir la infección inducida por *Rhizoctonia solani* (Howell y Stipanovic, 1979). Hasta hace muy poco tiempo se carecía de evidencia directa que apoyara la producción de antibióticos *in vivo*, como un mecanismo de control de patógenos por rizobacterias. Típicamente se establecía una correlación entre la inhibición de patógenos *in vitro* y la protección de las plantas *in vivo* contra la enfermedad por cepas seleccionadas (Kloepper y Schroth, 1981). El desarrollo de métodos genéticos ha permitido sustentar las anteriores observaciones. En uno de los reportes iniciales, Gutterson *et al.* (1986) mostraron que las mutantes negativas para antibióticos habían perdido la capacidad para inhibir un hongo patógeno. Por su parte, Thomashow y Weller (1988) generaron cepas defectuosas en la producción del antibiótico fenazina, y encontraron una estrecha relación entre la carencia de inhibición *in vitro* de *G. graminis* con la reducida protección del trigo contra el marchitamiento causado por éste, en completo contraste con la cepa silvestre. La confirmación definitiva del papel de los antibióticos en el control de enfermedades fue aportada posteriormente (Thomashow *et al.*, 1990; Weller *et al.*, 1988) mediante ensayos de cromatografía líquida de alta resolución, donde se detectaron fenazinas en la rizósfera de trigo colonizada por una cepa silvestre de *Pseudomonas*, mientras que este antibiótico no fue encontrado en tratamientos que incluyeron mutantes deficientes en la síntesis de este compuesto.

c) Producción de bacteriocinas: Históricamente, el término bacteriocina se ha aplicado a compuestos de tipo proteico con actividad de antibióticos y especificidad restringida contra cepas bacterianas filogenéticamente relacionadas a las cepas

productoras. Las bacteriocinas más ampliamente estudiadas son las colicinas producidas por *Escherichia coli*. La actividad letal de estos compuestos está dirigida principalmente contra otras cepas de *E. coli* y los habitantes intestinales, pero no presentan efecto contra bacterias gram-positivas o muchas otras gram-negativas. La bacteriocinogenia es una capacidad ampliamente distribuida entre especies de al menos 30 géneros, incluyendo muchos patógenos de plantas, de los cuales solo se conoce el modo de acción de la agrocina 84, producida por *Agrobacterium radiobacter* cepa 84, que inhibe específicamente la síntesis de ADN en *Agrobacterium tumefaciens*, el agente causal de tumorações en muchos cultivos; y de la caratovoricina sintetizada por *Erwinia carotovora*, que presenta actividad fosfolipasa contra cepas de su misma especie. Sin embargo, aunque se ha demostrado que la agrocina 84 es secretada en la superficie de las hojas, la concentración alcanzada generalmente es insuficiente para reducir los efectos causados por el patógeno (Vidaver, 1983). Smidt y Vidaver (1982) utilizaron una cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* productora de una bacteriocina que suprimó efectivamente a una variante sensible en hipocotilos infectados de frijol. Este efecto antagonista también pudo ser detectado en extractos de tejido vegetal. Sin embargo, cuando se utilizó una mutante patogénica bacteriocina-resistente, no ocurrió abatimiento del cuadro infectivo. Por su parte, muchas especies de *Bacillus* producen bacteriocinas, y entre las mejor caracterizadas se encuentran las megacinas de *B. megaterium*, aunque de particular interés para los patólogos son las producidas por *B. thuringiensis*. A pesar de que *B. thuringiensis* es bien conocido por su capacidad para sintetizar  $\delta$ -endotoxina y  $\beta$ -exotoxina, muy poco se sabe de las bacteriocinas producidas por esta especie. En 1957, Vankova fue el primero en describir su actividad antagonista contra otras gram-positivas, lo cual fue posteriormente confirmado en 1974 por De Barjac y Lajudie, entre serotipos de esta especie. En 1989, Montgomery y Yousten caracterizaron la thuricina de la cepa HD-2, cuya actividad antibacteriana inhibió el crecimiento de una amplia variedad de cepas estrechamente relacionadas.

d) Producción de ácido cianhídrico: Aunque no se ha definido claramente el papel del cianuro de hidrógeno (HCN) como un elemento de control para patógenos de plantas, se ha demostrado, por evidencia indirecta con una rizobacteria mutante incapaz de producir HCN, la importancia de este compuesto en la supresión de la pudrición negra de la raíz de la papa. Al menos en tabaco este mecanismo actuó favorablemente, a pesar de que la misma cepa careció de efecto sobre *G. graminis* en una infección de trigo (Bakker y Schippers, 1987). Otros investigadores han sugerido que la producción de HCN por rizobacterias puede ser nocivo para el crecimiento vegetal, puesto que se le ha relacionado con la reducción en el rendimiento de la papa. Consecuentemente, es posible que HCN ejerza distintos efectos sobre las plantas, ya que en tabaco también se ha notado que estimula la formación de pelillos radiculares, observación que implicaría, en parte, la resistencia a ciertos patógenos (Hass *et al.*, 1991).

e) Competencia: La exclusión competitiva de patógenos de plantas se ha demostrado escasamente en la rizófera. Sin embargo, este efecto se ha ilustrado brillantemente para las *Pseudomonas syringae* nucleadoras de hielo (Hielo<sup>+</sup>) en la filósfera. Las patovarietades de *Pseudomonas syringae* (Hielo<sup>+</sup>) causan daño a las plantas al servir como núcleos bacterianos de hielo en los tejidos, a temperaturas incluso de 0°C. En 1987, Lindow obtuvo una cepa mutante Hielo<sup>-</sup> a partir de una cepa Hielo<sup>+</sup>, y demostró que podía competir satisfactoriamente con la cepa patógena en la superficie de las hojas, disminuyendo así la incidencia del daño por congelación. Se ha sugerido que el factor competencia también pudiese jugar un papel importante en el tratamiento de enfermedades causadas por *Phytophthora* y *Fusarium*.

### **Consideraciones del mercado**

El estado actual del biocontrol en patología de plantas presenta un esquema ambivalente. Por un lado, a pesar de varias décadas de investigación solo se han

comercializado unos cuantos productos razonablemente efectivos. Por otra parte, las preocupaciones del efecto tóxico de los plaguicidas sobre la salud humana y el ambiente son cada vez mayores, de tal forma que en años recientes el mercado de los productos químicos ha decrecido voluntaria o forzadamente. De este modo, existe una clara e imperiosa necesidad de usar productos biológicos. Además, las perspectivas nunca han sido mejores, ya que a través de la biotecnología se ha generado la posibilidad para desarrollar nuevas estrategias dentro del biocontrol.

El mercado global para productos que protegen y estimulan el crecimiento de plantas asciende a 19.3 billones de dólares, de los cuales 4.1 corresponden a los fungicidas. Los diversos agentes microbianos, exceptuando *Rhizobium*, se comercializan en solo 25-55 millones de dólares ( $\sim 0.14\%$  del mercado químico), y el 90% de esta pequeña fracción es atribuible a productos de *B. thuringiensis* (Lethbridge, 1989), el agente de control biológico más exitoso hasta la fecha, que se ha utilizado durante décadas contra larvas de insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera. La notable aceptación de *B. thuringiensis* es función de una afortunada combinación de factores que rodean la biología de este organismo, la dinámica de producción y las utilidades de mercado. Esta bacteria puede ser producida fácilmente en masa, con un medio de cultivo barato, y se tienen detallados antecedentes de la estructura molecular del genoma, así como de la química de sus toxinas que aportan la base de las manipulaciones genéticas para diseñar formulaciones multitoxinas o alterar especificidades para los organismos blanco (Gelernter y Scwab, 1992; Heimpel, 1971; Powell *et al.*, 1990; Rowe y Margaritis, 1987), cualidades que en adición a la ubicuidad en la naturaleza (Martin y Travers, 1989; Meadows *et al.*, 1992; Smith y Couche, 1991), resultan altamente atractivas en un agente de control biológico, como candidato para la explotación comercial.

## MATERIAL Y METODOS

### Distribución de *F. moniliforme*

#### *Muestreo de cultivos de maíz en Nuevo León*

Durante el ciclo de cultivo primavera-verano se realizó un muestreo de mazorcas de maíz en las distintas áreas del Estado de Nuevo León, conformadas por los distritos agrícolas de Montemorelos, Galeana y Apodaca (SAGAR, 1997), donde se analizaron para cada uno de los anteriores, diversas localidades que al momento del estudio habían sembrado el grano de interés. En el primer caso se obtuvieron muestras de dos ejidos del municipio de Linares; en el segundo, Dr. Arroyo y Galeana contribuyeron con especímenes de siete y cinco ejidos, respectivamente. Mientras que del tercer distrito solo se recogieron mazorcas procedentes de Escobedo, en tres de sus ejidos (Tabla 1). En todos los casos fueron seleccionadas al azar plantas maduras de maíz blanco cultivadas para consumo humano, con la finalidad de coleccionar entre dos a diez unidades sin aparente contaminación fúngica.

#### *Aislamiento de *F. moniliforme**

Las mazorcas coleccionadas se depositaron en bolsas de papel rotuladas, y se transportaron al laboratorio para su debido procesamiento o almacenamiento a temperatura ambiente. De esas mazorcas, se seleccionaron 12 granos intactos, sin daño aparente en la cutícula y/o el pedicelo, los que se colocaron en cajas Petri para desinfectarlos superficialmente al adicionarles NaClO al 0.5 %, manteniéndolos así por 1 min, asegurándose de que todas las semillas estuvieran sumergidas en la solución durante ese tiempo. Con pinzas estériles se retiraron asépticamente los granos y se pasaron a una segunda caja Petri, a la que se adicionó agua destilada estéril hasta cubrirlos, para luego someterlos a una lenta agitación por breves momentos y posteriormente desechar el líquido sobrante. Una vez que esta operación

de lavado se efectuó por 3 veces, se seleccionaron 4 granos, los cuales se colocaron sobre papel secante estéril para eliminarles el exceso de humedad, acomodándolos después sobre la superficie

Tabla 1  
Localidades estudiadas con maíz cultivado en los 3 distritos agrícolas del Estado de Nuevo León

Distrito Agrícola *	Municipio	Ejido	Variedad de Maíz Cultivado
Montemorelos	Linares	Cerro Prieto	Criollo
		Loma Alta	Criollo
Galeana	Dr. Arroyo	Cerrito del Aire	Criollo
		Puerto de Dolores	Criollo
		Puerto de Aguilar	Criollo
		Guadalupe	Criollo
		Presita de Ruedas	Criollo
		San Juan del Palmar	Criollo
		El Charquillo	Criollo
Galeana	Galeana	La Gloria	H-791
		Puerto México	V-550
		El Cuije	Criollo
		La Lagunita	Criollo
Apodaca	Escobedo	Agua Fría	Pinto Amarillo
		San Nicolás	Blanco Purísima
		Santa Rosa	NLVS-2

\* = De acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

de una placa conteniendo el medio de cultivo modificado de pentacloro-nitrobenceno (PCNB: peptona, 15.0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g; pentacloro-nitrobenceno, 0.8 g; agar-agar, 20.0 g; agua destilada, 1.0 l; pH 5.5 a 6.5. Después de esterilizar, el medio se enfriaba para adicionar 1 g de sulfato de estreptomicina), selectivo para *Fusarium spp* (Nelson *et al.*, 1983). Las cajas se incubaron a  $28 \pm 2$  °C por 7 días y se realizaron observaciones cada 24 h para registrar las características de las colonias obtenidas a partir de los granos. Las cepas sospechosas se sembraron en agar sintético Nährstoffärmer (SNA:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 g;  $\text{KNO}_3$ , 1.0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0.5 g; KCl 0.5 g; glucosa, 0.2 g; sacarosa, 0.2 g; agar-agar, 20 g; agua destilada, 1.0 l; pH 4.5 a 5.5) y Papa Dextrosa Agar (PDA). Para confirmar la identidad de las cepas seleccionadas como *F. moniliforme*, se utilizaron criterios tanto macroscópicos de la colonia sobre PDA (diámetro de crecimiento, micelio aéreo, color del agar al reverso de la colonia), como microscópicos a partir de SNA (macroconidias en esporodoquio, microconidias en micelio aéreo, abundancia relativa de microconidias en el micelio aéreo, microconidias en cadenas, morfología de las microconidias, conidióforos en el micelio aéreo y formación de clamidosporas). Para tal propósito, la caja Petri se mantuvo bajo condiciones asépticas, al cubrirlas con un plástico adherible a fin de evitar la exposición al aire de las conidias, después de lo cual, se procedió a realizar las anteriores observaciones microscópicas con objetivo de 40 X para establecer la identidad de cada cepa, con base en las claves taxonómicas fúngicas definidas por Booth (1971), Nelson *et al.* (1993) y el novedoso programa interactivo de Internet, Fuskey (Seifert, 1996).

### *Estimación del potencial toxigénico in vitro*

Para el análisis de la capacidad productora de fumonisinas por las cepas de *F. moniliforme* aisladas de las diferentes localidades del Estado de Nuevo León, se inoculó cada una en placas de agar V-8 (jugo V-8 filtrado, 200 ml; agar-agar, 20 g; agua destilada, 800 ml, pH de 4.5 a 5.5 ) incubandose por 2 semanas a 25°C, tiempo después del cual se adicionaron a la placa 5 ml de agua destilada estéril para producir suspensiones conidiales (Stevens, 1974; Desjardins, 1994). Después de

reposar 2 ó 3 min, se extrajo mediante una jeringa estéril el sobrenadante de la suspensión y se depositó en tubos de ensaye para ajustar mediante diluciones, con la cámara de Neubauer como indicador, el número de células a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidias/ml (Lynch *et al.*, 1985), con la finalidad de incorporar por triplicado 1 ml de este inóculo a cada matraz Erlenmeyer estéril de 250 ml, conteniendo 50 g de maíz blanco (libre de toxinas y triturado a un grueso diámetro de partícula), humedecido con 11 ml de agua destilada. Estos matraces se incubaron a  $25 \pm 2$  °C por 28 días y luego se procedió a secar el material de cultivo durante 3 días a 60 °C, almacenándose posteriormente en refrigeración hasta su uso en el proceso de extracción de las fumonisinas producidas (Desjardins *et al.* 1992, Desjardins *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1990). Del material de cultivo seco se tomaron 10 g para colocarse en matraces Erlenmeyer de 50 ml, a los que se agregaron 20 ml de la mezcla metanol-agua en proporción 3:1. Esta suspensión se mantuvo en reposo bajo refrigeración durante 18 a 24 h, periodo durante el cual se agitó ligeramente algunas veces y después se procedió a filtrarla a través de papel filtro Whatman # 4, depositando los extractos en viales de vidrio de 20 ml, que permanecieron guardados en refrigeración menos de 24 h antes de someterlos al análisis de fumonisinas (AOAC, 1995).

### *Detección de fumonisinas*

Para todas la pruebas con fumonisinas se utilizó como reactivo control el estándar originalmente liofilizado de 11,000 mg/l de B<sub>1</sub> (pureza > 95 %), proporcionado por el Dr. Ronald D. Plattner (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, National Center for Agricultural Utilization Research, en Peoria Illinois, U.S.A.). Dicho estándar se reconstituyó con la mezcla acetonitrilo / agua en proporción 1:1, para preparar mediante diluciones seriadas, una curva patrón con las concentraciones de 62.5, 125, 250, 500 y 1,000 mg/l. Tanto de los extractos problema como de los anteriores estándares, se transfirieron con micropipeta Eppendorf, 10 ul a placas de sílica-gel (Whatman 60 A de 20 x 10 cm, previamente activadas en estufa a 115°C/1 h y mantenidas en desecador hasta su

enfriamiento), que posteriormente fueron introducidas en el tanque conteniendo el eluyente cloroformo - metanol - ácido acético (6:4:1), a fin de llevar a cabo la detección mediante cromatografía en capa fina. El solvente residual se dejó evaporar bajo la campana de extracción, y una vez que las placas estuvieron secas, se rociaron con *p*-anisaldehído al 0.5 %, disuelto en la mezcla metanol - ácido sulfúrico - ácido acético (17:1:2). A continuación se calentaron a 130 °C, evitando la evaporación durante 5 a 10 min hasta observar la aparición de las típicas manchas oscuras, indicativas de la presencia de fumonisinas, para luego proceder a la cuantificación de las mismas por extrapolación, al comparar la intensidad de color en relación con los estándares (Plattner *et al.*, 1992).

### **Antagonismo *in vitro* de *B. thuringiensis* contra *F. moniliforme***

Las cepas de *F. moniliforme* que se utilizaron en estos ensayos (Tabla 2) fueron proporcionadas por el United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, National Center for Agricultural Utilization Research, en Peoria Illinois, U.S.A. Estas cepas se activaron en cajas de Petri con agar V8 inclinado, y se incubaron durante 6 días a 28 °C, para luego conservarse en tubos con el mismo medio hasta antes de los experimentos. Continuamente se realizaron preparaciones microscópicas en fresco para verificar las características morfológicas de estos organismos, como medida de identidad (Nelson *et al.*, 1983; Seifert, 1996). Las cepas de *B. thuringiensis* que se probaron como agentes antagonistas, se obtuvieron de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la FCB-UANL (Tabla 3). Estas permanecieron liofilizadas, hasta que se activaron para su uso en tubos con torunda conteniendo 2.5 ml de caldo nutritivo a pH 7, los que se incubaron a 30 °C por 24 h en agitación rotatoria a 150 rpm, para luego resembrar las cepas en agar nutritivo inclinado a pH 7, y mantenerlas en incubación a 28 °C durante 48 h. Antes de cualquier ensayo, también se realizaron como medida de identidad, tinciones simples de cada cepa para confirmar al microscopio la forma característica de su cristal.

Tabla 2

Cepas de *F. moniliforme* usadas en los ensayos de antagonismo.

Mex-II-1	Mex-II-8	Mex-II-15	Mex-II-22	Mex-II-29
Mex-II-2	Mex-II-9	Mex-II-16	Mex-II-23	Mex-II-30
Mex-II-3	Mex-II-10	Mex-II-17	Mex-II-24	Mex-II-31
Mex-II-4	Mex-II-11	Mex-II-18	Mex-II-25	Mex-II-32
Mex-II-5	Mex-II-12	Mex-II-19	Mex-II-26	Mex-II-33
Mex-II-6	Mex-II-13	Mex-II-20	Mex-II-27	Mex-II-34
Mex-II-7	Mex-II-14	Mex-II-21	Mex-II-28	Mex-II-35

Tabla 3

Cepas de *B. thuringiensis* usadas en los ensayos de antagonismo.

Cepa	Subespecie	Serotipo
GM-1	<i>aizawai</i>	7
GM-2	Nd	8a8b
GM-3	<i>sotto</i>	4a4b
GM-4	<i>kumamotoensis</i>	18
GM-5	Nd	7
GM-6	<i>aizawai.</i>	7
GM-7	<i>aizawai.</i>	7
GM-8	<i>aizawai.</i>	7
GM-9	<i>aizawai.</i>	7
GM-10	<i>aizawai.</i>	7
GM-11	<i>aizawai.</i>	7
GM-12	<i>tolworthi</i>	9
GM-13	<i>ostriniae.</i>	8a8c
GM-14	<i>aizawai.</i>	7
GM-15	<i>nigeriae.</i>	8a8d
GM-16	<i>nigeriae.</i>	8a8d
GM-17	<i>nigeriae</i>	8a8d
GM-18	<i>neoleonensis.</i>	24
GM-19	Nd	nd
GM-20	<i>ostriniae</i>	8a8c

Nd = No determinado

### *Preparación de inóculos para ensayos de antagonismo*

La recuperación de las conidias de *F. moniliforme* (Handelsman *et al.*, 1990; He *et al.*, 1994) se realizó a partir de resiembras de las cepas activadas, en tubos con agar V8 incubados por 6 días a 28 °C, a los que se les adicionó agua destilada estéril y se agitó ligeramente durante 1 min, para luego dejar reposar 5 min esta suspensión y vaciar posteriormente el sobrenadante a otro tubo estéril. En la preparación de inóculos con apropiadas concentraciones de conidas, se emplearon como técnicas de conteo celular, el nefelómetro de McFarland y la cámara de Neubauer (Lynch *et al.*, 1985; Someasgaran y Hoben, 1985). Las suspensiones celulares de *B. thuringiensis* se obtuvieron cuando las cepas activadas se hicieron crecer en tubos con agar nutritivo inclinado, a los que se les adicionó un volúmen de solución salina estéril al 0.85%, para desprender las células creciendo superficialmente con el asa bacteriológica, y luego dejar reposar por 5 min para después vaciar el sobrenadante a un tubo estéril y ajustar el número de células a las concentraciones deseadas. Adicionalmente a las técnicas de conteo usadas para conidias, cuando fue necesario las células vegetativas y esporas se cuantificaron mediante cuenta viable por el método de Miles y Misra (Somasegaran y Hoben, 1985).

### *Selección de cepas antagonistas*

La técnica del "Disco de Agar" (Visser *et al.*, 1986), fue empleada como criterio selectivo de cepas antagonistas a *F. moniliforme*, en base a la inhibición del crecimiento fúngico, medido en términos del diámetro del halo formado por inóculos de *B. thuringiensis*, inmersos en discos de agar que fueron colocados sobre películas del micelio, creciendo superficialmente en placas de cultivo. Para este propósito, se sembraron las cepas de *B. thuringiensis* en agar nutritivo inclinado y se incubaron por 48 h a 28 °C, con la finalidad de añadir directamente al tubo, 3 ml de solución salina estéril (0.85%) para obtener una suspensión celular concentrada a  $3 \times 10^8$  cel/ml, de la cual se tomaron 2 ml que se adicionaron a tubos con 18 ml de agar nutritivo fundido. La mezcla se vació en cajas de Petri que se incubaron de 24 a 72 h.

Después de lo cual, con sacabocados se prepararon asépticamente para cada cepa, discos de agar con 8 mm de diámetro. Los experimentos de inhibición del crecimiento, también incluyeron los metabolitos producidos por las bacterias durante su crecimiento por 72 h a 30 °C en caldo nutritivo, contenido en matraces Erlenmeyer de 25 ml, que fueron incubados bajo agitación rotatoria a 150 rpm. Cada 24 h se tomaron alícuotas de 5 ml de estos medios, para centrifugarlas a 3,000 rpm durante 10 min, y así obtener los sobrenadantes que a continuación se hicieron pasar por filtros milipore (Tipo GS de 0.22 mm), depositando posteriormente, 20  $\mu$ l del filtrado, en discos estériles de papel Whatman, también de 8 mm de diámetro, los que a su vez se colocaron en cajas de Petri con agar V8 libre de humedad, sembradas previamente con una suspensión de  $3 \times 10^8$  conidias/ml, que fue extendida en la superficie mediante hisópo. En ambos casos se usaron testigos como negativos, discos de agar libres de células o de papel sin la adición de filtrados.

### *Optimización de condiciones antagónicas*

La interacción entre patógenos y los posibles antagonistas, consistió en enfrentar inicialmente a las 35 cepas de *F. moniliforme* contra las 20 de *B. thuringiensis*, en experimentos realizados bajo el sistema antes descrito, con agar V8 inoculado superficialmente con  $3 \times 10^8$  conidias/ml y discos de agar preparados también con de  $3 \times 10^8$  células/ml creciendo por 24 h a 28°C o de papel impregnado con medios de cultivo filtrados, libres de células. En este caso los ensayos duraron 15 días en incubación a 28 °C. Entre las variaciones que se hicieron a la anterior estrategia, se incluyen; la cantidad de antagonistas y patógenos probados; la proporción de inóculos fúngicos ( $10^4$ ) o bacterianos ( $10^9$  y  $10^{11}$ ) usados; el menor tiempo de interacción entre ambos (6 días); el mayor período de incubación del agar (48 o 72 h) para preparar los discos conteniendo las bacterias inmersas; así como la prolongación en el período de tiempo de contacto de los cultivos filtrados con las cepas del hongo.

## **Estabilidad de *B. thuringiensis* en el suelo**

En los experimentos para medir la estabilidad de *B. thuringiensis* en el suelo, se emplearon inicialmente las mismas cepas utilizadas para antagonizar a *F. moniliforme* (Tabla 3). Debido a la morfología variable del cristal paraesporal entre las mismas, se pudieron reconocer fácilmente las estructuras bipiramidales rectangulares, circulares, cuadrangulares o de formas irregulares como un indicio de identidad. Asimismo, tales cepas difirieron en el origen de aislamiento, aunque todas fueron aisladas de suelo, se obtuvieron de distintas regiones del país. Como organismos de referencia se utilizaron las cepas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* serotipo 3a3b (HD-1) de y *B. subtilis* (BS-FCB-1). Todas las cepas se mantuvieron en agar nutritivo inclinado hasta su uso en los diversos experimentos.

### *Suelos usados*

Se emplearon dos tipos de suelo representativos del estado de Nuevo León: xerosol (pH 7.3, 3.0% de materia orgánica) y litosol (pH 7.5, 2.5% de materia orgánica), cuya superficie conjunta constituye aproximadamente el 65% de territorio (35 y 30%) respectivamente. El primer suelo se colectó en campos de la región agrícola más importante, en el municipio de Anáhuac, mientras que el segundo se obtuvo de Villa de Santiago. Las características fisicoquímicas adicionales para ambos, se consultaron del texto de Buringh (1979). De ambas localidades y en distintos puntos del área, se colectaron muestras a profundidad de 3-15 cm, para combinarlas entre sí y formar una muestra compuesta de aproximadamente 20 kg, la que se colocó en una bolsa oscura de polietileno para transportarla al laboratorio, donde se secó al aire y se trituró a un tamaño de partícula < 2 mm, almacenándose en oscuridad a temperatura de refrigeración hasta su uso. Los análisis microbiológicos y fisicoquímicos de estos suelos, se hicieron utilizando métodos standard (Jackson, 1976; Palmer y Toreh, 1979; Soil Conservation Service, 1972). Para todos los ensayos se utilizaron como unidades experimentales, frascos de vidrio transparente de 10 ml, a los que se les adicionaron 2 g de suelo xerosol o litosol no estéril, y luego se

taparon con torunda de algodón para esterilizarlos en autoclave por 20 min a 121 °C. La humedad captada por el suelo a través de este proceso, se eliminó al depositar los frascos sin torunda en campanas de flujo laminar, ajustándose posteriormente al nivel de humedad deseado en cada experimento. La esterilidad se verificó por cuenta viable en agar nutritivo y Sabouraud.

### *Inoculación al suelo*

La semilla para la preparación de inóculos, procedió de cultivos patrón de cada cepa sembrados en agar inclinado. Mediante dos asadas, se transfirieron células a tubos de ensaye con 10 ml de caldo y se incubaron a 37°C por 24 h. Una suspensión bacteriana de esta fase, fue removida y usada para inocular (1% v/v) un segundo caldo que involucró 50 ml de medio contenido en matraces de 250 ml de capacidad. Estos cultivos se hicieron crecer por 24 o 72 h en agitador rotatorio a 200 rpm y 37°C, hasta alcanzar la fase logarítmica o estacionaria, respectivamente, para obtener células vegetativas así como esporas y cristales. Los datos obtenidos por este procedimiento se graficaron en papel semilogarítmico de tres ciclos, para conocer la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación (td) de cada cepa (Schlegel, 1979; Wang *et al.*, 1979). Simultáneamente se llevaron a cabo cuentas viables en placa por el método modificado de Miles y Misra (Somasegaran y Hoben, 1985). De estos matraces se tomaron volúmenes de 10 ml que se distribuyeron asépticamente en tubos de centrifuga para separar las células a 2,000 rpm durante 30 min. El paquete celular se resuspendió nuevamente y se lavó 3 veces, concentrándolo en solución salina para luego añadirlo al suelo en volúmenes precisos hasta ajustar a  $10^6$ - $10^8$  UFC/g. La agitación manual de los frascos, pretendió distribuir de forma homogénea los propágulos añadidos, advirtiéndose este efecto al mostrar el suelo una apariencia uniformemente húmeda. En todos los tratamientos con suelos, la suspensión celular agregada, también ajustó la humedad disponible a la capacidad de campo. Periódicamente, se determinó el peso de los recipientes, y se agregó agua destilada estéril para compensar las pérdidas por evaporación. El suelo inoculado en los recipientes, se incubó a temperatura ambiente en oscuridad. En este estudio,

cada una de las 20 cepas de *B. thuringiensis* se también se distribuyó en ambos tipos de suelos estériles, manteniéndose en un acomodo completamente al azar junto con sus respectivos controles en el área de resguardo, hasta por 190 días, tiempo durante el cual, se removieron y analizaron 7 muestras, a fin de establecer cambios en las densidades de población. Además del parámetro anterior, en la última fecha de muestreo, se determinó la capacidad de *B. thuringiensis* para producir cristales después de su permanencia en el suelo. A partir de los conteos viables de las cepas introducidas, se tomaron 10 colonias de las últimas diluciones y se prepararon frotis teñidos con cristal violeta, los cuales se analizaron posteriormente para detectar estructuras paraesporales (De Lucca *et al.* 1981). En la estimación de la tasa de esporulación por células vegetativas o la germinación de esporas en suelo, se añadió a muestras de xerosol estériles y no estériles, cualquiera de los propágulos provenientes de las cepas GM-1 o GM-4 (además de los controles). Después de una determinación inicial para enumerar poblaciones totales, diariamente (por lapsos de hasta 8 días, según la cepa), se obtuvieron muestras de suelo, para someterlas a un proceso de pasteurización a 65 °C por 30 min (West *et al.*, 1984a; West *et al.*, 1985a). Las diferencias en la densidad de población entre suspensiones de suelo pasteurizadas y no pasteurizadas se tomaron como evidencia de esporulación de células vegetativas o germinación de esporas.

### *Preparación de inoculantes con cepas seleccionadas*

Se preparó una formulación inoculante de aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/g, mediante la adición de una suspensión celular concentrada de *B. thuringiensis*, cepas GM-1, GM-4, HD-1 y la cepa de *B. subtilis*, BS-FCB-1, a una bolsa de plástico oscura conteniendo 1 Kg de un soporte estéril, formado por la mezcla arena-turba en proporción 5:1. Inmediatamente después de guardar la formulación a temperatura ambiente, se tomaron muestras de 1 g y se prepararon diluciones seriadas, que se distribuyeron en placas con agar nutritivo a fin de establecer la concentración inicial del producto. De la misma manera, con el objetivo de conocer el período de vida de la formulación inoculante, se tomaron muestras a intervalos regulares de tiempo y se sujetaron al procedimiento de conteo en placa. En experimentos para definir la

estabilidad de tales inoculantes, se tomaron aquellas formulaciones almacenadas que conservaron las características de calidad requeridas por al menos 2 meses, y se mezclaron a un volumen total de 10 g en proporciones de 1:10, con muestras de suelo estéril o no estéril de tipo xerosol, contenidas en recipientes de vidrio, los que luego se incubaron a temperatura ambiente. Como estrategia de medición de las densidades poblacionales de las 4 cepas introducidas a suelo como inoculantes, en ensayos con suelo estéril; nuevamente se usó agar nutritivo a pH 7 como medio de recuperación y conteo de la cepas, mientras que en los experimentos con suelo no estéril se emplearon los marcadores de resistencia a antibióticos en el mismo medio de cultivo suplementado con sulfato de estreptomycin, penicilina G y nistatina, a concentraciones de 100, 50 y 20  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Al inicio se probaron sensidiscos para conocer la respuesta de las cepas seleccionadas a diversos antibióticos, para tal caso, se prepararon discos de papel filtro de 5 mm de diámetro, impregnándolos con 5  $\mu\text{l}$  de una solución de 20  $\mu\text{g/ml}$  de uno u otro de los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico, amikacina, ampicilina, cloramfenicol, clorotetraciclina, estreptomycin, gentamicina y penicilina G. Con excepción de la penicilina G, que se disolvió en agua destilada, todas las soluciones antibióticas usadas para impregnación a papel o incorporación a medios de cultivo, se disolvieron o suspendieron en etanol al 95% y se esterilizaron por filtración a través de membranas milipore (0.22  $\mu\text{m}$ ), antes de añadirse asépticamente a los discos de papel estériles. La esterilidad de las soluciones se determinó por cuentas en placa. La respuesta de las cepas a los discos con antibiótico, se determinó al distribuir con hisópo estéril sobre placas del mismo agar, antes de depositar los discos, una alícuota de un cultivo en caldo nutritivo con  $10^7$  a  $10^8$  células/ml en fase de crecimiento. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  hasta por 3 días. El diámetro de la zona de inhibición se midió en mm en relación al borde del disco, y se consideró arbitrariamente como sensible o resistente a un antibiótico, aquel organismo cuya colonia formó un halo de inhibición en el crecimiento  $>$  o  $<$  1 mm, respectivamente. Los antibiogramas se realizaron por triplicado para cada una de las cepas (Barry, 1976; Cole y Elkan, 1979). Tomando como criterio los patrones de resistencia observados para las diversas cepas, y de acuerdo a los trabajos de Danso *et al.*, 1973; Kuykendanll y Weber, 1978; Saleh *et al.*, 1969; y West *et al.*,

1984a, se escogió la penicilina G, estreptomicina y nistatina, como agentes selectivos a incluir en el medio, para obtener mutantes espontáneas de cada una de las cepas, resistentes a los mismos. Las pocas colonias de las cepas que crecieron en el medio con antibiótico, fueron purificadas y propagadas en medios de la misma composición y usadas en selecciones sucesivas para concentraciones incrementadas y combinaciones entre los 3 antibióticos, hasta alcanzar las proporciones previstas. Las poblaciones heterotróficas aerobias nativas del suelo, se estimaron en agar nutritivo suplementado con 100 ug/ml de nistatina e incubado hasta por 5 días a 37°C (West, 1984; West *et al.*, 1985a).

### *Efecto de factores ambientales del suelo sobre los inoculantes*

En el interés de conocer la variables ambientales que determinarían el establecimiento de *B. thuringiensis* como un habitante nativo del suelo, se realizaron una serie de modificaciones a los factores fisicoquímicos del xerosol bajo estudio. Para tal propósito, se alteró el pH, nivel de humedad, disponibilidad de nutrientes y presencia de microorganismos nativos de suelo tipo xerosol (Boonkerd y Weaver, 1982; West *et al.*, 1985b). Inmediatamente después de la inoculación de las cepas (GM-1, GM-4 y HD-1) se añadió agua destilada estéril, a fin de ajustar la humedad de suelo estéril o no estéril a 3 diferentes grados. Los suelos inundados se prepararon al adicionar suficiente agua par formar una capa de 1 cm sobre la superficie. Aquellos tratamientos ajustados a capacidad de campo, se obtuvieron al inocular la suspensión celular como se ha descrito anteriormente. Mientras que los suelos secos se prepararon al colocar los recipientes sin torunda en una campana de flujo laminar aproximadamente durante 2 h. El contenido de agua en las muestras se mantuvo constante mediante reposiciones, aunque el pesaje periódico de los frascos durante los tiempos de incubación, indicó pérdidas insignificantes. Los nutrientes disponibles fueron suplementados al añadir: glucosa, residuos de follaje de maíz o de pasto, en cantidades suficientes para alcanzar un 6 % (Peña-Cabriales y Alexander, 1983). El primer suplemento se incluyó en al agua utilizada para ajustar la humedad, mientras que el segundo y tercero se agregaron como un polvo fino antes de adicionar el

agua. El pH original del suelo fue modificado a los rangos ácido, neutro y alcalino (5.0, 7.0 y 9.0 respectivamente), mediante la incorporación de cantidades apropiadas de ácido clorhídrico o carbonato de calcio. El equilibrio de pH en las muestras de carbonato, se logró varios días después de la adición del mismo, por lo cual, antes de usarse en los ensayos, los suelos tratados con cualquiera de los dos reactivos, se almacenaron por 8 días, minimizando la actividad microbiana de tratamientos no estériles al mantenerlos a temperatura de refrigeración. Aunque la adición de suplementos también alteró ligeramente el pH original del suelo, el efecto se tornó intrascendente, debido a que la corrección de este factor se llevó a cabo subsecuentemente al enriquecimiento orgánico. De la misma manera, la esterilización de suelos tratados hizo variar el pH previamente corregido. No obstante, las fluctuaciones observadas se consideraron dentro de un rango permisible. Al preparar las combinaciones de 4 factores (cepas, humedad, suplementos orgánicos y pH), se tuvo para suelos estériles 81 tratamientos diferentes, de los cuales fueron seleccionadas algunas condiciones ambientales, en las que *B. thuringiensis* fue capaz de proliferar, para probarlas después bajo condiciones no estériles y así conformar 12 tratamientos más. Invariablemente, los suelos enriquecidos se incubaron por 8 días, y durante ese tiempo, se tomaron 5 muestras, para detectar las respuestas de *B. thuringiensis* a las condiciones impuestas (Akiba *et al.*, 1977; Akiba *et al.*, 1979).

### *Recuperación de B. thuringiensis a partir de suelo inoculado*

Para recuperar las poblaciones inoculantes introducidas al suelo, se removieron varias repeticiones de los tratamientos a intervalos geométricos de tiempo. En este caso, se vaciaron 10 g del suelo contenido en las unidades experimentales a frascos de dilución con 90 ml de solución salina al 0.85% y se añadieron 5 gotas del detergente neutro Tween-80 además de 1 gota de la mezcla antiespumante aceite mineral-alcohol isopropílico (1:1). La suspensión fue agitada en vortex durante 5 min a velocidad media. Se prepararon diluciones seriadas, se sembraron en medios de cultivo y se cuantificaron las colonias por el método de Miles y Misra modificado, como ya se ha descrito. También se incluyeron durante las extracciones, suelos

control sin bacterias inoculantes. En base a la experiencia, la morfología colonial de *B. thuringiensis* fue reconocida fácilmente. Sin embargo, ante la posible presencia en suelos inoculados de otras especies de *Bacillus* con morfología colonial semejante, se descartó de la cuenta final, el escaso número de tales colonias que apareció en muestras de suelos testigo no inoculados (Petras y Casida, 1985; Pruett *et al.*, 1980).

### *Efecto de factores bióticos del suelo sobre los inoculantes*

En los campos de cultivo de la Facultad de Agronomía, U.A.N.L. en Marín, N.L., se colectaron muestras compuestas de suelo, a partir de la rizósfera de plantas sembradas en parcelas sometidas tanto a cultivos continuos como en rotación (Martyniuk y Wagner, 1978). El primer sistema de manejo de suelos, estuvo representado por el trigo y el zacate; mientras que los suelos en rotación incluyeron: hortalizas, algodón, frijol y cacahuate. En la tabla 4 se reportan los análisis físicos y químicos de los suelos bajo estudio (CETENAL, 1977; Jackson, 1976). Como medida del impacto de los factores bióticos de estos suelos sobre los inoculantes estudiados, se utilizó la enumeración de poblaciones antagonistas a *B. thuringiensis*, a través de la técnica descrita por Panthier y colaboradores (1979), consistente en una triple capa de agar, que permite la interacción de poblaciones de bacterias, actinomicetos y hongos, para identificar y cuantificar aquellos grupos antagonistas que afecten el crecimiento de *B. thuringiensis*. Diversas colonias de estos organismos, presentes en las mayores diluciones y que fueron capaces de inhibir el crecimiento de *B. thuringiensis*, se aislaron al eliminar parte de la capa superior y remover una porción de la colonia antagonista que se desarrolló en la capa inferior. La técnica del "disco de agar" (Visser *et al.*, 1986), también fue empleada en este caso como criterio selectivo de organismos antagonistas a *B. thuringiensis* en base al diámetro de inhibición del crecimiento.

Tabla 4.- Análisis fisicoquímico de los suelos cultivados que se utilizaron en este estudio.

Variable	Cultivos							
	Hortalizas	Trigo	Algodón	Frijol	Zacate	Cacahuete		
Densidad Aparente (g/cc)	2.10	1.60	1.33	1.42	1.89	2.00		
Color*	Seco 2.5Y 5/2	2.5Y 5/2	2.5Y 5/2	10YR 7/2	10YR 6/3	2.5Y 8/3		
	Húmedo 2.5Y 3/2	2.5Y 3/2	2.5Y 3/2	10YR 4/2	10YR 4/3	2.5Y 5/3		
pH	8.3	8.0	8.0	7.7	8.0	8.4		
Distribución	Arenas	10.2	38.2	8.2	32.2	38.2		
de partículas	Limos	40.6	34.6	30.6	36.6	12.6		
(%)	Arcillas	51.2	55.2	61.2	31.2	49.2		
Sales Solubles (mmhos/cm)	0.35	0.40	0.45	0.23	0.25	0.15		
Materia Orgánica (%)	2.35	1.60	2.42	2.24	1.85	1.42		
Nitrógeno Total (%)	0.16	0.15	0.14	0.13	0.15	0.13		
Potasio (%)	1.00	1.00	1.30	1.50	1.40	1.00		
Hierro (%)	2.32	2.40	2.60	2.20	2.10	2.10		
Calcio (%)	5.20	5.10	5.10	6.40	9.40	6.20		
Magnesio (%)	0.70	0.80	0.80	0.80	0.70	0.70		
Manganeso (%)	0.02	0.03	0.05	0.04	0.04	0.02		
Zinc (ppm)	59	60	61	49	59	65		
Cobre (ppm)	15	21	19	17	5	15		

\* Color determinado por el método de Munsell. Clasificación: 2.5Y 5/2 (Amarillo Grisáceo Oscuro); 2.5Y 3/2 (Café Negro); 10YR 7/2 (Amarillo Naranja Pálido); 10YR 4/2 (Amarillo Café Grisáceo); 10YR 6/3 (Amarillo Naranja Pálido); 10YR 4/3 (Café Amarillento Pálido); 2.5Y 8/3 (Amarillo Pálido); 2.5Y 5/3 (Café Amarillento Oscuro).

*Interacción en cultivos líquidos:* De las cepas de *B. thuringiensis*, tres fueron seleccionadas para estos experimentos; GM-1, GM-4 y HD-1, (pertenecientes a las variedades *aizawai*, *kumamotoensis* y *kurstaki*, respectivamente). Mientras que entre los antagonistas a las anteriores, tres actinomicetos (EH-1, EH-2 y EH-3) y una bacteria (EH-4), se escogieron entre muchos otros, en base a la capacidad para impedir el crecimiento de *B. thuringiensis*. Las cepas antagonistas se mantuvieron hasta su uso, en agar glicerol-arginina y agar nutritivo, respectivamente (Patel, 1974). En matraces con 100 ml de caldo nutritivo, se mezclaron suspensiones celulares de los organismos antagonistas seleccionados y *B. thuringiensis*, en porciones de 1 ml que contenían entre  $10^4$  -  $10^5$  células. Los cultivos mixtos fueron incubados a 37°C por 24 h en agitación rotatoria a 200 rpm y con intervalos regulares se tomaron muestras para enumeración de los niveles poblacionales de *B. thuringiensis* mediante la técnica de cuenta estándar en agar nutritivo, suplementado con 60 µg/ml de estreptomicina. Se realizó un ensayo adicional al tomar porciones del sobrenadante del caldo de crecimiento de los organismos antagonistas, las que fueron filtradas (milipore 0.2 µm) e impregnadas en discos de papel para colocarse en placas (4 c/u) sembradas por extensión en superficie con las diferentes cepas de *B. thuringiensis* (Habte y Barrion, 1984).

*Interacción en suelo:* Los sistemas experimentales consistieron en frascos de vidrio de 20 ml de volúmen con 10 g de suelo no estéril tamizado, proveniente de campos cultivados con frijol, y seco o esterilizado en autoclave por 30 min a 121 °C (Kulinska y Drozdowicz, 1983). Los recipientes fueron inoculados con 1 ml de la suspensión celular de una mutante espontánea de *B. thuringiensis* HD-1 resistente a 60 mg/ml de estreptomicina, en combinación con 1 ml de la suspensión de los antagonistas EH-1 y EH-4, usando como control el tratamiento sin antagonistas. En todos los tratamientos, la suspensión celular agregada ( $10^4$  -  $10^5$  UFC/g), también ajustó la humedad del suelo a capacidad de campo y los recipientes fueron incubados a 37 °C durante 7 días. La recuperación y enumeración de *B. thuringiensis* a partir del suelo, se llevo a cabo en medio suplementado con antibiótico (Barry, 1976; Danso *et al.*, 1973; Luna-Olvera y Peña-Cabriales, 1993; Pugashetti *et al.*, 1982).

## Mecanismos de contraataque por *B. thuringiensis*

### *Producción de bacteriocinas*

Las 20 cepas de *B. thuringiensis* (GM-1 a GM-20) probadas en otros experimentos, también fueron sometidas a la búsqueda de propiedades antagonistas contra otros organismos, a través de la producción de bacteriocinas. Asimismo, se incluyeron como referencia, las cepas de *B. thuringiensis* T-01001 y T-11001, reportadas previamente como productoras de bacteriocinas y que se obtuvieron del Departamento de Microbiología del Instituto Pasteur, en París, Francia (De Barjac y Lajudie, 1974). Estos cultivos se mantuvieron en agar nutritivo e incubaron a 37°C.

### *Preparación de cepas indicadoras*

Entre los organismos indicadores de la producción de bacteriocinas por cepas de *B. thuringiensis*, se incluyeron las cepas de: *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, que se obtuvieron del Departamento de Microbiología Médica, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. Los cultivos se mantuvieron en agar nutritivo y se incubaron a 37°C hasta su uso. La propagación de tales cepas se llevó al cabo en caldo nutritivo agitado a 200 rpm por 24 h. De este caldo, se tomaron alícuotas de 5 ml que se colocaron en tubos de centrifuga durante 15 min a 2,500 rpm, tiempo después del cual se eliminó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido otra vez en 1 ml de solución salina 0.85%. Esta etapa se repitió 3 veces, hasta que finalmente el concentrado de células obtenido se mezcló con agar nutritivo estéril fundido, para utilizarse de acuerdo a la técnica modificada de Kekessy y Piguet (1970), como herramienta detectora de las bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis*. Debido a que esta metodología se fundamenta en la difusión tridimensional de las bacteriocinas (Fikes *et al.*, 1983; Konisky, 1982), inicialmente la

cepa productora se inoculó mediante punción en la superficie del agar y las placas se incubaron a 30°C por 24 a 48 h. Posteriormente, el disco de agar se desprendió de la base de vidrio con una espátula estéril para invertir su posición, colocando el anverso como la superficie donde se vaciaron 5 ml de agar nutritivo fundido, previamente inoculado con la cepa indicadora. Una vez que las placas se incubaron a 30°C durante 12 a 24 h, se procedió a identificar las cepas productoras de bacteriocinas, en base a la presencia o ausencia de zonas de inhibición del crecimiento en la superficie inoculada con la cepa indicadora.

## **Bioensayos con plántulas**

### *Evaluación de variedades de maíz*

En esta fase del trabajo, se realizó inicialmente una evaluación de la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de diversas variedades de maíz proporcionadas por el Programa de Mejoramiento de Maíz, Frijol y Sorgo de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. (Tabla 5). Para este propósito, las semillas fueron esterilizadas superficialmente por inmersión durante 10 min, en una solución de hipoclorito de sodio al 4% y enjuagadas con agua destilada estéril por 3 veces, luego se depositaron 5 semillas de cada una de las variedades de maíz, en recipientes de unicel de 2 l de capacidad, conteniendo 1 kg de suelo colectado a partir de un campo cultivado con frijol en la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L., en Marín N.L. Los recipientes se colocaron en una cámara bioclimática mantenida a 30°C de temperatura, bajo un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad en condiciones de ventilación. A los 6 días de incubación se procedió a tomar los siguientes datos: altura de las plántulas, peso de raíces y peso del tallo, para luego seleccionar los materiales a utilizar en experimentos de supresión fúngica por las cepas de *B. thuringiensis* previamente seleccionadas, en base a las anteriores características.

Tabla 5  
 Variedades de maíz evaluadas para selección y uso en experimentos de control biológico de *F. moniliforme* con cepas de *B. thuringiensis*

Tipo de maíz	Procedencia *	Variedad
Polinización Libre	FA-UANL	Liebre
		Juanito
		Ratón I
		Ranchero
		San Nicolás
		Blanco Alemán
		Blanco Purísima
		Blanco Hualahuisés
	Comercial	V-402
		VS-409
NLV-52		
NLV-53		
Llera III		
Híbridos	FA-UANL	B-844
		H-430
		H-432
		AP-728W
		Oro-1013W
		Morgan-369
		Pioneer-3292
		Pioneer-3428
		Warner-2190
		Warner-51WW
Warner-3255		
Warner-3220WA		

\* = Todas las variedades fueron proporcionadas por la Facultad de agronomía de la UANL.

### *Supresión de la infección causada por F. moniliforme*

El inóculo fúngico para los bioensayos se preparó mediante la metodología usada para medir el potencial toxigénico de las cepas de *F. moniliforme*, en matraces conteniendo maíz molido, inoculado e incubado como ya se describió previamente. Después de este período, el grano antes triturado en partículas gruesas, fue secado a temperatura ambiente y colocado en bolsas de papel para molerse en mortero a un tamaño de partícula fina (alrededor de 1 mm). Un gramo de este inóculo fúngico ( $10^8$  conidias/g), fue diluido seriadamente en 99 g de la mezcla arena:suelo contenida en matraces de 500 ml con torunda de algodón hasta alcanzar proporciones de  $10^6$ ,  $10^4$  y  $10^2$  conidias/g, la cual, luego de la adición, se homogeneizó con agitación manual, para después llenar a  $\frac{3}{4}$  partes con este soporte infectivo, los tubos de ensaye donde crecerían las plántulas de maíz. En este caso, semillas pregerminadas de la variedad Blanco Alemán, que habían sido esterilizadas superficialmente como ya se describió antes, fueron sumergidas en una suspensión conoidal ( $10^9$ /ml) de *F. moniliforme* durante 15 min, antes de sembrarlas a 3 cm bajo la superficie del soporte contenido en los tubos preparados para el bioensayo, los que entonces se humedecieron con agua destilada estéril hasta alcanzar el nivel de capacidad de campo, y luego todas las repeticiones de cada uno de los tratamientos se dispusieron en gradillas bajo una disposición completamente al azar en la cámara bioclimática. El potencial antagonista de las cepas de *B. thuringiensis* usadas en este bioensayo, fue determinado de acuerdo al procedimiento descrito por Burgess y Lidell (1983), mediante la medición del grado de invasión del hongo dentro del mesocotilo de las plántulas. Después de 10 días de crecimiento en la cámara bioclimática, mantenida bajo las condiciones también antes descritas, las plántulas fueron extraídas desde su raíz a partir de los tubos, para seccionarlas asépticamente bajo mechero, en sus diferentes partes, eliminando en primera instancia la semilla y raíces, y luego arrancando las hojas para forzar a dejar expuesta la región de la plúmula y mesocotilo, misma que fue separada a su vez mediante el uso de un bisturí. El mesocotilo resultante de cada tratamiento se esterilizó superficialmente con el procedimiento ya mencionado, pero este tejido extirpado se mantuvo solo por 2 min en la solución de hipoclorito e igualmente se lavó por cuatro veces en agua destilada estéril. Los mesocotilos ya secos, después de

mantenerlos por 12 h en cajas de Petri incubadas a 30°C, se transfirieron al medio de cultivo PCNB, para mantenerlos por 7 días, período después del cual se buscó la presencia de *F. moniliforme*, tanto macroscópicamente, creciendo a partir de este tejido, como microscópicamente por observación de las estructuras distintivas ya descritas de *F. moniliforme*, en el interés de determinar el porcentaje de muestras con infección en función de las densidades del inóculo fúngico y la inoculación con antagonistas (Yuan y Crawford, 1995).

### **Análisis de datos**

Los datos obtenidos por las metodologías utilizadas, se sujetaron a diversos análisis estadísticos. A partir del estudio de la distribución de cepas de *F. moniliforme*, en maíz cultivado para consumo humano en el Estado de Nuevo León, se pretendió establecer diferencias entre los grados de toxigenicidad de las mismas, en función de los distritos de cultivo, las localidades muestreadas y la variedad de maíz cultivado de donde fueron aisladas originalmente. El efecto de las variables bióticas y abióticas sobre la estabilidad de los inoculantes de *B. thuringiensis* introducidos al suelo, así como su efectividad para antagonizar a *F. moniliforme* en términos de densidades de inóculos, también se consideraron en estas evaluaciones. Todos los experimentos que constaron de mas de tres repeticiones por tratamiento y sus respectivos controles, fueron valorados por el procedimiento de ANOVA. Los valores obtenidos, se compararon para separar las medias de los tratamientos que marcaron diferencias significativas de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey o Diferencia Mínima Significariva ( $p < 0.05$  y  $0.01$ ). Los análisis multifactoriales o de regresión y correlación con la comparación de sus pendientes mediante la prueba de "t" student, se efectuaron para aquellos experimentos que así lo requirieron (Spiegel, 1984; Zar, 1996).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### **Criterios de aislamiento de *F. moniliforme***

El aislamiento de las cepas de *F. moniliforme* se llevó a cabo en el medio selectivo de PCNB, donde fueron colocados por triplicado, 4 granos de cada muestra de maíz por caja Petri. La importancia de seleccionar los granos intactos, radica en que pueden presentar daño físico ocasionado durante la cosecha, el secado o el transporte, lo que pudiera favorecer la contaminación fúngica. Las concentraciones del NaClO usadas durante el proceso de desinfección, pueden ser no necesariamente similares a las utilizadas en este estudio, pero es necesario considerar que se desea eliminar solamente los contaminantes superficiales y no el micelio que se encuentra invadiendo el pericarpio, ya que un tratamiento severo de desinfección también puede eliminarlo. Cabe mencionar que la ausencia de hongos toxigénicos durante la etapa de aislamiento, no garantiza la ausencia de sus toxinas, ya que los hongos pueden haber desaparecido, pero no así sus metabolitos, tal y como lo indica Moreno (1988). La identificación llevada a cabo según los criterios de Nelson *et al.*, (1983) y Booth (1973), permitió denotar las características fúngicas típicas en PDA, SNA y PCNB de los aislados obtenidos a partir de los cultivos de maíz estudiados en el Estado de Nuevo León. Además, se observó que la coloración y el diámetro de la colonia en los medios usados, fue muy similar entre éstas, por lo cual se pudo ubicar a todas dentro de la Sección Liseola. Existen características generales entre las especies de *Fusarium*, entre las cuales pueden producir 3 tipos de esporas: macroconidias, microconidias y clamidosporas; conidióforos en forma de monofiálide (una sola abertura) o polifiálide (2 ó más aberturas). Las microconidias pueden presentarse en forma de cadenas sobre ambas fiálides. Además, se clasifican características primarias para la separación de especie en la taxonomía de *Fusarium* spp: la morfología de la macroconidia, la presencia o ausencia de microconidias y clamidosporas así como la morfología de los conidióforos. También se presentan características secundarias que pueden ser utilizadas para describir especies, donde los cultivos están creciendo bajo condiciones estándar de luz, temperatura y

sustratos, los criterios son: morfología y pigmentación de la colonia como también indica Nelson *et al.*, (1994); la coloración que se puede presentar es altamente variable entre las especies, pero en algunas es un factor crítico, generalmente el color púrpura al reverso indica que son especies de la Sección Liseola. Según Booth (1971), se clasifica dentro de esta Sección a *F. moniliforme* Sheldon y *F. moniliforme* var. *subglutinans*, mientras que Nelson *et al.*, (1983), incluyen a *F. moniliforme* Sheldon, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. anthophilum*. Sin embargo, las características morfológicas determinantes en *F. moniliforme* son la formación de microconidias en forma de cadena y en un micelio aéreo, así como la presencia de monofálides.

### **Distribución de cepas toxigénicas de *F. moniliforme* en Nuevo León**

A partir de los tres distritos de cultivo en el Estado de Nuevo León, en sus quince localidades estudiadas, se aislaron 20 cepas de *F. moniliforme* que fueron evaluadas para la producción de fumonisinas *in vitro* en medios de cultivo a base de maíz. En la Tabla 6 se puede observar la concentración de fumonisin B<sub>1</sub> producida por cada una de las cepas seleccionadas para este estudio. Mediante la TLC, se detectó la concentración de B<sub>1</sub> por estimación visual. Las cepas Mex-I-JH-2, Mex-I-JH-4 y Mex-I-JH-20 produjeron bajo estas condiciones, concentraciones de 1,600 a 2,400 ppm. Así mismo, a las cepas Mex-I-JH-1, Mex-I-JH-3 y Mex-I-JH-18 se les detectó cantidades entre 800 a 1,200 ppm. Para las cepas Mex-I-JH-6, Mex-I-JH-7, Mex-I-JH-9, Mex-I-JH-10, Mex-I-JH-11, Mex-I-JH-12, Mex-I-JH-15 y Mex-I-JH-17, C7, C8, C9, C12, C13, C14, C15 y C17, se observaron cantidades de 100 a 150 ppm, mientras que Mex-I-JH-5, Mex-I-JH-8, Mex-I-JH-14, Mex-I-JH-16 y Mex-I-JH-19, fueron incapaces de producir estas toxinas o lo hicieron en concentraciones inferiores a los límites de detección de la técnica utilizada para tal propósito, ya que la misma es insensible a valores menores de 50 ppm. Aunque la técnica de HPLC puede resolver fácilmente cantidades muy inferiores al límite utilizado, en el presente trabajo se interesaba conocer el potencial toxigénico de las cepas predominantes, es decir aquellas altamente productoras de fumonisinas (> 500 ppm).

Tabla 6  
 Potencial toxigénico de la cepas de *F. moniliforme* aisladas de maíz cultivado en las localidades de los 3 distritos de cultivo del Estado de Nuevo León.

Distrito de Cultivo	Municipio	Localidad	Varietas de Maíz	Cepas Aisladas de <i>F. moniliforme</i>	Fumonisina B <sub>1</sub> Producida (ppm)		
Montemorelos	Linares	Cerro Prieto	Criollo	Mex-I-JH-1	800 - 1,200		
			Criollo	Mex-I-JH-2	1,600 - 2,400		
			Criollo	Mex-I-JH-3	800 - 1,200		
			Criollo	Mex-I-JH-4	1,600 - 2,400		
			Criollo	Mex-I-JH-5	< 50		
Galeana	Dr. Arroyo	Cerro del Aire	Criollo	Mex-I-JH-6	100 - 150		
			Criollo	Mex-I-JH-7	100 - 150		
			Criollo	Mex-I-JH-8	< 50		
			Criollo	Mex-I-JH-9	100 - 150		
			Criollo	Mex-I-JH-10	100 - 150		
		P. de Ruedas	Criollo	Mex-I-JH-11	100 - 150		
			Criollo	Mex-I-JH-12	100 - 150		
			Criollo	Mex-I-JH-13	800 - 1,200		
		Apodaca	Escobedo	La Gloria	H-791	Mex-I-JH-14	< 50
					Criollo	Mex-I-JH-15	100 - 150
					V-550	Mex-I-JH-16	< 50
					Criollo	Mex-I-JH-17	100 - 150
					P. Amarrillo	Mex-I-JH-18	800 - 1,200
Santa Rosa	Escobedo	Santa Rosa	B. Purísima	Mex-I-JH-19	< 50		
			NLVS-2	Mex-I-JH-20	1,600 - 2,400		

Las cepas de *F. moniliforme* productoras de fumonisinas en concentraciones superiores a 500 ppm, se consideraron altamente productoras de B<sub>1</sub>, mientras que las cepas con 50 a 500 ppm de B<sub>1</sub> producida, se denominaron de producción intermedia y los valores inferiores a 50 ppm, de baja producción. En los 3 distritos del Estado de Nuevo León, se logró el aislamiento de cepas altamente productoras, además en el distrito de Galeana fue donde se realizó aislamiento en 10 localidades, pero la mayoría fueron cepas productoras intermedias o de baja producción; las cepas aisladas en Montemorelos que fueron altamente productoras pertenecen a la misma localidad a diferencia de la otra localidad que fueron de baja producción. De igual manera, se observó que las cepas de *F. moniliforme* están distribuidas en las 3 clasificaciones de concentración.

En la Tabla 7 se compara la concentración de fumonisinas producidas por cepas de *F. moniliforme* predominantes en los tres distritos de cultivo del Estado de Nuevo León. Los datos indican que existe diferencia significativa entre ellos, ya que en Montemorelos las cepas presentaron mayor capacidad para producir fumonisinas; por el contrario en Galeana las cepas tenían menor capacidad para producir dichas toxinas; aunque en este caso, se encontró la presencia de una cepa altamente productora, estadísticamente no se detectaron efectos significativos, basándose en las clasificaciones de concentración los datos nos marcan que existen valores superiores a 50 ppm, por lo tanto, se considera que los distritos de Apodaca y Montemorelos, presentan cepas con alto potencial para producir fumonisinas B<sub>1</sub> y el distrito de Galeana presenta un potencial intermedio. De la misma manera, en la Tabla 8 se muestra la comparación de los municipios analizados en base a la toxigenicidad de sus cepas de *F. moniliforme*, lo cual nos indica que existen 2 grupos homogéneos, los municipios de Galeana y Dr. Arroyo, como aquellos de bajo riesgo en cuanto a las toxinas presentes en su maíz, mientras que Escobedo y Linares, resultaron como zonas de alto riesgo en su maíz, dadas las tendencias observadas en la magnitud de toxinas producidas por las cepas predominantes en su territorio. Aunque estos dos últimos municipios pertenecen a distritos diferentes, no se encontró diferencia, ya que en ambos se aislaron cepas toxigénicas.

Tabla 7  
Concentración de fumonisina B<sub>1</sub> producida (ppm) por las cepas de *F. moniliforme* aisladas en los distritos de cultivo del Estado Nuevo León.

Distrito	Concentración de Fumonisina B <sub>1</sub> *	n
Galeana	151 a	36
Apodaca	905 b	15
Montemorelos	1,176 b	15

\* Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey.

Tabla 8  
Concentración de fumonisina B<sub>1</sub> producida (ppm) por las cepas de *F. moniliforme* aisladas en los municipios de los distritos de cultivo del Estado Nuevo León.

Municipio	Concentración de Fumonisina B <sub>1</sub>	n
Galeana	65 a	12
Dr. Arroyo	190 a	24
Escobedo	905 a	9
Linares	1,176 b	15

\* Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey.

Tabla 9  
Concentración de fumonisina B<sub>1</sub> producida (ppm) por las cepas de *F. moniliforme* aisladas de las variedades de maíz en los distritos de cultivo del Estado Nuevo León.

Variedades	Concentración de Fumonisina B <sub>1</sub>	n
V-550	50 a	3
H-791	50 a	3
Blanco Purísima	50 a	3
Criollo	453 a	45
Pinto Amarillo	1,000 ab	3
NLVS-2	1,666 b	3

\* Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey.

Tabla 10  
 Concentración de fumonisina B<sub>1</sub> producida (ppm) por las cepas de *F. moniliforme* aisladas las distintas localidades estudiadas del Estado Nuevo León.

Localidades	Distrito	Concentración de Fumonisina B <sub>1</sub>	n
Loma Alta	Montemorelos	50 a	3
La Gloria	Galeana	50 a	3
San Nicolás	Apodaca	50 a	3
Puerto México	Galeana	66 b	6
El Cuije	Galeana	75 b	3
Cerrito del Aire	Galeana	83 b	3
Presita de Ruedas	Galeana	100 b	3
Puerto de Dolores	Galeana	125 b	6
Puerto de Aguilar	Galeana	125 b	3
Guadalupe	Galeana	125 b	3
San Juan del Palmar	Galeana	125 b	3
El Charquillo	Galeana	1,000 c	3
Agua Fría	Apodaca	1,000 c	3
Cerro Prieto	Montemorelos	1,458 c	12
Santa Rosa	Apodaca	1,666 c	3

\* Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Tukey.

Las variedades de maíz cultivadas en las los distintos distritos, municipios y localidades, también fueron examinadas como un factor determinante en la distribución de cepas de *F. moniliforme* y su toxigenicidad. Tales datos se muestran en la Tabla 9, donde se definieron tres grupos homogéneos; aquel de baja producción de fumonisina B<sub>1</sub>, que incluyó a las variedades híbridas V-550, H-791, Blanco Purísima y maíz Criollo. Mientras que de la variedad Pinto Amarillo fueron aisladas cepas de producción intermedia; en contraste a el híbrido NLVS-2 que favoreció la distribución de cepas altamente productoras de fumonisinas. En la Tabla 10 se presentan las tendencias observadas entre las localidades estudiadas en referencia a los niveles de toxinas producidas por las cepas predominantes, donde

encontramos 3 grupos homogéneos, en el cual están las localidades de alto riesgo por contener cepas altamente productoras, conformadas a su vez por El Charquillo, Agua Fría, Cerro Prieto y Santa Rosa; las de riesgo intermedio; Puerto México, El Cuije, Cerrito del Aire, Presitas de Ruedas, Puerto de Dolores, Puerto de Aguilar, Guadalupe y San Juan del Palmar; y las bajo riesgo, que incluyó a Loma Alta, La Gloria y San Nicolás. Tales localidades no se concentraron en un distrito particular, sino que encontraron distribuidas en los 3 distritos estudiados.

De acuerdo con Riley *et al.*, (1993), existen métodos cromatográficos que se pueden aplicar para la detección y cuantificación de las fumonisinas. La cromatografía de gases acoplada al espectro de masas (GC-MS) es altamente sensible y específico, además su costo es muy elevado al igual que la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Por otro lado, la TLC es económica, pero de baja sensibilidad. Sin embargo, el límite de detección para TLC con *p*-anisaldehído es cerca de 100  $\mu\text{g}$  sobre la placa, pero las interferencias de los extractos crudos el cual migran con las FBs, pueden obstruir la detección. A pesar de estas limitaciones, la TLC puede ser utilizada para un monitoreo en los extractos crudos del MC, porque la producción de fumonisinas por cepas toxigénicas excede a 1,000  $\mu\text{g/g}$ , en límites de detección menores a éste se requiere limpieza de la muestra (Nelson, *et al.*, 1993), aunque con esta técnica se pueda estimar hasta 50 ppm. En 1994, Desjardins *et al.*, detectaron y cuantificaron FBs en MC de *F. moniliforme* mediante la extracción con ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 y la técnica de TLC con ACN/H<sub>2</sub>O 85:15 y como revelador *p*-anisaldehído, estos investigadores mencionan que la limpieza de las muestras no fue necesaria debido a que las concentraciones de FB1 obtenidas fue elevada, por lo tanto fácil de detectar. Considerando que la AOAC ha establecido una técnica oficial para cuantificar FBs mediante HPLC, que sustituye el ACN por el metanol, nosotros implementamos el método de extracción de esta técnica, sin efectuar limpieza de los extractos. La detección de la FB1 se realizó mediante TLC propuesta por Plattner *et al.*, (1990), el cual utilizó sílica gel desarrolladas en cloroformo/metanol/ácido acético (6:3:1) y *p*-anisaldehído, con un R<sub>f</sub> de 0.24. Sin embargo, en nuestra investigación se realizaron modificaciones a la polaridad del eluyente a (6:4:1), encontrando valores de

Rf de 0.74, esto nos indica que las impurezas se quedaron en un Rf inferior, por lo tanto se logró separar la FB1 de las interferencias de la matriz (pigmentos, lípidos y otros). Se realizaron co-cromatografías con el estándar de FB1 para confirmar la migración de la toxina y su separación, las manchas observadas confirmaron los resultados obtenidos, por lo que el método utilizado nos permitió la detección de la FB1 en los MC y la estimación de la concentración mediante la comparación visual con los estándares. En cada placa se aplicaron controles positivos (extractos crudos FB1 mayor de 2,000 ppm) y negativos (FB1 no detectable) para validar la técnica. Las recomendaciones en base a la técnica es que valores superiores a 200 ppm (Desjardins, *et al.*, 1994) es aplicar técnicas más sensibles como HPLC, pero los resultados obtenidos nos dan información sobre un panorama general en base a la presencia de cepas toxigénicas y predecir la importancia de realizar estudios posteriores en base a la cuantificación de estas toxinas directamente en el maíz, así como en sus productos derivados, respecto a la presencia de cepas toxigénicas en los 3 distritos de cultivo del estado de Nuevo León que se analizaron, el riesgo de que el maíz se encuentre contaminado con estas toxinas sería elevado.

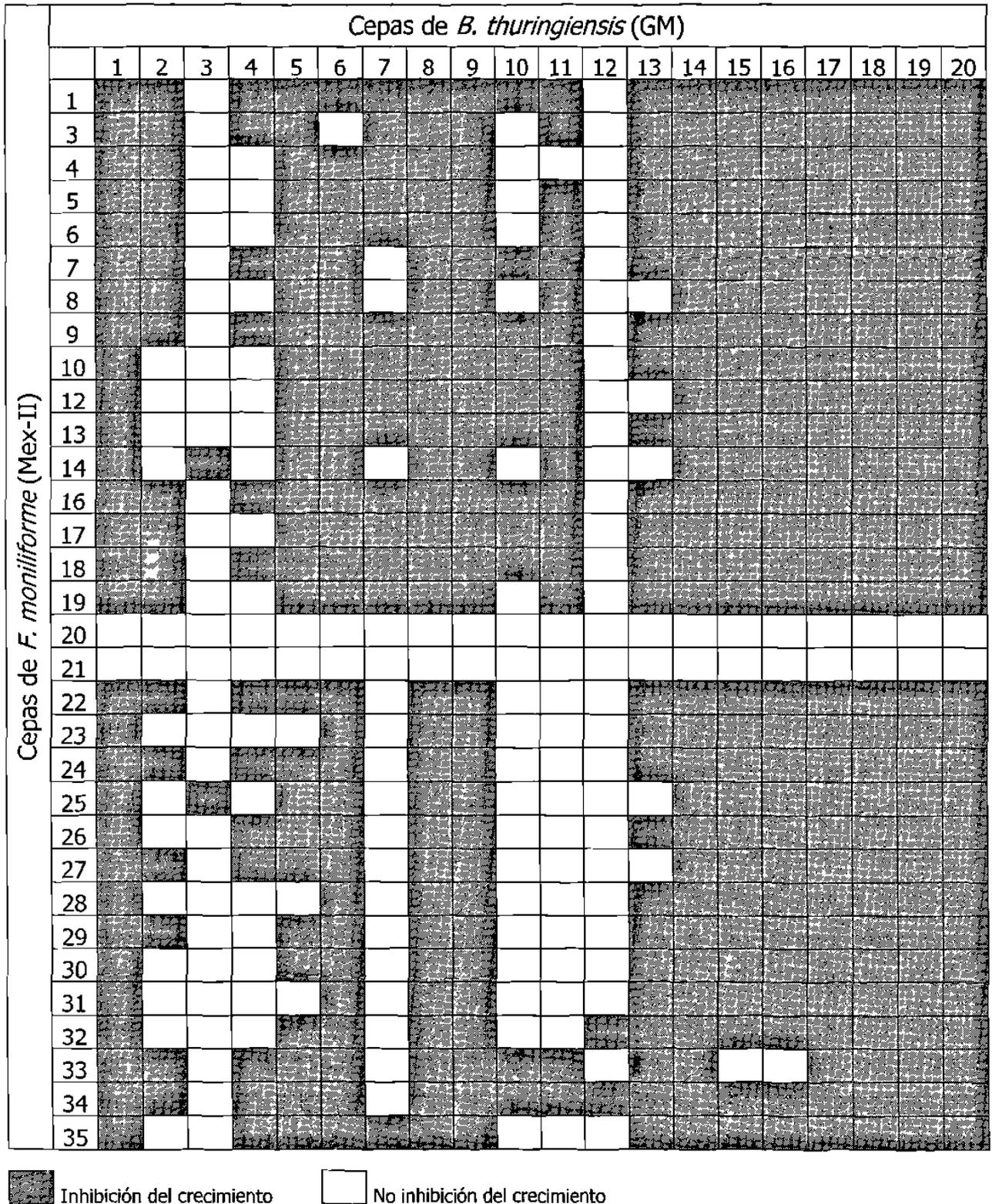
Las fumonisinas fueron descubiertas recientemente (1988), la toxicidad de maíz contaminado con *F. moniliforme* ha sido documentado por más de 100 años, una de las manifestaciones dramáticas es la LEM, enfermedad fatal para equinos causada por FB1, pero en otros animales las principales lesiones no son en el cerebro, sino en el pulmón donde desarrolla un edema fatal. No obstante, el papel de las FBs en maíz se ha establecido en algunas enfermedades del ganado, pero aún no se conoce su importancia en enfermedades del hombre y particularmente, es más difícil determinar su potencial carcinogénico. Sin embargo, la IARC, FDA entre otras, están evaluando el potencial toxigénico de las FBs, pero la IARC ha determinado que todavía no hay suficiente evidencia para clasificar las fumonisinas como un carcinógeno humano, aunque las ha clasificado como toxinas de *F. moniliforme* de la clase 2 B, posiblemente carcinógeno en humanos (Castegnaro y Wild, 1995; Desjardins, *et al.*, 1997).

Se sabe que más de 70 países regulan las micotoxinas en alimentos de humanos y forraje de animales, esta regulación incluye aflatoxinas en maíz, cacahuate, semilla de algodón y leche; desoxinivalenol y otros tricotecenos en maíz y trigo; ocratoxinas en granos, patulina en jugo de manzana y fumonisina B1 en maíz. Los niveles de tolerancia pueden impactar dentro de la agricultura en los productos de importación y exportación. Más específicamente, decisiones recientes de regulación sobre fumonisinas en maíz importado en algunos países europeos, puede impactar en el maíz exportado de los E.U.A. a Europa (Desjardins, *et al.*, 1997). En base a lo anterior es importante preocuparse por la salud humana en México y las pérdidas económicas que las FBs puede generar dentro de la agricultura y la ganadería, ya que también se realiza la importación de estos productos. Varios investigadores (Dutton, 1996; Desjardins, *et al.*, 1997) han presentado algunas estrategias para prevenir la presencia de *F. moniliforme* en los cultivos de maíz, ya que parece imposible poder eliminar en su totalidad estas toxinas debido al ciclo de vida de este hongo, principalmente cuando está en maíz asintomático, una de ellas ha sido mediante cultivos resistentes a cepas toxigénicas, la cual se ha investigado por Rheeder *et al.*, (1990), así como el uso de agentes de biocontrol, donde los granos de maíz son tratados con rizobacterias antagónicas (Bacon y Williamson, 1992), también están las prácticas rurales como la rotación de cultivos y el secado del mismo, para disminuir la formación de micotoxinas durante el crecimiento, cosecha y almacenamiento.

### **Antagonismo de *B. thuringiensis* contra *F. moniliforme***

Se llevó a cabo la interacción de 20 cepas de la colección GM de *B. thuringiensis* y 32 cepas de *F. moniliforme* (Mex-II), obteniéndose 640 combinaciones entre estas. Cuando se detectó disminución del crecimiento del micelio con formación de halos de inhibición de 12 mm de diámetro se consideró como interacción negativa, la formación de halos con crecimiento del micelio fué denominada interacción positiva, considerando no interacción cuando se comportaba igual que el testigo. La representación de tales datos se muestran en la Fig. 4. En base a los resultados

Fig. 4. Inhibición del crecimiento de *F. moniliforme* (Mex-II) por cepas de *B. thuringiensis* (GM) en la interacción a 28°C durante 15 días.



■ Inhibición del crecimiento      □ No inhibición del crecimiento

obtenidos de estas interacciones, se realizó la agrupación de las mismas en la Tabla 11, donde se observa el grupo A con el 22 % que corresponden a interacciones (- 2) y el B con el 52% de (-1), mientras que los grupos D y E dan un 8 % de interacciones positivas, finalmente el 18% corresponde a las que se determinaron no interacción. Así mismo, en la Tabla 12 se obtuvo el porcentaje de las interacciones (-), (0) y (+) de cada cepa de *B. thuringiensis*, un total de 32 cepas de *F. moniliforme* corresponden al 100%. En la Fig. 5 destacan las cepas GM-3 y GM-12 por sus interacciones de tipo positiva, ya que en la mayoría de las interacciones no presentó inhibición, mientras que las cepas GM-1, GM-8, GM-9, GM-14, GM-17, GM-18, GM-19 y GM-20 presentaron inhibición con el 94% y las cepas GM-6, GM-15 y GM-16 con el 91%. De igual manera en la Tabla 13, pero el porcentaje de las interacciones (-), (0) y (+) de cada cepa de *F. moniliforme*, un total de 20 cepas de *B. thuringiensis* corresponden al 100 %. En la Fig. 6 se observa que bajo las condiciones a la cual se trabajó el preliminar las cepas Mex-II-20 y Mex-II-21 presentaron resistencia al 100% de las cepas de *B. thuringiensis* dando valores de interacciones (0). Mientras que la cepa Mex-II-34 fué la más sensible ya que posee un 95% de interacción (-) y las cepas Mex-II-9, 16, 18 y 22 un 90%.

Los resultados obtenidos sugieren que la disminución del crecimiento de *F. moniliforme*, esta relacionado con la estimulación de la producción de enzimas debido al tiempo que se tardó en obtener un resultado favorable. Sin embargo puede estar relacionado con la producción de algún metabolito secundario bioactivos durante la esporulación. La producción de la toxina con actividad insecticida de *B. thuringiensis*, se usa actualmente para control biológico, pero no se han estudiado las diferentes sustancias que produce para controlar fitopatógenos, además de la influencia que pueden ejercer sobre ellos en el medio ambiente. La búsqueda y determinación de las sustancias responsables de la actividad antifúngica, que presentó *B. thuringiensis*, radica en que se ha reportado que el género *Bacillus* produce enzimas quitinolíticas así como sustancias antifúngicas y bactericinas; en donde podemos mencionar a *Bacillus cereus* UW85 que produce dos antibióticos con actividad antifúngica identificados como zwittermicina A y antibiótico B. También podemos mencionar

Tabla 11

Agrupamiento de interacciones entre 20 cepas de *B. thuringiensis* (GM) de y 32 cepas de *F. moniliforme* (Mex-II).

Grupo	$\Sigma$	%
A	135	21
B	339	53
C	116	18
D	50	8
Total	640	100

A) Halo de inhibición fuerte B) Halo de inhibición débil. C) Sin efecto D) Halo de crecimiento de micelio.

Tabla 12

Clasificación (porcentaje) de las interacciones entre 20 cepas de *B. thuringiensis* (GM) y las cepas de *F. moniliforme* (Mex-II).

Cepas de <i>B. thuringiensis</i>	Tipo de interacción		
	Negativas	Neutras	Positivas
GM-1	94	6	0
GM-2	53	47	0
GM-3	9	22	69
GM-4	47	53	0
GM-5	81	19	0
GM-6	91	9	0
GM-7	53	47	0
GM-8	94	6	0
GM-9	94	6	0
GM-10	53	47	0
GM-11	81	19	0
GM-12	6	6	88
GM-13	78	22	0
GM-14	94	6	0
GM-15	91	9	0
GM-16	91	9	0
GM-17	94	6	0
GM-18	94	6	0
GM-19	94	6	0
GM-20	94	6	0

Tabla 13  
Clasificación (porcentaje) de las interacciones entre 32 cepas *F. moniliforme* (Mex-II) y las cepas de *B. thuringiensis* (GM).

Cepas de <i>F. moniliforme</i>	Tipo de interacción		
	Negativas	Neutras	Positivas
Mex-II-1	85	5	10
Mex-II-3	85	5	10
Mex-II-4	75	15	10
Mex-II-5	80	10	10
Mex-II-6	80	15	5
Mex-II-7	85	5	10
Mex-II-8	70	20	10
Mex-II-9	90	0	10
Mex-II-10	80	15	5
Mex-II-12	75	15	10
Mex-II-13	75	15	10
Mex-II-14	70	25	5
Mex-II-16	90	5	5
Mex-II-17	95	0	5
Mex-II-18	90	0	10
Mex-II-19	80	10	10
Mex-II-20	0	100	0
Mex-II-21	0	100	0
Mex-II-22	90	0	10
Mex-II-23	70	20	10
Mex-II-24	80	10	10
Mex-II-25	80	15	5
Mex-II-26	85	5	10
Mex-II-27	80	15	5
Mex-II-28	70	20	10
Mex-II-29	75	20	5
Mex-II-30	70	20	10
Mex-II-31	60	30	10
Mex-II-32	70	25	5
Mex-II-33	75	15	10
Mex-II-34	95	0	5
Mex-II-35	75	15	10

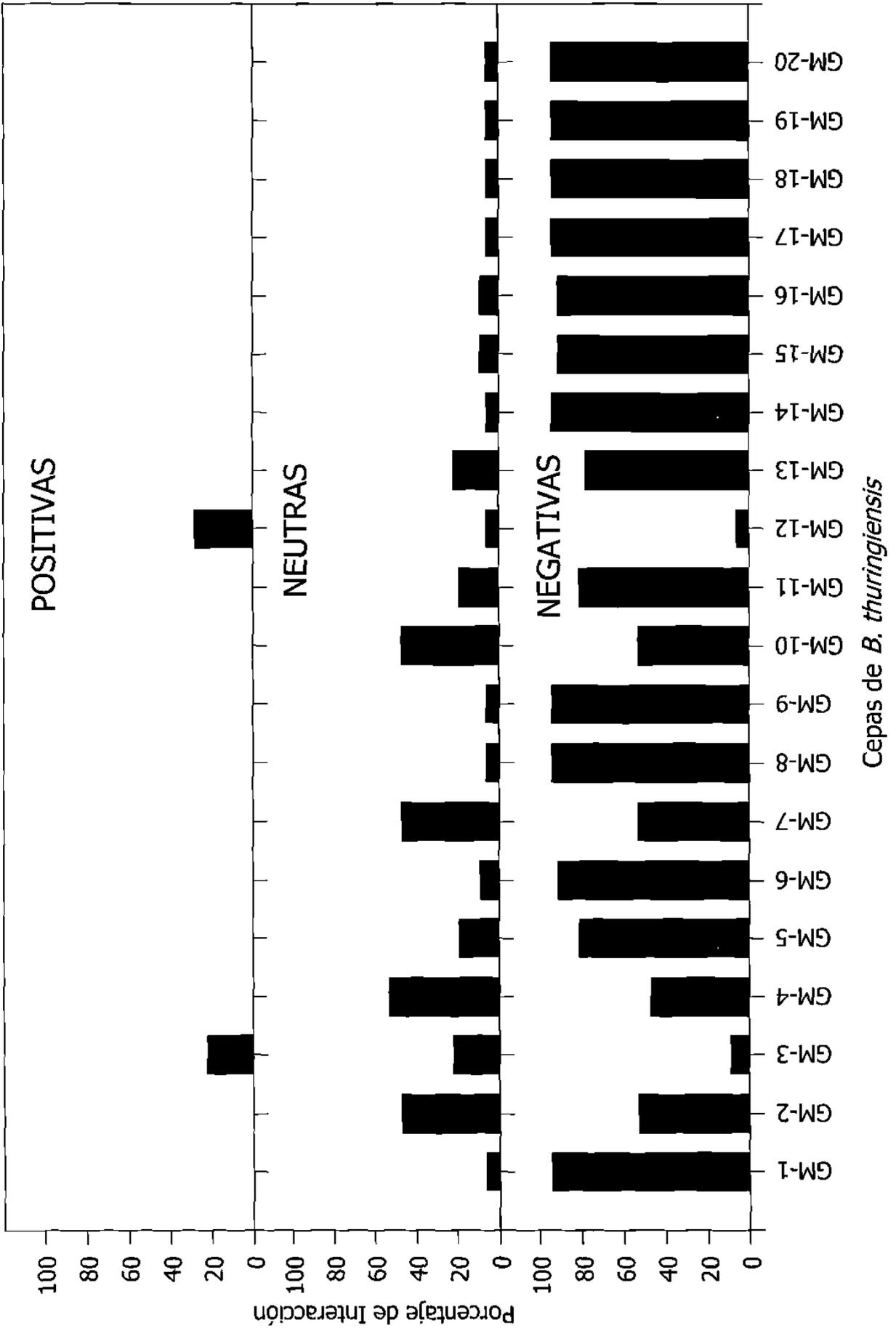
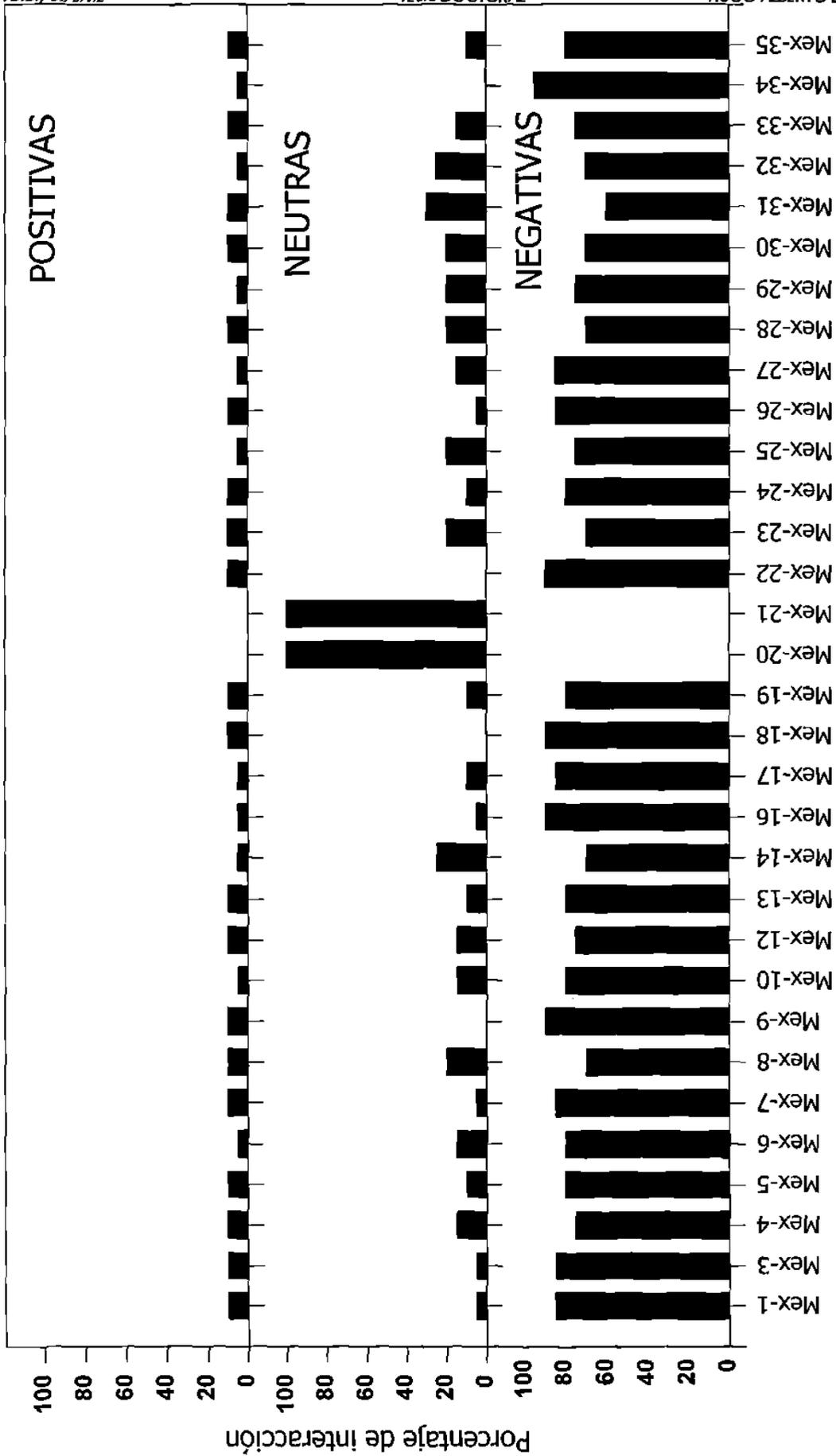


Fig. 5. Interacción de cepas de *B. thuringiensis* con cepas de *F. moniliforme*.



Cepas de *Fusarium moniliforme*

Fig. 6. Interacción de cepas de *F. moniliforme* con cepas de *B. thuringiensis*

a *Bacillus subtilis* que produce un lipopéptido antifúngico de la familia Iturin, Klich *et al.* (1991) impregnó discos de papel filtro con varias concentraciones de Iturin A, colocandolos sobre placas de agar con las conidias de *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* encontrando dicha actividad. Con el propósito de encontrar microorganismos que degraden la quitina se han realizado estudios con diferentes cepas encontrando más activos a las cepas *Alcaligenes denitrificans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*. Lo más relevante del estudio que realizó Slabospitskaia es la capacidad de 171 cepas de 15 especies de bacterias aeróbicas formadoras de esporas aisladas de diferentes superficies ecológicas, el cuál de 85 cepas de *Bacillus* el 50 % hidrolizó la quitina coloidal.

Se procedió a incrementar la concentración de *B. thuringiensis* en los discos de agar a  $1.2 \times 10^9$  cel / ml. La concentración de conidias que se utilizó fué igual a la utilizada en el preliminar. Los resultados se muestran en la Tabla 15, en donde existe inhibición del crecimiento de *F. moniliforme*, encontrándose que la cepa Mex-II-34 incrementó el diámetro de inhibición. Después de incubar las cajas petri 48 h a 28°C se observan halos de coloración rosa en el medio de cultivo, y en la superficie no se observa inhibición, se midieron los diámetros de los halos. Sin embargo, al pasar el tiempo (más de 6 días) se presentaron halos de inhibición que algunos corresponden a los de coloración (Tabla 14). Se incrementó la concentración celular de *B. thuringiensis* a  $1 \times 10^{11}$  cel/ml y se disminuyó la de *F. moniliforme* a  $1 \times 10^6$  cel/ml, para este propósito se trabajó con la cepa Mex-II-21 la cual no presentó interacción en el escrutinio y dió un resultado de sensibilidad (+++) con GM-6 y GM 11, (+) con GM-10 y GM-12, esto nos hace pensar que es importante la concentración celular a la cual se trabaja, ya que el crecimiento de esta cepa en particular es algodonoso. Debido a su rápido crecimiento no se pudieron detectar inhibiciones en el preliminar pero al bajar la concentración se logró observar inhibición. En cambio con la cepa Mex-II-34 se esperaban resultados muy similares, pero aquí existe la posibilidad de que el micelio del hongo es utilizado como sustrato para estimular a *B. thuringiensis* a producir alguna enzima principalmente quitinasa, ya que en la tabla 10 primero se observó el crecimiento del hongo y posteriormente se formaron los halos con

disminución del micelio, puede ser que al disminuir la concentración, no existe el suficiente estímulo para dar un resultado positivo (+++). Sin embargo se consideró (+) aquellas cepas que presentaban < 12 mm de diámetro es decir fue menor en tamaño en relación a otros experimentos.

Tabla 14

Inhibición del crecimiento de 10 cepas de *F. moniliforme* utilizando 8 cepas de *B. thuringiensis*, datos obtenidos después de 6 días de incubación a 28°C.

Cepas de <i>F. moniliforme</i>	<i>B. thuringiensis</i>																
	GM-1		GM-4		GM-6		GM-8		GM-12		GM-14		GM-17		GM-20		
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	
Mex-II-8	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mex-II-12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mex-II-13	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mex-II-22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mex-II-23	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mex-II-25	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mex-II-27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mex-II-28	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mex-II-31	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Mex-II-34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+

(+) = Inhibición del crecimiento (-) = No inhibición del crecimiento

Según los experimentos que realizó Hirano nos muestran que algunas cepas de fitopatógenos, inducen la actividad de la quitinasa utilizando la quitina presente en su pared celular del hongo. En este caso los sustratos se obtuvieron comercialmente. Además estudiaron el grado de inhibición y comparación de los efectos inhibitorios de quitinasa, quitosano y lisozima, encontrando una débil inhibición con quitinasa. Los estudios que realizó Sang-dal Kim con *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 muestra que el agente de biocontrol es una enzima lítica extracelular que es capaz de degradar la quitina y laminarina. La actividad de la quitinasa sobre el micelio de *Fusarium solani* fue más alto que con laminarina, esto se debe a que la pared celular de este hongo está formada por 47% de quitina y 14% de glucano. Se acepta comunmente

Tabla 15  
 Inhibición del crecimiento de las cepas de *F. moniliforme* por cepas de *B. thuringiensis* inmersas en discos de agar preparados con  $1.2 \times 10^9$  cel/ml en experimentos de 6 días incubados a 28°C.

		<i>Cepas de F. moniliforme</i> (Mex-II)			
		22	25	27	34
Cepas de <i>B. thuringiensis</i> (GM)	6	+	+	+	+++
	10	-	-	-	++
	11	+	+	+	+++
	12	-	-	-	++
	15	+	+	+	+++
	16	+	+	+	+++
	17	+	+	+	+++
	18	+	+	+	+++
	19	+	+	+	+++

+++ Halo de inhibición < 25 mm.  
 ++ Halo de Inhibición < 20 mm.  
 + Halo de inhibición < 15 mm  
 - No inhibición

que enzimas líticas juegan un papel esencial dentro del ciclo de vida de los hongos. Adicionalmente se trabajó con sobrenadantes filtrados de cultivos con *B. thuringiensis*, los resultados obtenidos fueron negativos ya que no se presentó inhibición en las cepas Mex-II-22, Mex-II-25, Mex-II-27, y Mex-II-34 las cuales fueron las que se utilizaron en este experimento. La posibilidad de contener una sustancia antifúngica se basa en los experimentos realizados por Handesman y colaboradores, ellos trabajaron con sobrenadantes filtrados de cepas de *Bacillus cereus* UW85 encontrando que produce 2 antibióticos que inhiben el damping-off de la alfalfa, además mencionan que existen múltiples estrategias para la supresión de enfermedades de plantas, lo cual sugiere que los antibióticos son requeridos pero no suficientes, ésto es en el caso de la actividad de cultivos UW85 como control biológico.

### Tasa de crecimiento *in vitro* de las cepas de *B. thuringiensis*

Las cepas de *B. thuringiensis* exhibieron velocidades de crecimiento variables, bajo condiciones *in vitro* (Tabla 16). Los valores extremos para el anterior parámetro correspondieron a las cepas GM-1 y GM-19 (0.32 y 1.5 h respectivamente), en tanto, el resto de las cepa probadas, incluyendo los controles HD-1 y BS-FCB-1, se desarrollaron en un rango intermedio en relación a las primeras.

Tabla 16  
Tasa de crecimiento (u) *in vitro*\* de las cepas de *B. thuringiensis* utilizadas en este estudio.

Cepa	u (hrs <sup>-1</sup> )
HD-1	0.643
GM-1	0.322
GM-2	0.592
GM-3	0.618
GM-4	0.770
GM-5	0.728
GM-6	0.676
GM-7	0.700
GM-8	0.650
GM-9	0.461
GM-10	0.817
GM-11	0.871
GM-12	1.300
GM-13	1.250
GM-14	0.671
GM-15	0.980
GM-16	1.200
GM-17	0.960
GM-18	0.764
GM-19	1.500
GM-20	0.771
<i>B. subtilis</i>	0.476

\* = Incubación a 37°C en agitación rotatoria a 200rpm

Las velocidades de crecimiento encontradas para *B. thuringiensis* en este medio ambiente particular, han indicado la heterogeneidad fisiológica entre los organismos de prueba, lo que a su vez permite sugerir una diversidad en atributos ecológicos dentro de los mismos. Puesto que muchos aspectos de la ecología de las especies, pueden ser deducibles de su comportamiento en cultivo puro, y al considerar que la sobrevivencia de éstas en hábitats naturales, dependerá finalmente de su habilidad para crecer en una tasa lo suficientemente alta para balancear la muerte originada por diversas causas (Brock, 1971), podría esperarse que aquellas cepas de *B. thuringiensis* con tales características mostrarían la mayor tendencia a persistir y colonizar el suelo una vez introducidas. Sin embargo, la reducción de la tasa de crecimiento para *B. thuringiensis* en el suelo, en comparación a la observada en el medio de cultivo, implicaría también una eventualidad razonablemente factible, en vista de la magnitud y diversidad microbiana en un ambiente donde sus poblaciones resultan prominentes competidores por sustratos disponibles. De esta manera, Brock (1979) observó que el tiempo de generación de *Escherichia coli* se alarga de 20 a 30 min en cultivo puro a 12 h en el tracto intestinal, y *Leucothrix mucor*, una bacteria marina, presenta un tiempo de generación casi 6 veces mayor en la naturaleza. Belser y Schmidt (1978), compararon la tasa de crecimiento del nitrificante autotrófico *Nitrobacter winogradsky* en 14 h con cultivos puros y 140 h en suelo nitrificado activamente.

### **Persistencia de *B. thuringiensis* en suelo**

El efecto de los componentes abióticos del suelo, sobre la persistencia de *B. thuringiensis* fue determinado al incubar diversas cepas del organismo hasta por 120 días en muestras estériles de suelo tipo xerosol y litosol (Fig. 7). La sobrevivencia de *B. thuringiensis* en suelo, graficada como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo seco contra el tiempo, revela que GM-1 experimentó una drástica caída de población para el día 140, ya que en xerosol y litosol su viabilidad se redujo 0.94 y 0.97 veces (X) respectivamente, el número original. De la misma manera que para GM-1, el subsecuente análisis de datos para

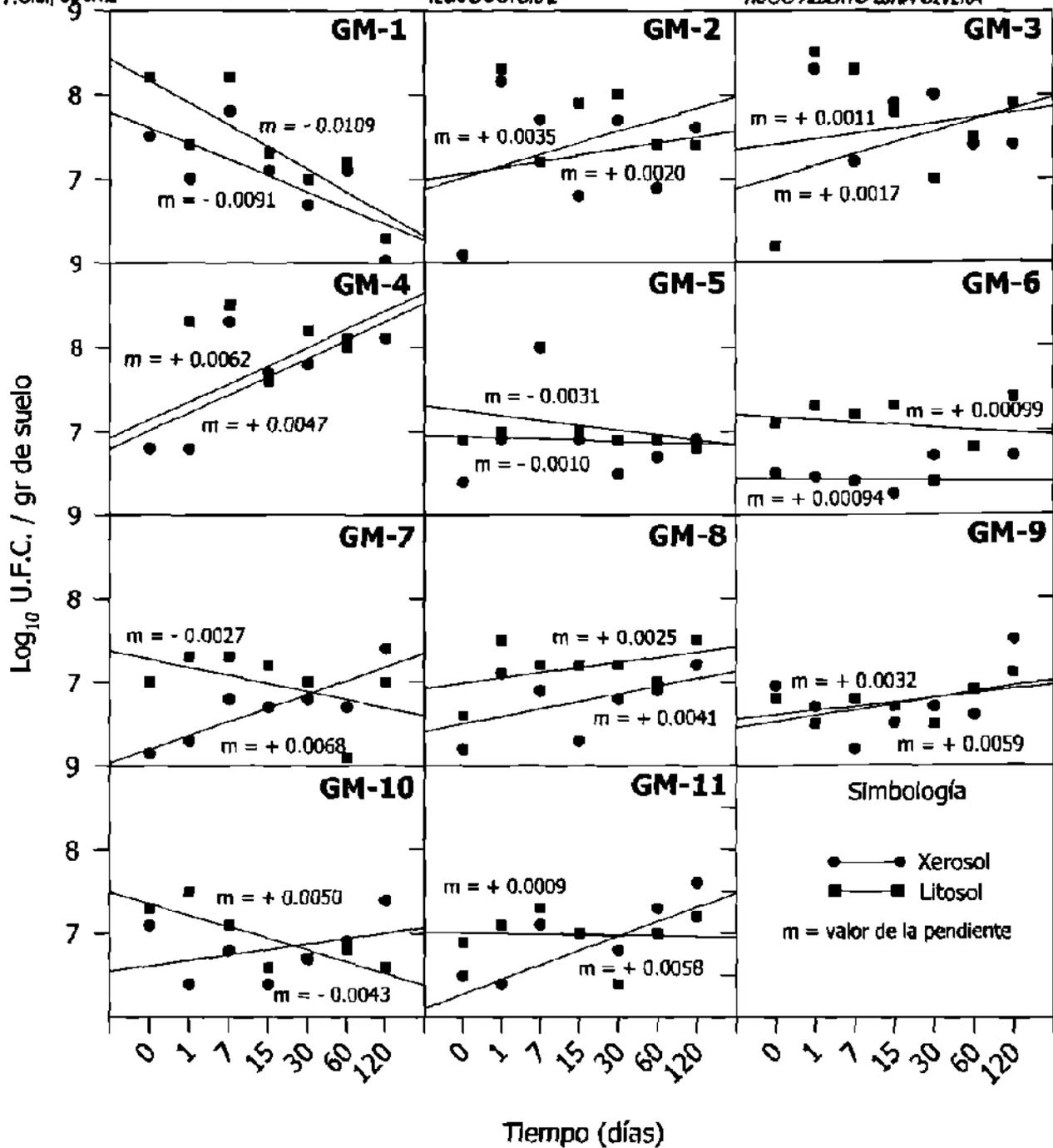
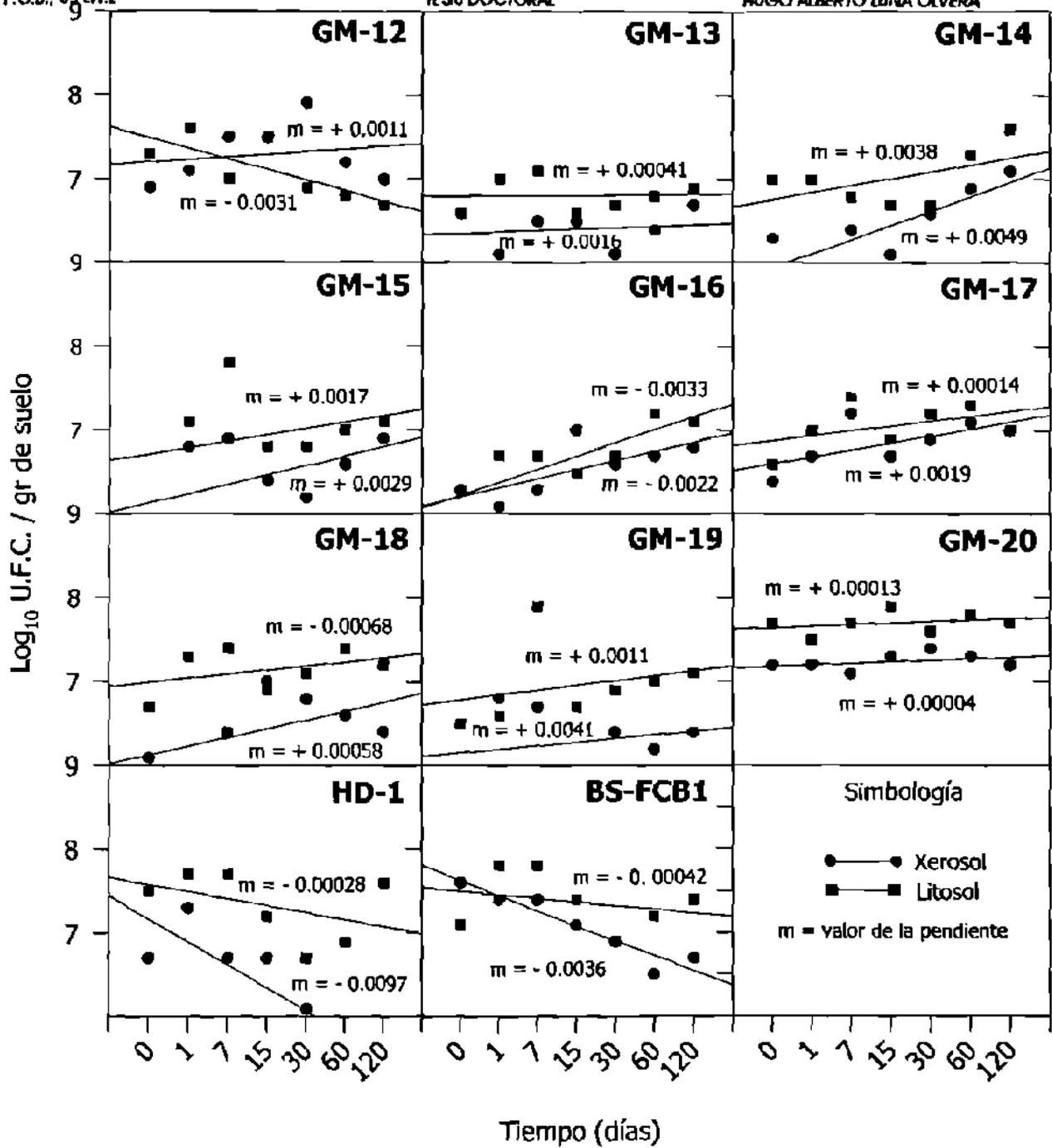


Fig. 7. Análisis de regresión de la persistencia de la cepas de *B. thuringiensis* en suelo estéril de tipo xerosol y litosol.



Continuación ... Fig. 7.

las cepas restantes, incluye la comparación propia (expresada en número de veces) entre la magnitud de poblaciones al día 140 de incubación en los representantes edáficos, con respecto a la cantidad inicial. Manifestándose en el orden correspondiente los valores obtenidos para xerosol, seguidos de los encontrados en litosol. De este modo, y a diferencia de GM-1, GM-2 respondió inversamente con incrementos netos del orden de 2.24 y 0.92 X. Un efecto poco perceptible, pero con tendencia a aumentar, ocurrió en el caso de GM-3, cuyos valores correspondieron a 0.44 y 0.73 X. Conviene destacar para la cepa en cuestión, el hecho de haberse desarrollado mejor en litosol, como sucedió escasamente entre los organismos probados. Una de las cepas examinadas más sobresaliente por su capacidad relativa para proliferar en las condiciones bajo estudio, estuvo representada por GM-4 que se elevó notablemente su población 6.27 y 4.01 X respectivamente, GM-5 que disminuyó casi uno y dos tercios (0.28 y 0.63 X respectivamente) su número inicial de células. Mientras que para GM-6 apenas puede apreciarse un desarrollo (0.48 y 0.37 X). La situación más contrastante aconteció con GM-7, que creció favorablemente en xerosol (7.91 X) y decreció en litosol (0.58 X), sucediendo algo similar con GM-10, pero en menor grado (4.14 y 0.75 X). GM-8, GM-9 y GM-11 ostentaron números positivos en xerosol y litosol, que en el mismo orden correspondieron a 2.80 y 1.23 X; 5.76 y 1.88 X; 11.88 y 0.49 X, resaltando en un grado de lo más significativo, el último organismo que en el primer suelo se desarrolló marcadamente con relación al segundo. El tercer organismo de los examinados en orden numérico, que disminuyó sus poblaciones en los dos tipos de suelo fue GM-12, con 0.39 y 0.74 X, haciéndose bastante notorio nuevamente, como se vió para los anteriores organismos con similares pérdidas (GM-1 y GM-5), un efecto menos favorable en lo que a persistencia se refiere en litosol. Todas las cepas de la siguiente disposición mostraron incrementos en las densidades celulares en comparación a los números iniciales: GM-13 (1.04 X, 0.23 X); GM-14 (8.12 X, 4.52 X); GM-15 (2.62 X, 1.14 X); GM-16 (1.65 X, 3.37 X); GM-17 (0.87 X, 0.06 X); GM-18 (0.30 X, 0.34 X); GM-19 (0.38 X, 0.60 X). Cabe destacar en este grupo, las proporciones alcanzadas por GM-14, que al igual que GM-4 y GM-11, demostraron habilidades adaptativas superiores sobre las demás cepas. Un comportamiento poco común entre las cepas de *B.*

*thuringiensis*, aconteció con GM-20, que contrariamente a las cepas que proliferaron en un suelo y decrecieron en otro (GM-7 y GM-10), expuso una ligera disminución en xerosol (0.01 X) e incrementó en litosol (0.05 X). La cepa HD-1, usada mundialmente como insecticida comercial, mostró al igual que GM-1, GM-5 y GM-12 reducciones de población en los dos suelos; sin embargo, a diferencia de las anteriores, el xerosol restringió severamente la sobrevivencia del organismo, de tal modo, que al día 140, 0.96 partes del inóculo habían desaparecido. Tal conducta no se apreció en litosol, que fue capaz de amortiguar en mayor grado la caída de 0.11 X. Sorprendentemente BS-FCB-1 (*Bacillus subtilis*), un organismo cuyo hábitat por naturaleza es el suelo, presentó también una baja capacidad para desarrollarse (0.80 y 0.16 X). La comparación de pendientes de la línea de regresión, obtenidas para la sobrevivencia de *B. thuringiensis* en ambos suelos, se presenta en la Tabla 17. En términos generales, el tipo de suelo no fue un factor determinante para que *B. thuringiensis* incrementara o disminuyera su población, ya que, de las 21 cepas probadas, 19 se comportaron de manera similar, en lo que respecta al anterior parámetro, y en solo dos (GM-7 y GM-10) se observó una influencia ambiental, particularmente de litosol, que marcó una diferencia reductiva en relación al xerosol. Al utilizar el anterior criterio comparativo, sobresale la capacidad de la cepa GM-4 para incrementar su población, ya que presentó el valor promedio más alto de pendiente positiva ( $m = 0.0054$ ), que contrasta con GM-1, que exhibió el mayor promedio de pendiente negativa ( $m = -0.0100$ ), seguida de las cepas de referencia HD-1 ( $m = -0.0046$ ) y BS-FCB-1 ( $m = -0.0020$ ). La esterilización de suelo, puede estimular el crecimiento de poblaciones inoculantes, como resultado de un incremento, asociado con la disponibilidad de nutrientes (Brown, 1973). Sin embargo, aunque la esterilización del suelo en este estudio eliminó los microorganismos nativos, y de este modo aumentó, los nutrientes disponibles, la estimulación en el crecimiento *B. thuringiensis* fue solo parcial, ya que no todas las cepas incrementaron sus números en suelo estéril. Davis (1975), ha encontrado una fuerte correlación entre la bacteriostasis y la acidéz del suelo, y Akiba *et al.* (1977), reportaron que el crecimiento de *B. thuringiensis* en suelos esterilizados y extractos de suelo fue menor o estuvo en el rango de pH entre 4.8 - 5.5. Es probable que la naturaleza esporádica del crecimiento de poblaciones

**Tabla 17**

Comparación de pendientes en la regresión sobre persistencia de las cepas de *B. thuringiensis* en suelo estéril durante 120 días

Cepa	Suelos	
	Xerosol	Litosol
HD-1	- 0.0091 a	- 0.0002 a
GM-1	- 0.0091 a	- 0.0109 a
GM-2	+ 0.0035 a	+ 0.0020 a
GM-3	+ 0.0011 a	+ 0.0017 a
GM-4	+ 0.00620 a	+ 0.0046 a
GM-5	- 0.00101 a	- 0.0031 a
GM-6	+ 0.0009 a	+ 0.0009 a
GM-7	+ 0.0068 a	- 0.0027 b
GM-8	+ 0.0041 a	+ 0.0025 a
GM-9	+ 0.0059 a	+ 0.0032 a
GM-10	+ 0.0050 a	- 0.0043 b
GM-11	+ 0.0058 a	+ 0.0009 a
GM-12	- 0.0011 a	- 0.0031 a
GM-13	+ 0.0016 a	+ 0.00041 a
GM-14	+ 0.0049 a	+ 0.0038 a
GM-15	+ 0.0029 a	+ 0.0017 a
GM-16	+ 0.0022 a	+ 0.0033 a
GM-17	+ 0.0040 a	+ 0.0004 a
GM-18	+ 0.0005 a	+ 0.00068 a
GM-19	+ 0.00079 a	+ 0.0011 a
GM-20	- 0.00004 a	+ 0.0002 a
<i>B. subtilis</i>	- 0.0036 a	- 0.0004 a

Las comparaciones estadísticas se establecen entre valores dentro del mismo renglón. Valores seguidos por letras distintas, indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Inoculantes de *B. thuringiensis* en suelos esterilizados esté relacionada en parte con los anteriores resultados. Una baja relación ha sido encontrada entre la velocidad de crecimiento *in vitro* y la sobrevivencia de *B. thuringiensis* en suelo estéril. Organismos como la cepa GM-12, GM-13 y GM-19, cuyas tasas de crecimiento fueron de las más elevadas (1.3, 1.25 y 1.5 h respectivamente) no mostraron consistencia con su habilidad para mantener altos números de población después de 120 días de incubación en los suelos. En cambio, cepas como GM-4, alcanzaron los mayores niveles a pesar de crecer más lentamente en comparación a las primeras. Solo para el caso de GM-1, se estableció relación entre ambos parámetros cuestionados, ya que la tasa de crecimiento (0.322 h), quizás haya sido la causa de la menor capacidad observada para equilibrar la mortalidad entre las cepas de *B. thuringiensis*. A partir del análisis de datos se manifiesta una importante tendencia de *B. thuringiensis* para sobrevivir bajo las condiciones ambientales del suelo, ya que de las 21 cepas, 14 (67 %) fueron capaces no solo de mantenerse, sino de proliferar, aunque con distinto grado durante el tiempo de prueba en los tipos de suelo estudiado. Por otro lado, 3 cepas (14 %) crecieron en un tipo de suelo y en otro disminuyeron su viabilidad, e incluso algunas (4 cepas = 19 %) respondieron con una mortalidad definida, cuando se inocularon en xerosol y litosol. De la misma manera, es posible distinguir una heterogeneidad en el comportamiento en suelo entre cepas de *B. thuringiensis*, por lo que la sobrevivencia dependerá finalmente de habilidades adaptativas o competitivas de la mismas.

Aunque no se han desarrollado estudios ecológicos de *B. thuringiensis*, utilizando una amplia variedad de cepas, como ha sido este caso, diversos autores apoyan de alguna manera los anteriores resultados. Akiba *et al.* (1979), han comparado la sobrevivencia de dos cepas de *B. thuringiensis* en muestras estériles de tres distintos suelos aluviales cultivados con moras. Cuando los organismos se inocularon bajo tales condiciones, los números celulares no decrecieron, sino que se incrementaron y permanecieron en altos niveles durante varios meses. Por el contrario, cuando Sekijima *et al.* (1977), hicieron una sola aplicación de *B. thuringiensis* a una diversidad de tipos de suelo, y siguieron su persistencia,

encontraron que los niveles de *B. thuringiensis* decrecieron gradualmente a distintas velocidades, dependiendo de la naturaleza del suelo y la cepa aplicada. Sin embargo, Aizawa (citado por Dulmage y Aizawa, 1982) al aplicar repetidas veces el organismo al suelo, no detectó acumulación del mismo, por lo que parece haber un límite en el nivel de *B. thuringiensis* que el suelo puede contener. Un hallazgo por demás interesante, que enfatiza por un lado el "status" poblacional de *B. thuringiensis* en suelo y por otro, la distribución natural del organismo en tal ambiente, proviene de los estudios de De Lucca *et al.* (1981), quienes revelaron una baja proporción del organismo (0.5 %) en relación a los formadores de espóra, pero que independientemente de esto, lo aislaron tanto de los suelos rocosos, vírgenes, forestales, no cultivados o plantados con diversos cultivos. Se ha indicado que el suelo juega un importante papel, para la distribución de la bacteria en la naturaleza (Dulmage y Aizawa, 1982). Tal aseveración está de acuerdo en parte con los resultados encontrados en los anteriores experimentos, donde un alto porcentaje de cepas logró mantenerse viable durante varios meses sin perder la capacidad de producir el cristal tóxico, después de recuperarse de este ambiente (Tabla 18).

### **Modificaciones ambientales del suelo**

Después de su inoculación en suelo estéril enriquecido con glucosa y sujeto a distintos pH y humedad, la cepa HD-1, se comportó de manera diferente. A pH 7, la población original se incrementó para todos los niveles de humedad, y volvió a decaer en subsiguientes muestreos. Variaciones de población ocurrieron también a pH 5 y 9 en suelo inundado. En el primer caso, los incrementos se presentaron al día 8, mientras que en el segundo, hubo disminuciones de población a partir de la primera fecha. Las diferencias en el número de organismos se indican con letras en la parte superior de las columnas. En orden decreciente, los valores se representan alfabéticamente, por lo que las columnas sin letras indican estabilidad en el número original. La situación fue diferente para el mismo microorganismo, cuando se añade al suelo residuos de maíz como fuente nutritiva. Se han observado reducciones de población en suelo con pH 5, a capacidad de retención de agua, así como bajo

Tabla 18  
Producción de cristales por cepas de *B. thuringiensis* en medio de cultivo 2 y 4 meses después de su introducción en suelo estéril de tipo xerosol y litosol.

Variedad	Cepa	Formación de cristal			
		Xerosol		Litosol	
		2 meses	4 meses	2 meses	4 meses
<i>aizawai</i>	GM-1	+	+	+	+
	GM-6	+	+	+	+
	GM-7	+	+	+	+
	GM-8	+	+	+	+
	GM-9	+	+	+	+
	GM-10	+	+	+	+
nd	GM-2	+	+	+	+
	GM-5	+	+	+	+
<i>sotta</i>	GM-3	+	+	+	+
<i>kumamotoensis</i>	GM-4	+	+	+	+
<i>aizawi</i>	GM-11	+	+	+	+
	GM-14	+	+	+	+
<i>ostrinae</i>	GM-13	+	+	+	+
	GM-20	+	+	+	+
<i>nigeriae</i>	GM-15	+	+	+	+
	GM-16	+	+	+	+
	GM-17	+	+	+	+
<i>neoleonensis</i>	GM-18	+	+	+	+
<i>tolworthi</i>	GM-12	+	+	+	+
nd	GM-19	+	+	+	+
<i>kurstaki</i>	HD-1	+	+	+	+

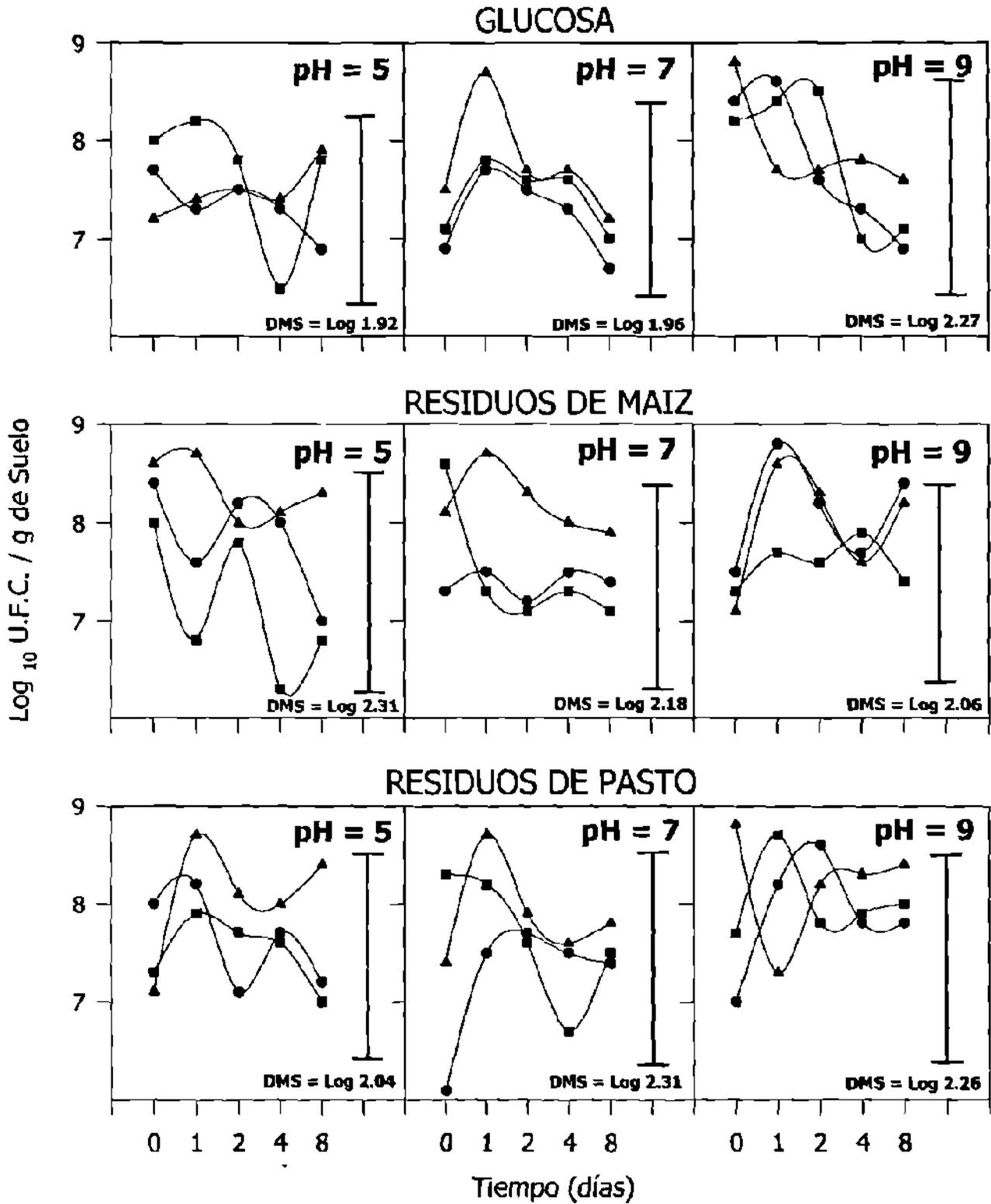


Fig. 8. Respuesta de *B. thuringiensis* HD-1 al enriquecimiento orgánico y la modificación de los factores ambientales en suelo estéril de tipo xerosol (○—○ seco; □—□ húmedo; ▲—▲ inundado).

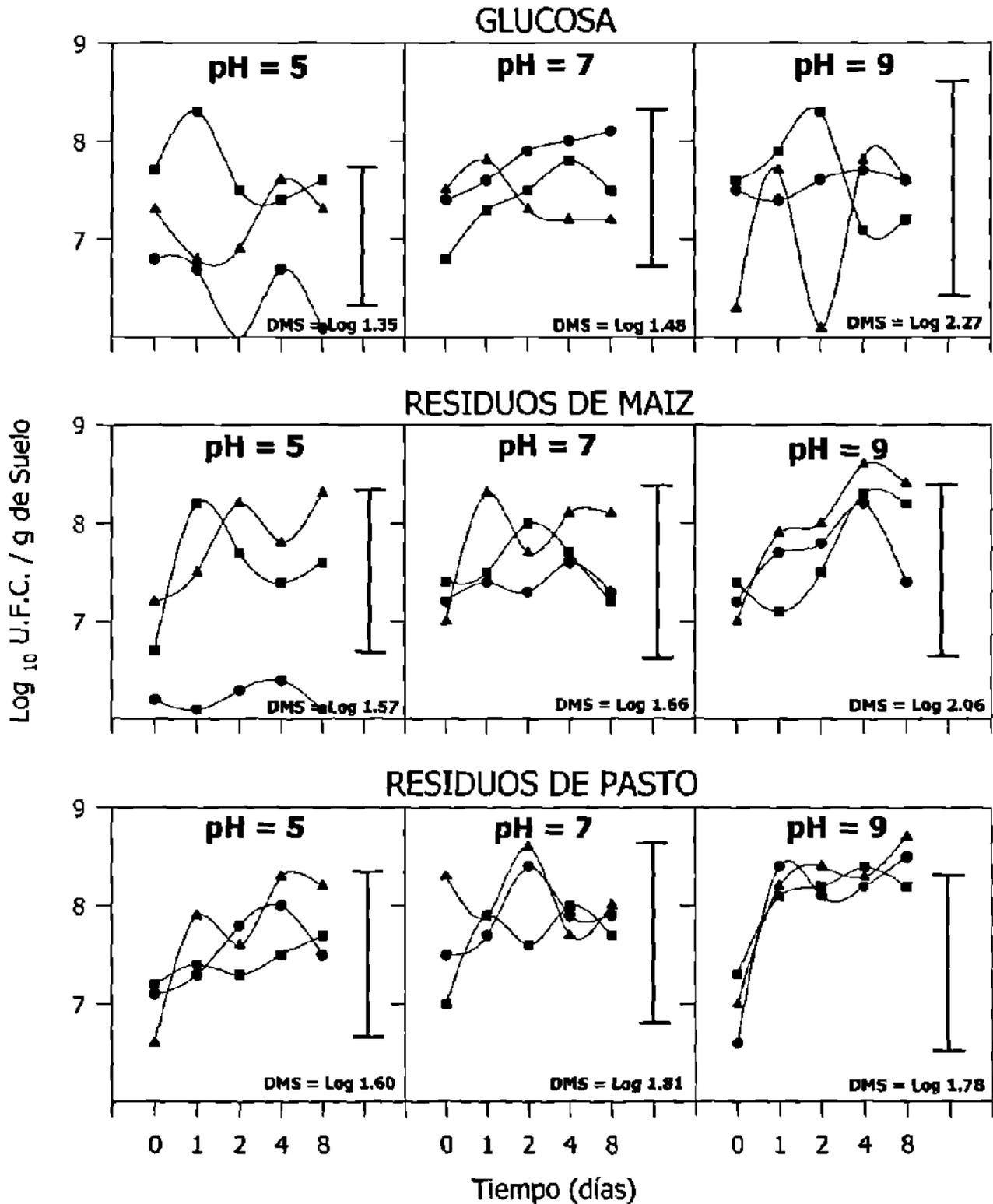


Fig. 9. Respuesta de *B. thuringiensis* GM-4 al enriquecimiento orgánico y la modificación de los factores ambientales en suelo estéril de tipo xerosol (○—○ seco; □—□ húmedo; ▲—▲ inundado).

condiciones secas. De nuevo a pH 7, vuelve a manifestarse la condición favorable a *B. thuringiensis* en suelos inundado y seco, pero no así a su máxima capacidad de retener el agua. Una respuesta bien marcada pareció ocurrir en suelo con pH 9 inundado, donde se presentaron 3 niveles estadísticos, resaltando el grado más alto después de la inoculación. Se han presentado incrementos de población bajo condiciones deficientes de humedad. Cuando *B. thuringiensis* HD-1 se introdujo en suelo enriquecido con residuos de pasto, en casi todos los pH y niveles de humedad se mostraron incrementos de población con caídas subsecuentes, apreciándose una mayor estimulación por parte de este residuo para el efecto observado, en comparación a otros utilizados.

A diferencia de HD-1, la cepa GM-4 de *B. thuringiensis*, mostró una estimulación relativamente baja, cuando se añadió glucosa al suelo, y se sujetó a modificaciones de pH y humedad. Únicamente a pH 5 y 7, así como para los niveles húmedo e inundado, ocurrieron incrementos de población. Sin embargo, al añadir residuos de maíz, como fuente de C y N en 5 de 9 condiciones, existe una respuesta positiva; es decir, tanto a pH 5, 7 y 9, destacando este último, porque en las tres humedades se manifestaron tales efectos. Aunque la anterior situación no fue tan contundente, como la observada al añadir residuos de pasto, e inocular esta cepa, que respondió incrementando su población en 8 de 9 condiciones. Aunque se esperaba una respuesta diferente, un bacilo nativo de suelo, aislado de xerosol, respondió de forma específica para ciertas condiciones, y no mostró cambios en los niveles originales, durante los tiempos de muestreo. Con glucosa, se incrementó a pH 5 y 7 bajo inundación, pero a pH 9 todos los niveles de humedad. Igualmente sucedió con residuos de maíz, pero respondió principalmente a pH 7 (3 niveles de humedad), seguido de pH 5 (2 niveles) y luego pH 9 (un nivel). Sin embargo, al agregar residuos de pasto en dos humedades de cada pH, se presentaron diferencias de población.

Las condiciones ambientales estériles, favorables para una respuesta medida como crecimiento de ambas cepas, fueron escogidas para ensayos con suelos no

estériles. La cepa HD-1, incrementó su número en cuatro de cuatro condiciones impuestas, mientras que GM-4 solo se desarrolló en dos de seis ocasiones, por lo que puede advertirse en este último caso, una influencia ejercida por la única variable que estuvo ausente en anteriores experimentos estériles: los organismos del suelo. Las fuentes de variación y la significancia en lo que respecta el efecto de parámetros ambientales sobre *B. thuringiensis* HD-1 y GM-4, mostraron que los factores evaluados causaron efectos importantes en el nivel poblacional de las cepas estudiadas. Asimismo, la conjugación de factores determinó que GM-4 variara su población en todos los casos, a diferencia de HD-1, que solo fue afectado al combinarse el carbono, pH y humedad (Figs. 8 y 9).

### **Esporulación de cepas de *B. thuringiensis* introducidas al suelo**

Un experimento fue desarrollado para conocer la capacidad de *B. thuringiensis* de permanecer como células vegetativas en el suelo tipo xerosol. Para lo cual, se siguió una cinética de esporulación (Fig. 10). Se obtuvieron datos contrastantes entre las cepas probadas. Mientras que GM-1 y HD-1 convirtieron casi en su totalidad las células vegetativas a esporas, en un lapso de 1 a 2 días, GM-4 pareció retardar el proceso, ya que, a los 4 días posteriores a su inoculación, aún se mantenía un logaritmo cercano a 3.4 células/g de suelo como su inóculo original. Un caso bastante interesante sucedió con *B. subtilis*, que progresivamente formó esporas, sin disminuir el nivel inoculado de células vegetativas. Es posible, que el comportamiento diferencial observado entre *B. thuringiensis* y *B. subtilis*, tenga su origen en los hábitats que por naturaleza se les reconocen. Mientras que el primero es un patógeno de insectos, el segundo, es un organismo típico de suelo, quizás bastante bien adaptado a las presiones ambientales del mismo.

El efecto de la fracción biótica del suelo, fue considerado sobre la germinación de esporas de los organismos de prueba en tratamientos estériles y no estériles, con verificación de cuentas vegetativas y esporuladas. Una bien definida germinación de esporas ocurrió con GM-1 en ambos tratamientos, pero se notó una diferencia incluir los organismos nativos que ejercieron un notable efecto sobre la bacteria en cuestión.

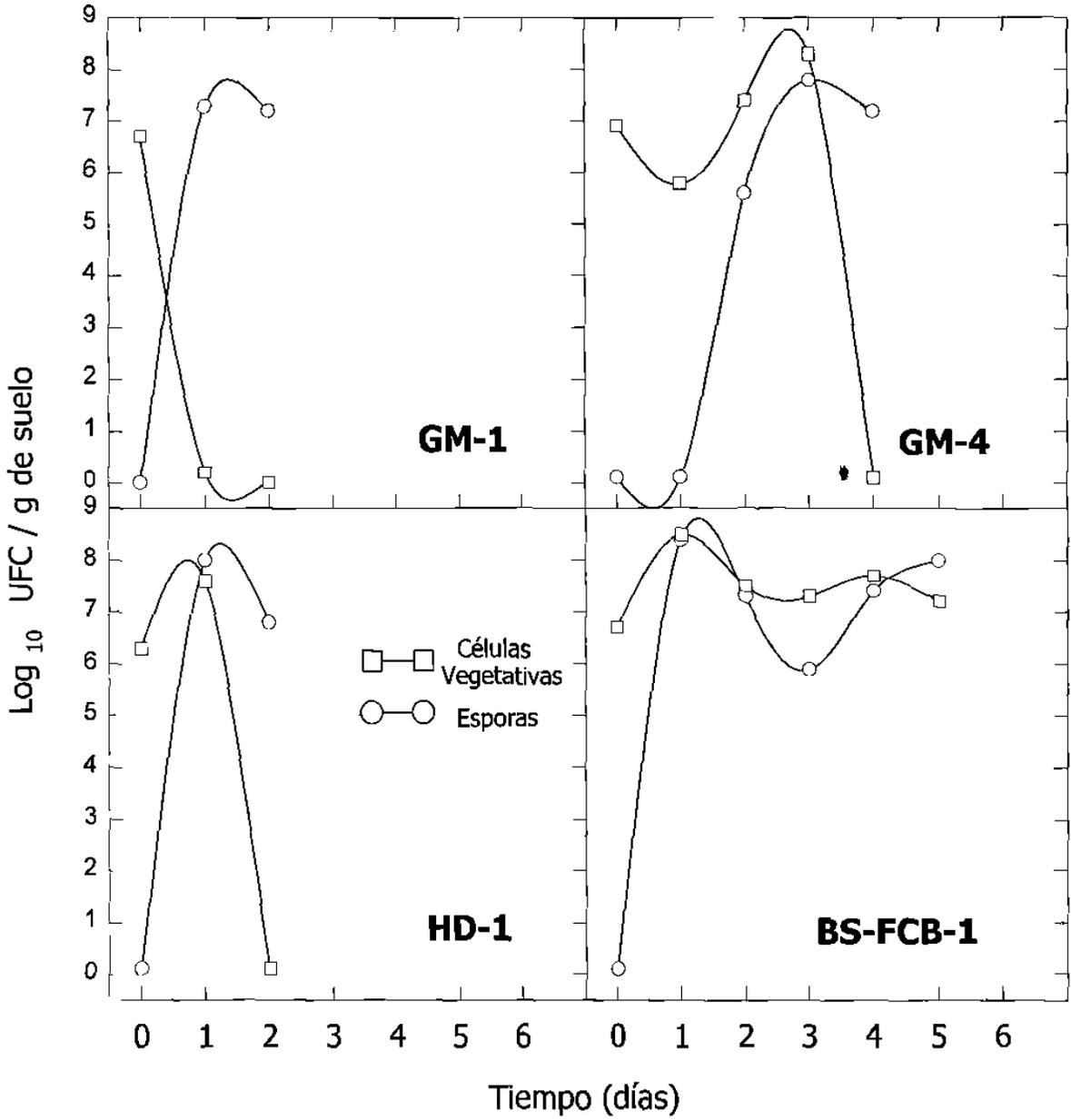


Fig. 10 Cinética de esporulación en cepas *B. thuringiensis* y *B. subtilis* introducidas a suelo tipo xerosol no estéril.

Tal efecto, se hizo más notorio en GM-4, cuya germinación inicial de esporas se disminuye drásticamente en este tratamiento, y no así en la condición estéril, donde importantemente se formaron células vegetativas a partir de esporas. Solamente en HD-1, se pudo detectar un incremento durante el tiempo de muestreo, en la cantidad de estos propágulos, para el tratamiento estéril, y curiosamente una mayor germinación en la condición no estéril. En apariencia, *B. subtilis* no fue afectada en lo que se refiere a la capacidad germinativa de sus esporas por la fracción biótica, ya que se han observado líneas de regresión casi paralelas en condiciones estériles y no estériles. La relativa habilidad de las esporas de *B. thuringiensis* para germinar, quizás tenga significancia ecológica. Se ha reconocido, que las esporas responden pobremente o no a los germinantes óptimos para *B. subtilis* (Bulla *et al.*, 1980). Dependiendo de la cepa, *B. thuringiensis* puede producir esporas que germinen, ya sea lenta o rápidamente. En el intestino de la larva, existe poca competencia con otros organismos, así que no se requiere una rápida germinación. Sin embargo, la situación es diferente en el suelo, donde Stahley *et al.* (1978), han considerado que una rápida germinación, puede conferirles ventajas en la sobrevivencia. Aunque en nuestro caso no pareció existir diferencia en la velocidad de germinación de esporas entre cepas, sí fue evidente que todas germinaron, y esto particularmente fue cierto para HD-1.

Los resultados de los anteriores experimentos multifactoriales demuestran, por un lado, que los factores ambientales del suelo, determinan que *B. thuringiensis* incremente o no sus poblaciones, pero, por otro lado, también involucran que el organismo se puede desarrollar bajo condiciones muy particulares. La introducción de *B. thuringiensis* en suelo estéril, permitió el incremento en el nivel original del inóculo en el orden de uno, dos y hasta tres logaritmos para ambas cepas, de una manera similar a la encontrada por Sekijima *et al.* (1977). El crecimiento de inoculantes microbianos en suelo estéril es común (Akiba *et al.*, 1977), y es principalmente atribuible a la carencia de competencia microbiana por la limitada fuente de nutrientes. Las anteriores sugerencias de que inoculantes microbianos son limitados en su crecimiento por factores ambientales del suelo (Peña Cabriales y Alexander, 1983; Bookerd y Weaver, 1982), también son apoyadas por nuestros datos. La

habilidad de las cepas de *Bacillus* por competir exitosamente con la biota activa del suelo por los nutrientes añadidos, también ha sido reportada por Saleh (1970), y se sugiere un reducido crecimiento de *B. thuringiensis*, causado por la ausencia de nutrientes disponibles, como pudo notarse también en nuestros experimentos. Sin embargo, en presencia de nutrientes añadidos por *B. thuringiensis* fue capaz de reproducirse en grado significativo durante escaso tiempo, lo que puede involucrar así, una limitada fuente nutricional que lo sostenga por prlongados períodos. Cuando se analiza en retrospectiva el crecimiento de *B. thuringiensis* en suelo no estéril, resalta la inhabilidad de algunas cepas de este organismo para desarrollarse extensamente bajo muchas condiciones naturales del suelo, lo que enfatiza por un lado, la necesidad de explorar la posibilidad de encontrar aquellas cepas que puedan contrarrestar los ataques de las poblacionaes nativas, cuyos nocivos efectos pueden causar a los inoculantes introducidos a los ecosistemas, fuertes perturbaciones en su establecimiento dentro de la comunidad. Por otra parte, revela la falta de atención a este respecto en los plaguicidas usados comercialmente, dadas las magníficas propiedades que tendrían tales productos al autoperepetuarse una vez aplicados en determinados sitios.

### **Antagonismo contra *B. thuringiensis* por micoroganismos de suelo**

Las fuentes de variación y significancia en lo que respecta a las poblaciones microbianas antagonistas a *B. thuringiensis* en suelos cultivados se presentan en la Tabla 19, 20 y 21. Se puede observar que no existió diferencia en la sensibilidad de las cepas de *B. thuringiensis* al ser antagonizadas, pero pueden notarse diferencias altamente significativas en la cantidad y proporción de los microorganismos antagonistas en relación directa al cultivo incorporado al suelo. Con la misma significancia, existieron diferencias entre la cantidad y proporción de los diferentes tipos de antagonistas evaluados.

Tabla 19  
Análisis de varianza de los factores involucrados en el antagonismo a *B. thuringiensis*  
por las poblaciones microbianas de suelos cultivados.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados		Grados de Libertad	Valor de "F"	
	Cantidad	Porcentaje		Cantidad	Porcentaje
Total	15.7392	1496.7560	107	1.88	4.88
Cepas (C)	0.2223	15.3076	2	1.42	2.67
Suelos (S)	4.6985	760.7068	5	12.06**	53.08**
Poblaciones (P)	2.1959	295.6829	1	28.17**	103.16**
C x S	0.9785	71.6984	10	1.25	2.50*
C x P	0.1667	3.7915	2	1.07	0.66
S x P	0.7840	43.6679	5	2.01	3.04*
C x S x P	1.0541	100.5925	10	1.35	3.50**
Repetición	0.1830	4.6860	2	1.17	0.81
Error	5.4557	200.6226	70		

Los valores son significativamente diferentes a  $p = 0.05$  y  $0.01$  cuando se indican con uno y dos asteriscos respectivamente.

HUGO ALBERTO LUNA OLVERA

TESIS DOCTORAL

Tabla 20  
Análisis de varianza de la cantidad de actinomicetos y bacterias antagonistas a las cepas de *B. thuringiensis*

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados		Grados de Libertad	Valor de "F"	
	Bacterias	Actinomicetos		Bacterias	Actinomicetos
Cepas (C)	0.214	0.051	2	3.15	1.87
Suelos (S)	2.564	4.193	5	15.13 **	61.84 **
C x S	1.704	0.208	10	5.02 **	1.53
Error	1.220	0.488	36		
Total	5.701	4.941			

Los valores son significativamente diferentes a  $p = 0.05$  y  $0.01$  cuando se indican con uno y dos asteriscos respectivamente.

Tabla 21  
Análisis de varianza del porcentaje de bacterias y actinomicetos antagonistas a las cepas de *Bacillus thuringiensis*

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados		Grados de Libertad	Valor de "F"	
	Bacterias	Actinomicetos		Bacterias	Actinomicetos
Cepas (C)	3.687	8.739	2	2.06	1.96
Suelos (S)	395.838	387.890	5	23.93 **	34.75 **
C x S	141.468	28.261	10	4.27 **	1.26
Error	119.092	80.371	36		
Total	670.085	505.263	53		

Los valores son significativamente diferentes a  $p = 0.05$  y  $0.01$  cuando se indican con uno y dos asteriscos respectivamente.

La cantidad de poblaciones microbianas antagonistas a *B. thuringiensis* en suelos cultivados se muestran en la Fig. 11. Se puede apreciar que suelos de parcelas sujetas a diversos cultivos y prácticas culturales exhibieron niveles variables de poblaciones antagonistas. Suelos cultivados con algodón y frijol hospedaron la mayor cantidad de actinomicetos antagonistas, mientras que las menores cantidades correspondieron a los cultivos de hortalizas, trigo, cacahuate y zacate. La Fig. 12 muestra los porcentajes de poblaciones microbianas antagonistas a cepas de *B. thuringiensis* en relación a la población total. El suelo rizosférico de parcelas de campo, cultivadas con frijol bajo el sistema de rotación exhibió el mayor nivel de actinomicetos antagonistas, mientras que el más bajo porcentaje correspondió a cultivos de cacahuate y zacate. Los cultivos de trigo y frijol elevaron notablemente la población bacteriana antagonista, una situación contrastante se manifestó para suelos cultivados continuamente con zacate. Los suelos agrícolas estudiados difirieron en referencia a sus poblaciones totales de actinomicetos y bacterias (Tabla 22). La población total de actinomicetos fluctuó de  $8.9 \times 10^5$  a  $11.23 \times 10^6$  cel/g de suelo y la población bacteriana de  $8.89$  a  $16.0 \times 10^6$  cel/g de suelo. Se encontró que la técnica de triple capa de agar, no fue factible de ser utilizada como medio para el conteo de hongos antagonistas a *B. thuringiensis*. Una de las principales razones fue la naturaleza extensiva de crecimiento en muchos hongos de suelo que al colonizar rápidamente la placa no permitían la formación de una capa superior uniforme de *B. thuringiensis* y por consiguiente ésto impidió que se efectuara el conteo de aquellas colonias antagonistas. Sin embargo, se pudo observar por este método, que los suelos estudiados efectivamente contenían organismos de este tipo capaces de antagonizar a *B. thuringiensis*. El grado de inhibición del crecimiento de *B. thuringiensis* fue demostrado mediante la técnica del "disco de agar" por diversos aislados de suelo; EH-1, EH-2, EH-3 (actinomicetos) y EH-4 (bacteria), antagonistas a las cepas GM-1, GM-4 y HD-1. El tamaño de los halos de inhibición exhibidos por los 4 antagonistas, difirió estadísticamente, lo cual indica que algunos microorganismos de suelo presentan mayor capacidad antagónica en comparación a otros. Mientras que no hubo diferencias entre las cepas de *B. thuringiensis*, en cuanto a su sensibilidad para ser antagonizadas.

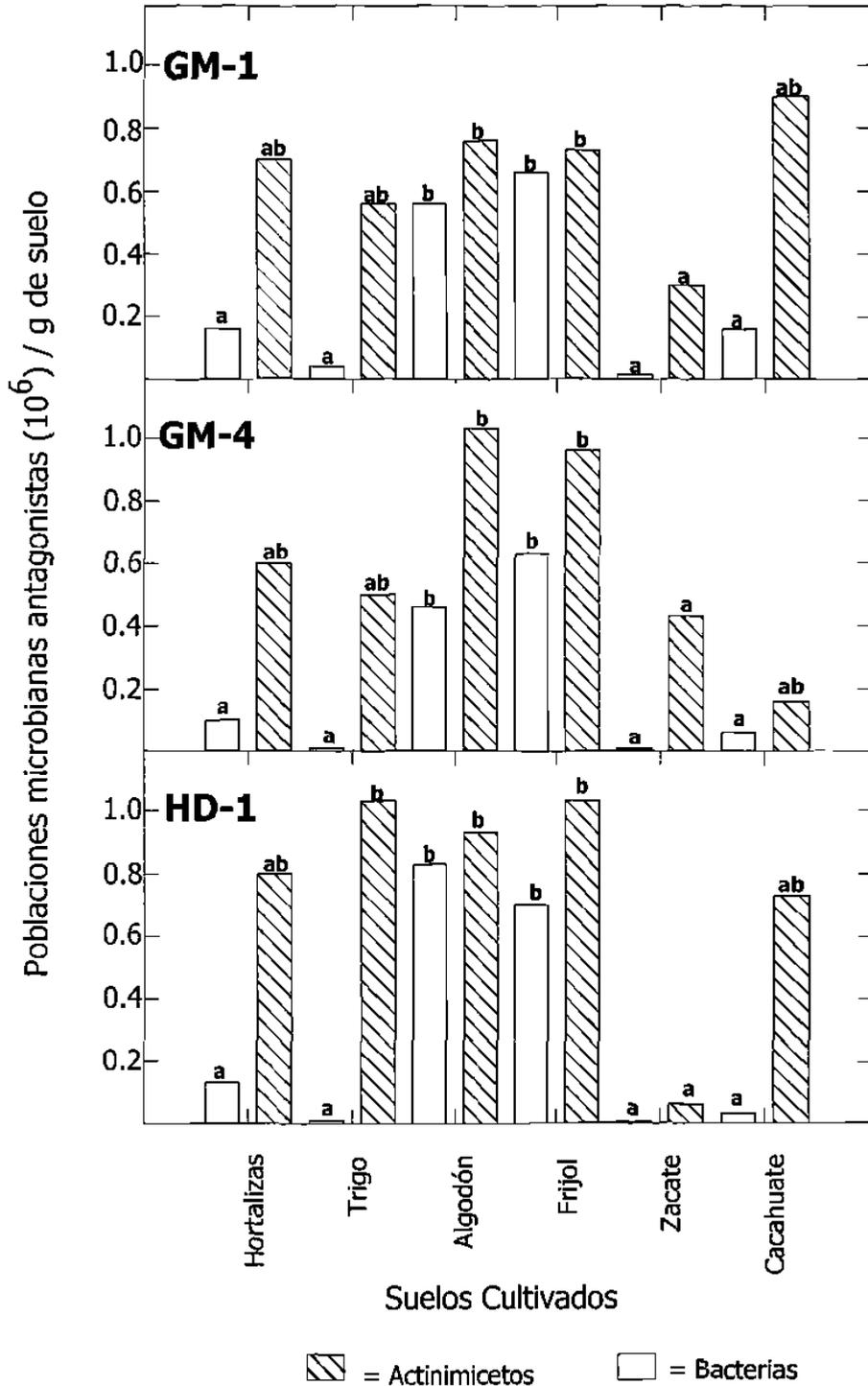


Fig. 11. Poblaciones microbianas antagonistas a cepas de *B. thuringiensis* en suelos cultivados. Las comparaciones se establecen entre columnas con igual nomenclatura para una misma cepa. Letras distintas indican diferencias significativas a un nivel de probabilidad de 0.05 (Tukey).

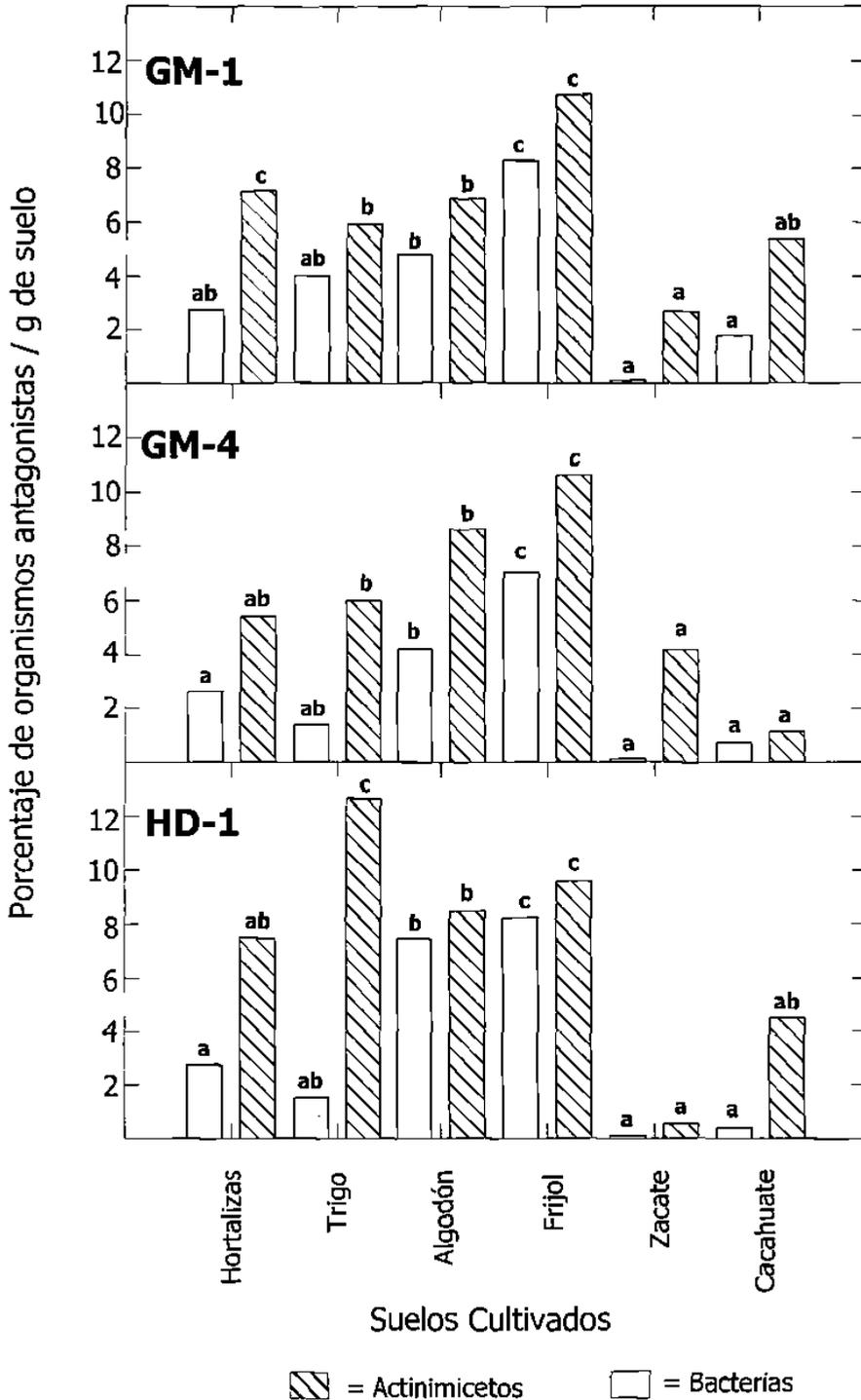


Fig. 12. Porcentaje de organismos antagonistas a cepas de *B. thuringiensis* en suelos cultivados. Las comparaciones se establecen entre columnas con igual nomenclatura para una misma cepa. Letras distintas indican diferencias significativas a un nivel de probabilidad de 0.05 (Tukey).

Tabla 22  
Cuentas viables de las poblaciones microbianas en los suelos cultivados.

Cultivo	Número ( $10^6$ )	
	Bacterias	Actinomicetos
Algodón	11.50 a	11.23 d
Cacahuatate	16.00 b	8.37 c
Frijol	8.89 a	8.54 c
Hortalizas	10.94 a	4.80 b
Trigo	9.14 a	0.95 a
Zacate	11.14 a	0.89 a

Valores seguidos por letras distintas dentro de la misma columna son significativamente diferentes ( $p = 0.05$ ) por la prueba de DMS.

La cinética de interacción entre *B. thuringiensis* HD-1 y dos organismos seleccionados, se presenta en la Fig. 13 y Tabla 23. Se puede apreciar claramente que en ausencia de organismos antagonistas, la cepa HD-1 se multiplicó rápidamente y alcanzó su máximo número (alrededor de  $10^8$  cel/ml, ésto es un incremento de casi 4 logaritmos) 24 h después de su inoculación, en completo contraste a los tratamientos que incluían organismos antagónicos, donde en ambos casos la densidad de *B. thuringiensis* exhibió una evidente disminución, hasta de 2 logaritmos en comparación al número inicial. Un efecto amensalista se confirmó mediante la formación de halos de inhibición de crecimiento de *B. thuringiensis* al utilizar discos de papel filtro impregnados con sobrenadantes filtrados (millipore 0.22  $\mu$ m) de los aislados de suelo, lo cual involucra que algún factor biológico activo es producido y liberado por estos organismos antagonistas al medio donde se desarrollan. Las cepas GM-1, GM-4 y HD-1 de *B. thuringiensis*, fueron susceptibles a los factores biológicos producidos por las cepas EH-3 y EH-4.

El comportamiento general de los tratamientos antagonistas (Tabla 24 y 25) en suelo estéril sugiere que *B. thuringiensis* sufrió una caída poblacional bajo estas condiciones. Cuando estuvieron presentes todos los componentes bióticos de suelo, *B. thuringiensis* no experimentó una disminución tan marcada en sus niveles de

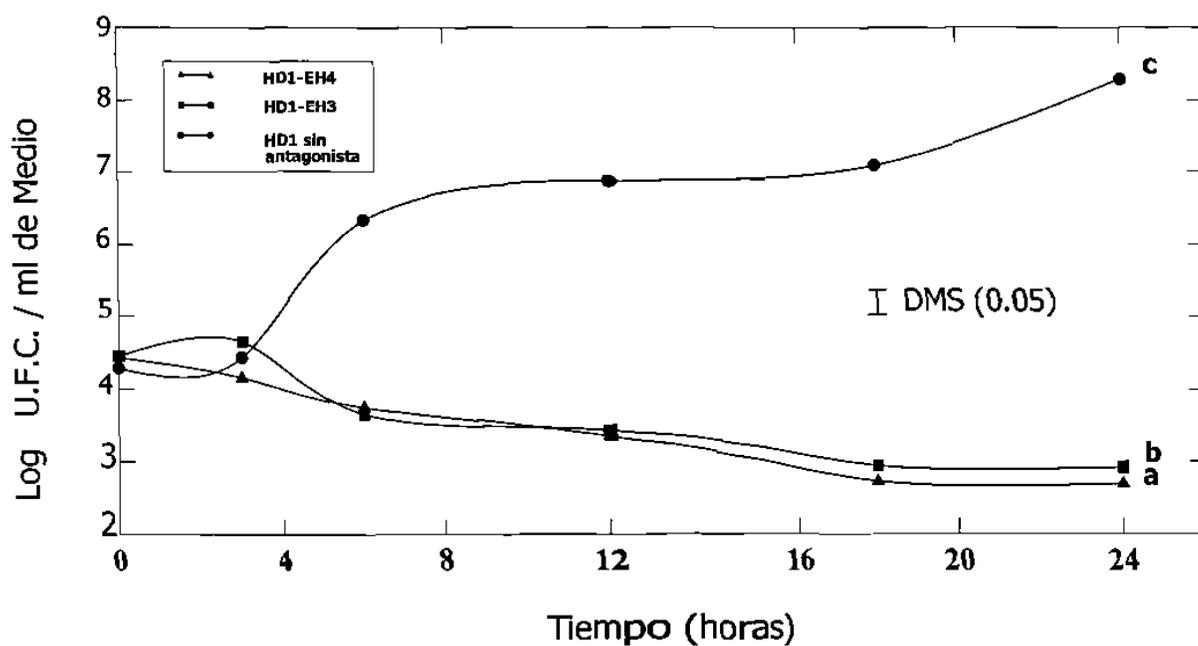


Fig. 13. Interacción de *B. thuringiensis* HD-1 con microorganismos antagonistas en medio de cultivo. DMS: Diferencia Mínima Significativa. Las letras minúsculas representan grupos estadísticos.

Tabla 23

Análisis de varianza de la interacción de *Bacillus thuringiensis* y microorganismos antagonistas en medio de cultivo.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Valor de "F"
Tratamientos (T)	86.7265	2	6949.30 **
Tiempo (Ti)	0.8347	5	26.75 **
T x Ti	48.6783	10	780.10 **
Repetición	0.0211	2	1.69 NS
Error	0.2121	34	
Total	136.4729	53	

Los valores son significativamente diferentes a  $p = 0.05$  y  $0.01$  cuando se indican con uno y dos asteriscos respectivamente.

Tabla 24

Análisis de varianza sobre la intracción de *Bacillus thuringiensis* y microorganismos antagonistas en suelo.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Valor de "F"
Total	3.8818	143	
Suelos (S)	0.6411	1	258.47 **
Tratamientos (T)	0.1125	2	22.68 **
Tiempo (Ti)	1.6953	7	97.64 **
S x T	0.0571	2	11.51 **
S x Ti	0.3608	7	20.78 **
T x Ti	0.2373	14	6.83 **
S x T x Ti	0.5410	14	15.58 **
Repetición	0.0034	2	0.68 NS
Error	0.2331	94	

Los valores son significativamente diferentes a  $p = 0.05$  y  $0.01$  cuando se indican con uno y dos asteriscos respectivamente.

Tabla 25  
Análisis de varianza sobre el comportamiento de *Bacillus thuringiensis* frente a organismos antagonistas en suelo estéril y no estéril.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados		Grados de Libertad		Valor de "F"	
	Estéril	No Estéril	Estéril y No Estéril	Estéril	No Estéril	
Tratamientos (T)	0.1641	0.0056	2	30.00 **	1.22 NS	
Tiempo (Ti)	1.3537	0.7023	7	70.68 **	43.61 **	
T x Ti	0.5705	0.2076	14	14.89 **	6.44 **	
Repetición	0.0046	0.0020	2			
Error	0.1258	0.1058	46			
Total	2.2189	1.0235	71			

Los valores son significativamente diferentes a  $p = 0.05$  y  $0.01$  cuando se indican con uno y dos asteriscos respectivamente.

población, lo cual implica que la comunidad microbiana del suelo impidió de alguna forma se manifestaran los efectos nocivos de las relaciones antagónicas con las cepas EH-3 y EH-4. En suelo estéril puede observarse que solo existieron diferencias significativas en los niveles de población de *B. thuringiensis* cuando este creció en ausencia de antagonistas en contraste con los datos obtenidos para el mismo tratamiento en suelo no estéril, donde no se manifestaron variaciones significativas entre tratamientos. Los resultados de los estudios antagonistas por miembros de la comunidad del suelo hacia *B. thuringiensis*, sugieren que tal mecanismo ecológico se manifiesta en función de diversos factores, entre estos el tipo de cultivo al que es sometido el suelo. Una marcada tendencia antagónica fue exhibida para aquellos suelos tratados bajo el sistema de rotación y efectos contrarios para suelos cultivados con el sistema continuo. Explicaciones a este fenómeno son atribuidas a que tales prácticas pueden modificar niveles de nutrientes, sustratos orgánicos, pH, aireación, humedad y temperatura, que influyen el crecimiento de microorganismos (Martyniuk y Wagner, 1978).

Dentro de las comunidades microbianas estudiadas en el suelo, las bacterias mostraron ser el grupo predominante antagonista a las cepas *B. thuringiensis* bajo las condiciones de prueba. Estudios de antagonismo enfocados sobre *R. japonicum* (Pugashetti *et al.*, 1982), han indicado que en rizósfera de frijol los actinomicetos antagonistas incluyeron a más del 70 % de los actinomicetos totales, mientras que de bacterias consistieron en menos del 10 % del total. Mientras que la proporción no varió significativamente con el cultivo o prácticas de manejo de suelos. La técnica disco de agar, ha sido empleada por varios investigadores (Kulinska y Drozdowicz, 1983; Patel, 1974; Visser *et al.*, 1986) para demostrar grados de antagonismo hacia microorganismos de interés. La actividad inhibitoria de actinomicetos y bacterias nativas de suelo contra cepas de *B. thuringiensis* se midió al utilizar esta técnica. Los actinomicetos evaluados en este estudio demostraron la mayor actividad antagonista en contraste a las bacterias seleccionadas. La disminución poblacional de *B. thuringiensis* por microorganismos antagonistas nativos de suelo, inoculados en medio de cultivo, se atribuyó a la producción de un factor biológico activo que fue

producido y liberado al medio, cuya naturaleza química se desconoce. Como este ensayo se efectuó en un medio de cultivo, existió un contacto íntimo entre los microorganismos, sin barreras físicas que pudieran intervenir en tal evento biológico. La presencia de los antagonistas empleados, EH-3 y EH-4, disminuyó drásticamente la población de *B. thuringiensis* HD-1, en un período de 24 h, mientras que en ausencia de ellos, la cepa HD-1 se desarrolló hasta alcanzar niveles máximos de  $10^8$  cel/ml de medio. Aunque no se han realizado estudios sobre efectos amensalistas a *B. thuringiensis*, los resultados obtenidos apoyan que este bacilo es susceptible a factores tóxicos liberados al medio de cultivo, de tal forma, que el sobrenadante filtrado de estos cultivos, por sí mismos ejercen efectos inhibitorios *in vitro*. Esto posiblemente proporcione una causa biológica que limita el potencial de acción de esta bacteria en la naturaleza.

Evidencias sobre efectos antagónicos hacia *B. thuringiensis* HD-1 se obtuvieron mediante ensayos de interacción en suelo. La comunidad microbiana residente proporcionó un condición favorable para que la cepa HD-1 mantuviera niveles poblacionales similares tanto en ausencia como en presencia de antagonistas. Sin embargo, estas tendencias variaron entre condiciones estériles y no estériles. El marcado contraste entre la capacidad de las cepas EH-3 y EH-4 para disminuir efectivamente el número de propágulos de *B. thuringiensis* en medio de cultivo y ejercer una influencia similar en suelo, sugiere que los constituyentes del suelo pueden mantener algún efecto protector en el organismo blanco. En este mismo respecto, Habte y Barrion (1984) han ilustrado la influencia de las arcillas minerales en la reducida actividad inhibitoria de un hongo productor de toxinas, sobre una cepa de *Rhizobium*. Reportes recientes enfatizan la posibilidad de aplicar *B. thuringiensis* al suelo para controlar enfermedades en plantas de origen parasitológico (Bone *et al.*, 1986; Bottjer y Bone, 1987), puesto que se ha encontrado que algunas cepas pueden tener actividad nematocida, lo cual podría permitir el desarrollo de un control biológico integrado para insectos y helmintos. No obstante, el potencial antagonista de la comunidad microbiana que limita su crecimiento en tal ambiente, deberá ser considerado.

## Producción de bacteriocinas por *B. thuringiensis*

De las 22 cepas de *B. thuringiensis* utilizadas, únicamente 3 produjeron bacteriocina con actividad antagonista a *Bacillus cereus*, y en este caso correspondió a las cepas GM-5 y GM-6 la mayor capacidad inhibitoria en contraste a la cepa T-11001 que se ubicó en la escala arbitraria igual a 1, no así las primeras que se colocaron en la escala 3. En el caso de *Micrococcus luteus*, se observó una mayor sensibilidad a las bacteriocinas de *B. thuringiensis*, ya que se detectaron 5 casos de actividad antagonista. Tales cepas fueron GM-1, GM-10, GM-14, GM-16 y T-01001, que en forma general se ubicaron en la escala 1 excepto GM-16 que alcanzó el nivel 2. Por su parte, *Corynebacterium diphtheriae* resultó sensible a 7 cepas de *B. thuringiensis* vía producción de bacteriocinas. Esta actividad fue detectada en GM-2, GM-4, GM-10, GM-11, GM-13, GM-16 y T-11001. De las anteriores, 2 cepas se ubicaron en el nivel 3, 1 en el nivel 2 y 4 en el nivel 1 de actividad antagonista. La cepa GM-10, que en *M. luteus* había presentado un nivel de 1 en *C. diphtheriae* lo incrementó considerablemente a 3, no así la GM-16 que en este último caso presentó un nivel de 1 en contraste al observado en *B. cereus* con un nivel de 3. Cepas de *B. thuringiensis* que en casos anteriores no habían presentado actividad antagonista a través de bacteriocinas, cuando interactuaron con *Staphylococcus aureus* mostraron tal actividad. Esto se refiere a GM-3, GM-7, GM-12, GM-15, que no presentaron un nivel mayor de 2. Otras cepas que también inhibieron el crecimiento de este organismo de prueba fueron GM-10, GM-11, GM-13, GM-14 y T-11001 que en este último caso al igual que GM-10 destacaron por su mayor actividad.

Una impresionante capacidad para producir bacteriocinas antagonistas fue mostrada por *B. thuringiensis* cuando se utilizó como microorganismo indicador la cepa de *Bacillus subtilis*. A este respecto, la mayor cantidad de cepas antagonistas fue detectada en comparación a cualquier otro microorganismo indicador, ya que 12 de las 22 cepas de *B. thuringiensis* fueron incluidas en alguno de los niveles de producción. En el nivel mayor se ubicaron las cepas GM-3, GM-10, GM-16, GM-18

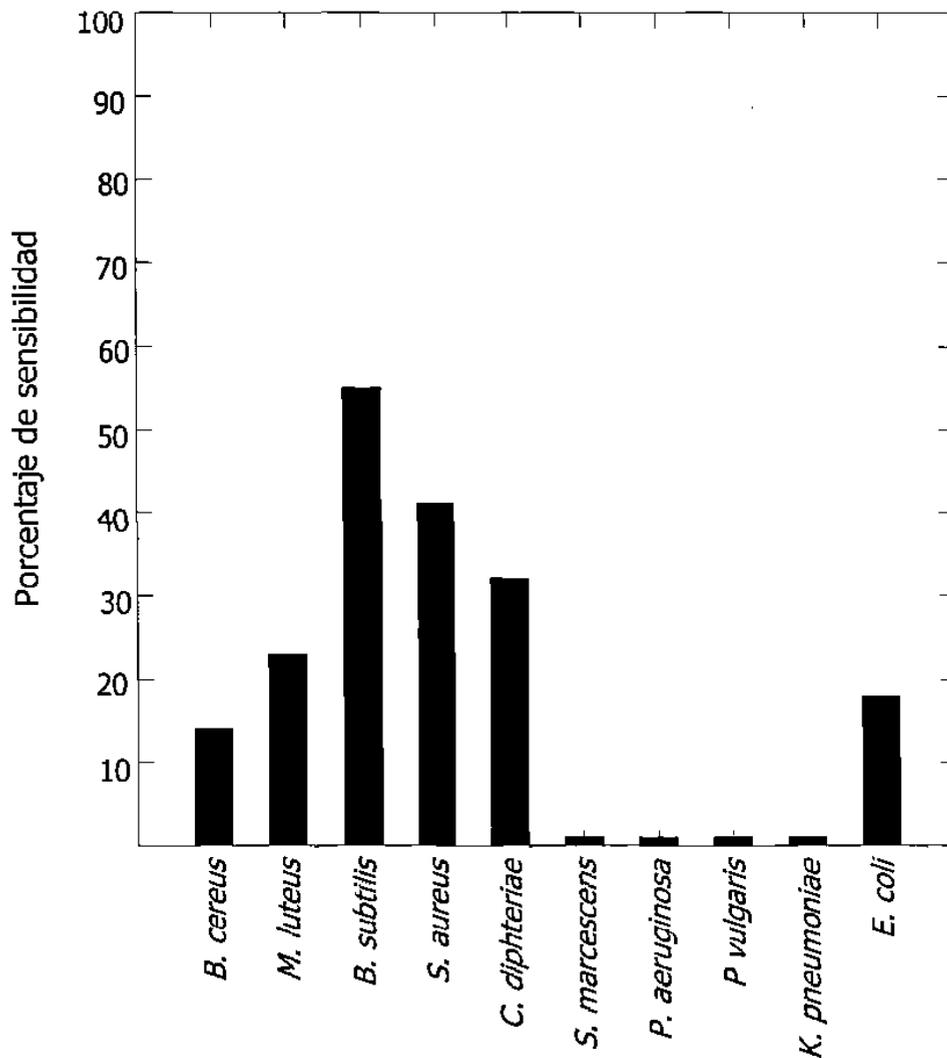


Fig. 14. Sensibilidad de los organismos utilizados como indicadores, a las bacteriocinas producidas por las 22 cepas de *B. thuringiensis* usadas en este estudio.

y GM-20. En el nivel intermedio (nivel 2) se incluyó GM-8, GM-15 y T-01001, mientras que en el nivel más bajo (nivel 1) se colocó GM-4, GM-6, GM-11 y GM-14. Como consecuencia de la elevada sensibilidad de *B. subtilis* a bacteriocinas de *B. thuringiensis*, cepas que no habían presentado actividad antagonista en otros organismos de prueba para este caso fueron detectados, a saber, GM-6, GM-8, GM-18 y GM-20.

Es de resaltar la baja sensibilidad de bacterias gramnegativas a bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis*, ya que de las 5 especies probadas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris*), solo la primera fue inhibida y esto en una frecuencia comparativamente baja en relación a las grampositivas. Sin embargo, para *E. coli* ocurrieron dos ejemplos importantes de inhibición en interacción con GM-10 y GM-14 (nivel 3). GM-1 y GM-4 presentaron niveles inferiores. Fue patente una destacada actividad inhibitoria sobre cepas grampositivas en *B. thuringiensis* GM-10 y GM-16, que en forma general afectaron al 80% de las cepas con que interactuaron. Las cepas GM-11, GM-14 y T-11001 observaron un 60% de actividad bacteriocina, mientras que GM-3, GM-4, GM-13, GM-15 y T-01001 se ubicaron en un 40%. A excepción de GM-9, GM-17 y GM-19 en las que no se detectó actividad inhibitoria sobre grampositivas, las cepas restantes tuvieron en promedio una frecuencia de 20% para producir bacteriocinas.

La resistencia de bacterias gramnegativas a bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis*, resulta muy notable cuando se observa que solo 4 cepas del organismo productor tuvieron capacidad antagonista. A este respecto GM-1 y GM-4 mostraron tal actividad aunque solo en una frecuencia de 20%, de la misma manera que se observó para GM-10 y GM-14, aún a pesar de que estas últimas habían mostrado una alta actividad sobre grampositivas en comparación a las primeras. Debido a esto, al hacer un promedio general de la capacidad inhibitoria de *B. thuringiensis* sobre bacterias grampositivas y gramnegativas se hace manifiesta una clara tendencia a disminuir. Sin excepción, todas las cepas indicadoras mostraron mayor o menor susceptibilidad, de tal forma que *B. subtilis* resultó afectada por el 55% de cepas

productoras de bacteriocinas seguida de *S. aureus* y *C. diphtheriae* con 41 y 32% respectivamente. Los menores niveles de susceptibilidad fueron observados en *M. luteus* y *B. cereus*. En completo contraste a lo anterior, las cepas gramnegativas en forma general fueron resistentes a las bacteriocinas producidas excepto *E. coli*, que fue afectada en un 18% por las cepas productoras. Para la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* pareció existir una relación entre la cantidad de bacteriocina producida y la inhibición a microorganismos interaccionantes. Las cepas GM-10 y GM-16 que fueron consistentes con la actividad antagonista sobre todo en bacterias grampositivas, también mostraron la mayor cantidad de bacteriocina producida, ubicándose en el nivel 3 de la escala arbitraria. La misma tendencia fue observada para cepas productoras que mostraron una baja frecuencia de actividad inhibitoria al ubicarse también en los menores niveles de producción. Esto mismo fue confirmado al utilizar como bacterias indicadoras a gramnegativas (Fig. 13), e incluso se mantuvo la consistencia sobre el efecto al analizar el total de cepas probadas (Fig. 14).

Nuestros resultados mostraron buen comportamiento en cuanto a producción de bacteriocinas se refiere, presentándose el mejor comportamiento en las cepas GM-10 y GM-16, las cuales produjeron bacteriocinas en mayor cantidad, comparada a la producida por las cepas T-01001 y T11001, que en previos trabajos reportados han mostrado mayor capacidad bacteriocina (de Barjac y Lajudie, 1974). Las cepas de *Bacillus thuringiensis*, mostraron la mayor producción de bacteriocinas contra *Bacillus subtilis*, este comportamiento podría explicarse en el hecho de que entre más estrecha sea la relación filogenética o genética entre las cepas (productora e indicadora), el efecto inhibitorio de la bacteriocina es mayor (Fikes et al., 1983). Becker et al., (1986) desarrollaron un trabajo demostrando lo anterior, en el cual utilizaron diferentes especies del género *Thermus*, como *aquaticus* ATCC 25104, *aquaticus* 3904, *caldophilus* (de Japón), *flavus* ATCC 33923, *rubens* ATCC 31556, *ruber* (de Rusia), *thermophilus* ATCC 27634, *Bacillus stearothermophilus*, *Escherichia coli* Carolina 15-5065 y *Staphylococcus aureus* ATCC 12600. Cada especie de *Thermus* fue probada para demostrar actividad antagonista entre especies, encontrándose que solo *T. rubens* exhibió actividad antagonista contra las demás

especies, pero ninguna actividad antagónica contra *B. stearothermophilus*, *E. coli* y *S. aureus*.

Un trabajo comparativo a éste fue el desarrollado por Favret y Yousten (1989) a la cepa HD-2 de *B. thuringiensis*, la cual fue seleccionada en base a un estudio de actividad bacteriocina interespecífica contra el 86% de 56 cepas examinadas. Esta cepa mostró actividad contra muchas otras especies grampositivas, pero tal caso no sucedió con especies gramnegativas, por consiguiente, las cepas sensibles a HD-2 fueron: *Bacillus cereus*, *B. cereus* ATCC 569 *B. cereus* ATCC 14579, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. sphaericus* 2362, *Corynebacterium xerosis* ATCC 373, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 y *S. epidermidis* ATCC 14990. Las cepas no sensibles fueron: *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 9955, *Aeromonas hydrophila* ATCC 9071, *Alcaligenes viscolactis*, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13084, *Erwinia carotovora* ATCC 495, *Escherichia coli* B, *E. coli* ATCC 9637, *E. coli* ATCC 12407, *Proteus mirabilis* ATCC 14153, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692, *P. fluorescens* ATCC 8100, *Bacillus laterosporus* NRS 590, *B. licheniformis*, *B. macerans* ATCC e8244, *Lactobacillus casei* ATCC 7469, *Mycobacterium amegmatis* ATCC 14468, *Streptococcus durans*, *S. faecalis* ATCC 19433 y *S. lactis* ATCC 11454. Cabe mencionar el hecho de que la técnica y condiciones de incubación presentadas en este trabajo fueron las mismas a las empleadas en nuestra investigación, aunque es importante recalcar que en el trabajo anterior, la cepa productora de bacteriocinas de *B. thuringiensis* no mostró inhibición contra gramnegativas, ello no prueba que las cepas indicadoras grampositivas sean resistentes a las bacteriocinas producidas por otros serotipos de *B. thuringiensis*, ya que solo se empleó una cepa de *B. thuringiensis* (HD-2), en contraste a nuestro trabajo donde cepas indicadoras gramnegativas fueron inhibidas por cuatro cepas de *B. thuringiensis*. Por lo tanto, el hecho de que GM-9, GM-17 y GM-19 no inhibieran cepas indicadoras no necesariamente significa incapacidad para la producción de bacteriocinas, sino que las cepas utilizadas como indicadoras no fueron susceptibles. Al pensar en un bioinsecticida, es importante tomar en cuenta las cepas de mayor toxicidad, de ahí la importancia en la producción de bacteriocinas por parte de las cepas de *B.*

*thuringiensis*, ya que la bacteriocina le proporciona mayor toxicidad a la bacteria y por lo tanto mayor eficiencia en el control de insectos, al ser utilizada en el control de larvas de lepidópteros (Pendleton, 1969), además de que *B. thuringiensis* tiene una importante repercusión en el medio ambiente, al actuar como regulador de poblaciones microbianas, ya que el agente mediador es a menudo una bacteriocina (Becker et al., 1986), además de ser utilizada como un mecanismo de defensa, competencia o sobrevivencia por muchas bacterias. La posibilidad de sobrevivencia de *B. thuringiensis* en suelo, hojas, etc. aumenta debido a su habilidad para producir bacteriocinas.

### **Supresión de *F. moniliforme* por *B. thuringiensis***

Previo a estos ensayos, se realizó la selección de la variedad de maíz a utilizar en los mismos. A este respecto, como ya se ha descrito, fueron usados diversos materiales proporcionados por Facultad de Agronomía de la UANL, donde básicamente se consideró su sensibilidad a la infección por 3 cepas de este hongo, (Mex-II-8, Mex-II-19 y Mex-II-34), las cuales también fueron seleccionadas a partir de previos experimentos (Tabla 26). Un total de 25 variedades que incluían tanto criollos como híbridos, fueron sometidas a esta prueba. Los resultados indicaron que solo 10 de las anteriores fueron infectados por alguna de las tres cepas fúngicas, pero especialmente la Blanco Alemán, NVL-52 y Llera III, fueron susceptibles por al menos a 2 de estas, a una concentración estándar de inóculo de  $10^8$  células/gr, a saber, Mex-II-19 y Mex-II-34, las cuales a su vez también infectaron a otras variedades, destacando sobre todo la última, por su capacidad para penetrar el tejido de 8 de tales variedades probadas, seguida de la Mex-II-19 con 5 casos de infección, en contraste con la Mex-II-8 que solo pudo infectar el maíz de tipo San Nicolás. Estos datos fueron utilizados al seleccionar los materiales para subsecuentes experimentos, de esta forma tanto la variedad Blanco Alemán, como la cepa Mex-II-34 se usaron en ensayos de supresión para *F. moniliforme* y en la estandarización de inóculos infectivos a tales plántas. En el primer caso, nuevamente se usaron las cepas de GM-1, GM-4 y HD-1 en adición a un control sin algún agente y como índice de protección

Tabla 26  
 Variedades de maíz evaluadas para selección y uso en experimentos de control biológico de *F. moniliforme* con cepas de *B. thuringiensis*

Variedad	Infección por <i>F. moniliforme</i> *		
	Mex-II-8	Mex-II-19	Mex-II-34
Liebre	-	-	-
Juanito	-	-	+
Ratón I	-	-	-
Ranchero	-	+	-
San Nicolás	+	-	+
Blanco Alemán	-	+	+
Blanco Purísima	-	-	-
Blanco Hualahuises	-	-	+
V-402	-	-	-
VS-409	-	-	-
NLV-52	-	+	+
NLV-53	-	-	-
Llera III	-	+	+
B-844	-	-	-
H-430	-	-	-
H-432	-	-	-
AP-728W	-	-	-
Oro-1013W	-	-	-
Morgan-369	-	-	+
Pioneer-3292	-	-	-
Pioneer-3428	-	-	-
Warner-2190	-	+	-
Warner-51WW	-	-	-
Warner-3255	-	-	+
Warner-3220WA	-	-	-

\* = Ensayo del mesocotilo de Burgess y Lidell.

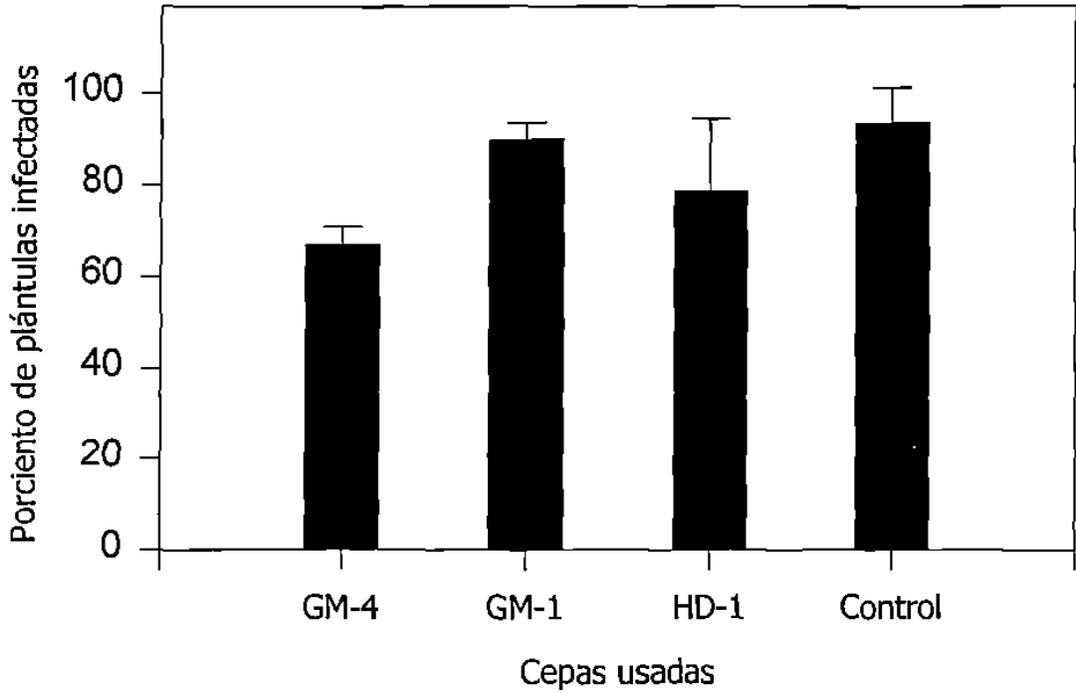


Fig. 15. Supresión de la infección fúngica en plántulas de maíz Blanco por cepas de *B. thuringiensis*.

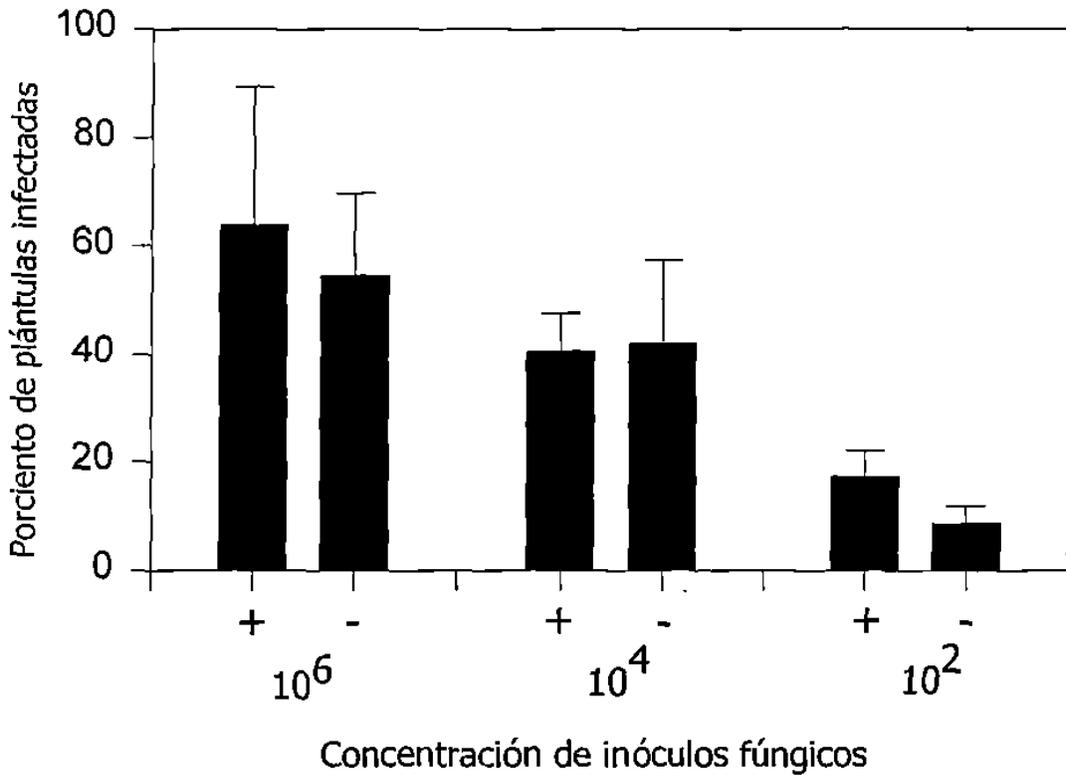


Fig. 16. Efecto de la concentración de los inóculos fúngicos en la supresión de la infección de plántulas de maíz Blanco Alemán por *B. thuringiensis* GM-4. (+ = mas inoculante - = menos inoculante).

del cultivo por tales agentes, se midió el porcentaje de plántulas infectadas. Los datos revelaron que en primera instancia, la cepa GM-4 fue el tratamiento que impidió una mas extensa infección entre las unidades de estudio en comparación a los otros tratamientos. En este caso, al final del experimento se observó que solo el 64 % había adquirido el hongo en sus tejidos, mientras que el resto había sido muy probablemente protegido por esta cepa. Por su parte, la cepa HD-1 alcanzó a mantener al margen de la infección a un 22 % de la población vegetal, pero incluso GM-1, pudo fomentar ligeramente este efecto, logrando un 13 % del total protegido. Aunque el control utilizado para este propósito, carecía de alguno de estos inoculantes, se pudo observar que no existió una infección de todas las plantas en este tratamiento, lo cual pudiere estar mas bien relacionado con la falla del inóculo para alcanzar su objetivo, que al mismo efecto antifúngico del mismo (Fig. 15). Cuando se realizaron variaciones en las cantidades de propágulos infectivos de la misma cepa, hacia la variedad de maíz usada en experimentos de tubos con plántulas, se encontró que la cepa GM-4, también empleada aquí, favoreció una menor infección del hongo e comparación a tratamientos donde cualquier agente estuvo ausente. En diversos estudios ya se han evaluado la prevalencia de una enfermedad y su severidad, así como los incrementos en el rendimiento, como una medida de efectividad de los tratamientos biocontrol. Otros intentos han incluido el determinar si el patógeno puede ser obtenido de la planta donde se supone estaría el agente protector. En esta investigación, *B. thuringiensis* fue evaluado en su capacidad para suprimir la infección y mediante la reducción en la infección del mesocotilo. Sin embargo, de acuerdo a Kuykendall y Windels (1981), los sitios de infección para *F. moniliforme*, como semillas, raíces y heridas, son factibles de penetrar solo por muy cortos períodos. Consecuentemente, los agentes de biocontrol no tienen necesariamente que eliminar a su contrincante, sino solo retardar la infección para llegar a ser efectivos. La densidad del patógeno contribuye grandemente a su potencial para infectar las plantas y para la severidad de la infección. La densidad de inóculo de un patógeno fúngico, necesaria para causar tal enfermedad, puede variar de especie a especie de patógeno y también depende del tipo de unidad infectiva y de la variedad del hospedero de que se trate. En nuestro

caso se realizó un previa selección a partir de una vasta colección de materiales, a fin de asegurar la infección como medio de visualizar la protección por el agente bajo estudio. Entre las cepas probadas de *B. thuringiensis* la GM-4 resultó mas prometedora respecto a las otras en términos de la factibilidad de utilizarse como inoculante dirigido hacia el suelo, dadas sus capacidades demostradas para mentenerse en el mismo, responder favorablemente a los cambios ambientales, esporular rápidamente o germinar cuando las circunstancias le favorezcan, pero sobre todo, por su capacidad para impedir la infección de *F. moniliforme* sobre la variedad de maíz utilizada. Aunque es posible experimentar sobre diversos rubros que seguramente fomentarían una mayor posibilidad de protección contra el patógeno estudiado, en este estudio ha quedado constancia de la amplia gama de propiedades aún sin explorar en este fascinante organismo.

## CONCLUSIONES

- 1.- Las cepas de *Fusarium moniliforme* con alta capacidad toxigénica, se encontraron distribuidas ampliamente dentro de los 3 distritos agrícolas del estado de Nuevo León.
- 2.- El grado de toxigenicidad entre las cepas aisladas de *F. moniliforme*, fue muy heterogéneo dentro de los distritos agrícolas, ya que los 3 niveles reconocidos de riesgo, estuvieron presentes en la distintas localidades.
- 3.- Existió una fuerte tendencia de las cepas de *B. thuringiensis* para desarrollar interacciones antagónicas hacia cepas toxigenicas de *F. moniliforme*.
- 4.- Las cepas de *B. thuringiensis* introducidas al suelo, demostraron su capacidad para persistir en este ecosistema, independientemente de variables ambientales adversas.
- 5.- La flora autóctona de los suelos de cultivo, afectó los niveles poblacionales de las cepas de *B. thuringiensis* a través de fenómenos amensalistas.
- 6.- Las cepas de *B. thuringiensis* demostraron una amplia capacidad para producir bacteriocinas capaces de inhibir el crecimiento de diversas especies grampositivas.
- 7.- La cepa GM-4 de *B. thuringiensis* fue capaz de suprimir en un grado aceptable, la infección de plantas de maíz Blanco Alemán por una cepa toxigénica de *F. moniliforme*. Tal evento supresivo fue dependiente de las proporciones del agente propuesto de control.
- 8.- El presente estudio ilustra las posibilidades de encontrar entre las cepas *B. thuringiensis*, nuevas propiedades antifúngicas capaces de suprimir añejos problemas fitopatológicos.

**LITERATURA CITADA**

- Abbas A. K., T. Tanaka, S. O. Duke, J. K. Porter, E. M. Wray, L. Hodges, A. E. Sessions, E. Wang, A. H. Merrill & R. T. Riley. 1994. Fumonisin and AAL-toxin induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant. Physiol.* **106**: 1085-1093.
- Abramson D., R. M. Clear & T. W. Nowicki. 1986. *Fusarium* species and trichothecene mycotoxins in suspect samples of 1985 Manitoba wheat. *Can. J. Plant Sci.* **67**: 611-619.
- Ainsworth G. C. 1981. Introduction to the history of plant pathology. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 11-34.
- Akiba Y., Y. Sekijima, K. Aizawa & N. Fujiyoshi. 1977. Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis*. II Dynamics of *Bacillus thuringiensis* in sterilized soil. *Japan J. Appl. Ent. Zool.* **21**: 41-46.
- Akiba Y., Y. Sekijima, K. Aizawa & N. Fujiyoshi. 1977. Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis*. II Dynamics of *Bacillus thuringiensis* in sterilized soil. *Japan J. Appl. Ent. Zool.* **21**: 41-46.
- Akiba Y., Y. Sekijima, K. Aizawa & N. Fujiyoshi. 1979. Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis*. III. Effect of pH on the growth of *Bacillus thuringiensis* in soil extracts. *Japan J. Appl. Ent. Zool.* **23**: 220-223.
- Akiba Y., Y. Sekijima, K. Aizawa & N. Fujiyoshi. 1979. Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis*. III. Effect of pH on the growth of *Bacillus thuringiensis* in soil extracts. *Japan J. Appl. Ent. Zool.* **23**: 220-223.
- Alberts J. F., W. C. A. Gelderblom, R. Vlegaar, W. F. O. Marasas & J. P. Rheeder. 1993. Production of [<sup>14</sup>C] fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme* MRC 826 in corn cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2673-2677.

- AOAC. 1995. AOAC official method 995.15 fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> in corn. Natural Toxins. Chapter 49. pp. 49-50.
- Attafuah A. & J. F. Bradbury. 1989. *Pseudomonas antimicrobica*, a new species strongly antagonistic to plant pathogens. J. Appl. Bacteriol. **67**: 567-573.
- Bacon C. W. & D. M. Hinton. 1996. Fusaric acid and pathogenic interactions of corn and non-corn isolates of *Fusarium moniliforme*, a nonobligate pathogen of corn. En "Fumonisins in Food: Advances in Experimental Medicine and Biology" Eds. L. S. Jackson, J. W. DeVries & L. B. Bullerman. Plenum Press. New York, N.Y. pp. 1-18.
- Bacon C. W. & J. W. Williamson. 1992. Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria whit corn. Mycopathology. **117**: 65-71.
- Baker K. F. 1980. Developments in plant pathology and mycology, 1930-1980. En "Perspectives in World Agriculture" Ed. Commonwealth Agriculture Bureau. England. pp. 207-236.
- Bakker A. W. & B. Schippers. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp - mediated plant growth stimulation. Soil. Biol. Biochem. **19**: 451-457.
- Barry A. L. 1976. The antimicrobial susceptibility test: principles and practices. Lea & Febiger. Philadelphia. pp. 163-179.
- Bayeen R. P. & D. M. Elgersma. 1985. Colonization and histopathology of susceptible and resistant carnations cultivars infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Neth. J. Plant Pathol. **91**: 119-135.
- Becker J. O. & R. J. Cook. 1988. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by fluorescent pseudomonads. Phytopathology. **78**: 778-782.

- Belser L. W. & E. L. Schmidt. 1978. Nitrification in soils. En "Microbiology-1978". American Society for Microbiology. Ed. D. Schelssinger. Washington, D.C. pp. 348-351.
- Bennett G. A., J. L. Richard & S. R. Eckhoff. 1996. Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. En "Fumonisins in Food" Eds. L. S. Jackson, J. W. Devries & L. B. Bullerman. Plenum Press. New York, N.Y. pp. 317-322.
- Bezuidenhout S. C., W. C. A. Gelderblom, C. P. Gorst-Allman, R. M. Horak, W. F. O. Marasas, G. Spiteller & R. Vleggaar. 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. J. Chem. Commun. **1988**:743-745.
- Bone L. W., K. P. Botjer & S. S. Gill. 1986. *Trichostrongylus colubriformis*: Isolation and characterization of ovidal activity from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Exp. Parasitol. **62**: 247-253.
- Boonkerd N. & R. W. Weaver. 1982. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. Appl. Environ. Microbiol. **43**: 585-589.
- Boonkerd N. & R. W. Weaver. 1982. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. Appl. Environ. Microbiol. **43**: 585-589.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 237 pp.
- Botjer K. P. & L. W. Bone. 1987. Changes in morphology of *Trichostrongylus colubriformis* eggs and juvenils caused by *Bacillus thuringiensis*. J. Nematol. **19**: 282-286.
- Broadbent P., K. F. Baker & Y. Waterworth. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal roots pathogens in australian soils. Australian J. Biol. Sci. **24**: 925-944.
- Brock T. D. 1971. Microbial growth rates in nature. Bacteriol. Rev. **38**: 39-58.

- Brock T. D. 1979. Biology of microorganisms. Third ed. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J.
- Brown M. E. 1973. Soil bacteriostasis limitation in growth of soil and rhizosphere bacteria. Can. J. Microbiol. **19**: 195-199.
- Bulla L. A., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shena, A. I. Aronson & P. C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. Crit. Rev. Microbiol. **8**: 197-204.
- Burgess L. W. & C. M. Lidell. 1983. Laboratory manual for *Fusarium* research. University of Sidney. 171 pp.
- Buringh P. 1979. Introduction to the study of soils in tropical and subtropical regions. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Third Ed. Wageningen, The Netherlands. pp. 24-51.
- Burr T. J., M. N. Schroth & T. Suslow. 1978. Increased potato yield by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. Phytopathology. **68**: 1377-1383.
- Buyer J. S & J. Leong. 1986. Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains. J. Biol. Chem. **261**: 791-794.
- Calhoun J. & D. Park. 1964. Fusarium diseases of cereals: infection of wheat plants, with particular reference to the effect of soil moisture and temperature on seedling infection. Trans. Brit. Mycol. Soc. **47**: 559-572.
- Castegnaro M. & C. Wild. 1995. IARC activities in mycotoxin research. Nat. Tox. **3**: 327-331.
- Cawood M. E., W. C. A. Gelderblom, R. Vleggaar, Y. Behrend, P. G. Thiel & W. F. O. Marasas. 1991. Isolation of the fumonisin mycotoxins a quantitative approach. J. Agric. Food. Chem. **39**: 1958-1962.

- CETENAL. 1977. Carta edafológica. Apodáca, N. L. México. pp 5-12.
- Cole M. A. & G. H. Elkan. 1979. Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. **37**: 867-870.
- Cole R. J., J. W. Kirksey, H. G. Cutler, B. L. Doupnik & J. C. Peckham. 1973. Toxin from *Fusarium monilliforme*: effects on plants and animals. Science. **179**: 1324-1326.
- Colvin B. M. & L. R. Harrison. 1992. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. Mycopathologia. **117**: 79-82.
- Cook J. R. & K. F. Baker. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Am. Phytopathol. pp. 17-22.
- Currier T. C. & C. Gawron-Burke. 1989. Commercial development of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide products,. 111-143. En "Biotechnology of plant-microbe interactions" Ed. J. P. Nakas and C. Hagedorn. McGraw-Hill Brook CO., New York.
- Dahiya J. S., D. L. Woods & P. J. Tewari. 1988. Control of *Rhizoctonia solani*, causal agent of brown gridling root rot of rapeseed by *Pseudomonas fluorescens*. Bot. Bull. Acad. Sin. **29**: 135-142.
- Danso S. K. A., M. Habte & M. Alexander. 1973. Estimating the density of individual bacterial populations introduced into natural ecosystems. Can. J. Microbiol. **27**: 865-870.
- Davis R. D. 1975. Bacteriostasis in soils sterilized by gamma irradiation and re-inoculated sterilized soils. Can. J. Microbiol. **21**: 481-484.
- Davis R. M., F. R. Kegel, W. M. Sills & J. J. Farrar. 1989. Fusarium ear rot of corn. Calif. Agric. 43: 4-5.
- De Barjac & Frachon B. 1990. Clasification of *Bacillus thuringiensis* strains according the H serotype. Entomophaga. **35**: 233-240.

- De Barjac H. & J. Lajudie. 1974. Mise en evidence de facteurs antagonistes du type des bacteriocines chez *Bacillus thuringiensis*. Ann. Microbiol. (Paris). **125B**: 529-537.
- De Lucca A. J., J. G. Simonson & A. D. Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. Can. J. Microbiol. **27**: 865-870.
- De Lucca A. J., J. G. Simonson & A. D. Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. Can. J. Microbiol. **27**: 865-870.
- Desjardins A. E. & T. M. Hohn. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. Mol. Plant-Microbe Interact. **10**: 147-152.
- Desjardins A. E., R. D. Plattner & P. E. Nelson. 1994. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast Mexico. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 1695-1697.
- Desjardins A. E., R. D. Plattner, D. D. Shackelford, J. F. Leslie & P. E. Nelson. 1992. Heritability of fumonisin B<sub>1</sub> production in *Gibberella fujikuroi* mating population A. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2799-2805.
- Desjardins A. E., R. D. Plattner, T. C. Nelsen & J. F. Leslie. 1995. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 79-86.
- Dubin H. J. 1984. Reflections on foot rots of wheat in warmer, nontraditional wheat-growing climates. En "Wheats for More Tropical Environments". Proc. Intern. Symp. Ed. R. L. Villarreal 24-28 September 1984. Mexico, D.F. / CIMMYT. pp. 185-192.
- Dulmage H. T. & K. Aizawa. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. En "Microbial and Viral Pesticides". Ed. E. Kurstak. Marcel Dekker. New York. pp. 209-237.

- Dulmage H. T. 1989. Production and use of *Bacillus thuringiensis*. Perspective from 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. **84**: 113-122.
- Dutton M. F. 1996. Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. Pharmacol. **70**: 137-161.
- Fermor T. R. & J. M. Lynch. 1988. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* screening, isolation and characterization of bacteria antagonistic to the pathogen (*Pseudomonas tolaasii*). J. Appl. Bacteriol. **65**: 179-187.
- Fikes J. D., B. L. Crabtree & B. D. Barridge. 1983. Studies on the mode of action of a bacteriocin produced by *Bacillus stearothermophilus*. Can. J. Microbiol. **29**: 1576-158.
- Foley D. C. 1962. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. Phytopatology. **52**: 870-872.
- Futrell M. C. & M. Kilgore. 1969. Poor stands of corn and reduction of root growth caused by *Fusarium moniliforme*. Plant. Dis. Rep. **53**: 213-215.
- Geels F. P. & B. Schippers. 1983. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonist fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathol. Z. **108**: 207-214.
- Gelderblom W. C. A., K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, R. M. Horak, R. Vleggaar & N. P. J. Kriek. 1988. Fumonisin – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 1806-1811.
- Gelderblom W. C. A., N. P. J. Kriek, W. F. O. Marasas & P. G. Thiel. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B<sub>1</sub>, in rats. Carcinogenesis. **12**: 1247-1251.
- Gelernter W. & G. E. Scwab. 1992. Transgenic bacteria, virus, algae and others microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxins delivery systems. En "*Bacillus*

- thuringiensis*. Its Uses and Future as a Biological Insecticide" Eds. P. Entwhistle, M. J. Bailey, J. Cory & S. Higgs. Wiley and Sons. New York, N.Y. pp. 78-105.
- Gilehrst D. G., B. Ward, V. Moussato & C. J. Mirocha. 1992. Genetic and physiological response to fumonisin and AAL-toxin by intact tissue of a higher plant. *Mycopathologia*. **117**: 57-64.
- Graham R. 1913. Forage poison in horses, cattle, and mules so-called cerebro-spinal meningitis and commonly termed "staggers". *Ky. Agric. Exp. Stn. Bull.* pp. 369-383.
- Gutterson N. I., T. J. Layton, J. S. Ziegler & G. J. Warren. 1986. Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent pseudomonads. *J. Bacteriol.* **165**: 696-703.
- Habte M. & M. Barrion. 1984. Interaction of *Rhizobium* sp with toxin producing fungus in culture medium and in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1080-1083.
- Habte M. & M. Barrion. 1984. Interaction of *Rhizobium* sp with toxin producing fungus in culture medium and in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1080-1083.
- Handelsman J., S. Raffel, E. H. Mester, L. Wunderlich & C. R. Grau. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 713-718.
- Handelsman J., S. Raffel, E. H. Mester, L. Wunderlich & C. R. Grau. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 713-718.
- Handelsman J., S. Raffel, E. H. Mester, L. Wunderlich & C. R. Grau. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 713-718.

- Handelsman J., S. Raffel, He, H., Lethbridge, B. J. & Silo-Suh, L. A. 1994. Biological Activities of two Fungistatic Antibiotics Produced by *Bacillus cereus* UW85 Appl. Environ. Microbiol. **60**: 2023-2030.
- Harrison L. R., B. M. Colvin, J. T. Greene, L. E. Newman & J. R. Cole. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B<sub>1</sub>, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Invest. **2**: 217-221.
- Hass D., C. Keel, J. Laville, M. Maurhofer, T. Oberhansli, U. Schnider, C. Voisard, B. Wuthrich & G. Defago. 1991. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO involved in the suppression of root diseases. En "Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions" Eds. H. Hennecke & D. P. S. Verma. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 117-136
- He H., L. A. Silo-Su, J. Handelsman & J. Clardy. 1994. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. Tetrahedron Lett. **35**: 2499-2502.
- Hebbar K. P., D. Atkinson, W. Tucker & P. J. Dart. 1992. Suppression of *Fusarium moniliforme* by maize root-associated *Pseudomonas cepacia*. Soil Biol. Biochem. **24**: 1009-1020.
- Heimpel A. M. 1971. Safety of insect pathogens for man and vertebrates. En "Microbial Control of Insects and Mites" Eds. Burges H. D. & N.W. Hussey. Academic Press. New York, N.Y. pp. 469.
- Hirano, S. & N. Nagao. 1989. Effects of Chitosan, Pectic acid Lisozyme and Chitinase on the Grouth of several. Phytopathogens. Agric. Biol. Chem. **53**: 3061-3066.
- Howell C. R. & R. D. Stipanovic. 1980. Suppression of *Phytium ultimum* - induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. Phytopathology. **70**: 712-715.

- Howell C. R. & R. D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with and antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*. **69**: 480-482.
- Jackson L. S., J. J. Hlwyka, K. R. Senthil & L. B. Bullerman. 1996. Effect of thermal processing on the stability of fumonisins. En "Fumonisin in Food" Eds. L. S. Jackson, J. W. DeVries & L. S. Bullerman. Plenum Press. New York, N.Y. pp. 345-353.
- Jackson M. L. 1976. Análisis químico de suelos. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. pp. 282-310.
- Jashiewicz K., S. J. Van Rensburg, W. F. O. Marasas & W. C. A. Gelderblom. 1987. Carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* culture material in rats. *JNCL*. **78**: 321-325.
- Kekessy D. A. & J. D. Piguet. 1970. New method for detecting bacteriocin production. *Appl. Microbiol.* **20**: 282-283.
- Kempf H. J. & G. Wolf. 1989. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat. *Hystopathology*. **79**: 990-994.
- Kempf H. J. & G. Wolf. 1989. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat. *Hystopathology*. **79**: 990-994.
- Kerr A. 1972. Biological control of crown-gall: seed inoculation. *J. Appl. Bacteriol.* **35**: 493-497.
- Kim J. C., H. J. Kang, D. H. Lee, Y. H. Lee & T. Yoshizawa. 1993. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3798-3802.

- Klich M. A., Lax, A. R. & Bland, J. M. 1991. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptitolipid produced by *Bacillus subtilis*. J. Mycopathology. (Metherlands) **116**: 7780.
- Kloepper J. W. & M. N. Schroth. 1981. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. Phytopathology. **71**: 1020-1024.
- Kloepper J. W., J. Hume, F. M. Scher, C. Singleton, B. Tipping, M. Laliberte, T. Frauley, C. Kuutchau, C. Simonson, R. Lifshitz, I. Zalezka & L. Lee. 1988. Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapseed). Plant Dis. **72**: 42-46.
- Kloepper J. W., J. Leong, M. Teintze & M. N. Schroth. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive solis. Curr. Microbiol. **4**: 317-320.
- Kloepper J. W., M. N. Schroth & T. D. Miller. 1980b. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology. **70**: 1078-1082.
- Kommendahl T. & C. E. Windels. 1981. Root-, stalk- and ear-infecting *Fusarium* species in corn in the USA. En "Fusarium Diseases, Biology and Taxonomy" Ed. P. E. Nelson, T. A. Toussoun & R. J. Cook. The Pennsylvania State University Press. University Park. pp. 94-105.
- Konisky J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. Annu. Rev. Microbiol. **36**: 125-144.
- Kriek N. P. J., T. S. Kellerman & W. F. O. Marasas. 1981. A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep, and rats. Onderstepoort J. Vet. Res. **48**: 129-131.

- Kuc J. 1983. Induced systemic resistance in plants to diseases caused by fungi and bacteria. En "The Dynamics of Host Defense" Eds. J. A. Bailey & B. J. Deverall. Academic Press Inc. London. pp. 191-221.
- Kulinska D. & A. Drozdowicz. 1983. Occurrence of microorganism antagonistic to *Azospirillum* spp. Zbl. Mikrobiol. **138**: 585-594.
- Kulinska D. & A. Drozdowicz. 1983. Occurrence of microorganism antagonistic to *Azospirillum* spp. Zbl. Mikrobiol. **138**: 585-594.
- Kuykendall L. D. & D. F. Weaver. 1978. Genetically marked *Rhizobium* identifiable as inoculum strain in nodules of soybean plants growth in fields populated with *Rhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. **36**: 915-919.
- Lamprecht S. C., W. F. O. Marasas, J. F. Alberts, M. E. Cawood, W. C. A. Gelderblom, G. S. Shephard, P. G. Thiel & F. J. Calitz. 1994. Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. Phytopathology. **84**: 383-391.
- Leslie J. F., R. D. Plattner, A. E. Desjardins & C. J. R. Klittich. 1995. Fumonisin B<sub>1</sub> production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section Liseola). Phytopathology. **82**: 341-45.
- Leslie L. F. 1995. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. Can. J. Bot. **73**: 8282-8291.
- Lethbridge G. 1989. An industrial view of microbial inoculants for crop plants. En "Microbial Inoculation of Crop Plants" Eds. R. Campbell & R. M. Macdonald. IR Press. Oxford. pp 11-28.
- Lindberg G. D. 1981. An antibiotic lethal to fungi. Plant Dis. **65**: 680-683.
- Lindow S. E. 1987. Competitive exclusion of epyphitic bacteria by Ice<sup>-</sup> *Pseudomonas syringae* mutants. Appl. Environ. Microbiol. **53**:2520-2527.

- Loper J. E. 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology*. **78**: 166-172.
- Luna Olvera H. A. & J. J. Peña-Cabriales. 1993. Ecología de *Bacillus thuringiensis*. En "Biotecnología para la Producción de Insecticidas Microbianos con Énfasis Sobre *Bacillus thuringiensis*". L. J. Galán Wong, C. Rodríguez Padilla, H. Medrano Roldán, R. S. Taméz Guerra y H. A. Luna Olvera (Eds.). Editorial Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp. 112-119.
- Luo Y., T. Yoshizawa & T. Katayama. 1990. Comparative study of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3723-3726.
- Luo Y., T. Yoshizawa, J. S. Yang, S. Y. Zhang & B. J. Zhang. 1992. A survey of the occurrence of *Fusarium* micotoxins (trichotecenes, zearalenone and fusarochromanone) in corn and wheat samples from Shaanxi provinces, China. *Micotoxin Res.* **8**: 85-91.
- Lynch M. J., S. S. Raphael, L. D. Mellor, P. P. Spare & M. J. Ingood. 1985. Métodos de laboratorio. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. Segunda edición. pp. 708-713.
- Mai W. F. 1987. Interactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**: 317-338.
- Marasas W. F. O., K. Jaskiewicz, F. S. Venter & D. J. Van Schalkwyk. 1988a. *Fusarium moniliforme* contamination of maize in esophageal cancer areas in Transkei. *S. Afr. Med. J.* **74**: 110-114.
- Marasas W. F. O., T. S. Kellerman, J. G. Pienaar & T. W. Naudé. 1986. Leucoencephalomalacia: a mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon. *Onderstepoort. J. Vert. Res.* **43**: 113-122.

- Marasas W. F. O., T. S. Kellerman, W. C. A. Gelderblom, J. A. W. Coetzer, P. J. Thiel & J. J. Van der Lugt. 1988b. Leucoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B<sub>1</sub> isolated from *Fusarium moniliforme*. Onderstepoort J. Vet. Res. **55**: 197-203.
- Martin P. W. & R. S. Travers. 1989. Worldwid abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 2437-2442.
- Martyniuk S. & G. H. Wagner. 1978. Quantitative and qualitative examination of soil microflora associated with different management systems. Soil Sci. **125**: 343-350.
- Martyniuk S. & G. H. Wagner. 1978. Quantitative and qualitative examination of soil microflora associated with different management systems. Soil Sci. **125**: 343-350.
- Mazzola M., R. J. Cook, L. S. Thomashow, D. M. Weller & L. S. Pierson III. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2624-2630.
- Mc Loughlin T. J., J. P. Quinn, A. Battermann & R. Bookland. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1760-1763.
- Mc Loughlin T. J., J. P. Quinn, A. Battermann & R. Bookland. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1760-1763.
- Meadows M. P., D. J. Ellis, J. Butt, P. Jarret & H. D. Burges. 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1344-1350.
- Merril A. H. Jr. 1991. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. J. Bioenerg. Biomemb. **23**: 83-104.

- Mesterhazy A. 1985. Effect of seed production area on the seedling resistance of wheat to *Fusarium* seedling blight. *Agronomie*. **5**: 491-497.
- Miller M. A., J. P. Honstead & R. A. Lovell. 1996. Regulatory aspects of fumonisins with respect to animal feed. En "Fumonisins in Food" Eds. L. S. Jackson, J. W. Devries & L. B. Bullerman. Plenum Press. New York, N.Y. pp. 363-368.
- Montgomery E. F. & A. A. Yousten. 1989. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **53**: 206-216.
- Moreno M. E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. UNAM. ISBN 968-36-0718-7 Primera Ed. Cap. 4. pp. 31-76.
- Morgan F. L. 1963. Infection inhibition and germ-tube lysis of three cereal rusts by *Bacillus pumilus*. *J. Bacteriol.* **53**: 1346-1348.
- Munkvold G. P., D. C. Mc Gee & W. M. Carlton. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. **87**: 209-217.
- Munkvold G.P. & A. E. Desjardins. 1997. Fumonisins in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* **81**: 556-565.
- Murphy P. A., S. Hendrich, E. C. Hopmans, C. C. Hauck, Z. Lu, G. Buseman & G. Munkvold. 1996. Effect of processing on fumonisin content of corn. En "Fumonisins in Food" Eds. L. S. Jackson, J. W. Devries & L. B. Bullerman. Plenum Press. New York, N.Y. pp. 323-334.
- Neish G. A., E. R. Farnworth, R. Greenhalgh & J. C. Young. 1983. Observations on the occurrence of *Fusarium* species and their toxins in corn in Eastern Ontario. *Can. J. Plant Pathol.* **5**: 11-16.
- Nelson P. E. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*. **117**: 29-36.

- Nelson P. E., A. E. Desjardins & R. D. Plattner. 1993. Fumonisin, mycotoxin production by *Fusarium* species, biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**:233-252.
- Nelson P. E., C. M Dignani & E. J Anaissie. 1994. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol.* **7**: 449-504.
- Nelson P. E., R. D. Plattner, D. D. Shackelford & A. E. Desjardins. 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2410-2412.
- Nelson P. E., R. D. Plattner, D. D. Shackelford & A. E. Desjardins. 1992. Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and some related species. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 984-989.
- Nelson P. E., T. A. Toussoun & W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park, PA. 193 pp.
- Norred W. P., E. Wang, H. Yoo, R. T. Riley & A. H. Jr. Merril. 1992. *In vitro* toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. *Mycopathologia.* **117**: 73-78.
- O'Gara F., P. Treacy, D. O'Sullivan & P. Higgins. 1986. Biological control of phytopathogens by *Pseudomonas* spp.: genetic aspect of siderophore production and root colonization. En "Iron Siderophores and Plant Disease" Ed. T. R. Swinburne. Plenum Publishing Corp. New York, N. Y. pp. 331-339.
- O'Sullivan D. J. & F. O'Gara. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**: 662-676.
- Ordentlich A., Y. Elad & I. Chet. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology.* **78**: 84-88.

- Osburn R. M., J. L. Milner, E. S. Oplinger, R. S. Smith & J. Handelsman. 1995. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. **79**: 551-556.
- Palmer R. G. & F. R. Troeh. 1979. Introducción a la ciencia del suelo - manual de laboratorio. A.G.T. Editor, S.A. México, D.F. pp. 27-40, 52-64.
- Panthier J. J., H. G. Diem & Y. Dommergues. 1979. Rapid method to enumerate and isolate soil actinomycetes antagonistic towards rhizobia. Soil Biol. Biochem. **11**: 443-445.
- Papavizas G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*. biology ecology and the potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. **23**: 23-54.
- Park D. L., R. López-García, S. Trujillo-Preciado & R. L. Price. 1996. Reduction of risks associated with fumonisins contamination in corn. En "Fumonisins in Food" Eds. L. S. Jackson, J. W. Devries & L. B. Bullerman. Plenum Press. New York. N.Y. pp. 335-344.
- Park J. C., M. S. Zong & I. M. Chang. 1991. Survey of the presence of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxinivalenol, and T-2 toxin in korean cereals of the 1989 harvest. Food Addit. Contam. **8**: 447-451.
- Park S. 1997. Fumonisins page. Internet: <http://www.ansci.cornell.edu/1997term/Park/>. pp. 1-13.
- Patel J. J. 1974. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. Plant Soil. **41**: 395-402.
- Patel J. J. 1974. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. Plant Soil. **41**: 395-402.
- Pendleton I. R. 1968. Ecological significance of antibiotics of some varieties of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. **13**: 235-240.

- Peña-Cabriaes J. J. & M. Alexander. 1983. Growth of *Rhizobium* in soil amended with organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**: 241-245.
- Peña-Cabriaes J. J. & M. Alexander. 1983. Growth of *Rhizobium* in soil amended with organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**: 241-245.
- Petras S. F. & L. E. Casida. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1496-1501.
- Pittet A., V. Parisod & M. Schelleberg. 1992. Occurrence of fumonisins B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> in corn-based products from the Swiss market. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 1252-1354.
- Plattner R. D., W. P. Norred, K. A. Voss, R. Peterson, D. D. Shackelford & D. A. Weislander. 1990. A method of detection of fumonisin in corn samples associated whit field cases of equine leukoencephalomalacia. *Mycology.* **82**: 698-702.
- Plattner R. D., D. Weisleder, D. D. Shackelford, R. Peterson & R. G. Powell. 1992. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia.* **117**: 23-28.
- Ponchet M., V. Duprez & P. Ricci. 1983. Suppression of both induced resistance and phytoalexin production by salicylic acid during elicitation of carnation cuttings. *Acta Hortic.* **141**: 61-70.
- Powell K. A., J. L. Faull & A. Renwick. 1990. The commercial and regulatory challenge. En "Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens" Ed. D. Hornby. CAB International. Wallingford, England. pp. 445-463.
- Pruett C. J. H., D. Burges & C. H. Wyborn. 1980. Effect of exposure to soil on potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **35**: 168-174.
- Pugashetti B. K., J. S. Angle & G. H. Wagner. 1982. Soil microorganisms antagonistic towards *Rhizobium japonicum*. *Soil. Biol. Biochem.* **14**: 45-49.

- Pugashetti B. K., J. S. Angle & G. H. Wagner. 1982. Soil microorganisms antagonistic towards *Rhizobium japonicum*. Soil. Biol. Biochem. **14**: 45-49.
- Reeder J. P., W. F. O. Marasas & P. S. Vanwyk. 1990. Fungal association in corn kernels and effects on germination. Phytopathology. **80**: 131-134.
- Reeder J. P., W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, E. W. Sydenham, G. S. Shephard & D. J. Van Schalwyk. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. Phytopathology. **82**: 353-357.
- Reedy M. S. & J. E. Rahe. 1989. *Bacillus subtilis* B-2 and selected onion rhizobacteria in onion seedling rhizospheres: effects on seedling growth and indigenous rhizosphere microflora. Soil. Biol. Biochem. **21**: 379-383.
- Riley R. T., W. P. Norred & C. W. Bacon. 1993. Fungal toxins in foods. Recent concerns. Annu. Rev. Nutr. **13**: 167-189.
- Rosales A. M. & T. W. Mew. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice-associated antagonistic bacteria. Plant Dis. **81**: 49-52.
- Ross P. F., L. G. Rice, R. D. Plattner, G. D. Osweiler, T. M. Wilson, D. L. Owens, H. A. Nelson & J. L. Richard. 1990. Concentrations of fumonisins B<sub>1</sub> in feeds associated with animal health problems. Mycopathologia. **114**: 129-135.
- Rottinghaus G. E., E. E. Caotney & H. C. Minor. 1992. A rapid sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. J. Vet. Diagn. Invest. **4**: 326-329.
- Rowe G. E. & A. Margaritis. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. Crit. Rev. Biotechnol. **6**: 87-123.
- Rytter J. I., F. L. Lukezic, R. Craig & G. W. Moorman. 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. Phytopathology. **79**: 367-370.
- Sabry S. A. 1992. Microbial degradation of Shrimp-shell waste. J. Basic Microbiol. **32**: 107-111.

- SAGAR. 1997. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Programa de Fomento Agrícola. Informe: la encuesta nacional sobre rendimientos agrícolas de maíz, frijol y sorgo. Primavera-verano/97.
- Sakthivel N. & S. S. Gnanamanickam. 1987. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oryza sativa* L.). Appl. Environ. Microbiol. **53**: 2056-2059.
- Sala N., V. Sanchis, P. Vilaro, R. Viladrich, M. Torres, I. Viñas & R. Canela. 1994. Fumonisin producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain. J. Food. Prot. **57**: 915- 917.
- Saleh S. M., R. F. Harris & O. N. Allen. 1969. Method for determining *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner in soil. Can. J. Microbiol. **15**: 1101-1104.
- Saleh S. M., R. F. Harris & O. N. Allen. 1970b. Fate of *Bacillus thuringiensis* in soil: effect of soil pH and organic amendment. Can. J. Microbiol. **16**: 677-680.
- Sang-dal Kim, Ho-seong Lim & Yong-su Kim. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 510-516.
- Schlegel H. G. 1979. Microbiología general. Segunda edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. pp. 161.
- Seifert K. 1996. FusKey: *Fusarium* interactive key. Agriculture and Agri-Food Canada. Cat. No. A42-66/1996E-IN. Internet: <http://res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html>.
- Sekijima Y., Y. Akiba, K. Ono, K. Aizawa & N. Fujiyoshi. 1977. Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis*. I. Dynamics of *Bacillus thuringiensis* in soil of mulberry field. Japan J. Appl. Ent. Zool. **21**: 35-40.
- Sheldon J. L. 1904. A corn mold. Annu. Rep. Agric. Exp. Stn. Nebr. pp. 23-32.

- Slabospitskaia A. T. & S. S. Krymovskaia. 1992. The chitinases of aerobic sporulating bacteria isolated from different ecological sources. *Microbiol Zh* **54**: 16-22.
- Smidt M. L. & A. K. Vidaver. 1982. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* PsW1 in plant tissue. *Can. J. Microbiol.* **28**: 600-604.
- Smith K. P., M. J. Havey & J. Handelsman. 1993. Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. *Plant Dis.* **77**: 139-142.
- Smith R. A. & G. A. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 311-315.
- Sneh B., M. Dupler, Y. Elad & R. Baker. 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a Fusarium-suppressive soil. *Phytopathology.* **74**: 1115-1124.
- Soil Conservation Service. 1972. Soil survey laboratory methods and procedures for collecting soil samples. U.S. Department of Agriculture. Washington, D.C. pp. 15-23.
- Somasegaran P. & H. J. Hoben. 1985. Methods in legume *Rhizobium* technology. University of Hawaii. Niftal Project & MIRCEN. pp. 46-49.
- Spiegel R.M. 1984. Estadística. Primera edición. Ed. Mc Graw Hill. México, D.F. pp. 357.
- Stack M. E. & R. M. Eppley. 1992. Liquid chromatographic determinations of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **75**: 834-837.
- Stahly D. P., D. W. Dingman, L. A. Bulla & A. I. Aronson. 1978. Possible origin and function of the parasporal crystals in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84**: 581-588.
- Stevens R. B. 1974. Mycology guide book. University of Washington Press. Seattle.

- Suslow T. V. & M. N. Schroth. 1982. Rhizobacteria of sugar beet: effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology*. **72**: 199-206.
- Sydenham E. W., G. S. Shephard, P. G. Thiel, W. F. O. Marasas & S. Stockenstrom. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 2014-2018.
- Sydenham E. W., P. G. Thiel, W. F. O. Marasas, G. S. Shephard, D. J. Van Schalkwyk & K. R. Koch. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 1900-1903.
- Sydenham E. W., S. Stockenstrom, P. G. Thiel, G. S. Shephard, K. R. Koch & W. F. O. Marasas. 1995. Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 1198-1201.
- Sydenham E. W., W. F. O. Marasas, G. S. Shephard, P. G. Thiel & E. Y. Hirooka. 1992. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 994-997.
- Tanaka T., A. Hasegawa, S. Yamamoto, U. S. Lee, Y. Sugiura & Y. Ueno. 1988. Worldwide contamination of cereals by *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxinivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.* **36**: 979-983.
- Tanaka T., A. Hasegawa, Y. Matsuki & Y. Ueno. 1985. A survey of the occurrence of nivalenol, deoxinivalenol and zearalenone in foodstuffs in health foods in Japan. *Food Addit. Contam.* **2**: 259-265.
- Thiel P. G., G. S. Shephard, E. W. Sydenham, W. H. O. Marasas, P. E. Nelson & T. M. Wilson. 1991. Levels of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in feed associated with confirmed cases of equine leukoencephalo-malacia. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 109-111.

- Thiel P. G., W. F. O. Marasas, E. W. Sydenham, G. S. Shephard & W. C. A. Gelderblom. 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for humans and animal health. *Mycopathol. Appl. Mycol.* **117**: 3-9.
- Thomas M. D. & I. W. Buddenhagen. 1980. Incidence and persistence of *Fusarium moniliforme* in symptomless maize kernels and seedlings in Nigeria. *Mycologia.* **20**: 882-887.
- Thomashow L. S. & D. M. Weller. 1988. Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* **170**: 3499-3508.
- Thomashow L. S., D. M. Weller, R. F. Bonsall & L. S. Pierson III. 1990. Production of phenazin-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* spp. in the rizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 908-912.
- Tolleson W. H., W. B. Melchior, S. M. Morris, M. J. McGarrity, O. E. Domon, L. Muskhelishvili, S. J. James & P. C. Howard. 1996. Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin B<sub>1</sub> in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. *Carcinogenesis.* **17**: 239-242.
- Tseng T. C., K. L. Lee, T. S. Deng, C. Y. Liu & J. W. Wang. 1995. Production of fumonisins by *Fusarium* species of Taiwan. *Mycopathology.* **130**. 117-121.
- Turner J. T. & P. A. Backman. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant. Dis.* **75**: 347-353.
- Van Peer R. & B. Schippers. 1988. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. Strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Can. J. Microbiol.* **35**: 456-463.
- Van Rensburg S. J. 1986. Role of mycotoxins in endemic liver and esophageal cancer. En "Bioactive Molecules. 1. Mycotoxins and Phycotoxins" Eds. P. S. Steyn & R. Vlegaar. Elsevier, Amsterdam. pp. 483-494.

- Van Wyk P. S., G. D. C. Pauer & W. F. O. Marasas. 1987. Geographic distribution and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot of wheat in the Orange Free State, South Africa. *Phytophylactica*. **19**: 271-274.
- Vankova J. 1957. Study of the effect of *Bacillus thuringiensis* on insects. *Folia Biol.* (Prague). **3**: 175-182.
- Vensonder R. F. & P. Golinski. 1989. Metabolites of *Fusarium*. En "*Fusarium: Micotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*" Ed. J. Chelkowski. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam, The Netherlands. pp. 1-35.
- Vicedo B., R. Peñalver, M. J. Ansis & M. M. López. 1993. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and *pAgK84* transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the *Trā* mutant strain K1026. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 309-315.
- Vidaver A. K. 1983. Bacteriocins: the lure and reality. *Plant. Dis.* **May**: 471-474.
- Viseer R., W. H. Holzapfel, J. J. Bezuidenhout & M. Kotze. 1986. Antagonism of lactic bacteria against phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 552-555.
- Visser R., W. H. Holzapfel, J. J. Bezuidenhout & J. M. Kotze. 1986. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 552-555.
- Voss K. A., W. J. Chamberlain, C.W. Bacon, R.T. Riley & W. P. Norred. 1995. Subchronic toxicity of fumonisin B<sub>1</sub> to male and female rats. *Food Addit. Contam.* **12**: 473-8.
- Wang D. I. C., C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunhill, A. E. Humphrey & M. D. Lilly. 1979. Fermentation and enzyme technology. John Wiley & Sons. New York. pp. 57-97.
- Wang E., W. P. Norred, C. W. Bacon, R. T. Riley & A. H. Merrill. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J. Biol. Chem.* **266**: 14486-14490.

- Weller D. M., W. J. Howie & R. J. Cook. 1988. Relationship between *in vitro* inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and suppression of take-all of wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*. **78**: 1094-1100.
- West A. W. 1984. Fate of insecticidal, proteinaceous parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Soil. Biol. Biochem.* **16**: 357-360.
- West A. W., H. D. Burges & C. H. Wyborn. 1984. Effect of incubation in natural and autoclaved soil upon potency and viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **44**: 121-127.
- West A. W., H. D. Burges, T. J. Dixon & C. H. Wyborn. 1985a. Effect of incubation in non-sterilized and autoclaved arable soil on survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula. *New Zealand J. Agric. Res.* **28**: 559-566.
- West A. W., H. D. Burges, T. J. Dixon & C. H. Wyborn. 1985b. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effect of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **17**: 657-665.
- Yang J. B. 1989. Study of cause of Kaschin-Beck disease and intervention measures. *J. Chin. Local Dis.* **8**: 134-184.
- Yoshizawa T., A. Yamashita & Y. Luo. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1626-1629.
- Yuan W. M. & D. L. Crawford. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seeds rots. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3119-3128.
- Yuen G. Y., M. N. Schroth & A. H. Mc Cain. 1985. Reduction of fusarium wilt of carnation with suppressive soils and antagonistic bacteria. *Plant Dis.* **69**: 1071-1075.

- Zar J. H. 1996. Biostatistical analysis. Third Edition. Printice-Hall. Inc. Englewood. New Jersey.
- Zenteno-Zevada M. & M. Ulloa. 1977. Microflora en mazorcas de maíz (*Zea mays* L.). Rev. Latinoam. Microbiol. **19**: 27-31.
- Zhen Y. Z. 1984. The culture and isolation of fungi from the cereals in five high and three low incidence counties of esophageal cancer in Henan Province. J. Chin. Tumor. **6**: 27-29.

