

00381  
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CONTROL BIOLÓGICO DE Aspergillus flavus  
Link Ex Fries, POR MEDIO DE BACTERIAS  
SAPROFITAS ANTAGONICAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA)**

**P R E S E N T A**

**ISAAC JUAN LUNA ROMERO**

**2000**

**285737**

**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

El suelo de rizosfera, estigmas y brácteas de maíz fueron muestreadas en diferentes regiones de México: Cocotitlán y Tezoyucan en el Estado de México; y el Bajío en el Estado de Guanajuato. Las bacterias se aislaron por la técnica de dilución en placa, se obtuvieron 3425 aislamientos y se probó su capacidad antagónica. Cinco aislamientos provenientes de la rizosfera, tuvieron buena actividad inhibitoria sobre *Aspergillus flavus* en medio de cultivo PDA. Los aislamientos bacterianos de estigmas y brácteas no tuvieron actividad antagónica contra el hongo. Los aislamientos Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226 y Ba-72, todos de rizosfera, fueron caracterizados mediante pruebas bioquímicas tradicionales, así como la aplicación del Kit API 20E y 20 NE. Todos fueron identificados como *Pseudomonas fluorescens*. El aislamiento Co-47 mostró tener el mayor espectro de actividad antagónica sobre varios hongos fitopatógenos, los cuatro aislamientos restantes tuvieron actividad antagónica variable sobre los mismos hongos fitopatógenos. *Fusarium* sp. resultó ser el más resistente al efecto de las bacterias antagónicas, excepto al aislamiento Co-47 que sí lo inhibió. Hubo un efecto 100% inhibitorio sobre conidios y esclerocios de *A. flavus* con el aislamiento Co-47. El periodo de incubación de las bacterias antagónicas con la siembra posterior del hongo no debe ser mayor a 72 horas, ya que después de este tiempo no hay cambios en la actividad antagónica de las bacterias. El mejor método para determinar el efecto sinérgico de los aislamientos fue mediante la siembra directa alternada, no hubo efecto sinérgico en la mayoría de las combinaciones. El carácter saprófito de las bacterias antagónicas fue comprobado mediante la reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco y pudrición de tubérculos de papa, ambas pruebas resultaron negativas. La germinación de semillas de chile, tomate, maíz, calabaza y coliflor no se vió afectada, únicamente la semilla de chícharo fue afectada en su germinación. Los bioensayos con los cinco aislamientos bacterianos en mazorcas de maíz con granos en estado lechoso, mostraron protección contra *A. flavus* en un rango de 74.4% a 96.8% respecto al 100% de infección que tuvo el testigo. En invernadero y campo los aislamientos Co-47 y Co-81 mostraron tener buen efecto protector contra la infección de *A. flavus*. El componente activo involucrado está relacionado con la presencia de sideróforos para los aislamientos Co-47, Co-81, y Tez-118; pero no para el Tez-226, además, el componente activo del aislamiento Co-47 fue proteico y de carácter termolábil. Los aislamientos bacterianos provenientes de la rizosfera del maíz son saprófitos, con potencial antagónico para el control biológico de *A. flavus*.

Luna Romero Isaac Juan  
Control Biológico de *Aspergillus flavus*  
Lin K. Ex. Fries Por Medio de Bacterias  
Saprophytes Antagónicas.

## ABSTRACT

Maize silks, bracts and soil around the roots, were sampled from different areas of Mexico: Cocotitlan and Tezoyucan from State of Mexico, and the area of El Bajío from the State of Guanajuato. A dilution plate method was used to isolate antagonistic bacteria, 3425 isolates were obtained, and their antagonistic activity was tested. Five isolates from rhizosphere inhibited *Aspergillus flavus* on potato-dextrose-agar (PDA) medium. Isolates from maize silks and bracts had no activity against this fungus. Isolates Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226 and Ba-72 from rhizosphere with antagonistic activity were identified as *Pseudomonas fluorescens* by morphological and biochemical tests, as well as the application of Kits API 20E and API 20 NE. Isolate Co-47 had the best antagonistic activity against phytopathogenic fungi. *Fusarium* sp. was resistant to antagonistic effect from rhizosphere bacteria, with the exception of isolate Co-47, which inhibited the fungus. Other antagonistic isolates showed variable effects against the same fungus. A total inhibitory effect on conidia and sclerotia from *A. flavus* was observed with isolate Co-47.

An incubation period of 72 hours was established for antagonistic bacteria, on PDA medium, with fungal inoculation afterwards; after this time period there were no changes in the bacterial antagonistic activity. The method to determine a synergistic effect was placing bacteria in the medium at alternated points, no combination of isolates had good synergistic effect. Tobacco hypersensitive reaction at different concentrations (107, 108, 109 colony forming units) and potato rot test were negative for all 5 isolates. No antagonistic bacteria affected germination of seeds of pepper, bean, tomato, maize, squash, and cauliflower. Bioassays with the 5 positive isolates on the ear at milky state, showed from 3.2 to 15.6% of infection in relation to 100% damage in controls. At greenhouse and field, isolates Co-47 and Co-81 showed a protective effect against *A. flavus* infection. Siderophores are the active component of isolates Co-47, Co-81 and Tez-118 but not of Tez-226. The active component of isolate Co-47 was determined as a protein with thermolabile properties. Bacteria isolated from maize soil rhizosphere are considered saprophytic and potentially antagonistic to *A. flavus*.

Luna Romero Isaac Juan  
 Control Biológico de *Aspergillus flavus*  
 Link Ex. Fries - Por Medio de  
 Bacterias Saprofitas Antagónicas

DEDICATORIA

i

A mi esposa e hijas:      Corina  
  
   Karina  
   Laura  
   Angélica

A mis padres y hermanas:  
                                 Agustín y Esther  
  
                                 Graciela  
                                 Hilda  
                                 María

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes Instituciones y personas su valiosa y desinteresada colaboración que me permitió alcanzar las metas planeadas:

**Universidad Nacional Autónoma de México**, por el programa de Doctorado que seguí y que me formó como profesionista.

**Instituto de Biología**, por brindarme las facilidades de laboratorio y materiales para la realización del proyecto.

**Dra. Magda Carvajal Moreno**, Directora de tesis, quien siempre me brindó su apoyo, orientación e influyó positivamente en mi formación profesional.

**Instituto Politécnico Nacional**, por la licencia otorgada para concluir la tesis.

**Academia de Fitopatología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN** integrada por los Profesores: José Luis Cortés, Teresa Guzmán, Marcelo Basaldúa, Cristina Castro. Por su compañerismo y apoyo para realizar el programa Doctoral y concluirlo satisfactoriamente.

**A mi Comité Tutorial:** Dr. Ronald Ferrera Cerrato, Dr. Alfredo Echeagaray, Dr. Humberto Hernández por su asesoría y sugerencias para mejorar el proyecto.

**Dra. Jobita Martínez**, Departamento de Biotecnología, CINVESTAV, Zacatenco, por su colaboración en la identificación de un aislamiento.

**Dr. Guillermo Carrillo**, Instituto de Genética, Colegio de Posgraduados, por su asesoría e interés para la detección de sideróforos.

**QBP. Isabel Salas Vargas**, Departamento de Microbiología, ENCB, IPN, por su ayuda en la detección de proteínas en el componente activo.

**Dr. Carlos Flores**, Departamento de Ecología, ENCB, IPN, por su apoyo en los análisis estadísticos de los ensayos.

**Sr. Benito Juárez** quien facilitó la parcela para realizar el estudio de campo.

A todas y cada una de las personas que han contribuido en mi formación profesional mi agradecimiento.

## CONTENIDO

Páginas

Dedicatoria . . . . .	i
Agradecimientos . . . . .	ii
Contenido . . . . .	iii
Lista de Tablas . . . . .	vi
Lista de Figuras . . . . .	viii
Lista de Apéndices . . . . .	x
Resumen . . . . .	xi
Abstract . . . . .	xii
<b>I. INTRODUCCIÓN . . . . .</b>	<b>1</b>
1. <i>Aspergillus flavus</i> Link ex Fries . . . . .	2
1.1. Taxonomía . . . . .	2
1.2. Importancia económica . . . . .	3
1.3. Ciclo . . . . .	3
a. Mecanismos de penetración . . . . .	3
b. Condiciones de patogenicidad . . . . .	4
1.4. Aflatoxinas . . . . .	4
2. Métodos generales de control . . . . .	5
2.1. Físicos . . . . .	5
2.2. Químicos . . . . .	6
2.3. Prácticas de cultivo . . . . .	6
2.4. Legales y normativos . . . . .	7
3. Control biológico . . . . .	8
3.1 Antecedentes históricos . . . . .	8
3.2 Definición . . . . .	9
3.3 Métodos de control biológico . . . . .	9
a. Uso de los microorganismos vivos contra los fitopatógenos . . . . .	10
b. Uso de resistencia genética a las enfermedades . . . . .	10
3.4 Ventajas y desventajas . . . . .	11
3.5 Perspectiva industrial . . . . .	11
4. Las bacterias antagónicas . . . . .	12
4.1. Taxonomía . . . . .	13
4.2. Mecanismos de acción . . . . .	14
4.3. Condiciones para su actividad . . . . .	15
4.4. Estado actual del control biológico en México . . . . .	16
<b>II. OBJETIVOS . . . . .</b>	<b>18</b>

III.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
3.1	Aislamiento de <i>Aspergillus flavus</i> .....	19
3.2	Muestreo de suelo agrícola de maíz .....	19
3.3	Aislamiento y selección de bacterias antagónicas .....	19
	Primera etapa de selección	
a.	Del suelo .....	20
b.	De los estigmas .....	21
c.	De las brácteas .....	21
d.	Bacterias con capacidad antagónica comprobada .....	22
3.4	Cuantificación de la capacidad antagónica sobre <i>A. flavus</i> .....	22
3.5	Espectro de acción de las bacterias antagónicas sobre hongos fitopatógenos .....	23
3.6	Mecanismo de acción .....	23
a.	Fungistática o fungicida .....	23
b.	Efecto del aislamiento Co-47 sobre el micelio, conidios y esclerocios de <i>A. flavus</i> .....	25
c.	Efecto sinérgico entre bacterias antagónicas .....	26
3.7	Identificación de las bacterias en biocontrol .....	28
3.8	Identificación del aislamiento bacteriano Co-47. ....	33
a.	Por kits de identificación .....	33
b.	Por homología del ADN .....	35
3.9	Efecto de la siembra de aislamientos antagónicos a diferentes tiempos respecto a <i>A. flavus</i> .....	35
3.10	Bioensayos de las bacterias antagónicas sobre mazorcas de maíz con granos en estado lechoso .....	36
3.11	Determinación del efecto inocuo en especies vegetales .....	36
3.12	Efecto de las bacterias antagónicas sobre la germinación de semillas de diferentes especies vegetales .....	37
3.13	Antagonismo en invernadero a cielo abierto y en campo .....	37
3.14	Caracterización del principio activo .....	39
3.15	Constitución proteica del componente activo del aislamiento Co-47 .....	40

<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	42
4.1	Aislamiento de <i>A. flavus</i>	42
4.2	Muestreo de suelo agrícola de maíz.	42
4.3	Aislamiento y selección de bacterias antagónicas	43
	a. Del suelo de rizosfera	43
	b. De los estigmas	43
	c. De las brácteas	44
	d. Bacterias de actividad antagónica comprobada	44
4.4	Cuantificación de la capacidad antagónica de los aislamientos bacterianos sobre <i>A. flavus</i>	45
4.5	Espectro de acción de las bacterias antagónicas sobre diferentes hongos fitopatógenos	57
4.6	Mecanismos de acción	61
	a. Fungistática o fungicida	61
	b. Efecto del aislamiento Co-47 sobre el micelio, conidios y esclerocios de <i>A. flavus</i>	62
	c. Efecto sinérgico	65
4.7	Identificación de las bacterias en biocontrol	69
4.8	Identificación del aislamiento Co-47 mediante homología con ADN	71
4.9	Efecto de las bacterias antagónicas sobre <i>A. flavus</i> a diferentes tiempos	71
4.10	Bioensayos en mazorca de maíz con granos en estado lechoso, para determinar el efecto protector de las bacterias antagónicas	74
4.11	Determinación del efecto inocuo de las bacterias antagónicas sobre especies vegetales	78
4.12	Efecto de las bacterias antagónicas sobre la germinación de semillas de diferentes especies vegetales	78
4.13	Pruebas de antagonismo en plantas de maíz en invernadero y campo	80
	a. Invernadero	80
	b. Campo	81
4.14	Caracterización del principio activo de la cepa Co-47	84
4.15	Constitución proteica del componente activo del aislamiento Co-47	86
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	91
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	92
<b>VII.</b>	<b>APÉNDICES</b>	104

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Bacterias con capacidad antagónica de suelo de rizosfera, estigmas y filosfera de plantas de maíz . . . . .	44
2. Diámetro de las colonias de <i>A. flavus</i> con bacterias antagónicas de suelo de rizosfera . . . . .	47
3. Resumen de promedios de inhibición de la colonia de <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de bacterias de suelo de la rizosfera . . . . .	48
4. Diámetro de las colonias de <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de bacterias antagónicas aisladas de estigmas de mazorca de maíz . . . . .	50
5. Promedio de inhibición del crecimiento (en cm) de <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de bacterias de los estigmas de la mazorca de maíz . . . . .	51
6. Diámetro de las colonias de <i>A. flavus</i> con bacterias antagónicas de brácteas de la mazorca del maíz . . . . .	52
7. Promedio de la inhibición del diámetro (en cm) de <i>A. flavus</i> con bacterias de las brácteas de la mazorca de maíz . . . . .	53
8. Diámetro de las colonias de <i>A. flavus</i> inhibidas con aislamientos bacterianos de capacidad antagónica comprobada contra ciertos hongos y bacterias fitopatógenos . . . . .	56
9. Promedio de inhibición del crecimiento de <i>A. flavus</i> por efecto de bacterias con capacidad antagónica comprobada contra otros fitopatógenos a diferentes tiempos . . . . .	57
10. Inhibición por bacterias antagónicas sobre hongos fitopatógenos . . . . .	60
11. Antibiosis promedio por bacterias antagónicas sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos en medio PDA . . . . .	61
12. Efecto de las bacterias antagónicas contra <i>Aspergillus flavus</i> en mezcla de suspensiones 1:1 v/v . . . . .	64
13. Efecto de la bacteria antagónica Co-47 sobre la germinación de conidios de <i>Aspergillus flavus</i> . . . . .	65
14. Efecto de las mezclas de bacterias antagónicas sobre el diámetro (cm) de crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> . . . . .	68
15. Crecimiento relativo de <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de las mezclas de bacterias antagónicas . . . . .	69
16. Diámetro alcanzado por <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de la combinación alternada de bacterias antagónicas . . . . .	70

## Tabla

17.	Comportamiento sinérgico de los aislamientos bacterianos antagónicos sobre el crecimiento de <i>A. flavus</i> . . . . .	71
18.	Pruebas para identificar a los aislamientos bacterianos antagónicos . . . . .	72
19.	Inhibición de <i>A. flavus</i> sembrado a diferentes tiempos respecto a las bacterias antagónicas . . . . .	76
20.	Porcentaje de infección por <i>Aspergillus flavus</i> en mazorca de maíz con granos en estado lechoso previa protección con bacterias antagónicas . . . . .	79
21.	Porcentaje de infección por <i>Aspergillus flavus</i> en mazorcas de maíz protegidas por bacterias antagónicas . . . . .	80
22.	Efecto de las bacterias antagónicas sobre el porcentaje de germinación de semillas de diferentes especies vegetales . . . . .	81
23.	Promedio del porcentaje de germinación de diferentes vegetales por efecto de aislamientos bacterianos a dos concentraciones . . . . .	82
24.	Protección por los aislamientos bacterianos antagónicos contra la infección de <i>Aspergillus flavus</i> en invernadero . . . . .	83
25.	Protección por bacterias antagónicas sobre la infección por <i>A. flavus</i> en mazorcas de maíz en campo . . . . .	85
26.	Resumen del efecto protector de las bacterias antagónicas sobre el porcentaje de infección por <i>Aspergillus flavus</i> en mazorcas de maíz . . . . .	86
27.	Estimulación de los aislamientos bacterianos para la producción de sideróforos en medio deficiente y adicionado de ión férrico . . . . .	87
28.	Efecto de diferentes extractos sobre la producción del componente activo del aislamiento Co-47 . . . . .	89
29.	Calibración para albúmina y determinación de proteína en el extracto crudo . . . . .	91

## CONTENIDO

Páginas

Dedicatoria . . . . .	i
Agradecimientos . . . . .	ii
Contenido . . . . .	iii
Lista de Tablas . . . . .	vi
Lista de Figuras . . . . .	viii
Lista de Apéndices . . . . .	x
Resumen . . . . .	xi
Abstract . . . . .	xii
<b>I. INTRODUCCIÓN . . . . .</b>	<b>1</b>
1. <i>Aspergillus flavus</i> Link ex Fries . . . . .	2
1.1. Taxonomía . . . . .	2
1.2. Importancia económica . . . . .	3
1.3. Ciclo . . . . .	3
a. Mecanismos de penetración . . . . .	3
b. Condiciones de patogenicidad . . . . .	4
1.4. Aflatoxinas . . . . .	4
2. Métodos generales de control . . . . .	5
2.1. Físicos . . . . .	5
2.2. Químicos . . . . .	6
2.3. Prácticas de cultivo . . . . .	6
2.4. Legales y normativos . . . . .	7
3. Control biológico . . . . .	8
3.1 Antecedentes históricos . . . . .	8
3.2 Definición . . . . .	9
3.3 Métodos de control biológico . . . . .	9
a. Uso de los microorganismos vivos contra los fitopatógenos . . . . .	10
b. Uso de resistencia genética a las enfermedades . . . . .	10
3.4 Ventajas y desventajas . . . . .	11
3.5 Perspectiva industrial . . . . .	11
4. Las bacterias antagónicas . . . . .	12
4.1. Taxonomía . . . . .	13
4.2. Mecanismos de acción . . . . .	14
4.3. Condiciones para su actividad . . . . .	15
4.4. Estado actual del control biológico en México . . . . .	16
<b>II. OBJETIVOS . . . . .</b>	<b>18</b>

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> . . . . .	19
3.1 Aislamiento de <i>Aspergillus flavus</i> . . . . .	19
3.2 Muestreo de suelo agrícola de maíz . . . . .	19
3.3 Aislamiento y selección de bacterias antagónicas . . . . .	19
Primera etapa de selección	
a. Del suelo . . . . .	20
b. De los estigmas . . . . .	21
c. De las brácteas . . . . .	21
d. Bacterias con capacidad antagónica comprobada . . . . .	22
3.4 Cuantificación de la capacidad antagónica sobre <i>A. flavus</i> . . . . .	22
3.5 Espectro de acción de las bacterias antagónicas sobre hongos fitopatógenos . . . . .	23
3.6 Mecanismo de acción . . . . .	23
a. Fungistática o fungicida . . . . .	23
b. Efecto del aislamiento Co-47 sobre el micelio, conidios y esclerocios de <i>A. flavus</i> . . . . .	25
c. Efecto sinérgico entre bacterias antagónicas . . . . .	26
3.7 Identificación de las bacterias en biocontrol . . . . .	28
3.8 Identificación del aislamiento bacteriano Co-47. . . . .	33
a. Por kits de identificación . . . . .	33
b. Por homología del ADN . . . . .	35
3.9 Efecto de la siembra de aislamientos antagónicos a diferentes tiempos respecto a <i>A. flavus</i> . . . . .	35
3.10 Bioensayos de las bacterias antagónicas sobre mazorcas de maíz con granos en estado lechoso . . . . .	36
3.11 Determinación del efecto inocuo en especies vegetales . . . . .	36
3.12 Efecto de las bacterias antagónicas sobre la germinación de semillas de diferentes especies vegetales . . . . .	37
3.13 Antagonismo en invernadero a cielo abierto y en campo . . . . .	37
3.14 Caracterización del principio activo . . . . .	39
3.15 Constitución proteica del componente activo del aislamiento Co-47 . . . . .	40

<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	42
4.1	Aislamiento de <i>A. flavus</i>	42
4.2	Muestreo de suelo agrícola de maíz.	42
4.3	Aislamiento y selección de bacterias antagónicas	43
a.	Del suelo de rizosfera	43
b.	De los estigmas	43
c.	De las brácteas	44
d.	Bacterias de actividad antagónica comprobada	44
4.4	Cuantificación de la capacidad antagónica de los aislamientos bacterianos sobre <i>A. flavus</i>	45
4.5	Espectro de acción de las bacterias antagónicas sobre diferentes hongos fitopatógenos	57
4.6	Mecanismos de acción	61
a.	Fungistática o fungicida	61
b.	Efecto del aislamiento Co-47 sobre el micelio, conidios y esclerocios de <i>A. flavus</i>	62
c.	Efecto sinérgico	65
4.7	Identificación de las bacterias en biocontrol	69
4.8	Identificación del aislamiento Co-47 mediante homología con ADN	71
4.9	Efecto de las bacterias antagónicas sobre <i>A. flavus</i> a diferentes tiempos	71
4.10	Bioensayos en mazorca de maíz con granos en estado lechoso, para determinar el efecto protector de las bacterias antagónicas	74
4.11	Determinación del efecto inocuo de las bacterias antagónicas sobre especies vegetales	78
4.12	Efecto de las bacterias antagónicas sobre la germinación de semillas de diferentes especies vegetales	78
4.13	Pruebas de antagonismo en plantas de maíz en invernadero y campo	80
a.	Invernadero	80
b.	Campo	81
4.14	Caracterización del principio activo de la cepa Co-47	84
4.15	Constitución proteica del componente activo del aislamiento Co-47	86
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	91
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	92
<b>VII.</b>	<b>APÉNDICES</b>	104

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Bacterias con capacidad antagónica de suelo de rizosfera, estigmas y filosfera de plantas de maíz . . . . .	44
2. Diámetro de las colonias de <i>A. flavus</i> con bacterias antagónicas de suelo de rizosfera . . . . .	47
3. Resumen de promedios de inhibición de la colonia de <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de bacterias de suelo de la rizosfera . . . . .	48
4. Diámetro de las colonias de <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de bacterias antagónicas aisladas de estigmas de mazorca de maíz . . . . .	50
5. Promedio de inhibición del crecimiento (en cm) de <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de bacterias de los estigmas de la mazorca de maíz . . . . .	51
6. Diámetro de las colonias de <i>A. flavus</i> con bacterias antagónicas de brácteas de la mazorca del maíz . . . . .	52
7. Promedio de la inhibición del diámetro (en cm) de <i>A. flavus</i> con bacterias de las brácteas de la mazorca de maíz . . . . .	53
8. Diámetro de las colonias de <i>A. flavus</i> inhibidas con aislamientos bacterianos de capacidad antagónica comprobada contra ciertos hongos y bacterias fitopatógenos . . . . .	56
9. Promedio de inhibición del crecimiento de <i>A. flavus</i> por efecto de bacterias con capacidad antagónica comprobada contra otros fitopatógenos a diferentes tiempos . . . . .	57
10. Inhibición por bacterias antagónicas sobre hongos fitopatógenos . . . . .	60
11. Antibiosis promedio por bacterias antagónicas sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos en medio PDA . . . . .	61
12. Efecto de las bacterias antagónicas contra <i>Aspergillus flavus</i> en mezcla de suspensiones 1:1 v/v . . . . .	64
13. Efecto de la bacteria antagónica Co-47 sobre la germinación de conidios de <i>Aspergillus flavus</i> . . . . .	65
14. Efecto de las mezclas de bacterias antagónicas sobre el diámetro (cm) de crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> . . . . .	68
15. Crecimiento relativo de <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de las mezclas de bacterias antagónicas . . . . .	69
16. Diámetro alcanzado por <i>Aspergillus flavus</i> por efecto de la combinación alternada de bacterias antagónicas . . . . .	70

## Tabla

17.	Comportamiento sinérgico de los aislamientos bacterianos antagónicos sobre el crecimiento de <i>A. flavus</i> . . . . .	71
18.	Pruebas para identificar a los aislamientos bacterianos antagónicos . . . . .	72
19.	Inhibición de <i>A. flavus</i> sembrado a diferentes tiempos respecto a las bacterias antagónicas . . . . .	76
20.	Porcentaje de infección por <i>Aspergillus flavus</i> en mazorca de maíz con granos en estado lechoso previa protección con bacterias antagónicas . . . . .	79
21.	Porcentaje de infección por <i>Aspergillus flavus</i> en mazorcas de maíz protegidas por bacterias antagónicas . . . . .	80
22.	Efecto de las bacterias antagónicas sobre el porcentaje de germinación de semillas de diferentes especies vegetales . . . . .	81
23.	Promedio del porcentaje de germinación de diferentes vegetales por efecto de aislamientos bacterianos a dos concentraciones . . . . .	82
24.	Protección por los aislamientos bacterianos antagónicos contra la infección de <i>Aspergillus flavus</i> en invernadero . . . . .	83
25.	Protección por bacterias antagónicas sobre la infección por <i>A. flavus</i> en mazorcas de maíz en campo . . . . .	85
26.	Resumen del efecto protector de las bacterias antagónicas sobre el porcentaje de infección por <i>Aspergillus flavus</i> en mazorcas de maíz . . . . .	86
27.	Estimulación de los aislamientos bacterianos para la producción de sideróforos en medio deficiente y adicionado de ión férrico . . . . .	87
28.	Efecto de diferentes extractos sobre la producción del componente activo del aislamiento Co-47 . . . . .	89
29.	Calibración para albúmina y determinación de proteína en el extracto crudo . . . . .	91

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Placa con PDA marcada de acuerdo al patrón (izquierda) y patrón de siembra de aislamientos bacterianos en puntos equidistantes, al centro <i>A. flavus</i> (derecha) . . . . .	21
2. Siembra de bacterias antagónicas en microcultivo en placa de vidrio.	25
3. Esclerocios de <i>Aspergillus flavus</i> producidos en medio de cultivo PDA . . . . .	26
4. Kit de pruebas bioquímicas API 20 E: <i>P. putida</i> (arriba), el aislamiento Co-47 (abajo) . . . . .	34
5. Código numérico para la identificación de bacterias. . . . .	34
6. Colonia típica de <i>Aspergillus flavus</i> con esclerocios maduros . . . . .	42
7. Localidades de muestreo del suelo de rizosfera, Cocotitlán (derecha), Tezoyucan (centro) y Bajío (izquierda) . . . . .	43
8. Efecto de los aislamientos bacterianos de la rizosfera de maíz, sobre <i>Aspergillus flavus</i> en medio PDA . . . . .	46
9. Efecto de las bacterias antagónicas de la rizosfera sobre <i>Aspergillus flavus</i> . . . . .	46
10. Aislamientos bacterianos antagónicos contra <i>Aspergillus flavus</i> obtenidos de los estigmas y probados en forma independiente . . . . .	49
11. Efecto de las bacterias aisladas de los estigmas, sobre el desarrollo de <i>Aspergillus flavus</i> en pruebas de laboratorio . . . . .	51
12. Aislamientos bacterianos antagónicos contra <i>Aspergillus flavus</i> aislados de las brácteas . . . . .	53
13. Efecto de las bacterias aisladas de las brácteas sobre el desarrollo de <i>Aspergillus flavus</i> en pruebas de laboratorio . . . . .	54
14. Aislamientos bacterianos con actividad antagónica comprobada, contra otros fitopatógenos, probados contra <i>Aspergillus flavus</i> . . . . .	55
15. Inhibición del desarrollo de <i>Phytophthora cinnamomi</i> por bacterias antagónicas en medio PDA . . . . .	58
16. Inhibición del desarrollo de <i>Fusarium</i> por bacterias antagónicas . . . . .	59
17. Antibiosis de los aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos . . . . .	61

## RESUMEN

El suelo de rizosfera, estigmas y brácteas de maíz fueron muestreadas en diferentes regiones de México: Cocotitlán y Tezoyucan en el Estado de México; y el Bajío en el Estado de Guanajuato. Las bacterias se aislaron por la técnica de dilución en placa, se obtuvieron 3425 aislamientos y se probó su capacidad antagónica. Cinco aislamientos provenientes de la rizosfera, tuvieron buena actividad inhibitoria sobre *Aspergillus flavus* en medio de cultivo PDA. Los aislamientos bacterianos de estigmas y brácteas no tuvieron actividad antagónica contra el hongo. Los aislamientos Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226 y Ba-72, todos de rizosfera, fueron caracterizados mediante pruebas bioquímicas tradicionales, así como la aplicación del Kit API 20E y 20 NE. Todos fueron identificados como *Pseudomonas fluorescens*. El aislamiento Co-47 mostró tener el mayor espectro de actividad antagónica sobre varios hongos fitopatógenos, los cuatro aislamientos restantes tuvieron actividad antagónica variable sobre los mismos hongos fitopatógenos. *Fusarium* sp. resultó ser el más resistente al efecto de las bacterias antagónicas, excepto al aislamiento Co-47 que sí lo inhibió. Hubo un efecto 100% inhibitorio sobre conidios y esclerocios de *A. flavus* con el aislamiento Co-47. El periodo de incubación de las bacterias antagónicas con la siembra posterior del hongo no debe ser mayor a 72 horas, ya que después de este tiempo no hay cambios en la actividad antagónica de las bacterias. El mejor método para determinar el efecto sinérgico de los aislamientos fue mediante la siembra directa alternada, no hubo efecto sinérgico en la mayoría de las combinaciones. El carácter saprófito de las bacterias antagónicas fue comprobado mediante la reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco y pudrición de tubérculos de papa, ambas pruebas resultaron negativas. La germinación de semillas de chile, tomate, maíz, calabaza y coliflor no se vió afectada, únicamente la semilla de chícharo fue afectada en su germinación. Los bioensayos con los cinco aislamientos bacterianos en mazorcas de maíz con granos en estado lechoso, mostraron protección contra *A. flavus* en un rango de 74.4% a 96.8% respecto al 100% de infección que tuvo el testigo. En invernadero y campo los aislamientos Co-47 y Co-81 mostraron tener buen efecto protector contra la infección de *A. flavus*. El componente activo involucrado está relacionado con la presencia de sideróforos para los aislamientos Co-47, Co-81, y Tez-118; pero no para el Tez-226, además el componente activo del aislamiento Co-47 fue proteico y de carácter termolábil. Los aislamientos bacterianos provenientes de la rizosfera del maíz son saprófitos, con potencial antagónico para el control biológico de *A. flavus*.

## LISTA DE APÉNDICES

Apéndice	Página
1. Medios de cultivo para bacterias y hongos . . . . .	111
2. Tablas de lectura de resultados de: A) API 20 E y B) API 20 NE. . . . .	116
3. Escala de Mac Farland para la preparación de suspensiones bacterianas. . . . .	118
4. Medio mínimo para la detección de sideróforos. . . . .	119
5. Medio Universal de Cromo Azurol (CAS) para la detección de sideróforos. . . . .	120
6. Método de Lowry para cuantificar proteínas. . . . .	121
7. Método de extracción del componente activo en solución acuosa . . . . .	122
8. Cálculos para la cuantificación de proteínas presentes en el extracto crudo . . . . .	123

## I. INTRODUCCIÓN

En México se desarrolló una gran civilización en la antigüedad, original e independiente basada en el maíz. La palabra maíz proviene de "*mahiz*", dialecto de aborígenes de Haití, en náhuatl se conocía como *Tlayolli* y en maya como *Ixi*.

Carlos Linneo lo describió y clasificó con el género *Zea* y especie *mays*, y desde entonces se conoce en la ciencia como *Zea mays* L. (Castañeda, 1990).

El consumo de maíz, como alimento principal, se dió al hacerse sedentarios los pobladores mesoamericanos (Castañeda, 1990). El maíz es una planta tan domesticada que no puede reproducirse por sí misma dadas sus características biológicas y agronómicas, y desaparecería si el hombre lo dejara de sembrar y cultivar. Se reconoce como originario de Mesoamérica, aunque su domesticación pudo realizarse de modo simultáneo y autónomo en otros lugares del continente. Su migración posterior explica la gran diversidad de razas, variedades, colores y tamaños; así como su capacidad para adaptarse a diferentes climas y condiciones, desde ecuatoriales hasta subárticos, incluyendo zonas áridas.

El maíz ha sido modelo para explicar leyes, aplicaciones agronómicas y para la creación de nuevas tecnologías. Ha significado trabajo, moneda, pan y religión para muchos pueblos, y su escasez ha traído problemas sociales. Es un bienestar económico para países autosuficientes o exportadores, quienes lo venden a los países dependientes o compradores, ya que es materia prima para la producción de carne, leche, huevo y como insumo en la industria básica y complementaria, pues interviene en alrededor de 800 artículos usados por el hombre (Castañeda, 1990).

Al establecer monocultivos para satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos, se ha roto el equilibrio ecológico, y han aparecido enfermedades y plagas que bajan la producción. Las pérdidas ocasionadas por hongos, bacterias y virus llegan al 9 % de la cosecha mundial. Los virus y los hongos, los más numerosos fitopatógenos, ocasionan enfermedades severas, difíciles de controlar.

La plántula de maíz es atacada por hongos como *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*, sufriendo ahogamiento o "damping-off" y pudriciones de raíz cuando la planta es adulta. En tallos y hojas, hay hongos como la "roya" *Puccinia graminis* que causa infecciones severas; *Helminthosporium* produce tizones; *Cephalosporium* y *Macrophomina* que originan pudriciones de tallo. La espiga es afectada por hongos como *Sphacelotheca reiliana* que producen carbonos, o *Ustilagoideia virens* que es un falso carbón (Shurtleff, 1980).

La mazorca y granos del maíz son infectados por hongos como *Gibberella*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Claviceps*, *Ustilago*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, los tres últimos géneros, además producen toxinas con efecto necrótico, cancerígeno y teratógeno para el hombre y los animales (F.A.O., 1990).

*Aspergillus flavus* causa pudriciones severas que se inician en el campo, y se incrementan cuando las mazorcas se almacenan a una humedad arriba del 16%; la infección aumenta en mazorcas dañadas por insectos, pájaros, roedores o el hombre, en plantas acamadas y con mala cobertura de las brácteas donde las mazorcas quedan expuestas a humedad ambiental.

En la presente Introducción trataremos en primer lugar al patógeno *A. flavus*, después los métodos de control en general, al control biológico en particular y por último a las bacterias antagónicas usadas en este último método de control y que son nuestro objetivo de estudio en este trabajo.

## 1. *Aspergillus flavus* Link ex Fries.

Hongo deuteromicete con fase sexual desconocida, es capaz de infectar cereales, oleaginosas y otros granos. Se manifiesta desde el campo y en los almacenes ocasiona daños mayores a granos consumidos por animales o humanos. Además, produce micotoxinas que son metabolitos secundarios tóxicos, como las aflatoxinas, ácido aspergílico, aflatoxicol, etc. que al ser ingeridos dañan la salud.

Este hongo es un saprófito oportunista y requiere de condiciones específicas para invadir tejido vegetal en el campo y convertirse en un patógeno problema para la industria alimentaria (F.A.O., 1990).

### 1.1. Taxonomía

El género *Aspergillus*, tiene conidióforos largos de pared delgada producidos a partir de una célula del pie hifal, que terminan en vesículas o cabezuelas rodeadas de una (uniseriada) ó 2 hileras (biseriada) de esterigmas o fiálides que producen esporas asexuadas o conidios. Los esterigmas primarios son delgados, oscuros y en la punta producen conidios (Wyllie and Morehouse, 1977).

Thom y Church (1926) escribieron la primera monografía del género *Aspergillus*, y lo clasificaron en grupos con base en las similitudes con los hongos más comunes viejos o las especies más representativas. Por ejemplo, el grupo *Aspergillus niger* incluye todas las especies con cabezas conidiales negras.

El concepto de grupo fue adoptado por Thom y Raper (1945) y ampliado por Raper y Fennel (1965), para incluir las especies recientemente descubiertas y descritas. Este sistema de grupo simplifica la determinación de aislamientos de *Aspergillus* a nivel de especie. Reconocieron 132 especies, que separaron en 18 grupos, algunos pequeños como los de *A. candidus* y *A. terreus* con una sola especie; otros grandes como el de *A. nidulans* con 19 especies y *A. versicolor* con 17 especies.

Czapek agar es un medio útil para identificar muchas especies de *Aspergillus*, en él esporulan abundantemente mostrando el color característico de sus cabezuelas conidiales, rara vez se requiere emplear extracto de malta agar para la formación de esclerocios. Algunos miembros del grupo *A. glaucus* y *A. restrictus* requieren 20% a 40% de sacarosa en lugar del 3% que normalmente se usa en el medio de Czapek (Raper and Fennel, 1965).

*A. flavus* se caracteriza por producir colonias verde-amarillentas, usualmente con fiálides biseriadas, conidios finamente rugosos, de tamaño y forma variable y esclerocios de color café rojizo. A diferencia, *A. parasiticus* desarrolla colonias verde oscuro, con fiálides uniseriados, generalmente sin esclerocios y sus conidios son

marcadamente rugosos. A ninguna especie del grupo *flavus* se le conoce estado perfecto (Wyllie and Morehouse, 1977).

*A. flavus* se aísla fácilmente en diferentes medios y temperaturas, pero para aislarlo de granos de maíz, el medio recomendado es a base de papa-dextrosa-agar (PDA) con tergitol NPX adicionado con clorotetraciclina e incubado a 20°C y 30°C. Bothast y Fennel (1974) desarrollaron un medio para el aislamiento e identificación de *A. flavus* y *A. parasiticus*, en este medio se produce un pigmento amarillo y hay poca esporulación.

## 1.2. Importancia económica

Los problemas económicos ocasionados por *A. flavus* se deben a las aflatoxinas (AF) en los alimentos de animales y del hombre. Hay pocos estudios y estadísticas incompletas sobre este tema, las pérdidas varían según el año y el país. Mannon y Johnson (1985) estiman que de 10% a 50% de los cereales contaminados provienen de África y del Extremo Oriente.

Varios países rehusan reconocer pérdidas y niegan su existencia por motivos comerciales, esto dificulta evaluar el problema ocasionado por *A. flavus*. Cuando hay pérdidas durante un embarque de productos, ni las aseguradoras marítimas, ni las fuentes gubernamentales publican ningún dato. Los expertos hacen extrapolaciones, a menudo arriesgadas sobre las consecuencias económicas y comerciales del problema derivado de los hongos toxicógenos (Jemmali, 1987).

Un producto agrícola contaminado, reduce su valor comercial y no hay ganancias para el productor, como consecuencia, el intermediario ganará menos por los productos rechazados, decomisados o vendidos con descuento; esto trae una pérdida potencial de mercado y de materia prima. Por último, al ingerir alimentos contaminados hay pérdidas económicas por reducción de peso, susceptibilidad a otras enfermedades y muerte en animales, y las pérdidas en el hombre son por inasistencia al trabajo, gastos médicos, hospitalización y muerte (Jemmali, 1987).

A nivel internacional es difícil concertar acuerdos satisfactorios sobre producción agrícola y convenios sobre productos y seguridad alimentaria.

## 1.3. Ciclo

### a. Mecanismos de penetración

*A. flavus* es un hongo de distribución mundial, desde países altamente tecnificados, hasta los que están en vías de desarrollo. Está en el aire, suelo, en almacenes de granos que no desinfectan paredes, en herramientas, muebles, etc., que son lugares donde reposan las esporas del hongo.

La infección natural se inicia con el inóculo primario en forma de esclerocios o conidios en el suelo agrícola o en residuos vegetales, posteriormente cuando las condiciones ambientales son óptimas, los conidióforos producen y liberan conidios, que pueden ser transportados por viento o la salpicadura del agua de lluvia, hasta los

estigmas de la mazorca (Wicklowsky *et al.*, 1984).

La penetración se inicia en los estigmas, con la producción de enzimas que rompen las paredes celulares. Después, el hongo llega hasta el grano y lo invade directamente, o bien penetra por medio de heridas ocasionadas por insectos. Cuando la infección avanza hacia las brácteas, se produce gran cantidad de micelio, con formación de conidióforos y conidios que son fuente de inóculo secundario y se realiza la dispersión y propagación en el campo hacia otras plantas, e inicia otro proceso infeccioso, hasta convertirse en un verdadero problema fitopatológico. El inóculo va de la cosecha a los almacenes donde se forman focos de contaminación hacia todo el grano (Jones *et al.*, 1980; Marsh and Payne, 1984).

### **b. Condiciones de patogenicidad.**

La humedad y temperatura, afectan la viabilidad de conidios, la colonización y desarrollo de *A. flavus* en los granos de maíz y su producción de aflatoxinas.

La viabilidad de los conidios depende de la humedad relativa y disminuye cuando aumenta la temperatura (Diener and Davis, 1986). Teitell (1958) encontró que de 75% a 81% de humedad relativa y de 29°C a 45°C los conidios del hongo mueren. Por otro lado, hay reportes de que *A. flavus* puede incrementar su actividad parasítica a temperaturas altas (Jones, *et al.* 1980; Lalande *et al.*, 1989). La temperatura tiene un efecto directo sobre la infección de *A. flavus* en maíz, así de 30°C a 38°C se favorece más la infección de los granos que de 21°C a 26°C. Los niveles óptimos de temperatura para la producción de aflatoxinas son de 26°C a 30°C. La penetración de los conidios por los estigmas a 30°C es factor clave para la infección independientemente de los insectos vectores.

## **1.4. Aflatoxinas**

Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios tóxicos que químicamente corresponden a bis dihidrofurano-cumarinas. No tienen olor, sabor ni color por lo que no se detectan a simple vista y son resistentes a altas temperaturas, a la pasteurización, fermentación y nixtamalización por lo que son difíciles de controlar.

Las AF son producidas por ciertas cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*. La contaminación varía según las condiciones geográficas, estacionales, del cultivo, la cosecha y almacenamiento. Los cultivos tropicales y subtropicales son más propensos a la contaminación e infección que los de regiones templadas o frías (OPS, 1979). La producción de AF se puede iniciar en el campo, antes y durante la cosecha, o bien en el almacén (Lillehoj *et al.*, 1980).

Las AF son muy peligrosas para los animales y humanos, en mg/kg causan efectos tóxicos agudos como son vómitos, diarreas, hemorragias internas y muerte, y en µg/kg ingeridas por largo tiempo causan efectos crónicos como son hepatitis, cirrosis, síndrome de Reye, inmunosupresión, malformaciones en fetos, abortos y cánceres en diversos órganos digestivos, principalmente hígado, colon, recto y páncreas. En muchas regiones del mundo, se han reportado brotes de aflatoxicosis

debido a la ingestión de productos contaminados. Estudios epidemiológicos indican una alta incidencia de tumores de hígado, en personas que ingieren de manera cotidiana alimentos contaminados con AF, como pueden ser cereales, oleaginosas, lácteos, cárnicos, especias, huevo y fruta seca.

Desde el descubrimiento de las AF, en 1960, a la fecha se han identificado alrededor de 3500 diferentes micotoxinas, sin embargo las más estudiadas son las AF, por lo que se cuenta con un amplio acervo bibliográfico que contempla: aspectos históricos, estudios fisicoquímicos, efectos en animales, plantas, hombre, alimentos contaminados; métodos de detección, destoxificación, y control; impacto económico, así como aspectos legislativos (Allcroft, 1969; Andrellos *et al.*, 1967; Asao *et al.*, 1965; Blanc, 1987; Butler and Barnes, 1963; Carnaghan *et al.*, 1963; Coomes *et al.*, 1966; Chang *et al.*, 1963; Lee *et al.*, 1969; Mann *et al.*, 1967; De long *et al.*, 1962; Diener and Davis, 1986; FAO, 1990; Fischbach and Campbell, 1965; OPS, 1979; Jemmali, 1987; Jelinek, 1987; Jewers, 1987; Leonard *et al.*, 1975; Ong, 1975; Patterson, 1977; Schoental and White, 1965; Stoloff and Trager, 1965; Trager and Stoloff, 1967; Wyllie and Morehouse, 1977; Van der Zijden *et al.*, 1962).

## 2. Métodos generales de control.

Para mantener los cultivos sanos e incrementar su productividad se han establecido métodos de control que varían según la enfermedad que se quiera evitar, el tipo de patógeno, el hospedero y la interacción entre ellos.

Los métodos de control que se aplican en general son preventivos y a veces curativos. Los tratamientos preventivos se deben aplicar antes de que la enfermedad se presente, pues la propagación de patógenos es muy rápida y difícil de controlar especialmente en condiciones ambientales óptimas para el patógeno.

Los métodos para el control de fitopatógenos pueden ser físicos, químicos, prácticas de cultivo, legales o normativos y biológicos (Agris, 1997).

### 2.1. Físicos.

El control de enfermedades por métodos físicos, involucra tratamientos de órganos vegetales, semillas y suelo mediante calor a diferente temperatura, ya sea por medio de agua caliente, a temperaturas que van desde los 35°C hasta los 54°C, con una duración de minutos a horas. Así se controlan enfermedades causadas por hongos, nemátodos, virus, micoplasmas y rickettsias.

Se emplea aire caliente entre 35°C y 40°C para tratar semillas y frutos almacenados, para secar superficies y acelerar la suberización de las heridas producidas por fricción en su manejo.

Se usan temperaturas bajas para controlar enfermedades postcosecha, sobre todo de órganos carnosos. Las temperaturas alrededor del punto de congelación no destruyen a los patógenos, pero retardan su desarrollo y su metabolismo. Muchos de los frutos y vegetales perecederos, son enfriados inmediatamente después de su cosecha, y son trasladados en vehículos con refrigeración, para conservar el producto hasta su comercialización.

Dentro de los métodos físicos se han empleado radiaciones electromagnéticas como luz ultravioleta, rayos X, rayos gamma, partículas alfa y beta; todos estos destruyen propágulos de fitopatógenos en frutos, vegetales y gramíneas postcosecha, pero la exposición a la radiación necesaria para destruir al patógeno, también daña el tejido vegetal, por lo que hasta hoy no se emplea este sistema con fines comerciales (Eckert and Sommer, 1967).

## 2.2. Compuestos químicos.

Hasta la década de los 40s el control de plagas y enfermedades se orientaba a prácticas culturales (Curl, 1963); después de la Segunda Guerra Mundial, se fabricaron productos químicos para el combate de enfermedades de las plantas, que en dosis mayores pueden ser tóxicos para las plantas, animales y hombre.

El control químico actualmente se aplica en campo, invernadero y almacén, se usan compuestos tóxicos contra hongos, bacterias y nemátodos que inhiben su germinación, desarrollo y reproducción.

La mayoría de los fungicidas y bactericidas aplicados al follaje, tienen acción protectora más que curativa, por lo que hay que aplicarlos antes de que el patógeno se establezca (Brandes, 1971). Hay muchos productos químicos para controlar patógenos del follaje, semillas, bulbos y tubérculos, tanto de la rizosfera como para desinfectar el suelo (Sharvelle, 1969).

Los pesticidas a base de cobre son muy utilizados, especialmente el caldo bordelés (hidróxido de calcio y sulfato de cobre) que produce un fungicida y bactericida efectivos. La fitotoxicidad del cobre se puede reducir al aumentar la proporción de hidróxido de calcio.

Los compuestos a base de azufre, son buenos fungicidas contra cenicillas, royas, tizones foliares y pudriciones de frutos. Las mezclas de azufre y cal tienen buen efecto para el control de varias enfermedades fungosas. Los carbamatos, compuestos a base de azufre, tienen amplio espectro para controlar enfermedades del fruto y follaje de hortalizas y se comercializan con diferentes nombres: Thiram, Ferbam, Ziram, Zineb y Maneb.

Los compuestos del tipo de las quinonas, compuestos bencénicos y heterocíclicos son efectivos contra enfermedades del suelo y el tratamiento de semillas (Evans, 1968).

Hay fungicidas sistémicos, que se absorben a través del xilema, pero no son translocados a zonas nuevas de crecimiento de las plantas, las que quedan sin protección (Erwin, 1973).

La mayoría de estos fungicidas son más efectivos cuando se aplican como tratamiento a la semilla, como humectantes de raíces o cuando se inyectan al tallo de árboles frutales (Agrios, 1997).

## 2.3. Prácticas de cultivo.

Las prácticas culturales son el método más antiguo para el control de

enfermedades en plantas, constan de diversas actividades entre las que destacan:

*Eliminación de fuente de inóculo.*

Es la exclusión de material vegetal enfermo fuera del área de cultivo. Al dejar cortes de poda infectados dentro del área de cultivo por días ó meses, se incrementa y dispersa el inóculo y se enferman plantas o árboles. La erradicación del material vegetal infectado y su quema en depósitos apropiados deberá ser inmediata a la poda.

*Eliminación de hospedantes alternos.*

Muchas de las plantas herbáceas llamadas "malas hierbas" dentro del área de cultivo, pueden actuar como hospedantes alternos de enfermedades bacterianas, fungosas, virales o de nemátodos, hay que erradicarlas para mantener el cultivo limpio y reducir las posibilidades de infección.

*Rotación de cultivos*

El agricultor siembra por períodos de 3 a 4 años una variedad o especie, y después siembra especies diferentes para que no se establezcan los patógenos, es una forma efectiva para controlar enfermedades.

*Fechas de siembra*

Los fitopatógenos tienen un comportamiento cíclico según las condiciones ambientales. Si se atrasa o adelanta la siembra, habrá condiciones ambientales desfavorables para el patógeno y se reducen las posibilidades de infección.

La aplicación de prácticas agrícolas mejora el vigor de las plantas e incrementa su resistencia a las enfermedades. La fertilización adecuada, el buen drenaje, riego suficiente y espaciamento entre plantas pueden tener un efecto sobre el control de una enfermedad determinada (Agrios, 1997).

## **2.4. Legales y normativos.**

Basado en normas regionales, estatales o del país, para regular la entrada o salida de material vegetal en condiciones de óptima sanidad. Su aplicación está dirigida al establecimiento de inspecciones y cuarentenas de plantas en el campo, invernadero o almacén, para la erradicación de la fuente de inóculo.

Los inspectores realizan inspecciones y cuarentenas cuya función es prohibir la entrada de material vegetal infectado en regiones libres de la enfermedad, evitando epifitias como "el cáncer bacteriano de los cítricos", " el tizón del castaño", "la enfermedad del olmo Holandés" y "el nemátodo enquistado de la soya" que entraron de otros países a Estados Unidos por no aplicar con precisión y eficiencia las normas cuarentenarias (Gram, 1960).

Los reglamentos establecidos por el Departamento de Sanidad Vegetal de los diferentes países, también rigen la venta de plantas en vivero, tubérculos, bulbos, semilla y otros órganos de propagación vegetativa. Los agricultores interesados en

producir y vender semillas libres de enfermedades deben someter sus productos a una inspección fitosanitaria, y en caso de encontrarse libres de la enfermedad, la agencia de inspección expedirá un certificado sobre el buen estado sanitario del material vegetal en cuestión (Gram, 1960).

### 3. Control biológico.

#### 3.1 Antecedentes históricos

El control biológico como método científico se inició a principios del siglo XIX (Wilson & Huffaker, 1976). Smith fue el primero en utilizar el concepto de "Control Biológico" para referirse a plagas presentes de manera natural o introducidas, para el control de insectos. Curl (1963) y Stevens (1960) incluyen otras formas de control no químico, basadas en el uso de variedades resistentes o tolerantes, prácticas culturales, manipulación genética para la creación de machos estériles, en el caso del control de plagas.

Biffen (1905) creó variedades resistentes a enfermedades económicamente importantes basándose en la genética mendeliana, y Wellhausen (1937) trabajó sobre el efecto de la constitución genética del hospedante sobre la virulencia de *Phytomonas stewartii*.

Hartley (1921) hizo el primer control de una pudrición de damping-off o ahogamiento de plántulas de pino en semillero causado por *Pythium* y *Rhizoctonia*. Estableció que existe un "factor biológico" donde la introducción de ciertos saprófitos (competidores microbianos) al suelo, controlaron los hongos patógenos mencionados y a la vez se mejoró el desarrollo de las plántulas.

Baker (1962) pasteurizó el suelo a una temperatura y tiempos precisos para eliminar los patógenos y muchos saprófitos residentes responsables del equilibrio microbiano, pero sobrevivieron los microorganismos resistentes al calor, en especial bacterias que forman esporas de resistencia que son importantes en procesos naturales de antagonismo.

Merriman *et al.* (1975) aumentaron la producción de cereales, maíz y zanahoria en campos australianos, por la inoculación de semillas con *Bacillus* y *Streptomyces*. Burr (1978) y Kloepper *et al.* (1980) bacterizaron semilla de jitomate con *Pseudomonas* y se inhibió el desarrollo de microorganismos deletéreos.

El interés por investigar sistemas de control biológico de las enfermedades en las plantas aumentó de esa época a la fecha, con gran cantidad de publicaciones en revistas científicas (Adams, 1990; Andrews, 1992; Baker, 1968; Blakeman and Fokkema, 1982; Backman and Rodríguez-Kabana, 1975; Calistru *et al.*, 1997; Cook, 1984; Cook, 1990; Cooksey and Moore, 1982; Chang and Kommedahl, 1968; Duplessis *et al.*, 1985; Flores *et al.*, 1997; Fravel, 1988; Fridlender *et al.*, 1993; Herrera-Estrella, 1998; Homma *et al.*, 1989; Howell and Stipanovic, 1980; Kerr, 1980; Linderman, 1983; Mitchell, 1973; Montes *et al.*, 1992; Papavizas and Lumsden, 1980; Puyesky, 1999; Scher and Castagno, 1985; Virgen y García, 1990; Weller, 1988; Wilson and Pusey, 1985; Wood and Tveit, 1955; Zavaleta *et al.*, 1993 a,b).

En los últimos años al avanzar la ingeniería genética, se han creado plantas

transgénicas con resistencia a ciertas enfermedades; esto implica la manipulación genética mediante mensajeros con capacidad de introducir genes específicos con técnicas moleculares, que hacen de las plantas organismos resistentes a los patógenos y plagas. Esta área de la ingeniería genética está en sus inicios (Cook, 1984, 1990 y 1991; Louw, 1999; Miklas *et al.*, 1996; Puyesky *et al.*, 1999; Valadés *et al.*, 2000; Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998).

### 3.2 Definición

En Fitopatología, según Baker y Cook (1974), se define como control biológico a la inhibición del patógeno mediante el uso de cualquier organismo diferente al hombre, y que toma en consideración:

- a) Uso de microorganismos residentes dentro de un ecosistema.
- b) Planta hospedante.
- c) El patógeno usado contra sí mismo.

En el primer caso, los microorganismos residentes, tienen más éxito cuando se utilizan en su lugar de origen, o en lugares con condiciones climáticas similares a las propias de las que fueron aislados.

La planta hospedante representa el sitio de interacción entre el fitopatógeno y los microorganismos saprófitos antagónicos, y dependerá de la resistencia que tenga por sí misma para soportar el ataque de fitopatógenos.

Con respecto al patógeno usado contra sí mismo, es por la introducción de cepas poco virulentas o bien de las llamadas bacterias promotoras del crecimiento, ambas desencadenan procesos de resistencia inducida en las plantas. La concepción paradójica del control biológico retarda el progreso de esta tecnología de alto nivel, que contribuye con mejores sistemas para controlar fitopatógenos.

El fundamento del control biológico, es la conservación del medio ambiente mediante la aplicación de microorganismos vivos; se consideran características del hospedante, patógeno y medio ambiente, junto con los microorganismos de la rizosfera y la filosfera. Las interacciones que se establecen entre la planta, el patógeno y microorganismos antagónicos, definen el éxito o fracaso de un sistema de control biológico. Al entender estas interacciones, se podrán implementar sistemas de control biológico con mayores posibilidades de éxito (Mitchell, 1973).

### 3.3 Métodos del control biológico

El control biológico de fitopatógenos considera: características de las plantas, microorganismos, sus componentes genéticos, o ciertas reacciones, que resultan en un fenómeno similar al de inmunidad que presentan los animales, cuando se ponen en contacto con algún agente extraño a su organismo.

**a. Uso de microorganismos vivos contra los fitopatógenos.**

La búsqueda de microorganismos antagónicos se ha incrementado en los últimos años, pues se han encontrado bacterias y hongos, que al ser aplicados al suelo, controlan de modo efectivo las enfermedades de la raíz, y también se buscan bacterias que controlen fitopatógenos de la filosfera.

Las bacterias antagónicas, deben tener características comerciales como ser inocuas a las plantas, animales, al hombre y al medio ambiente, ser de fácil manejo, económicas y de aplicación práctica.

La inoculación de patógenos poco virulentos en las plantas, desencadena una resistencia inducida, se buscan bacterias saprófitas que induzcan una reacción "inmune" y fortalezcan a las plantas para resistir la infección de los patógenos en contacto con ellas (Baker, 1987 y 1986).

Cada día se encuentran nuevos microorganismos para el control biológico de enfermedades de plantas, principalmente bacterias y hongos de la rizosfera y de la filosfera (Andrews, 1992; Gottlieb *et al.*, 1952; Hornby, 1978; Kloepper *et al.*, 1980; Kloepper and Schroth, 1981; Rouatt and Katznelson, 1961). Hay supresión natural de enfermedades en diferentes suelos ("Suelos supresivos" de patógenos), y son los microorganismos benéficos parte importante en el balance natural y fuente del control biológico (Cook, 1991).

**b. Uso de la resistencia genética a las enfermedades.**

Son métodos no contaminantes, baratos, pero de alta tecnología ya que implican el conocimiento profundo tanto del fitopatógeno por controlar, como del cultivo.

El uso de la resistencia genética del maíz contra sus enfermedades no contamina, es más barato a la larga aunque tarda más tiempo en poder aplicarse. La resistencia genética no es un fenómeno estable, sino que continuamente cambia al mutar el patógeno, y esto trae una carrera entre el cambio genético del patógeno y el desarrollo de variedades resistentes por el hombre.

La obtención de variedades resistentes es un método accesible, seguro y efectivo para controlar las enfermedades de las plantas y que ayuda a conservar el medio ambiente (siempre y cuando no se pierda la resistencia), pues no sólo evita las pérdidas por las enfermedades, sino también los gastos derivados de las aspersiones con compuestos químicos, muchos altamente residuales. Varias Estaciones Agrícolas Experimentales en diferentes países, tienen programas específicos para la formación de variedades resistentes a enfermedades importantes o difíciles de controlar cuya semilla se distribuye para beneficio de los agricultores.

La búsqueda de sistemas de control biológico está en desarrollo y es un trabajo prometedor (Adams, 1990; Baker, 1987 y Wilson and Pusey, 1985). Así como hay reglas para el uso racional de pesticidas, las debe haber para usar microorganismos que controlen fitopatógenos, especialmente con plantas y microorganismos desarrollados mediante ingeniería genética y que serán liberados en el campo.

### 3.4. Ventajas y desventajas.

El control biológico es una alternativa con ventajas y desventajas sujetas al análisis y discusión para su posible aplicación.

Dentro de las **ventajas** reconocidas para el manejo de las enfermedades por medio de organismos vivos se tienen:

- a. Inocuidad, los agentes biológicos no son tóxicos o no deben serlo, su uso no daña la microflora regional, se mantiene un equilibrio ecológico, se conserva el medio ambiente, y se benefician las poblaciones vegetales circundantes a los campos de cultivo donde se aplican.
- b. Al ser productos inocuos, el hombre puede hacer un manejo seguro durante la producción industrial y su aplicación al campo.

Como **desventajas** tenemos:

- a. Los agentes de control son difíciles de formular comercialmente por su naturaleza biológica.
- b. Requieren un manejo especializado para mantenerse viables y efectivos por largos periodos al momento de su aplicación.
- c. Pueden perder su eficaz actividad antagónica por mutaciones.
- d. Por su carácter biológico son incompatibles con productos químicos, no deben mezclarse para obtener un efecto aditivo (Linderman, 1983; Cook, 1991).
- e. Deben de ser inocuos a plantas, animales y humanos durante la producción y aplicación al campo.

### 3.5. Perspectiva industrial

Muchos de estos productos biológicos se han desarrollado científicamente sin una clara perspectiva industrial y se han explotado poco a nivel comercial. Ha habido un esfuerzo científico en la búsqueda de sistemas de control biológico, y ya es tiempo para su comercialización y explotación en beneficio del agro mundial y del entorno ecológico.

Algunas compañías privadas reconocen la necesidad de comercializar los productos biológicos para el control de enfermedades (Cook, 1991); pero otras empresas en Japón, Estados Unidos y Europa han suspendido sus programas de investigación y desarrollo debido al pequeño mercado para estos productos y al alto costo de este tipo de investigación (Adams, 1990; Baker, 1986; Cook, 1984).

Idealmente los investigadores, industriales interesados, extensionistas y comercializadores o buscadores de mercado, deberían conciliar esfuerzos para seleccionar los agentes con éxito potencial, que sean técnicamente viables y comercialmente atractivos para ser aceptados por las normas de regulación ambiental (Baker, 1986).

Hasta la fecha han sido registrados 41 productos de control biológico citados en Internet, de los cuales los 5 más conocidos son:

- a. **BINAB T** a base de *Trichoderma spp.*, para proteger las heridas por poda, de los hongos que pudren la madera (Ricard, 1981).
- b. La compañía Kodak's F-Stop tiene un producto a base de *Trichoderma*, para proteger al chícharo, frijol y maíz de los hongos causantes del damping-off (Cook, 1991).
- c. **Agrocin 84** elaborado a base de *Agrobacterium radiobacter* cepa 84, para proteger árboles frutales, estacas de rosal y crisantemo (Kerr, 1980).
- d. **DAGGER G** que es una mezcla de turba con *Pseudomonas fluorescens* para prevenir el tizón en semilleros de algodón causado por *Rhizoctonia* y *Pythium sp.*
- e. **W.R. GRACE and Company**, a base de *Gliocladium virens* para el control de *Pythium* y *Rhizoctonia* de plantas ornamentales.

#### 4. Bacterias antagonicas

Muchas bacterias controlan hongos fitopatógenos pero de modo inconsistente. El uso de bacterias dependerá de su habilidad para controlar la microflora nociva para las plantas y mantener estable su capacidad antagonica (Lambert *et al.*, 1987; Leyns *et al.*, 1990; Blakeman and Fokkema, 1982).

Algunas bacterias son efectivas en laboratorio y en el campo; o mostrar excelentes resultados en el laboratorio, pero al aplicarse al campo no tener ninguna efectividad (Baker, 1986; Kloepper and Schroth, 1981).

El primer caso de uso con éxito de bacterias como agentes de control biológico, fue *Agrobacterium radiobacter var. radiobacter* cepa 84, que controla la "agalla de la corona" producida por *A. radiobacter var. tumefaciens* en frutales y ornamentales, su uso se ha extendido por todo el mundo (Cooksey and Moore, 1982; Du Plessis *et al.*, 1985; Kerr, 1980).

Las bacterias del género *Bacillus* se han aplicado sobre una amplia variedad de plantas dando control efectivo de fitopatógenos; son fuertes candidatos para el control biológico, pues producen endosporas resistentes a altas temperaturas; así como a condiciones ambientales de desecación. Desde 1983 se comercializa un producto formulado a base de *Bacillus subtilis* A13 aislado de micelio lisado de *Sclerotium rolfsii*, que además estimula el desarrollo de las plantas y suprime fitopatógenos (Weller, 1988).

*Pseudomonas spp.* es un género con excelentes características antagonicas que ha sido estudiado por investigadores de la Universidad de California, Berkeley en la década de los 70's.

Burr *et al.* (1978) encontraron que cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida*, aplicadas a tubérculos de papa, ejercieron cierto efecto antagonico a patógenos del suelo, y mejoraron el crecimiento de las plantas. Kloepper y Schroth (1981), trabajaron con remolacha y rábano con los mismos resultados. A las cepas

aisladas a partir de la rizosfera se les nombró **Promoting Grow Plant Rhizobacteria** (PGPR), es decir bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, este término se aplica para definir bacterias con habilidad para colonizar raíces de una manera agresiva (Chang and Kommedahl, 1968; Elad and Baker, 1985; Fridlender, *et al.* 1993; Hornby, 1978; Howell and Stipanovic, 1979, 1980 y 1983).

Cepas de *Pseudomonas* fluorescentes suprimen muchos fitopatógenos como es el caso de *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, que ocasiona pudrición radicular en cereales, enfermedad, que ha ocasionado epifitias en las principales zonas de trigo en los Estados Unidos de Norteamérica (Weller, 1985).

#### 4.1. Taxonomía.

La clasificación de bacterias considera un número de características, que resulta ser más limitado, que las utilizadas para la clasificación de animales y plantas. En las bacterias no se aplica el principio que establece: "La ontogenia recapitula a la filogenia"; tampoco existen registros fósiles suficientes, esto aunado a la reproducción asexual, complica crear una taxonomía completa para bacterias como la del resto de seres vivos.

Se usan patrones morfológicos y metabólicos en los laboratorios de microbiología para elaborar manuales y guías de identificación de bacterias. La subdivisión morfológica de bacterias en: cocos, bacilos y espirilos es un carácter fundamental y estable, así como los patrones de producción de energía como son algunas fermentaciones específicas, metabolismo oxidativo o fotosíntesis.

Las relaciones taxonómicas hechas claves son determinantes; por ejemplo, para identificar un organismo desconocido es necesario relacionarlo con otro previamente descrito. De esta manera, por medio de colecciones de referencia con cultivos tipo, que se mantienen en ciertos laboratorios, se realizan los trabajos de identificación, a nivel de especie.

Para evitar la arbitrariedad de características importantes, algunos investigadores con ayuda de las computadoras, han retomado una propuesta hecha en el siglo XVIII, por el biólogo francés Adanson y han desarrollado la taxonomía numérica donde se establecen gran cantidad de caracteres con base en la proporción de características compartidas para cada cepa y grupo, sin dar a ninguna característica mayor peso que a otra. Este trabajo es laborioso y conduce a un significativo reagrupamiento de ciertas clases de microorganismos (Brock and Madigan, 1991).

Como la información genética se encuentra codificada en el ADN, ahora se definen las relaciones evolutivas en términos más precisos y operacionales como el grado de homología de su ADN. Estudios bioquímicos del ADN, dan una propuesta directa para medir las interrelaciones de diferentes organismos. A través de la composición del ADN se ha encontrado que para las bacterias el porcentaje G-C es de 30% a 70%. Los coeficientes de sedimentación indican que el cromosoma bacteriano es homogéneo después de fragmentarse en pequeños segmentos. Así, la composición del ADN es una característica estable, arraigada a lo largo del proceso evolutivo e importante en la identificación de bacterias.

Las bacterias con potencial para el biocontrol, se ubican en diversos géneros: *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Amorphosporangium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Pasteuria*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas*. Dada la gran diversidad de microflora en la rizosfera, filosfera y suelo es probable que un espectro amplio de cepas potencialmente efectivas, haya sido escasamente explotada (Weller, 1988).

#### 4.2. Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción en sistemas de biocontrol se refieren a las interacciones (competencia, antibiosis e hiperparasitismo/predación) entre los patógenos y los microorganismos que los inhiben o matan (Mitchell, 1973).

**Competencia.** La competencia por nutrientes presentes en exudados de las raíces, semilla y/o filosfera, probablemente ocurre en muchas interacciones entre bacterias y fitopatógenos, esta acción es responsable de un cierto control por bacterias introducidas. Grandes poblaciones de bacterias de la rizosfera reducen las fuentes de carbón y nitrógeno aprovechables, limitando así la germinación de las esporas de hongos patógenos y la colonización e infección de la raíz (Baker, 1968; Elad and Baker, 1985; Mitchell, 1973).

Muchas *Pseudomonas* fluorescentes crecen rápidamente en la rizosfera, por su versatilidad nutricional, y evitan el establecimiento de hongos fitopatógenos. Suslow (1982), sugirió que la exclusión del nicho, es un mecanismo importante en los procesos de antagonismo; ciertas áreas sobre las raíces, como los puntos de unión de las células, y los puntos de emergencia de las raíces laterales, son colonizados por muchas clases de bacterias; incluyendo las bacterias deletéreas, dada la abundancia de exudados en estos lugares de la planta.

La inoculación de bacterias de la rizosfera en un sistema agrícola, puede prevenir o reducir el establecimiento de bacterias deletéreas en esos sitios. *Agrobacterium radiobacter* var. *radiobacter* cepa 84 evita el establecimiento de *A. radiobacter* var. *tumefaciens* y, por el bloqueo físico de los sitios de infección, la reduce (Cooksey and Moore, 1982; Kerr, 1980; Duplessis et al., 1985).

**Antibiosis.** La antibiosis por la producción de antibióticos u otros compuestos, es importante en la inhibición de algunas bacterias y hongos (Kloepper and Schroth, 1981; Kloepper et al., 1980). Cuando *Bacillus subtilis* fue adicionado al suelo se redujo la infección por *Streptomyces scabies*, la bacteria produce un antibiótico similar a la subtilina, es una antibiosis por antibióticos (Gottlieb et al., 1952). *B. subtilis* también fue usado contra *Monilinia fructicola* con éxito (McKeen et al., 1986).

Agrocin 84 es un antibiótico producido por *A. radiobacter* var. *radiobacter* cepa 84, que controla la infección por *A. radiobacter* var. *tumefaciens* en tejido que pudiese estar dañado. La fenacina (dímero de fenacina-1 carboxilato, también reportado como forma monómera) es producida por algunas *Pseudomonas fluorescens* y suprime la infección por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* en trigo a concentraciones menores de 1 mg/mL en pruebas *in vitro*, además también tiene

acción contra otros patógenos de la pudrición del tallo del trigo (Cooksey and Moore, 1982; Duplessis *et al.*, 1985; Kerr, 1980; Weller, 1985).

Howell y Stipanovic (1980) demostraron que la piolutorina y la pirrolnitrina, antibióticos obtenidos de *P. fluorescens* pf-5, protegen al algodón contra el damping-off inducido por *Pythium ultimum* y por *Rhizoctonia solani*, igual que las bacterias adicionadas al suelo. *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*, controla la pudrición del tallo del chícharo por *Rhizoctonia* mediante el antibiótico gelandamicina (Gottlieb, *et al.*, 1952; Howell and Stipanovic, 1979, 1980 y 1983).

**Hiperparasitismo.** Los términos hiperparasitismo, micoparasitismo, parasitismo directo y parasitismo interfungoso, se utilizan indistintamente para referirse al parasitismo de un hongo o bacteria sobre otro hongo, el microorganismo con esta actividad se conoce como hiperparásito (Boosalis, 1964).

Los hiperparásitos se clasifican en dos grandes grupos según su modo de acción y sus efectos sobre el hospedante: el grupo biótrofo obtiene sus nutrientes de células vivas, estos parásitos pueden matar a sus hospedantes o una parte de ellos, o causar poco daño y no ser perceptibles.

El segundo grupo de hiperparásitos, es el necrotrófico, son los hongos o bacterias que obtienen sus nutrientes de células muertas. Usualmente este tipo de parásitos mata las células del hospedante antes de invadirlo.

Los 3 mecanismos de hiperparasitismo son diversos y complejos: a) cuando forma haustorios dentro de las células del hospedante; b) por la disolución enzimática de las paredes del hospedante, y c) por la formación de pequeñas células de contacto llamadas "buffer" en la punta de la hifa parasítica, en este contacto se aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática y se facilita el paso de nutrientes del hospedante hacia el hiperparásito (Boosalis, 1964; Mitchell & Alexander, 1963; Morgan, 1963; Papavizas and Lumsden, 1980).

#### 4.3. Condiciones para su actividad

Para que las bacterias antagónicas tengan una actividad óptima, las condiciones ambientales son determinantes, hay una diferencia marcada, entre las bacterias antagónicas de la rizosfera y las de la filosfera. Hay características específicas que permiten la colonización de estos nichos, según las condiciones microclimáticas y nutricionales que se establezcan (Andrews, 1992; Weller, 1988).

El microclima de la filosfera abarca unos pocos milímetros sobre la superficie de la hoja. El filoplano es un ambiente dinámico, que depende de variables cíclicas y no cíclicas, incluye: temperatura, humedad relativa, rocío, lluvia, viento y radiación. Un cambio de las variables anteriores puede ocurrir, por ejemplo: la temperatura superficial puede diferir por algunos grados, cruzando la superficie de la hoja, dependiendo del grosor de la capa límite y de las características morfológicas superficiales de la misma (Ayres, 1935; Barnett and Lilly, 1958; Burrage, 1971; Burrage, 1976).

En contraste la raíz tiene un ambiente denso y poroso cuyo carácter "buffer"

protege al rizoplasma de los cambios ambientales bruscos, las raíces y sus microorganismos asociados, viven en un ambiente mucho más estable que el de las hojas; por tanto se puede tener un control más efectivo (Box and Hammond, 1990).

En el filoplasma los nutrientes se originan endógena o exógenamente y se conforman por: carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, alcoholes, elementos minerales traza, vitaminas y hormonas; así como compuestos antimicrobianos como fenoles y terpenos. Los nutrientes tienen un papel directo como sustratos microbianos, y otro indirecto para la síntesis de antibióticos y/o sideróforos sobre el filoplasma (Fiala *et al.*, 1990; Garber and Hutchinson, 1988; Tukey, 1970).

El ambiente nutricional del rizoplasma es diferente al de la hoja, muchos exudados radiculares se originan de tejido joven, en la región de crecimiento, y son químicamente más complejos y profusos que los encontrados en el filoplasma. Los microorganismos en esta zona, se desarrollan en un ambiente rico en energía, lo cual facilita su colonización y supervivencia (Andrews, 1992).

Comparando el potencial de colonización de la filosfera y de la rizosfera, en las raíces es mucho mayor que en las hojas, pues las condiciones microclimáticas y nutricionales son mejores que en el filoplasma (Andrews, 1992; Blakeman and Fokkema, 1982).

#### 4.4. Estado actual del control biológico en México

La investigación de control biológico en Fitopatología en México está en etapa inicial, la mayoría de los trabajos son sobre el posible uso de microorganismos antagónicos y la aplicación de extractos y/o residuos vegetales, muchos de éstos se han realizado en laboratorio e invernadero (Carrillo *et al.*, 1991; Casarrubias y Frias 1992; Fucikovsky *et al.*, 1989; Khalil, 1991; López y González, 1990; Roncal *et al.*, 1991; Salazar *et al.*, 1994; Samaniego, 1991; Tovar y Gaona, 1993; Zavaleta-Mejía, *et al.*, 1989; Zavaleta-Mejía *et al.*, 1993) y muy pocos a nivel de campo (Carrión *et al.*, 1992; Castrejón y González, 1994; Montes *et al.*, 1992; Torres-Barragán *et al.*, 1994).

Carrión y colaboradores (1992) redujeron la infección por *Hemileia vastatrix*, causa de la roya del café, por la aspersión mensual de conidios de *Verticillium lecanii* a diferentes concentraciones, con resultados prometedores.

La aplicación de *Bacillus subtilis* a la semilla de sandía, redujo la infección por *Fusarium oxysporum* (Virgen y García, 1990).

La adición de filtrado de *Helminthosporium tritici-repentis*, sobre plantas con roya de la cebada, *Puccinia graminis* redujo el desarrollo final de la enfermedad en un 40% e incrementó la producción de grano.

La micorrización de plantas de cebolla con *Glomus sp.*, retardó el inicio de la pudrición blanca, por *Sclerotium cepivorum*, dando protección significativa contra la enfermedad durante las primeras semanas después del trasplante. Castrejón y González (1994), encontraron que la micorrización de la cebolla aumenta la producción de los bulbos (Torres *et al.* 1994).

El control de fitopatógenos por la adición de residuos ó extractos vegetales, se

ha estudiado con mayor intensidad en los últimos 10 años. Hay diversos metabolitos tóxicos de plantas que actúan como antagonistas de fitopatógenos y plagas (Montes, 1997; Montes *et al.*, 1992). Se puede explotar este potencial antimicrobiano de ciertas plantas, por rotación de cultivos, asociación y/o incorporación de sus residuos al suelo, o por la preparación de infusiones de sus tejidos. Destacan los trabajos de Zavaleta-Mejía y colaboradores, que han demostrado que la rotación e incorporación de residuos de cempoaxóchitl al suelo, o su asociación con chile o jitomate, disminuyen significativamente: a) la cantidad de agallas en raíz por *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita*, b) se reducen los insectos vectores de virus, principalmente ácaros y mosquitas blancas, esto disminuye la virosis, en dichas hortalizas y c) reducir el daño causado por *Alternaria solani* en follaje y fruto (Rojas-Martínez *et al.*, 1994).

Hay pocos trabajos de investigación sobre control biológico de fitopatógenos realizados en México, ya sea por uso de microorganismos o por la adición de extractos vegetales; se requiere mayor continuidad en los trabajos de laboratorio e invernadero, para probar su potencial en campo y que los resultados sean aplicados a nivel comercial por los productores, en beneficio de la población (Zavaleta y Ochoa, 1992; Zavaleta *et al.* 1993 a,b).

## II. OBJETIVOS

1. Buscar bacterias con capacidad antagónica contra *Aspergillus flavus*.
2. Cuantificar el efecto antagónico contra *A. flavus* de bacterias aisladas de la rizosfera y filosfera del maíz en condiciones de laboratorio.
3. Identificar los aislamientos bacterianos con actividad antagónica contra *A. flavus*.
4. Determinar el efecto fungicida ó fungistático de las bacterias antagónicas sobre *A. flavus*.
5. Conocer la acción inhibitoria de las bacterias antagónicas sobre diversos hongos fitopatógenos.
6. Bioensayos a nivel laboratorio en mazorcas de maíz con granos en estado lechoso para establecer la capacidad infectiva del hongo y protectora de las bacterias.
7. Comprobar el efecto deletéreo o inocuo y carácter saprófito de los aislamientos bacterianos antagónicos, sobre diferentes especies vegetales.
8. Determinar el grado de protección contra la infección de *A. flavus* en pruebas de invernadero y campo.
9. Caracterizar el componente activo, producido por los aislamientos más eficientes.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 Aislamiento de *Aspergillus flavus*.

Se aisló *A. flavus*, a partir de semilla de maíz contaminada, de la bodega rural "Las Yescas", Estado de Tamaulipas, para ello se desinfestaron 50 semillas con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos y se dieron dos lavados con agua destilada esterilizada (Armentrout, 1988). Seis granos se distribuyeron simétricamente en cajas de Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) (Apéndice 1a) y se incubaron a 28°C hasta la aparición de colonias fúngicas típicas de *A. flavus*.

Se identificó *A. flavus*, por las características macroscópicas y microscópicas del hongo, según las claves de Raper y Fennell (1965).

#### 3.2 Muestreo de suelo agrícola de maíz.

El muestreo de suelo de rizosfera se efectuó en tres parcelas dedicadas al cultivo de maíz, dos de ellas localizadas en el Estado de México, y la tercera en el Estado de Guanajuato, con la siguiente localización:

Parcela 1. Tezoyucan, Km 35 carretera Lechería-Texcoco.

Parcela 2. Cocotitlán, carretera Cocotitlán-Juchitepec Municipio de Chalco.

Parcela 3. Bajío, carretera Celaya-Irapuato.

Para muestrear el suelo de la rizosfera se tomaron de cada parcela, al azar, 15 plantas de maíz en estado fenológico de madurez completa; cada planta se extrajo con todo y raíz, así como de 500 a 1000 g de su suelo adherido. Las muestras se depositaron en bolsas de plástico de 30 x 40 cm etiquetadas y se colocaron en un refrigerador a 4°C para evitar alteraciones en la microflora bacteriana, por efecto de la actividad metabólica de microorganismos en el proceso de descomposición de la materia orgánica.

Se muestreó suelo dedicado al cultivo de maíz, para obtener colonias bacterianas nativas adaptadas al cultivo y que puedan tener mejor éxito en mecanismos de control contra *A. flavus*.

#### 3.3 Aislamiento y selección de bacterias antagónicas.

La selección de bacterias con actividad antagónica contra *A. flavus* se efectuó en dos etapas que fueron:

1a. Del total de bacterias aisladas del suelo en los puntos de muestreo.

2a. De las antagónicas probadas individualmente contra *A. flavus*.

## Primera etapa de selección

### a. Del suelo

Se pesaron 10 g de suelo de rizosfera de cada punto de muestreo, y se mezclaron con 95 mL de agua destilada esterilizada, agitando vigorosamente y sin dejarlo sedimentar se hicieron una serie de diluciones, tomando 0.1 mL de la suspensión original, para adicionarle 0.9 mL de agua destilada esterilizada, hasta obtener una dilución de  $1:10^7$ . A partir de esta dilución se pipeteó 0.1 mL de la solución y se sembró en medio de cultivo B de King (King *et al.*, 1954) (Apéndice 1 d), distribuyéndose homogéneamente en la superficie del medio de cultivo con una varilla de vidrio triangular. Las cajas fueron incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias bacterianas (García, 1981; Johnson *et al.*, 1960; Leben *et al.*, 1965).

Se seleccionaron todas las colonias bacterianas que se desarrollaron en las diferentes cajas, con base en su aspecto, color, tamaño y textura; teniendo cuidado de no repetir la misma colonia.

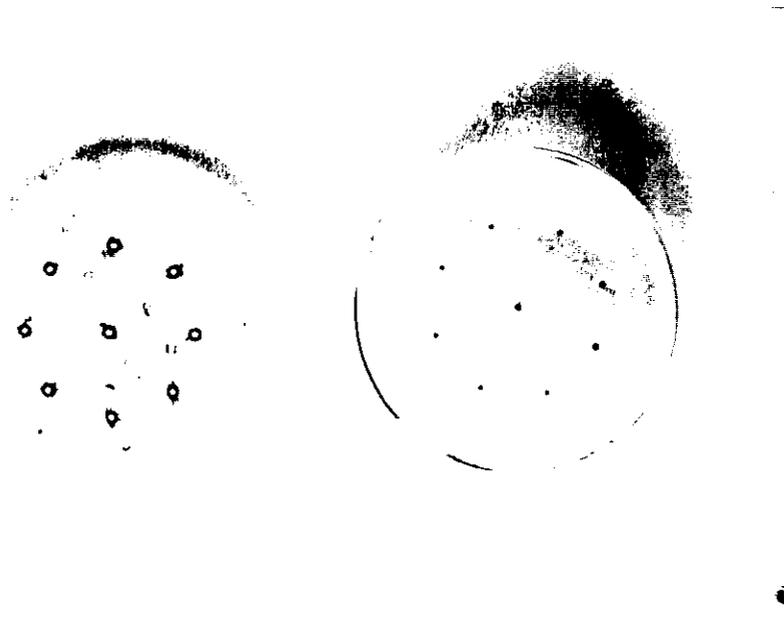
*Co* hace referencia a las colonias obtenidas en parcelas de la localidad de Cocotitlán, *Tez* a las parcelas de Tezoyucan y *Ba* a las del Bajío.

Para probar la capacidad inhibitoria de las colonias bacterianas seleccionadas contra *A. flavus* se realizó siembra directa, es decir; las colonias desarrolladas en la placa sembrada con la dilución  $10^{-7}$  se iban probando inmediatamente sin hacer transferencia y conservación (como normalmente se acostumbra), esto con el propósito de ahorrar medio de cultivo y tiempo. Con la punta de una aguja de disección se tocó una colonia de *A. flavus* de cinco días de desarrollo, y una vez impregnada de conidios, se tocó la superficie del medio de cultivo en el centro de la placa de PDA; se requirió cuidado para que la punta de la aguja no se impregnara en exceso de conidios, ya que se hubieran desarrollado colonias por toda la placa y no una sola colonia como se espera. Después de 48 horas de desarrollo de la colonia fungosa, en torno a ésta, a una distancia de 2.5 cm se sembraron por punto los aislamientos bacterianos, utilizando una asa bacteriana recta con el extremo en forma de L, la punta hizo contacto con la colonia bacteriana y con la punta del asa impregnada de bacterias se tocó la superficie del medio de cultivo en un punto previamente marcado por la parte posterior de la caja de Petri.

Se seleccionaron las bacterias que indujeron una zona de inhibición del hongo. En cada placa se probaron 12 colonias bacterianas diferentes (Figura 1).

Ya comprobada la actividad antagónica de las bacterias, se procedió a la transferencia de la colonia bacteriana original (de la placa con las colonias de la dilución  $10^{-7}$ ) en medio de cultivo B de King para tenerla en cultivo puro, y conservarla para lo cual se preparó por triplicado una suspensión bacteriana de  $3 \times 10^9$  células/mL en una solución salina al 0.85% para su conservación a 4°C hasta su utilización en los ensayos de antagonismo propuestos.

Este método descrito, fue utilizado para el aislamiento y selección de bacterias antagónicas aisladas de los estigmas y brácteas de la mazorca de maíz.



**Figura 1.** Placa con PDA marcada de acuerdo al patrón (izquierda) y patrón de siembra de aislamientos bacterianos en puntos equidistantes, al centro *A. flavus* (derecha).

**b. De los estigmas**

Se pesaron 10 g de estigmas de mazorcas de maíz, compradas en la Central de Abastos de la Ciudad de México, para aislar las bacterias. Los estigmas se molieron a baja velocidad por 30 segundos con 95 mL de agua destilada esterilizada, en una licuadora. De la suspensión obtenida se elaboraron una serie de diluciones; se midió 0.1 mL de una concentración de  $10^{-6}$  y se sembró en medio B de King distribuyéndose en la superficie mediante una varilla de vidrio triangular y se incubó a  $28^{\circ}\text{C}$ , hasta la aparición de colonias bacterianas. Se procesaron un total de 60 muestras. La selección de bacterias y su capacidad antagónica fue probada de la manera descrita en la sección 3.3 a.

**c. De las brácteas.**

Se pesaron 10 g de brácteas externas de mazorca del maíz, cortadas en fragmentos de  $2\text{ cm}^2$ , se dejaron reposar con 100 mL de agua destilada esterilizada, durante 30 minutos y después se agitó vigorosamente durante 1 minuto con una varilla de vidrio. Con la suspensión se hicieron diluciones y de la  $10^{-6}$ , se sembró 0.1 mL en medio B de King, se distribuyó homogéneamente en la superficie con una varilla

de vidrio triangular e incubó a 28°C hasta la aparición de colonias bacterianas. Se procesaron 60 muestras. La selección de bacterias y su capacidad antagónica fueron realizadas de la manera descrita en sección 3.3 a.

**d. Bacterias con capacidad antagónica comprobada.**

Se usaron aislamientos bacterianos con capacidad antagónica conocida contra diversos fitopatógenos y se probaron contra *A. flavus*. Las bacterias eran del cepario del Instituto de Edafología del Colegio de Postgraduados y del Laboratorio de Fitopatología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y fueron:

**Cepa 11 Ps.** Proporcionada por el Dr. Ronald Ferrera del Colegio de Postgraduados, Montecillos Estado de México. Esta cepa ha probado tener actividad antagónica contra hongos fitopatógenos como: *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium* y *Sclerotinia*.

**Cepas B (1, 2 y 3)** Proporcionadas por la Biól. Cristina Castro, de La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. con actividad antagónica contra *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*.

**Cepa Bp-1.** Proporcionada por el M.en C. Isaac Luna actualmente Doctorante en el Instituto de Biología de la U.N.A.M. Esta cepa tiene actividad antagónica contra ciertas bacterias fitopatógenas como: *Clavibacter michiganense*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas solanacearum* y *Erwinia carotovora*.

**Cepa B-4** Proporcionada por el M.en C. Isaac Luna con actividad antagónica contra *Sclerotinia* y *Fusarium*.

La actividad antagónica se realizó por el método descrito en la sección 3.3 a.

### 3.4 Cuantificación de la capacidad antagónica sobre *A. flavus*

#### Segunda etapa de selección

Para cuantificar la actividad antagónica de los aislamientos bacterianos seleccionados, tanto en la **primera etapa** como de aquellos con actividad antagónica comprobada contra diferentes fitopatógenos, se sembraron por separado y triplicado del siguiente modo:

Se sembró cada aislamiento bacteriano, en la superficie del medio PDA, siguiendo un círculo de 5.5 cm de diámetro. Después se sembró *A. flavus* al centro según la metodología expuesta en la sección 3.3 a. Las placas se incubaron a 28°C y se registró el diámetro de crecimiento de *A. flavus*, cada 24 horas por 8 días, tiempo suficiente para ver el efecto inhibitorio de las bacterias sobre este hongo; como testigo

se sembró sólo el hongo por triplicado. Para evaluar diferencias significativas, entre la capacidad de inhibición de los diferentes aislamientos probados, se realizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis (Zar, 1985).

Se seleccionaron aquellas bacterias que produjeron una reducción menor al 50 % del diámetro de la colonia de *A. flavus* respecto al testigo, cuando este alcanzó su máximo crecimiento.

### 3.5 Espectro de acción de las bacterias antagónicas sobre hongos fitopatógenos.

Para determinar el espectro de acción de las bacterias antagónicas sobre diferentes géneros de hongos fitopatógenos se seleccionaron los aislamientos bacterianos con mayor capacidad antagónica: Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226, Ba-72 y Ba-252. Los hongos fitopatógenos incluidos en este ensayo fueron: *Colletotrichum lindemuthianum* aislado de hojas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*); *Curvularia sp.* aislado de mancha foliar en hojas de cebolla (*Allium cepa*); *Fusarium sp.* aislado de plántulas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con síntomas de damping-off; *Helminthosporium sp.* aislado de hojas de maíz (*Zea mays*) con síntomas típicos de tizón; *Penicillium sp.* aislado de fruto de naranja (*Citrus*); *Pestalotia sp.* aislado de mancha foliar del cafeto (*Coffea arabica* L.); *Phoma sp.* aislado de mancha foliar de plátano (*Musa sapientis* L.); *Phytophthora cinnamomi* aislado de raíces de aguacatero (*Persea indica* Mill.) con síntomas de "tristeza del aguacatero"; *Rhizoctonia solani* aislado de síntomas de "costra negra" de la papa (*Solanum tuberosum* L.); *Sclerotium cepivorum* aislado de cebolla (*Allium cepa*) con síntomas de pudrición blanca y *Sclerotinia sclerotiorum* aislado del girasol (*Helianthus annuus*) con síntomas de "Pudrición blanda del capítulo del girasol", todos depositados en el cepario del Laboratorio de Fitopatología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del I.P.N.

Cada aislamiento bacteriano se sembró de manera independiente, en uno de ocho puntos en circunferencia de 2.5 cm de diámetro, en medio PDA, siguiendo la metodología aplicada en el punto 3.3 a, al centro del círculo se sembraron los hongos con excepción de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora cinnamomi*, que fueron sembrados con un cilindro de la colonia fungosa obtenida con sacabocado de 5 mm de diámetro. El ensayo se realizó por triplicado y las cajas se incubaron a 28°C durante 10 días, se midió el diámetro final alcanzado por cada hongo. Como testigos se sembraron, en PDA por triplicado, los hongos fitopatógenos. Se aplicó análisis de varianza a los resultados.

### 3.6 Mecanismos de acción

#### a. Fungistática ó fungicida.

La determinación del efecto fungistático ó fungicida, producido por las bacterias antagónicas, incluidos aislamientos de rizosfera, filosfera y de actividad comprobada, se estudió con tres diferentes ensayos:

- i) El primer ensayo consistió en la preparación de suspensiones bacterianas y

del hongo. Se hicieron suspensiones con cada aislamiento bacteriano antagónico (Co-47, Co-81, Co-165, Ba-205, Ba-72, Ba-53, Ba-252, Ba-118, Tez-226, Tez-227, Es-169, Es-383, Br-576, 11Ps y B-4) a una concentración de  $3 \times 10^7$  células/mL; por otro lado, se preparó una suspensión de *A. flavus* a una concentración de  $3.5 \times 10^5$  conidios/mL. Las suspensiones de bacterias y del hongo se mezclaron en proporción 1:1, con la mezcla resultante se sembró 0.1 mL al centro de una caja de Petri con PDA. Como testigo se sembró *A. flavus* de la suspensión original del hongo diluida 1:1 con agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a 28°C durante 6 días. Todo el ensayo se hizo por triplicado. Si las bacterias tenían capacidad fungicida no dejarían crecer al hongo, y si tenían actividad fungistática iban a permitir su desarrollo en menor grado respecto al testigo.

ii) En el segundo ensayo, se sembró 0.1 mL (concentración de  $3.5 \times 10^5$  conidios/mL) de *A. flavus*, al centro de 48 cajas de Petri con PDA (3 repeticiones de cada uno de los 15 aislamientos bacterianos, más 3 del testigo), se incubaron 48 horas. Cuando la colonia fungosa creció a 2.5 cm de diámetro, se inundó cada placa con una suspensión de  $3 \times 10^7$  bacterias/mL de cada cepa antagónica por separado, el exceso de suspensión fue decantado y eliminado, se incubaron las placas otras 48 horas a 28°C. Al término de este periodo, con una aguja de disección curva, se hizo un corte en herradura de 3 cm, en nuevas cajas de Petri con PDA, se levantó cada lengüeta de medio, y se colocó por abajo en el vidrio del fondo, un cuadrado de PDA con parte de la colonia fungosa y bacteriana, se cubrió con la lengüeta de PDA para que el hongo creciera a través del medio y se purificara de bacterias que no crecen a través de él. De este modo, en las placas donde logre crecer el hongo más lentamente que el testigo, se considera un efecto fungistático, y en caso de que no crezca por haber sido destruido por las bacterias antagónicas habrá un efecto fungicida.

iii) Para el tercer ensayo se consideraron sólo 5 aislamientos bacterianos con el mejor efecto antagónico. Se hicieron microcultivos, en una placa de vidrio con nueve cavidades, de 2 cm de diámetro x 0.5 cm de profundidad, y se les puso PDA. En el 50 % de la superficie de cada cavidad con PDA, se sembró, por estría y por separado, cada bacteria con actividad antagónica: Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226, y Ba-72 (Figura 2) y se incubaron a 28°C por 48 horas. En la otra mitad de cada cavidad con PDA, se puso una gota de conidios de *A. flavus*, a una concentración de  $3 \times 10^5$ , y se volvieron a incubar 72 horas. Para conocer el efecto de las bacterias antagónicas sobre los conidios, se tomó una parte del PDA del sitio donde fue colocada la gota de suspensión de conidios, y se transfirió a otra caja de Petri con PDA y se incubó a 28°C por 6 días para checar su viabilidad.

Como testigo se sembró al hongo en toda la superficie de una cavidad completa con PDA, por triplicado, y se tomó una parte del medio con conidios con una aguja de disección, se depositó en una caja con PDA y se incubó.

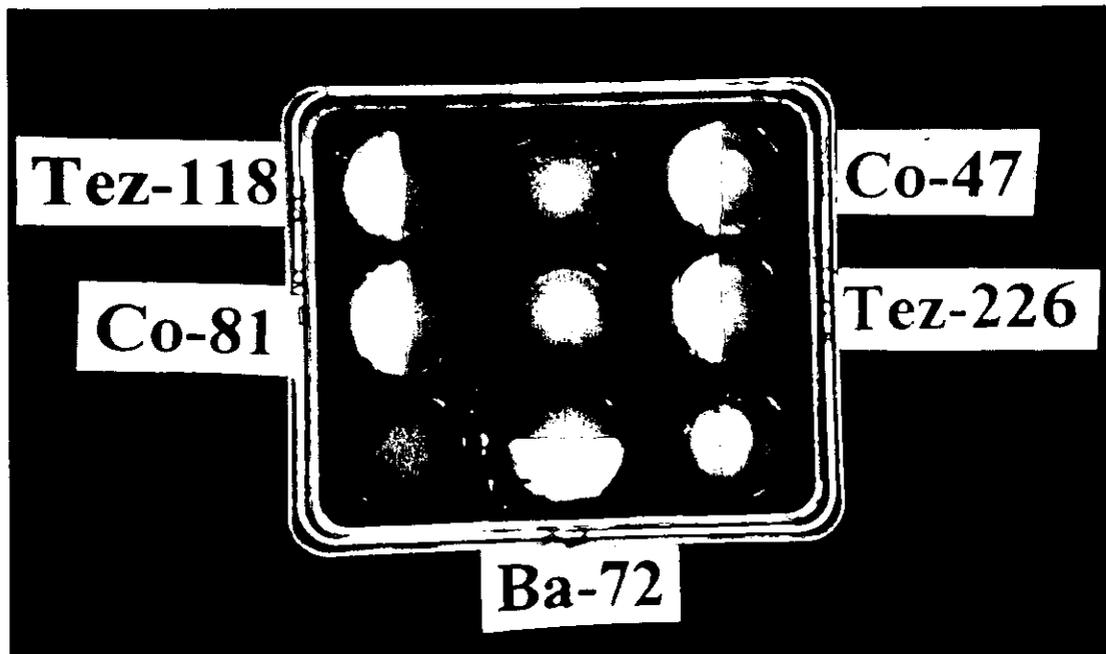


Figura 2. Siembra de bacterias antagónicas en microcultivo en placa de vidrio.

- b. Efecto del aislamiento Co-47 sobre el micelio, conidios y esclerocios de *A. flavus*.

**Micelio.** Para conocer la posible actividad micolítica del aislamiento bacteriano antagónico Co-47 sobre el micelio de *A. flavus* se hizo un microcultivo en porta objetos biexcavados; se sembró *A. flavus* en medio de cultivo PDA al centro de cada excavación. Cuando las colonias tuvieron 1 cm de diámetro, se inoculó una con una suspensión de  $3 \times 10^7$  del aislamiento Co-47, inundando con ella toda la colonia fungosa, la otra colonia quedó como testigo sin inocular. Se observaron los cambios en la estructura del micelio cada hora bajo el microscopio óptico, durante 12 horas.

**Conidios.** Para determinar el efecto antagónico de la cepa Co-47 sobre los conidios de *A. flavus*, se colocó PDA en cada cavidad de un portaobjetos biexcavado, en el 50% de la superficie de una cavidad se sembró por estría el aislamiento Co-47, se incubó a 28°C por 48 horas. Posteriormente, a 3 mm del área de crecimiento bacteriano se colocó una gota de suspensión conidial de *A. flavus* ( $3 \times 10^6$  conidios/mL). En la otra cavidad del portaobjetos, se colocó al centro una gota con conidios del hongo a la misma concentración, ambas gotas se dejaron secar y se colocó un cubreobjetos en el área que ocupó la gota de conidios, y se observó al microscopio óptico cada 4 horas durante 16 horas así como a las 24 y 48 horas, el ensayo se hizo por cuadruplicado.

**Esclerocios.** Para producir esclerocios en medio PDA se incubó *A. flavus* durante 15 días a 28°C, y se cosecharon 700 esclerocios (Figura 3) para probarse con cada aislamiento bacteriano (Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226 y Ba-72). Hubo 2 testigos, uno donde se sembraron sólo esclerocios y otro con esclerocios tratados con la bacteria no antagónica *Erwinia carotovora* var. *carotovora*. Se pusieron 100 esclerocios en 20 mL de una suspensión ( $3 \times 10^8$  bacterias/mL) de cada aislamiento bacteriano, durante 20 minutos; se colocaron 20 esclerocios por caja de Petri con PDA, se incubaron por 10 días a 28°C y se registró el número de esclerocios germinados.

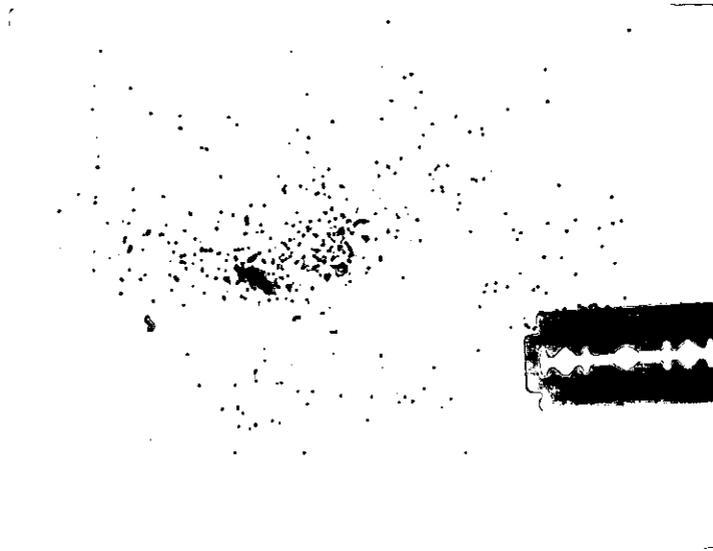


Figura 3. Esclerocios de *Aspergillus flavus* producidos en medio de cultivo PDA.

#### c. Efecto sinérgico entre bacterias antagónicas.

Para ello se seleccionaron los aislamientos: Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226, Ba-72 y Ba-252, que tuvieron la mejor capacidad antagónica de acuerdo a los valores registrados en ensayos previos. Los aislamientos Ba-53 y Ba-205 fueron eliminadas porque perdieron efecto antagónico después de 10 transferencias.

El estudio sobre efecto sinérgico se hizo de dos maneras:

- i) Mezcla de suspensiones bacterianas, e inoculación en medio sólido.
- ii) Inoculación directa por pares y de manera alternada en medio PDA de acuerdo a metodología de la sección 3.3 a.

i) Mezcla de suspensiones bacterianas.

Con cada aislamiento bacteriano antagónico se preparó una suspensión a una concentración de  $3 \times 10^8$  bacterias/mL según la escala de Mc Farland, para elaborar mezclas en proporción 1:1, conforme al siguiente diagrama:

**Combinaciones entre aislamientos bacterianos y su efecto sobre *A. flavus*.**

	A	B	C	D	E	F
A	A-A					
B	A-B	B-B				
C	A-C	B-C	C-C			
D	A-D	B-D	C-D	D-D		
E	A-E	B-E	C-E	D-E	E-E	
F	A-F	B-F	C-F	D-F	E-F	F-F

A = Co-47

B = Co-81

C = Tez-118

D = Tez-226

E = Ba-252

F = Ba-72

G = Es-383

Se sembraron 0.01 mL de cada mezcla en suspensión en 18 puntos en una circunferencia de 5.5 cm de diámetro, al centro se sembró *A. flavus* según metodología aplicada en la sección 3.3a. Las cajas se incubaron a 28°C durante 10 días, después se midió el diámetro alcanzado por *A. flavus*. El ensayo se realizó por triplicado, como testigo las placas sembradas sólo con *A. flavus*.

ii) Inoculación directa por pares.

Los aislamientos con mejor actividad antagónica se sembraron en forma directa y alternada por pares, en 18 puntos equidistantes, en una circunferencia de 5.5 cm de diámetro según sección 3.3 a.

En este ensayo se omitió el aislamiento Ba-252 por haber perdido actividad antagónica. Las cajas se incubaron a 28°C durante 10 días, al término de este periodo se midió el diámetro alcanzado por la colonia de *A. flavus*. La prueba se corrió por triplicado teniendo como testigo cajas inoculadas únicamente con *A. flavus*. Se realizó análisis de varianza a ambos ensayos para su interpretación.

### Combinaciones entre los aislamientos bacterianos para la siembra directa.

	A	B	C	D	E
A	A/A				
B	A/B	B/B			
C	A/C	B/C	C/C		
D	A/D	B/D	C/D	D/D	
E	A/E	B/E	C/E	D/E	E/E

A = Co-47    C = Tez-118    E = Ba-72  
 B = Co-81    D = Tez-226

### 3.7 Identificación de las bacterias en biocontrol.

A las bacterias que mostraron buena capacidad para inhibir el desarrollo de *A. flavus*, se les aplicaron las pruebas bioquímicas y morfológicas para identificarlas según el Manual de Bergey (Holt *et al.*, 1994).

Las pruebas bioquímicas seleccionadas y aplicadas para la identificación de las bacterias antagonicas fueron: tinción de Gram y de flagelos (método de Pepler), oxidación/ fermentación de glucosa, reducción de nitratos a nitritos, actividad lipolítica, producción de: fluorescencia en medio de cultivo B de King y en medio FN, indol, levana, ácido sulfúrico, oxidasa, dihidrolasa de arginina; hidrólisis de almidón y gelatina; producción de ácido a partir de: arabinosa, celobiosa, glucosa, maltosa, manosa, sacarosa, trealosa, xilosa, adonitol, inositol, dulcitol, manitol, sorbitol y propionato; crecimiento a 5°C y 41°C.

Los aislamientos Co-47, Tez-118 y Co-81 fueron observados bajo el microscopio electrónico de transmisión para determinar la presencia, ubicación y número de flagelos, según la siguiente metodología:

En una rejilla de cobre de 3 mm de diámetro previamente cubierta con polipropileno se colocó una gota de la suspensión ( $3 \times 10^8$  bacterias/mL) de cada cepa bacteriana, y dejó secar al ambiente, después se le añadió una gota de ácido fosfotúngstico al 1%, se dejó secar y observó.

#### a) Tinción de Gram y reacción con hidróxido de potasio.

La tinción de Gram separa las bacterias en dos grandes grupos Gram + positivas y Gram - negativas, según la composición química de su pared celular, las bacterias Gram + con un 80% de lipoproteínas y las Gram - con alrededor de un 20%. Debido a esta característica las bacterias Gram + retienen colorantes lipofílicos como el cristal violeta, en tanto que las bacterias Gram - no lo retienen (Koneman *et al.*, 1985).

Rye desarrolló una prueba análoga a la reacción de Gram, que se realiza en un minuto y define con seguridad cuando una bacteria es Gram + ó Gram -, para ello se mezcla una gota de hidróxido de potasio al 3 %, y una asada de masa bacteriana con movimientos rotatorios, se forma un compuesto mucilaginoso, que al separar el asa formará un hilo muy fino, esto indicará que la bacteria es Gram -, si no se forma el hilo, será Gram + (Apéndice 1 b).

**b) Tinción de flagelos.**

Los flagelos son organelos de locomoción de las bacterias y ciertos protozoarios, su presencia y ubicación es un carácter taxonómico importante para definir los géneros bacterianos. Para su detección se emplea un método de tinción, o la observación directa bajo el microscopio electrónico de transmisión.

La tinción con colorantes requirió la preparación de una suspensión bacteriana ( $3 \times 10^7$  bacterias/mL), de la que se colocó una gota, en un extremo del portaobjetos ligeramente inclinado para que se desplazara al extremo opuesto; después se secó la gota al medio ambiente y se adicionaron 4 gotas de cristal violeta a lo largo del frotis bacteriano, se dejó actuar el colorante durante cinco minutos y posteriormente se lavó su exceso con agua de la llave, y se adicionaron 4 gotas de mordente que se dejó actuar durante 10 minutos, finalmente fue lavado con agua de la llave y secado al medio ambiente para su observación al microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100 x) (Apéndice 1 c) (Clark, 1976).

**c) Fluorescencia.**

La producción de un pigmento fluorescente (fluoresceína) en medio de cultivo B de King o FN (Apéndice 1d, 1e) caracteriza a algunas especies de *Pseudomonas*. Impurezas de hierro en el medio de cultivo reprimen la formación del pigmento e inhiben la fluorescencia.

Cada aislamiento antagónico fue sembrado, por el método de estría, en medio B de King y en medio FN en tubo de ensaye inoculado por punción y estría, se incubaron a 28°C durante 72 horas; después cada caja y tubos se sometieron a luz ultravioleta de onda larga, de lámpara Black-Ray, Black Light Lamp, Long Wave UVL-22, 115 volts, 60 ciclos y 17 ampers (King et al., 1954; Pikett and Petersen, 1970).

**d) Oxidación/fermentación.**

Las bacterias metabolizan los carbohidratos, por procesos de oxidación o de fermentación. Algunas bacterias metabolizan un carbohidrato, sólo bajo condiciones aeróbicas; mientras que otras producen ácido, aeróbica y anaeróticamente. Las bacterias anaeróbicas facultativas pueden crecer, metabolizar y reproducirse bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

La fermentación es un proceso anaeróbico, donde un carbohidrato produce dos triosas y sus productos finales varían según el sistema enzimático y las condiciones

ambientales para cada especie bacteriana.

Se empleó el medio base de Hugh and Leifson (Apéndice 1 f) con alta concentración de glucosa y baja de peptona. Las condiciones anaeróbicas se establecieron adicionando a cada tubo inoculado, 2.0 mL de aceite mineral esterilizado. En la condición aeróbica, los tubos se inocularon sin aceite mineral. Los testigos fueron tubos sin inocular en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Un cambio en la coloración del medio de verde a amarillo, indica la producción de ácido para ambas condiciones, lo cual será interpretado con O/F (Hugh and Leifson, 1953).

**e) Producción de ácidos a partir de carbohidratos.**

Se empleó otra vez el medio base de Hugh and Leifson (Apéndice 1f); sólo que se substituyó la glucosa por el carbohidrato que se necesitaba probar (Apéndice 1g). Un cambio en la coloración del medio de verde a amarillo, indica la producción de ácido. Se probaron los carbohidratos presentados en la Tabla 18 (Hugh and Leifson, 1953).

**f) Reducción de nitratos a nitritos.**

La reducción de nitratos a nitritos y producción de gas usualmente sucede bajo condiciones anaeróbicas, donde un microorganismo deriva su oxígeno a partir de un nitrato. El oxígeno sirve como un receptor de hidrógeno. Muchas bacterias aeróbicas son anaeróbicas facultativas y sólo pueden reducir nitrato en ausencia de oxígeno. La respiración anaeróbica es un proceso de oxidación por sustancias inorgánicas, principalmente nitrato y sulfato y raramente es utilizado el carbonato.

La desnitrificación es reducción de nitrato a gas u óxido nitroso. Cada molécula de nitrato al reducirse acepta cinco electrones.

La reducción de nitrato a nitrito es una prueba importante en el proceso de identificación bacteriana. Dependiendo del pH, el nitrato toma el hidrógeno liberado en los procesos metabólicos y se produce nitrito o amonio y puede continuar hasta la formación de gas.

Se colocaron 4 mL del medio base de nitrato de potasio (Apéndice 1h) en tubos de ensaye y cada uno tenía introducido un tubo de Durham para detectar la producción de una burbuja de gas. Se inoculó cada aislamiento antagónico e incubó a 28°C durante 72 h, después se adicionaron 4 gotas de los reactivos A y B (Apéndice 1 h) para detectar la reducción de nitratos a nitritos, manifestada por un viraje en la coloración del medio, de ámbar a rosa o rojo y la producción de una burbuja de gas en caso de que la produzcan (Mac Faddin, 1976).

**g) Producción de ácido sulfhídrico.**

Algunas bacterias heterótrofas liberan sulfuro a partir de aminoácidos (peptona, cisteína, cistina y tiosulfato) que contienen azufre, y se produce sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) en presencia de la enzima cisteína desulfhidrasa. Así, un microorganismo productor de ácido sulfhídrico cultivado en un medio orgánico como la peptona, reduce el azufre por hidrogenación produciendo  $H_2S$ .

Para identificar bacterias antagónicas se usó medio líquido a base de peptona, utilizando acetato de plomo como indicador, este método es sensible para detectar trazas de ácido sulfhídrico (Apéndice 1 i). También se puede usar el medio de Kligler-fierro-agar en tubo inclinado.

Matraces de 50.0 mL recibieron 20.0 mL de medio de cultivo a base de peptona, cada aislamiento antagónico se sembró por triplicado y en la boca de cada matraz se colocó papel filtro impregnado con acetato de plomo, sin tocar las paredes del matraz, ni la superficie del medio líquido inoculado, para no matar las bacterias por toxicidad con el acetato de plomo.

#### h) Hidrólisis de gelatina.

Algunas bacterias rompen moléculas de proteína en péptidos de bajo peso molecular o en aminoácidos mediante enzimas proteolíticas. Estas enzimas licúan la gelatina y esta capacidad las identifica.

Cada aislamiento bacteriano antagónico se inoculó de 1 a 2 cm de profundidad, por punción mediante una asa recta, en 4 mL de medio de caldo nutritivo con gelatina al 10% (Apéndice 1 j) en tubos de ensaye. Los tubos inoculados fueron incubados a 28°C durante 8 días, después a 5°C durante 20 minutos; de esta manera las bacterias con capacidad para licuar la gelatina, disuelven el medio sólido a líquido; mientras que con bacterias que no producen enzima proteolítica el medio se mantiene sólido (Blazevia, 1975).

#### i) Producción de dihidrolasa de arginina.

El sistema enzimático de la dihidrolasa de arginina, permite crecer a ciertas *Pseudomonas* en condiciones anaeróbicas. El sistema consiste de dos enzimas:

- a. La *arginina desaminasa* que degrada la arginina a citrulina más amonio.
- b. La *ureidasa*, convierte la citrulina a ornitina más bióxido de carbono y amonio.

Se inoculó cada aislamiento antagónico, por separado, en tubos de ensaye con 4 mL de medio de Thornley (Apéndice 1 k) y se les añadieron 2.0 mL de aceite mineral esterilizado para tener condiciones anaeróbicas. Los tubos inoculados se incubaron a 28°C hasta ver cambios de color del medio de ámbar a rojo en el caso de las bacterias con capacidad para producir dihidrolasa de arginina (Shaad, 1980).

#### j) Hidrólisis de almidón.

Esta prueba identifica los microorganismos que hidrolizan almidón, por la acción enzimática de la amilasa. Polisacáridos como el almidón y las dextrinas al hidrolizarse producen más de 6 moléculas de monosacáridos. Hay dos tipos de amilasa, la alfa-amilasa o endoamilasa excretada por muchas bacterias y la beta-amilasa o exoamilasa, presente en las plantas superiores.

El medio de cultivo es a base de almidón soluble al 2% (Apéndice 1 l) en cajas

de Petri. Las bacterias antagónicas se sembraron tocando la superficie del medio en cinco puntos equidistantes; las placas se incubaron a 28°C durante 5 días, después se añadió solución de Lugol (Apéndice 1 b) a cada placa. La hidrólisis del almidón aparece como una zona clara alrededor del desarrollo bacteriano (Koneman *et al.*, 1985).

#### k) Producción de oxidasa.

La enzima oxidasa se produce intracelularmente por un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación de citocromo reducido mediante oxígeno molecular, el cual actúa como aceptor de electrones en estado terminal.

Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía de la respiración, proceso que oxida varios sustratos.

La producción de oxidasa, es útil en la taxonomía bacteriana. Con una asa bacteriológica de platino o varilla de vidrio fina, se depositó masa bacteriana en la superficie de un papel filtro impregnado con una solución al 1% de tetrametil-para-fenil-enediamina-HCl; las asas bacteriológicas de alambre común no se recomiendan, ya que la oxidación de fenil enediamina puede ser catalizada por trazas de hierro. La solución de la amina debe conservarse frascos color ámbar; el reactivo puede perder sensibilidad y cambiar de color al almacenarse por mucho tiempo.

Cada aislamiento antagónico se depositó con una asa de vidrio en tiras de papel filtro impregnado con la amina tetrametilada y 1 minuto después se leyó el cambio de coloración (Apéndice 1 m) (Weaver *et al.*, 1968).

#### l) Producción de levana.

La levana es un polisacárido producido por ciertas bacterias que al crecer en un medio rico en sacarosa forman colonias convexas, por las grandes cantidades de levana producida y esto las identifica.

El medio de cultivo fue agar nutritivo con sacarosa al 5% (Apéndice 1 n). Cada cepa antagónica, se sembró tocando la superficie del medio en cinco puntos equidistantes, las cajas se incubaron a 28°C durante 5 días. Colonias cóncavas indican la producción de levana y colonias planas se consideran levana negativas.

#### m) Producción de catalasa.

La catalasa es una enzima con hematina como grupo prostético, descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua ( $H_2O$ ) y oxígeno ( $O_2$ ) y su función es eliminar el  $H_2O_2$  tóxico resultante del proceso de oxidación-reducción acoplado.

Para la prueba, se cultivó cada cepa antagónica en medio B de King (Apéndice 1 d). Después de 48 h de incubación a cada caja se le añadieron 2.0 mL de  $H_2O_2$  al 10%, la formación de burbujas indica el desprendimiento de oxígeno, por las cepas capaces de producir catalasa (Taylor and Achanzer, 1972).

n) **Producción de indol.**

El triptofano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos: indol, escatol y ácido indolacético. Varias enzimas intracelulares involucradas se llaman triptofanasas, nombre del complejo sistema de enzimas mediador de la producción de indol. El ácido indol pirúvico es el mayor intermediario en la degradación del triptofano, y de él se puede formar indol por desaminación, y el escatol por descarboxilación del ácido indolacético.

La presencia de indol identifica a ciertas bacterias. La prueba se realizó en tubos de ensaye con 4 mL de medio de cultivo base, donde se inocularon las cepas antagonicas por separado y triplicado, después de 48 h de incubación a cada tubo se le adicionaron 5 gotas de reactivo de Kovak (Apéndice 1 'o´) (Vracko and Sherries, 1963).

o) **Actividad lipolítica.**

Ciertas bacterias producen enzimas que rompen las cadenas de grasas, esta característica sirve para taxonomía. La prueba se realizó en cajas de Petri con medio a base de Tween 80 y cloruro de calcio (Apéndice 1 p).

### 3.8 **Identificación del aislamiento bacteriano Co-47.**

a. **Por kits de identificación.**

Al aislamiento Co-47 se le aplicaron las pruebas bioquímicas tradicionales, y además fue analizado con API 20 E y API 20 NFT de Chemical Labs que comprenden 40 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas y una base de datos, como testigo se manejó *Pseudomonas aureoginosa*. La galería 20 E y 20 NFT están compuestas cada una por 20 microtubos conteniendo medios y/o sustratos deshidratados (Figura 4) (BioMérieux, 1990).

Las pruebas convencionales se realizaron con una suspensión bacteriana en solución salina. Las reacciones producidas durante la incubación a 28°C, dan virajes espontáneos coloreados o revelados por la adición de reactivos. Las pruebas de asimilación constan en la inoculación de las bacterias en un medio mínimo, y aquellas capaces de usar el sustrato crecerán óptimamente.

Estas reacciones se leen con la tabla de lectura (Apéndice 2 a, 2 b) y la determinación con la tabla de identificación API 20 E index y 20 NFT index o el programa informático para la identificación, para esto, del conjunto de reacciones debe obtenerse un número de la siguiente manera (Codebook Analitab Products Inc, 1985).

En la hoja de resultados las pruebas están separadas en grupos de tres y un valor de 1, 2 ó 4 para cada una; a las reacciones positivas les corresponderá el valor asignado y la suma de cada grupo de tres representará un valor que permite obtener un código de siete cifras, el cual establecerá la identificación precisa de la cepa en cuestión (Figura 5).

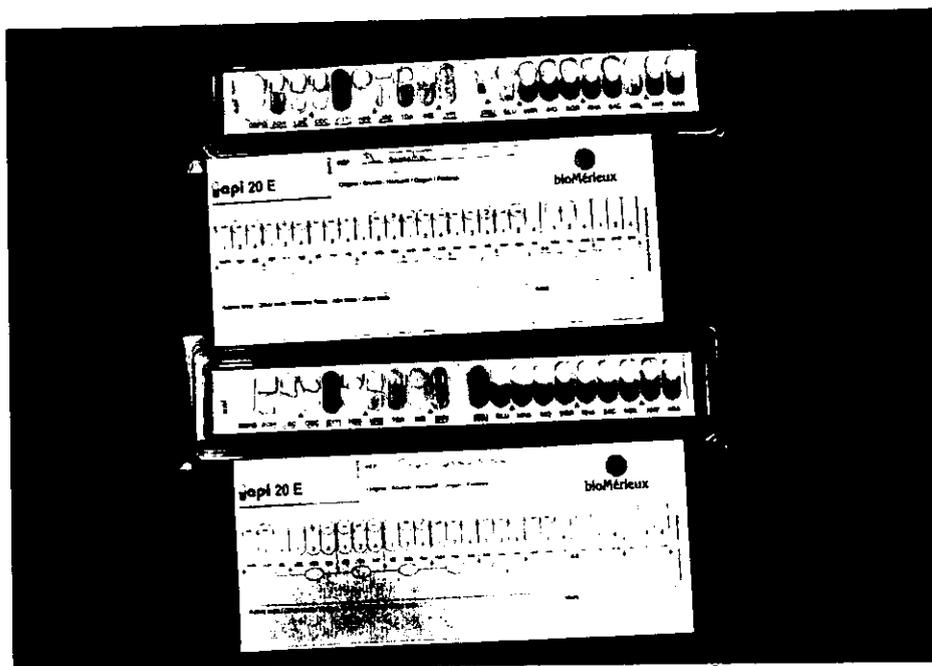


Figura 4. Kit de pruebas bioquímicas API 20 E: *P. putida* (arriba), el aislamiento Co-47 (abajo).

**api 20 E**

REF. : \_\_\_\_\_

Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelevo : \_\_\_\_\_



1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
CHO	IND	ESC	GGT	GGT	SM	ES	TR	IND	CO	GGT	GGT	CO	MAH	IND	SK	SH	SAC	MR	APP	ALA	CR

1	2	4	1	2	4
IND	TR	SAC	CO	CR	OX

Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Otros tests : \_\_\_\_\_

Ident. : \_\_\_\_\_

---

**api NFT**

REF. : \_\_\_\_\_

Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelevo : \_\_\_\_\_



1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
IND	TR	SAC	CO	CR	ES	GEL	PRPD	ESL	LA	MA													

1	2	4	1	2	4
IND	TR	SAC	CO	CR	OX

Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Otros tests : \_\_\_\_\_

Ident. : \_\_\_\_\_

Figura 5. Código numérico para la identificación de bacterias.

## b. Por homología del ADN.

En años recientes la molécula 16 S ribosomal (rRNA) ha adquirido un papel importante en el conocimiento de las relaciones filogenéticas entre bacterias, y es un conocimiento universal relevante para la identificación de bacterias en las que no hay una identificación precisa mediante métodos convencionales (Young *et al.*, 1991). Con el advenimiento de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y las técnicas de secuenciación directa del ácido desóxirribonucleico (ADN) amplificado, pueden ser obtenidas secuencias confiables rápidamente. La determinación parcial de la homología del aislamiento Co-47 se realizó mediante la secuenciación de 16 S rRNA.

El ADN del aislamiento Co-47 se obtuvo mediante lisis de las células con sulfato de dodecil sódico, extracción con fenol y precipitación con etanol, el ADN obtenido se amplificó mediante PCR, posteriormente se clonó con un plásmido (vector). El plásmido vector introdujo la información en células de *E. coli*, estas bacterias clonadas se sembraron en un medio a base de carbicidina, las colonias que incorporaron la información por la clonación se desarrollaron de color blanco. Después de incrementar las poblaciones de las colonias bacterianas blancas, fueron sometidas a lisis alcalina, para la obtención de plásmidos, que fueron tratados con las enzimas Eco y R1 Pst. Posteriormente, se aplicó una electroforesis utilizando un *primer* que contenía fluoresceína para obtener la secuenciación. Los resultados de secuenciación se introdujeron en el banco de datos para determinar la homología con especies de *Pseudomonas fluorescens* (Caetano-Anollés and Gresshoff, 1977; Davin-Regli *et al.*, 1995; Innes *et al.*, 1988; Winship, 1989; Yi-Wei and Persing, 1999; Young and Wexler, 1988).

## 3.9 Efecto de la siembra de aislamientos antagónicos a diferentes tiempos respecto a *A. flavus*.

En este ensayo se buscó conocer el tiempo en que se produce la mayor inhibición, por los aislamientos Co-47, Co-81, Ba-72, Ba-252, Tez-118 y Tez-226, sobre *A. flavus* en medio de cultivo PDA, sembrado a diferentes tiempos respecto al hongo. Los tiempos de incubación para cada aislamiento bacteriano y la siembra posterior de *A. flavus* fueron: 0 h, 24 h, 48 h y 72 horas. En el tiempo 0 h, se sembró el aislamiento bacteriano en ocho puntos equidistantes, formando una circunferencia de 2.5 cm de diámetro en medio PDA, al centro fue sembrado *A. flavus* según metodología de la sección 3.3 a. El ensayo se hizo por triplicado para cada aislamiento bacteriano en estudio. Para los tiempos de 24, 48 y 72 h, se siguió el mismo procedimiento, después de 24 horas de incubación a 28°C, se sembró *A. flavus* al centro de la circunferencia. Como testigos para cada tiempo, únicamente el hongo fue sembrado en medio PDA, en los tiempos estudiados. Se midió el diámetro de la colonia de *A. flavus* a los 10 días de sembrar al hongo, cuando el testigo cubre el 100% de la superficie del medio PDA.

## b. Por homología del ADN.

En años recientes el gen 16 S ribosomal (rRNA) ha adquirido un papel importante en el conocimiento de las relaciones filogenéticas entre bacterias, y es un conocimiento universal relevante para la identificación de bacterias en las que no hay una identificación precisa mediante métodos convencionales (Young *et al.*, 1991). Con el advenimiento de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y las técnicas de secuenciación directa del ácido desóxirribonucleico (ADN) amplificado, pueden ser obtenidas secuencias confiables rápidamente. La similitud del aislamiento Co-47 se realizó mediante la secuenciación de 16 S rRNA.

El ADN del aislamiento Co-47 se obtuvo mediante lisis de las células con sulfato de dodecil sódico, extracción con fenol y precipitación con etanol, el ADN obtenido se amplificó mediante PCR, posteriormente se clonó con un plásmido (vector). El plásmido vector introdujo la información en células de *E. coli*, estas bacterias clonadas se sembraron en un medio a base de carbicidina, las colonias que incorporaron la información por la clonación se desarrollaron de color blanco. Después de incrementar las poblaciones de las colonias bacterianas blancas, fueron sometidas a lisis alcalina, para la obtención de plásmidos, que fueron tratados con las enzimas Eco y R1 Pst. Posteriormente, se aplicó una electroforesis utilizando un *primer* que contenía fluoresceína para obtener la secuenciación. Los resultados de secuenciación se introdujeron en el banco de datos para determinar la homología con especies de *Pseudomonas fluorescens* (Caetano-Anollés and Gresshoff, 1977; Davin-Regli *et al.*, 1995; Innes *et al.*, 1988; Winship, 1989; Yi-Wei and Persing, 1999; Young and Wexler, 1988).

### 3.9 Efecto de la siembra de aislamientos antagónicos a diferentes tiempos respecto a *A. flavus*.

En este ensayo se buscó conocer el tiempo en que se produce la mayor inhibición, por los aislamientos Co-47, Co-81, Ba-72, Ba-252, Tez-118 y Tez-226, sobre *A. flavus* en medio de cultivo PDA, sembrado a diferentes tiempos respecto al hongo. Los tiempos de incubación para cada aislamiento bacteriano y la siembra posterior de *A. flavus* fueron: 0 h, 24 h, 48 h y 72 horas. En el tiempo 0 h, se sembró el aislamiento bacteriano en ocho puntos equidistantes, formando una circunferencia de 2.5 cm de diámetro en medio PDA, al centro fue sembrado *A. flavus* según metodología de la sección 3.3 a. El ensayo se hizo por triplicado para cada aislamiento bacteriano en estudio. Para los tiempos de 24, 48 y 72 h, se siguió el mismo procedimiento, después de 24 horas de incubación a 28°C, se sembró *A. flavus* al centro de la circunferencia. Como testigos para cada tiempo, únicamente el hongo fue sembrado en medio PDA, en los tiempos estudiados. Se midió el diámetro de la colonia de *A. flavus* a los 10 días de sembrar al hongo, cuando el testigo cubre el 100% de la superficie del medio PDA.

**Hipersensibilidad en tabaco.** Se prepararon suspensiones ( $3 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^8$  y  $3 \times 10^9$  células/mL) de cada aislamiento bacteriano antagónico, según la escala de Mac Farland (Apéndice 3). Cada suspensión se infiltró, con jeringa de insulina, en diferentes áreas intervenales de hojas de tabaco variedad xanthi, y se observaron por 72 horas, bajo condiciones de laboratorio (Klement and Goodman, 1967). Como testigo positivo se inoculó una suspensión de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y como testigo negativo se infiltró *Xantomonas campestris* pv. *phaseoli*.

**Pudrición de tubérculos de papa.** Tubérculos de papa variedad alfa, desinfestados y flameados con alcohol, se cortaron en rodajas de 1 cm de grosor, y se colocaron en cajas de Petri con papel filtro humedecido a modo de cámara húmeda, al centro de cada rodaja de papa se hizo una incisión de 3 mm de profundidad por 3 cm de largo, donde fue depositado 1 mL de suspensión (de  $3 \times 10^9$  células/mL) de cada bacteria antagónica por separado (Shaad, 1980). Como testigo positivo se inoculó una rodaja de papa con una cepa de *Erwinia carotovora* y un testigo negativo con *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, ambas cepas de la colección del Laboratorio de Fitopatología de la ENCB del IPN. Todos los tratamientos y sus testigos se incubaron a 28°C y se registraron por 72 horas.

### 3.12 Efecto de las bacterias antagónicas sobre la germinación de semillas de diferentes especies vegetales.

El efecto de los aislamientos Co-47, Tez-226 y Ba-72 se probó sobre la germinación en semillas de: maíz, frijol, jitomate, calabaza, chícharo y coliflor. Se prepararon suspensiones ( $3 \times 10^7$  y  $3 \times 10^9$  bacterias/mL) con cada aislamiento bacteriano antagónico. Para asegurar la adhesión de las bacterias a la superficie de la semilla, a cada una de las suspensiones bacteriana, se les añadió carbonato de calcio al 40% y cola vegetal (fécula de maíz + hidróxido de sodio) al 1%. Con esta suspensión se bacterizaron 100 semillas de cada especie vegetal y se colocaron sobre papel húmedo, 10 hileras de 10 semillas cada una. El papel con las semillas se enrolló y selló, todos los rollos se colocaron en una caja de plástico (de 30 cm por 20 cm y 7.5 de altura), se mantuvo la humedad constante y las cajas se incubaron a 28°C por ocho días. Como testigo se seleccionaron el mismo número de semillas de especies vegetales pero sin inocularse con suspensión bacteriana. Se aplicó Análisis de Devianza a los resultados, que es similar al análisis de varianza pero adaptado a datos sin distribución normal (Mc Gullagh & Nelder 1983; Crawley, 1993).

### 3.13 Antagonismo en invernadero a cielo abierto y en campo.

#### a. Pruebas de antagonismo en invernadero a cielo abierto.

Con el propósito de establecer el grado de protección que las bacterias antagónicas Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226 y Ba-72 podrían proporcionar a los estigmas de la mazorca de maíz, contra la infección de *A. flavus*; se diseñó el siguiente experimento en invernadero a cielo abierto:

En una área de 4 x 4 m se prepararon 8 surcos, con 50 cm de separación entre ellos, se sembraron 5 semillas de maíz a lo largo, a lomo de surco, cada 40 cm. Cuando las plantas germinaron y alcanzaron 40 cm de altura, se hizo un aclareo dejando las tres plantas más vigorosas, el resto fue eliminado; se tuvieron 30 plantas por surco, un total de 240 plantas, para aplicarles los siguientes tratamientos de inoculación por aspersión:

Surco 1. 2 mL de suspensión de *A. flavus*.

Surco 2. Co-47 + *A. flavus*.

Surco 3. Co-81 + *A. flavus*

Surco 4. Tez-118 + *A. flavus*.

Surco 5. Tez-226 + *A. flavus*.

Surco 6. Ba-72 + *A. flavus*.

Surco 7. Testigo con aspersión de agua destilada esterilizada.

Surco 8. Aspersión de suspensión bacteriana de cada aislamiento por separado.

Las bacterias se inocularon a una concentración de  $3 \times 10^9$  bacterias/mL y los conidios de *A. flavus* a una concentración de  $3 \times 10^6$  conidios/mL. En cada uno de los tratamientos, la inoculación de las bacterias y del hongo sobre los estigmas se efectuó asperjando primero la suspensión bacteriana en el momento que los estigmas se encontraban expuestos en el ápice de la mazorca y comenzaban a tomar una coloración café; una vez inoculados con las bacterias, fueron asperjados con la suspensión de conidios de *A. flavus* (Jones *et al.*, 1980; Rambo *et al.*, 1974). Cada una de las mazorcas fue etiquetada y cubierta con una bolsa de plástico y una bolsa de papel durante cinco días. Las mazorcas se cosecharon al término de la madurez fisiológica y se deshidrataron a 36°C hasta que el grano llegó de 10 a 12 % de humedad. Se escogieron al azar cinco mazorcas de cada tratamiento, que fueron desgranadas completamente y se seleccionaron 100 granos, que se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 2% y se sembraron seis en cajas con PDA (Armentrout, 1988) para recuperar *A. flavus* y determinar el porcentaje de infección, así como el efecto protector de las bacterias antagónicas.

#### b. Pruebas de antagonismo a nivel de campo

Las pruebas de campo para estudiar el comportamiento de las bacterias antagónicas: Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226 y Ba-72 se realizaron en una parcela ejidal del Sr. Benito Juárez localizada en la carretera libre a Juchitepec, Estado de México. El maíz fue sembrado a lomo de surco a una distancia de 40 cm con 50 cm entre surcos y tuvo las prácticas culturales tradicionales hasta el fin de la cosecha. La inoculación de cada bacteria antagónica se hizo por aspersión de una suspensión bacteriana ( $3 \times 10^9$  bacterias/mL) y otra de *A. flavus* ( $3 \times 10^6$  conidios/mL) según los siguientes tratamientos:

Surco 1 Co-47	Surco 5 Tez-226	Surco 9 Ba-72
Surco 2 Co-47 + <i>A. flavus</i>	Surco 6 Tez-226 + <i>A. flavus</i>	Surco 10 Ba-72 <i>A. flavus</i>
Surco 3 Co-81	Surco 7 Tez-118	Surco 11 <i>A. flavus</i>
Surco 4 Co-81 + <i>A. flavus</i>	Surco 8 Tez-118 + <i>A. flavus</i>	Surco 12 Agua destilada

Se seleccionaron 15 plantas, con mazorcas bien formadas, por surco, las inoculaciones tanto de las bacterias como del hongo se realizaron cuando los estigmas estaban expuestos y comenzaban a ser café rojizos, de acuerdo a los tratamientos señalados. Una vez inoculadas, las mazorcas fueron etiquetadas y cubiertas con una bolsa de plástico y otra de papel que se quitaron cinco días después.

Las mazorcas se cosecharon cuando la planta había concluido su madurez fisiológica y colocadas por separado en bolsas de papel bien etiquetadas, se trasladaron al laboratorio y se colocaron en un cuarto a 36°C para su deshidratación, hasta alcanzar 10-12% de humedad. Se seleccionaron, al azar, cinco mazorcas de cada tratamiento, para su evaluación en el laboratorio. Para determinar el porcentaje de infección por *A. flavus* y la protección dada por las bacterias, de cada mazorca se separaron 100 granos de maíz que fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% durante 2 minutos y seis se colocaron en cajas con PDA e incubaron en el laboratorio durante 8 días. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por Análisis de Devianza.

### 3.14 Caracterización del principio activo.

Las pruebas para la caracterización del principio activo de los aislamientos Co-47, Tez-118, Tez-226 y Co-81 fueron orientadas, hacia identificación de sideróforos excretados por las bacterias y que son compuestos de bajo peso molecular con alta afinidad por el ión férrico, los cuales se han reportado como responsables de la inhibición de un gran número de microorganismos fitopatógenos, siendo principalmente bacterias del género *Pseudomonas* las responsables de procesos de antagonismo mediado por sideróforos.

La capacidad de los aislamientos bacterianos antagónicos para producir sideróforos como un mecanismo para inhibir a *A. flavus*, fue probada de dos maneras:

- a. Utilización de un medio mínimo y
- b. Desarrollo del aislamiento bacteriano en un medio universal a base de Cromo azurol (CAS) para la detección de sideróforos (Schwyn and Neilands, 1987; Shenker *et al.*, 1995).

**a. Medio mínimo.** Para saber si un microorganismo produce sideróforos se utilizan medios de cultivo deficientes en ión ferrico, bajo estas condiciones se estimula a la bacteria para que produzca estos compuestos, siempre y cuando tenga capacidad para hacerlo. En un medio de cultivo sólido deficiente en ion férrico (Apéndice 4), se colocó una gota de suspensión de conidios de *A. flavus* y se distribuyó en la superficie del medio con una varilla de vidrio triangular, y después se colocó una gota de suspensión bacteriana que había sido desarrollada previamente en un medio base con ácido glutámico (Apéndice 4). A los testigos se sembró el hongo y después la bacteria en un medio con ión férrico. Todos los tratamientos se realizaron por cuadruplicado y se midió el halo de inhibición del hongo, después de 48 horas de incubación a 28°C. La presencia de un halo de inhibición de *A. flavus* en torno a la cepa bacteriana crecida en el medio deficiente en ión ferrico indicará la producción de sideróforos, comparado con el testigo en el que no se manifestará dicho halo.

b. **Medio universal para la detección de sideróforos Cromo Azurol (CAS).** Schwyn y Neilands (1987) desarrollaron un medio altamente sensible para detectar sideróforos (Apéndice 5) a base de cromo azurol que es un quelante débil del ión férrico, y ha sido aceptado como un método cualitativo confiable y seguro para determinar la producción de sideróforos por microorganismos. Los aislamientos Co-47, Co-81, Tez-118 y Tez-226, se sembraron en medio Universal (CAS), para ello se preparó una suspensión bacteriana ( $3 \times 10^8$  células/mL), y una gota de ella se colocó en la superficie del medio universal; como testigo en la misma caja fue sembrada una cepa de *Rhizobium melliloti* CP 98; se incubó durante 48 horas a 28°C.

La presencia de un halo amarillo o naranja en torno a los aislamientos sembrados indica una respuesta positiva para la producción de sideróforos, por cualquiera de los aislamientos con capacidad para producirlos.

### 3.15 Constitución proteica del componente activo del aislamiento Co-47.

Para determinar el carácter proteico del componente activo se efectuó el siguiente experimento:

- a) Búsqueda del mejor extracto para la producción del componente activo en medio de cultivo.
- b) Extracción del componente activo.
- c) Efecto de la temperatura sobre el componente activo.
- d) Determinación del carácter proteico del componente activo.

a) **Búsqueda del mejor extracto para la producción del componente activo.** Con el mejor aislamiento bacteriano antagónico, en las pruebas de laboratorio y campo, y que además dió prueba de sideróforos positiva, se efectuó un ensayo para obtener el medio de cultivo para la producción del componente activo en medio sólido, para ello se probó el comportamiento de varios extractos:

De levadura, carne y de papa, cada uno de ellos a las concentraciones 0.25%, 0.50%, 1%, 1.5% y 2%. Cada uno de los aislamientos bacterianos fueron sembrados en torno a una circunferencia de 5.5 cm de diámetro en ocho puntos y el hongo se inoculó al centro según metodología aplicada en la sección 3.3 a. Como testigo se sembró al hongo en cada extracto y concentración, se incubaron las cajas a 28°C por 8 días, tiempo en que el hongo cubrió el 100% de la superficie del medio, en cada extracto. El ensayo se corrió por triplicado.

b) **Extracción del componente activo.** El extracto crudo con el componente activo se obtuvo sembrando la bacteria Co-47 en medio de cultivo con el extracto que tuvo la mayor actividad antagónica sobre el hongo. Para obtener el extracto crudo se siguió la metodología de Shannahan *et al.* (1992) (Apéndice 7).

c) **Efecto de la temperatura sobre el componente activo.** Se determinó la termo-resistencia del componente activo del extracto crudo al medir ocho volúmenes de 30

mL del extracto crudo, colocados en ocho vasos de precipitados de 50 mL, y puestos en una estufa previamente calibrada a las temperaturas de evaporación (70°C, 65°C, 60°C, 55°C, 50°C, 45°C, 40°C y 35°C) llevando el volumen original a 6 mL. Se centrifugó a 8000 rpm el volumen final obtenido en cada vaso, y el sobrenadante se filtraron con filtros Millipore (0.25  $\mu$ ) esterilizados. El filtrado se sometió a bioensayo en placa, para medir la actividad antagónica del componente activo o su pérdida por efecto de las temperaturas de evaporación aplicadas.

**d) Determinación del carácter proteínico del componente activo.** Se usó el método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951) que es altamente sensible para cuantificar las proteínas existentes en el extracto crudo. Para ello se elaboró una curva tipo con albúmina a las concentraciones 0, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu$ /mL. Para evitar un efecto aditivo del contenido proteico de las bacterias, una vez producido el componente activo, las células fueron eliminadas de la superficie del medio por tres lavados con H<sub>2</sub>O d esterilizada. El extracto crudo y las soluciones de albúmina a diferentes concentraciones, fueron sometidas a la misma técnica (Apéndice 6) y se leyó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro marca Spectronic<sup>R</sup> 20 Genesys<sup>TM</sup>. Debido a que el extracto crudo se obtuvo de medio sólido PDA, se cuantificaron las proteínas del medio sin crecimiento bacteriano, para restar este valor a la concentración de proteínas del extracto, que es el valor real de la proteína existente en el extracto crudo problema.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Aislamiento e identificación de *A. flavus*

En varias placas de PDA sembradas con los granos de maíz, se desarrollaron colonias de hongos con micelio blanco y producción de pigmento color rosa. En otras placas hubo crecimiento de colonias fúngicas de color verde amarillento.

Al microscopio compuesto, el hongo blanco presentó microconidios y macroconidios del tipo de *Fusarium* sp., también se desarrolló *Rhizopus* y *Aspergillus niger*. Estos hongos son parte de la microflora normal de granos almacenados y también son responsables de daños físicos, deteriorando la calidad del producto y por tanto su precio de comercialización (Duffus, 1985).

Las colonias del hongo verde-amarillento, se transfirieron para tener cultivo puro y con base en las claves de Raper y Fennell (1965), se observaron las características macroscópicas y microscópicas que correspondieron a *A. flavus* que ya fueron descritas en la sección 1.1 de Taxonomía de este trabajo. A los 10 días de desarrollo de la colonia fungosa, se formaron esclerocios de 2-3 mm de diámetro. Con base en lo anterior quedó identificado el hongo como *Aspergillus flavus* Link (Figura 6).

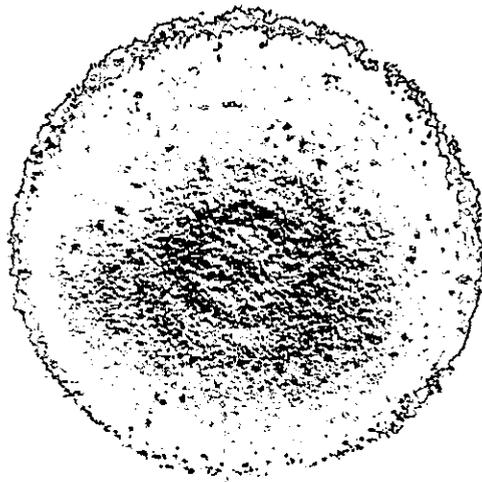


Figura 6. Colonia típica de *Aspergillus flavus*, con esclerocios maduros.

### 4.2 Muestreo de suelo agrícola de maíz.

De la recolección de muestras realizadas en las dos localidades dedicadas al cultivo de maíz localizadas en el Estado de México, Cocotitlán y Tezoyucan se obtuvieron 90 muestras del suelo de rizosfera, el cultivo de maíz aún estaba en pie y en etapa final de madurez.

En la región del Bajío se obtuvieron 120 muestras de suelo de rizosfera en reposo de invierno, de 8 parcelas. Esta diferencia de suelos de rizosfera del Bajío y del Estado de México, permitió conocer la capacidad de supervivencia de ciertas bacterias antagonicas, sometidas a condiciones adversas de invierno.



Figura 7. Localidades de muestreo del suelo de rizosfera, Cocotitlán (derecha), Tezoyucan (centro), y Bajío (izquierda).

#### 4.3 Aislamiento y selección de bacterias antagonicas.

##### Primera etapa de selección.

##### a. Del suelo de rizosfera

Las bacterias saprófitas, aisladas de los diferentes lugares se desarrollaron bien en medio B de King; se optó por usar medio PDA para las pruebas de antagonismo, porque crecen bien tanto las bacterias como el hongo *A. flavus*.

De un total de 2168 colonias bacterianas puras, 10 aislamientos (Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226, Tez-227, Ba-53, Ba-72, Ba-205 y Ba-252) tuvieron antagonismo variable en su actividad inhibitoria sobre el hongo, mostrada con un halo de inhibición de *A. flavus* en la zona cercana a la colonia bacteriana.

##### b. De los estigmas.

Se usaron estigmas frescos, que no estén en proceso de descomposición, pues se comprobó que a medida que los estigmas se oscurecen, hay más bacterias saprófitas necrotróficas, que los destruyen y aumentan sus poblaciones y que desplazarán, por competencia de espacio y nutrientes a las bacterias antagonicas.

Se probó la actividad antagonica de 571 colonias bacterianas aisladas de las cuales 7 resultaron con ligera actividad antagonica. Estos aislamientos bacterianos,

a diferencia de los obtenidos de la rizosfera del maíz, produjeron un efecto inhibitorio menor; el desarrollo del hongo se reduce respecto a la zona de avance, formándose un pequeño halo de inhibición que desaparece con el tiempo; el hongo no crece sobre la colonia bacteriana, como sucede con otros aislamientos bacterianos saprófitos.

### c. De las brácteas.

De 686 colonias bacterianas de brácteas de mazorca de maíz aisladas se probó su antagonismo, y 5 aislamientos (Br-253, Br-276, Br-345, Br-365 y Br-576) resultaron con poca actividad inhibitoria sobre *A. flavus*, muy similar a la observada con las bacterias obtenidas de los estigmas.

### d. Bacterias de actividad antagónica comprobada

Hubo poco efecto de las cepas con actividad antagónica comprobada contra otros fitopatógenos, del Instituto Politécnico Nacional y el Colegio de Posgraduados; el crecimiento del hongo se retrasó respecto al testigo, pero con el tiempo cubrió las colonias bacterianas. Sin embargo, estas cepas se siguieron considerando para la segunda fase de selección, donde se probaron individualmente.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos del total de bacterias aisladas de las localidades y de diferentes partes de la planta del maíz; así como de los aislamientos bacterianos que resultaron con actividad antagónica.

**Tabla 1: Bacterias con capacidad antagónica de suelo de rizosfera, estigmas y filosfera de plantas de maíz.**

Muestra	Localidad	Nº de colonias	Bacterias con actividad antagónica
Rizosfera	Cocotitlán	455	Co (47, 81).
Rizosfera	Tezoyucan	475	Tez (118, 226, 227).
Rizosfera	Bajío	1238	Ba (53, 72, 205, 252).
Estigmas	C. A.	571	Es (127, 288, 371, 169, 294, 383, 349).
Brácteas	C. A.	686	Br (576, 253, 365, 276 y 345)
Cepas aap	CP e IPN	6	B (1, 2, 3, 4), 11-PS y BP-1.
<b>Total</b>		<b>3431</b>	<b>27</b>

aap = actividad antagónica probada; CP = Colegio de Posgraduados; ENCB = Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN; Co = Cocotitlán (Estado de México); Ba = Bajío (Guanajuato); Tez = Tezoyucan (Estado de México); C. A. = Central de Abastos, D.F. Es = Estigmas; Br = Brácteas; B = *Bacillus*; Bp = Bacteria del poro; 11 Ps = *Pseudomonas* sp.

El mayor número de bacterias con potencial antagonico se encontró en la rizosfera del maíz (Tabla 1), de la filosfera no se lograron aislar bacterias con verdadero potencial inhibitorio, en algunos casos sólo se expresó una inhibición incipiente donde el hongo logró crecer rodeando la colonia bacteriana; este comportamiento las hace poco atractivas para el control de *A. flavus*. Aunque las bacterias de la rizosfera no están adaptadas a los estigmas, conviene probar su capacidad de adaptación a estos sitios dada su alta actividad inhibitoria sobre el hongo. Estas poblaciones, con bajo potencial antagonico, presentes en la filosfera, hace que los estigmas sean vulnerables y susceptibles de infectarse por *A. flavus* (Payne, 1987).

#### 4.4 Cuantificación de la capacidad antagonica de los aislamientos bacterianos sobre *A. flavus*.

##### 2a. etapa de selección.

##### a. Suelo de rizosfera.

El antagonismo de cada aislamiento obtenido en la 1a. etapa de selección sobre *A. flavus*, se obtuvo midiendo el diámetro (cm) de la colonia del hongo. Se presenta la inhibición por cada aislamiento bacteriano (Tabla 2) en medio PDA (Figura 8).

La capacidad antagonica de las diferentes bacterias aisladas fue variable, se registraron datos cada 24 horas por aislamiento (Tabla 3). Los aislamientos Co-47, Co-81, Tez-226, Tez 118, Ba-53, Ba-205, y Ba 252 tuvieron un buen efecto (Figura 9); con Tez-227 no obstante que se inhibió el desarrollo del hongo, éste último cubrió las colonias bacterianas y la placa de PDA. Aún cuando algunos aislamientos bacterianos de la rizósfera tuvieron una actividad antagonica aceptable, hay que considerar su comportamiento *in vivo* o sea su posible adaptación al medio aéreo (estigmas) del contorno de la mazorca, que es el sitio de mayor riesgo de infección para el maíz, a nivel campo.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la eficiencia de las cepas para inhibir al hongo ( $H = 85.16$ ,  $P = 0.0001$ ). Los aislamientos Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226, Ba-53, Ba-205 y Ba-252 fueron los más efectivas reduciendo en más del 50% el diámetro promedio de la colonia del hongo y la Ba-72 con un 52%, son los más recomendables, si se mantiene su actividad antagonica, por el contrario el aislamiento Tez-227 no logró inhibir al hongo (Figura 9).

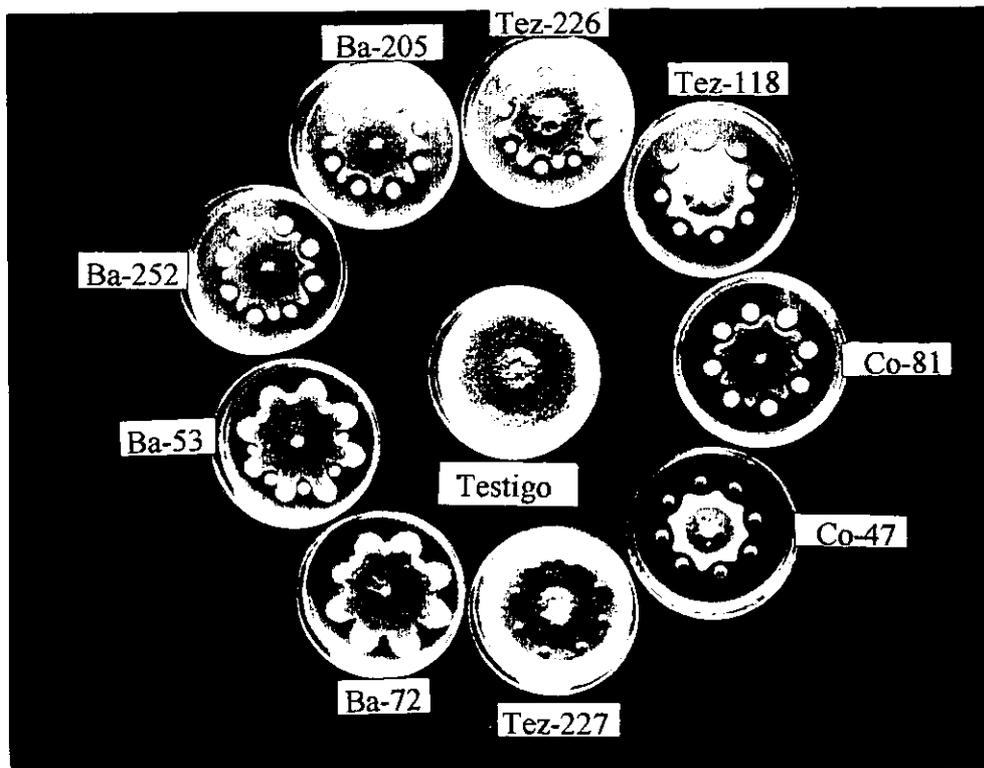


Figura 8. Efecto de los aislamientos bacterianos de la rizosfera de maíz, sobre *Aspergillus flavus* en medio PDA.

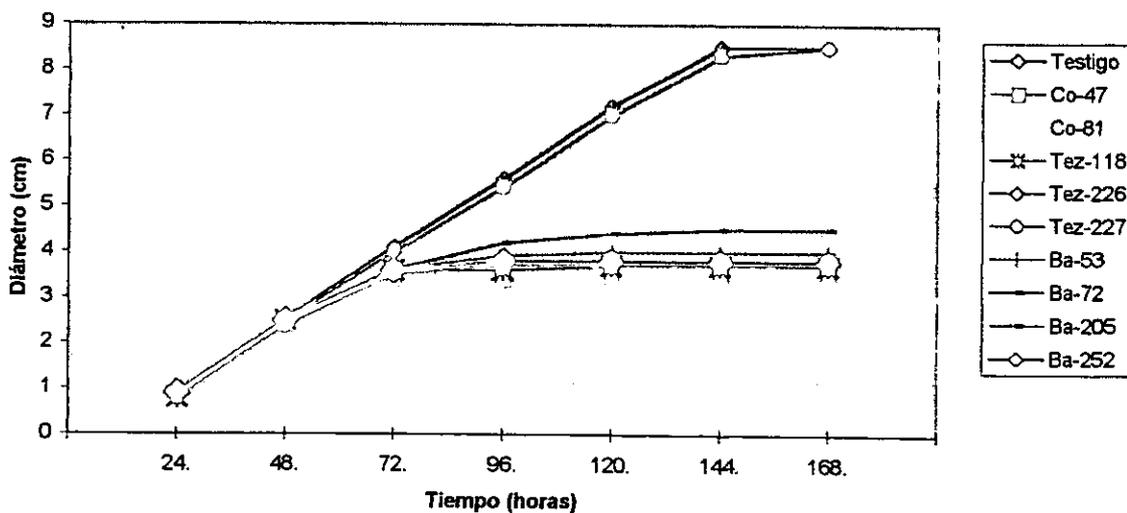


Figura 9. Efecto de las bacterias antagonicas de la rizosfera sobre *Aspergillus flavus*.

Tabla 2: Diámetro de las colonias de *A. flavus* con bacterias antagónicas de suelo de rizósfera.

Cepas de bacterias	Diámetro (cm) de colonias de <i>A. flavus</i> a diferentes tiempos.						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Ba-53	0.9	2.5	3.6	3.9	4.2	4.2	4.2
	0.8	2.4	3.6	3.8	3.8	3.8	3.8
	0.9	2.4	3.6	4.1	4.2	4.2	5.2
Promedio	0.8	2.4	3.6	3.9	4.0	4.0	4.0
Ba-72	0.8	2.4	3.6	4.2	4.4	4.5	4.5
	0.8	2.4	3.6	4.2	4.4	4.5	4.5
	0.8	2.4	3.6	4.2	4.4	4.5	4.5
Promedio	0.8	2.4	3.6	4.2	4.4	4.5	4.5
Ba-205	0.8	2.4	3.5	3.7	3.7	3.7	3.7
	0.8	2.4	3.5	3.7	3.7	3.7	3.7
	0.8	2.4	3.6	3.7	3.7	3.7	3.7
Promedio	0.8	2.4	3.5	3.7	3.7	3.7	3.7
Ba-252	0.9	2.5	3.7	4.0	4.1	4.10	4.1
	0.8	2.4	3.5	3.7	3.7	3.7	3.7
	0.8	2.4	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
Promedio	0.8	2.4	3.6	3.8	3.8	3.8	3.8
Co-47	0.8	2.4	3.4	3.4	3.4	3.5	3.5
	0.9	2.4	3.4	3.4	3.4	3.5	3.5
	0.8	2.4	3.4	3.4	3.5	3.5	3.5
Promedio	0.8	2.4	3.4	3.4	3.4	3.5	3.5
Co-81	0.9	2.4	3.4	3.4	3.5	3.50	3.5
	0.8	2.4	3.4	3.4	3.5	3.50	3.5
	0.8	2.4	3.4	3.5	3.5	3.50	3.5
Promedio	0.9	2.4	3.4	3.4	3.5	3.5	3.5
Tez-118	0.8	2.5	3.6	3.6	3.7	3.7	3.7
	0.8	2.5	3.6	3.6	3.7	3.7	3.7
	0.8	2.4	3.6	3.6	3.7	3.7	3.7
Promedio	0.8	2.5	3.6	3.6	3.7	3.7	3.7
Tez-226	0.9	2.5	3.6	3.8	3.8	3.8	3.8
	0.8	2.5	3.6	3.8	3.8	3.8	3.8
	8.9	2.4	3.6	3.8	3.8	3.8	3.8
Promedio	0.8	2.5	3.6	3.8	3.8	3.8	3.8
Tez-227	0.9	2.5	4.0	5.4	7.0	8.3	8.5
	0.8	2.5	4.0	5.4	7.0	8.3	8.5
	0.8	2.5	4.0	5.3	7.0	8.3	8.5
Promedio	0.9	2.5	4.0	5.4	7.0	8.3	8.5
Testigo	0.8	2.6	4.2	5.6	7.3	8.5	8.5
	0.9	2.5	4.1	5.6	7.2	8.5	8.5
	0.8	2.4	4.0	5.5	7.2	8.5	8.5
Promedio	0.8	2.5	4.1	5.6	7.2	8.5	8.5

Tabla 3. Resumen de promedios de inhibición de la colonia de *Aspergillus flavus* por efecto de bacterias de suelo de la rizosfera.

Aislamientos	Diámetro (cm) alcanzado por <i>A. flavus</i> en diferentes tiempos.						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Testigo	0.8	2.5	4.1	5.6	7.2	8.5	8.5
Co-47	0.9	2.4	3.4	3.4	3.5	3.5	3.5
Co-81	0.9	2.4	3.4	3.4	3.5	3.5	3.5
Ba-53	0.9	2.4	3.6	4.0	4.0	4.0	4.0
Ba-72	0.8	2.4	3.6	4.2	4.4	4.5	4.50
Ba-205	0.8	2.4	3.5	3.8	3.8	3.8	3.8
Ba-252	0.9	2.4	3.6	3.0	3.8	3.8	3.8
Tez-118	0.8	2.5	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7
Tez-226	0.9	2.5	3.6	3.8	3.8	3.8	3.9
Tez-227	0.9	2.4	3.6	3.8	3.8	3.8	3.8

Co = Cocotitlán, Tez = Tezoyucan, Ba = Bajío, h = horas

#### b. De estigmas

Las bacterias aisladas de los estigmas probadas individualmente contra *A. flavus* retardaron algo el crecimiento del hongo respecto del testigo (Tabla 4), pero el hongo acabó cubriendo completamente la placa. Con los aislamientos Es (288, 294, 127 y 383) el hongo no creció sobre las colonias bacterianas sino que las rodeó, comportamiento observado desde el primer aislamiento en la primera prueba de selección; con los aislamientos Es (169, 343 y 371) al igual que con Tez-227 y Co-165 el hongo creció sobre ellas (Figura 10).

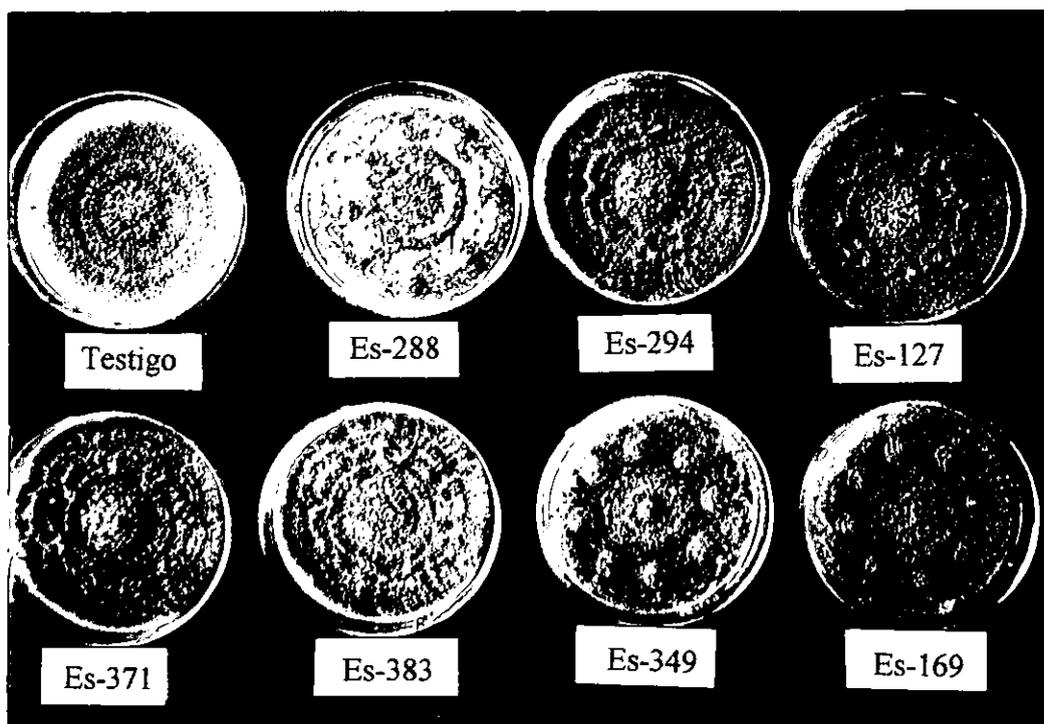


Figura 10: Aislamientos bacterianos antagónicos contra *Aspergillus flavus* obtenidos de los estigmas y probados en forma independiente.

Se presentan los promedios registrados en los diferentes tiempos para cada aislamiento (Tabla 5 y Figura 11), las cepas Es-288, Es-349 y Es-383 tienen el mejor comportamiento inhibitorio, sin embargo, el hongo creció sobre éstas, por lo cual no son buenos candidatos para el control biológico de *A. flavus*, especialmente si son comparados con los aislamientos de la rizosfera que mostraron buena efectividad.

Las bacterias aisladas de la filosfera (parte aérea) tienen importancia por poder estar adaptadas al sitio de los estigmas de la mazorca, lugar de entrada de los conidios del hongo, cualquier efecto antagónico efectivo cobraría mayor relevancia por la localización y adaptación natural de las bacterias a esta zona. Las bacterias de los estigmas trabajadas, dieron resultados donde se aprecia que el antagonismo fue mínimo por lo que no se recomienda su uso para el control de *A. flavus*.

Tabla 4: Diámetro de las colonias de *Aspergillus flavus* por efecto de bacterias antagonicas aisladas de estigmas de mazorca de maíz.

Cepas de bacterias	Diámetro (cm) de colonias de <i>A. flavus</i> a diferentes tiempos.						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Testigo	0.9	2.6	4.30	6.1	7.4	8.5	8.5
	0.9	2.6	4.40	6.2	7.6	8.5	8.5
	0.9	2.6	4.40	6.0	7.4	8.5	8.5
Promedio	0.9	2.6	4.4	6.1	7.5	8.5	8.5
Es-383	0.9	2.5	3.60	4.0	5.4	6.4	7.6
	0.9	2.6	3.60	4.1	5.0	6.5	7.5
	0.9	2.6	3.50	4.1	5.2	6.3	7.0
Promedio	0.9	2.6	3.56	4.1	5.3	6.4	7.4
Es-288	0.9	2.4	3.6	4.7	5.6	6.7	7.8
	0.9	2.3	3.5	4.4	5.6	6.8	8.0
	0.9	2.4	3.5	4.5	5.5	6.7	7.8
Promedio	0.9	2.4	3.5	4.5	5.6	6.7	7.9
Es-371	0.9	2.5	3.8	5.0	6.4	7.3	8.5
	0.9	2.6	3.9	5.2	6.5	7.5	8.5
	0.9	2.6	3.9	5.1	6.4	7.4	8.5
Promedio	0.9	2.6	3.9	5.1	6.4	7.4	8.5
Es-127	0.9	2.5	3.9	5.2	6.4	7.5	8.5
	0.9	2.5	3.9	5.2	6.3	7.4	8.5
	0.9	2.5	3.9	5.3	6.4	7.4	8.5
Promedio	0.9	2.5	3.9	5.2	6.4	7.4	8.5
Es-169	0.9	2.5	3.9	5.1	6.4	7.5	8.5
	0.9	2.6	3.9	5.1	6.5	7.5	8.5
	0.9	2.6	3.9	5.1	6.4	7.4	8.5
Promedio	0.9	2.6	3.9	5.1	6.4	7.5	8.5
Es-294	0.9	2.5	3.8	5.2	6.4	7.5	8.5
	0.9	2.5	3.9	5.3	6.5	7.6	8.5
	0.9	2.5	3.9	5.3	6.5	7.6	8.5
Promedio	0.9	2.5	3.9	5.3	6.5	7.6	8.5
Es-349	0.9	2.5	3.5	4.6	5.4	6.4	7.7
	0.9	2.5	3.6	4.7	5.5	6.5	7.6
	0.9	2.5	3.6	4.7	5.5	6.5	7.7
Promedio	0.9	2.5	3.5	4.7	5.5	6.5	7.7

Tabla 5. Promedio de inhibición del crecimiento (en cm) de *Aspergillus flavus* por efecto de bacterias de los estigmas de la mazorca de maíz.

Aislamientos	Diámetro alcanzado por <i>A. flavus</i> en diferentes tiempos.						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Testigo	0.9	2.6	4.4	6.0	7.5	8.5	8.5
Es-383	0.9	2.6	3.6	4.1	5.3	6.4	7.4
Es-288	0.9	2.4	3.5	4.5	5.6	6.7	7.9
Es-371	0.9	2.6	3.9	5.1	6.4	7.4	8.5
Es-127	0.9	2.5	3.9	5.2	6.4	7.4	8.5
Es-294	0.9	2.5	3.9	5.2	6.5	7.6	8.5
Es-169	0.9	2.6	3.9	5.1	6.4	7.5	8.5
Es-349	0.9	2.5	3.5	4.7	5.5	6.5	7.7

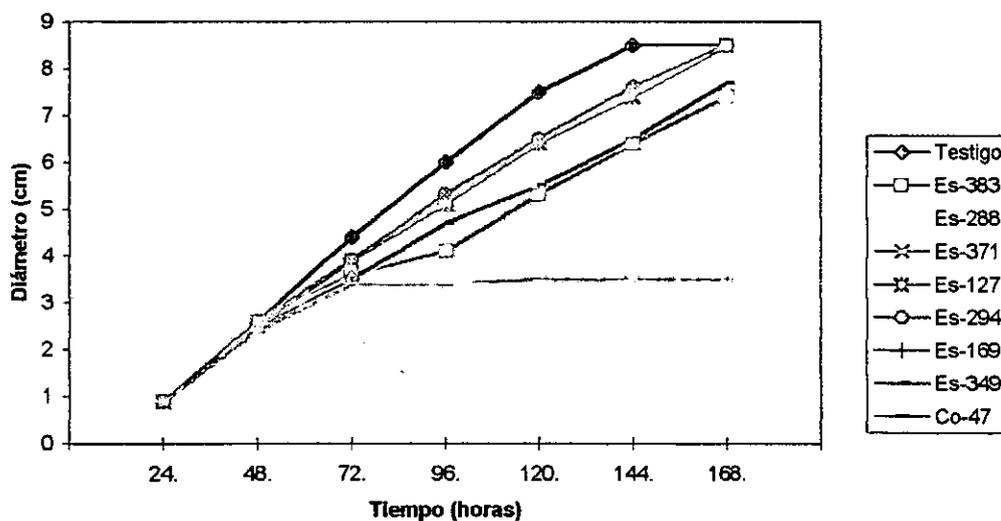


Figura 11. Efecto de las bacterias aisladas de los estigmas, sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus* en pruebas de laboratorio.

### c. De las brácteas

Cuando se probaron los cinco aislamientos bacterianos, seleccionados y aislados de las brácteas, de manera independiente contra *A. flavus*, se comportaron de modo similar a algunos de los aislamientos bacterianos de los estigmas, se observó también un crecimiento del hongo alrededor de las colonias bacterianas pero no sobre éstas (Tabla 6, Figura 12).

Estos aislamientos presentaron menor efecto antagónico respecto a los de la rizósfera (Tabla 7 y Figura 13). El sitio de infección por el hongo en la naturaleza es cercano, por eso era importante probarlos.

**Tabla 6: Diámetro de las colonias de *A. flavus* con bacterias antagónicas de brácteas de la mazorca del maíz.**

Cepas de bacterias	Diámetro (cm) de colonias de <i>A. flavus</i> a diferentes tiempos.						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Testigo	0.9	2.6	4.0	5.9	7.0	8.5	8.5
	0.9	2.6	4.0	5.9	7.0	8.5	8.5
	0.9	2.6	3.9	5.9	7.0	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>0.9</b>	<b>2.6</b>	<b>4.0</b>	<b>5.9</b>	<b>7.0</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
Br-576	0.9	2.5	3.6	4.1	4.4	5.4	7.2
	0.9	2.4	3.5	4.1	4.4	5.4	7.3
	0.9	2.3	3.5	4.2	4.5	5.5	7.3
<b>Promedio</b>	<b>0.9</b>	<b>2.4</b>	<b>3.5</b>	<b>4.1</b>	<b>4.4</b>	<b>5.4</b>	<b>7.3</b>
Br-253	0.9	2.4	3.4	4.0	4.3	5.4	6.6
	0.9	2.5	3.6	4.1	4.3	5.5	6.8
	0.9	2.5	3.6	4.3	4.3	5.5	6.9
<b>Promedio</b>	<b>0.9</b>	<b>2.3</b>	<b>3.5</b>	<b>4.1</b>	<b>4.3</b>	<b>5.5</b>	<b>6.8</b>
Br-365	0.9	2.5	3.5	4.2	5.4	6.7	7.4
	0.9	2.5	3.6	4.0	5.4	6.3	7.3
	0.9	2.5	3.7	4.2	5.4	6.5	7.4
<b>Promedio</b>	<b>0.9</b>	<b>2.5</b>	<b>3.6</b>	<b>4.1</b>	<b>5.4</b>	<b>6.5</b>	<b>7.4</b>
Br-276	0.9	2.5	3.6	4.7	5.6	6.9	8.2
	0.9	2.4	3.5	4.6	5.8	6.7	8.3
	0.9	2.5	3.6	4.7	5.7	6.7	8.3
<b>Promedio</b>	<b>0.9</b>	<b>2.5</b>	<b>3.7</b>	<b>4.7</b>	<b>5.7</b>	<b>6.8</b>	<b>8.3</b>
Br-345	0.9	2.4	3.6	4.7	5.9	6.8	7.9
	0.9	2.5	3.7	4.8	6.1	7.0	7.7
	0.9	2.5	3.7	4.8	6.0	7.0	7.8
<b>Promedio</b>	<b>0.9</b>	<b>2.5</b>	<b>3.7</b>	<b>4.8</b>	<b>6.0</b>	<b>6.9</b>	<b>7.8</b>

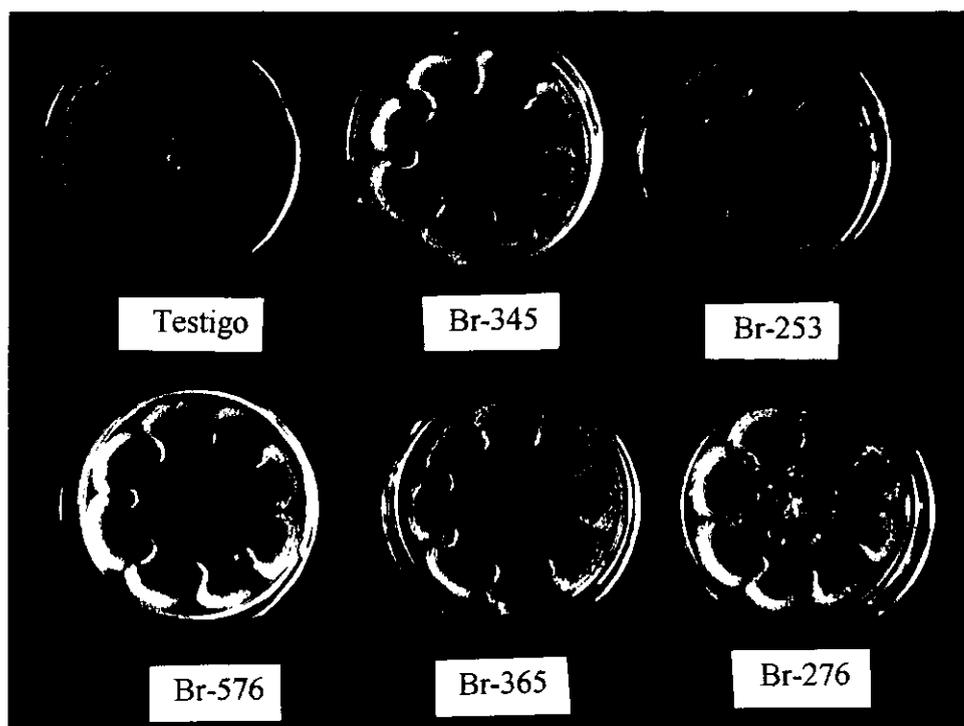


Figura 12. Aislamientos bacterianos antagonicos contra *Aspergillus flavus* aislados de las brácteas.

Tabla 7. Promedio de la inhibición del diámetro (en cm) de *A. flavus* con bacterias de las brácteas de la mazorca de maíz.

Aislamientos	Diámetro (cm) de las colonias de <i>A. flavus</i> en diferentes tiempos						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Testigo	0.9	2.6	4.0	5.9	7.0	8.5	8.5
Br-576	0.9	2.4	3.5	4.1	4.4	5.5	7.26
Br-253	0.9	2.5	3.5	4.1	4.4	5.5	6.76
Br-365	0.9	2.5	3.6	4.1	5.4	6.5	7.36
Br-276	0.9	2.5	3.6	4.7	5.7	6.8	8.26
Br-345	0.9	2.5	3.7	4.8	6.0	6.9	7.80

Br = Brácteas, h = horas

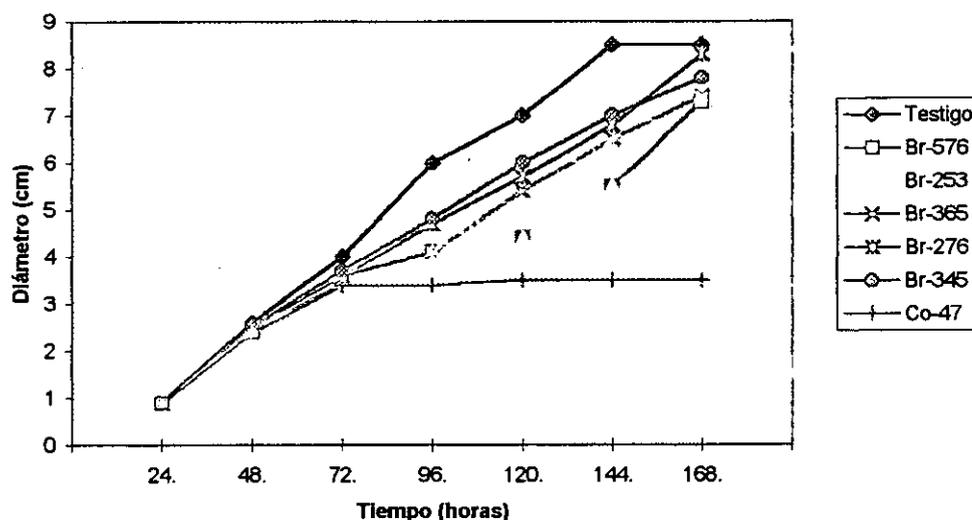


Figura 13. Efecto de las bacterias aisladas de las brácteas sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus* en pruebas de laboratorio.

#### d. Bacterias con actividad antagónica comprobada.

Las bacterias con actividad antagónica comprobada contra diferentes microorganismos fitopatógenos, inhibieron poco a *A. flavus* comparadas con los aislamientos de rizosfera (Co-47, Co-81, Tez-118 y Tez-226) que inhibieron más del 50% el desarrollo del hongo. El hongo creció sobre las colonias bacterianas hasta cubrir totalmente la placa de PDA (Figura 14). Los aislamientos: Tez-227, Es (169, 343 y 371) se comportaron igual.

La Tabla 8 presenta el comportamiento antagónico de los aislamientos al probarse individualmente contra *A. flavus*.

En la Tabla 9 se aprecia una tendencia similar a la de los aislamientos bacterianos de la filosfera (estigmas y brácteas) donde ninguno inhibió como para ser seleccionado para bioensayos de antagonismo posteriores, los resultados muestran pocas posibilidades de éxito.

En la segunda etapa se seleccionaron las bacterias antagónicas Co-47, Co-81, Ba-205, Ba-72, Ba-53, Ba-252, Tez 118 y Tez-226, para bioensayos subsecuentes. Los aislamientos de la filosfera (estigmas y brácteas) tuvieron actividad antagónica baja y no fueron considerados.

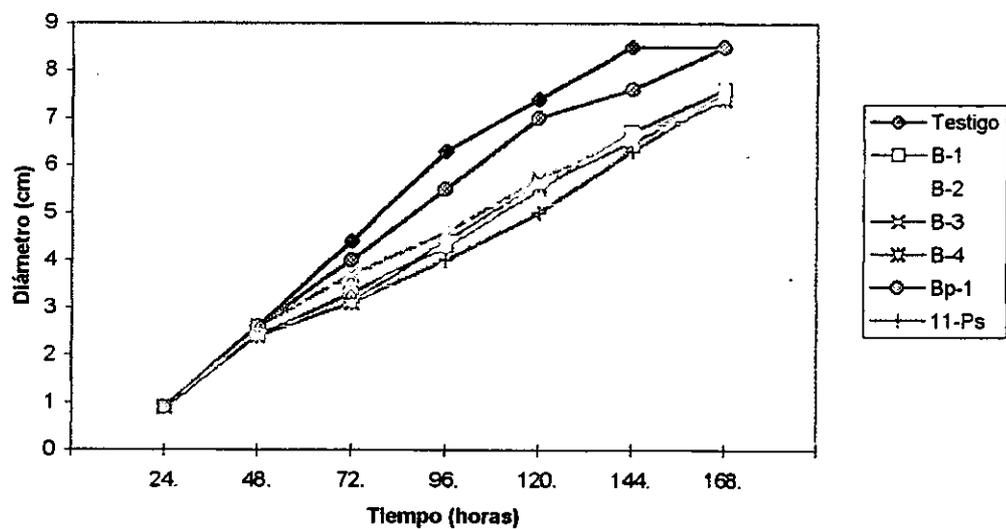


Figura 14. Aislamientos bacterianos con actividad antagónica comprobada, contra otros fitopatógenos, probados contra *Aspergillus flavus*.

Tabla 8: Diámetro de las colonias de *A. flavus* inhibidas con aislamientos bacterianos de capacidad antagónica comprobada contra ciertos hongos y bacterias fitopatógenos.

Cepas de bacterias	Diámetro (cm) de colonias de <i>A. flavus</i> crecidas a diferentes tiempos.						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Testigo	0.9	2.6	4.3	6.2	7.3	8.5	8.5
	0.9	2.6	4.5	6.4	7.4	8.5	8.5
	0.9	2.6	4.3	6.4	7.4	8.5	8.5
Promedio	0.9	2.6	4.4	6.3	7.4	8.5	8.5
B-1	0.9	2.4	3.3	4.4	5.5	6.8	7.6
	0.9	2.4	3.2	4.1	5.3	6.6	7.5
	0.9	2.4	3.3	4.4	5.6	6.7	7.6
Promedio	0.9	2.4	3.1	4.3	5.5	6.7	7.6
B-2	0.9	2.3	3.1	3.9	5.5	6.2	7.3
	0.8	2.3	3.2	4.0	5.3	6.1	7.0
	0.9	2.3	3.2	4.0	5.3	6.2	7.2
Promedio	0.9	2.3	3.2	4.0	5.4	6.2	7.2
B-3	0.9	2.5	3.6	4.5	5.7	6.6	7.5
	0.9	2.6	3.7	4.6	5.7	6.5	7.5
	0.9	2.6	3.8	4.6	5.7	6.6	7.6
Promedio	0.9	2.6	3.7	4.6	5.7	6.6	7.5
B-4	0.9	2.5	3.4	4.5	5.7	6.5	7.4
	0.9	2.4	3.3	4.4	5.6	6.5	7.4
	0.9	2.4	3.3	4.3	5.6	6.4	7.4
Promedio	0.9	2.4	3.3	4.4	5.6	6.5	7.4
Bp-1	0.9	2.6	4.1	5.5	6.7	7.6	8.5
	0.9	2.6	4.0	5.5	6.7	7.6	8.5
	0.9	2.5	4.0	5.4	6.7	7.5	8.5
Promedio	0.9	2.6	4.0	5.5	6.7	7.6	8.5
11-Ps	0.9	2.4	3.1	3.9	4.9	6.2	7.4
	0.9	2.5	3.0	3.9	5.0	6.3	7.5
	0.9	2.4	3.1	4.1	5.2	6.3	7.5
Promedio	0.9	2.4	3.1	4.0	5.0	6.3	7.5

Tabla 9. Promedio de inhibición del crecimiento de *A. flavus* por efecto de bacterias con capacidad antagónica comprobada contra otros fitopatógenos a diferentes tiempos.

Aislamiento	Diámetro (cm) de colonias de <i>Aspergillus flavus</i> a diferentes tiempos						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Testigo	0.90	2.60	4.36	6.33	7.36	8.50	8.5
B-1	0.90	2.40	3.26	4.30	5.46	6.70	7.56
B-2	0.86	2.30	3.16	3.96	5.36	6.16	7.16
B-3	0.90	2.56	3.70	4.56	5.7	6.56	7.53
B-4	0.90	2.43	3.13	4.40	5.63	6.46	7.40
Bp-1	0.90	2.56	4.03	5.46	6.70	7.56	8.50
11-Ps	0.90	2.43	3.06	3.96	5.00	6.26	7.46

B = *Bacillus*, Bp = Bacteria del poro, 11-Ps = *Pseudomonas* sp. h = horas

El método usando medio sólido empleado para cuantificar la capacidad antagónica de las bacterias sobre *Aspergillus flavus* es más preciso que el utilizado por Jiménez (1996) quien usó medio líquido para determinar la biomasa producida por *Rhizoctonia solani* desarrollado en el mismo medio con bacterias antagónicas del género *Bacillus* sp., sin embargo la condición líquida no es idónea para el desarrollo del hongo, quien estaría en desventaja con las bacterias antagónicas.

La ventaja de cuantificar el potencial antagónico en medio sólido midiendo el diámetro alcanzado por el hongo en cultivo dual con las bacterias antagónicas, permite tener una medida más precisa derivada de las condiciones de cultivo que son más cercanas a las naturales, éste método es similar al empleado por Oedjijono (1983) quien cuantificó la antibiosis midiendo halos de inhibición. Askew y Laing (1994) propusieron un método de cuantificación antagónica en medio sólido, en el que establecen cuatro niveles según el crecimiento de *Trichoderma* sp. en cultivo dual con *Rhizoctonia*; este método es semicuantitativo y no refleja con precisión la capacidad antagónica de un microorganismo. El método aplicado en el presente trabajo es más preciso pero no es aplicable a antagonistas que producen compuestos inhibitorios volátiles.

#### 4.5 Espectro de acción de las bacterias antagónicas sobre diferentes hongos fitopatógenos.

El aislamiento bacteriano Co-47 mostró 100% de inhibición, sobre los hongos fitopatógenos: *Helminthosporium*, *Penicillium*, *Phytophthora cinnamomi* (Figura 15), *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum*, en un 98.8% *Pestalotia*; el resto de los hongos fue inhibido de un 88 % a 82% respecto al testigo. Siguió el Tez-118, en capacidad para inhibir hongos fitopatógenos, con un 100% de inhibición sobre *Penicillium*, *Phytophthora cinnamomi* y *Sclerotium cepivorum*; en un 93.4 % *Helminthosporium*; en un 92.6 *Sclerotinia sclerotiorum*; en un 85.2 % *Phoma* y *Rhizoctonia solani*. Los aislamientos Co-81, Tez-226 y Ba-72 inhibieron total o parcialmente el desarrollo de los hongos probados, en un rango de 58.8% a 100%, con excepción de *Fusarium*, que no se inhibió (0%) con ninguna de las tres cepas.

El aislamiento Ba-252 no inhibió ninguna de las cepas de hongos fitopatógenos, ya sea porque perdió capacidad inhibitoria contra los hongos probados, o en general, incluso contra *A. flavus*.

Hubo efectos estadísticamente significativos tanto de los aislamientos antagónicos, como de los hongos fitopatógenos. Los aislamientos Co-47, Co-81 y Tez-118 fueron los que inhibieron mejor a la mayoría de los hongos; mientras que el aislamiento Ba-252 fue que inhibió menos a los hongos probados (Tabla 10 y 11; Figuras 16 y 17). Asimismo, *Sclerotium cepivorum* es el más susceptible a la mayoría de los aislamientos bacterianos antagónicos, el que inhibió menos fue Co-81 (58.5%) respecto al testigo.

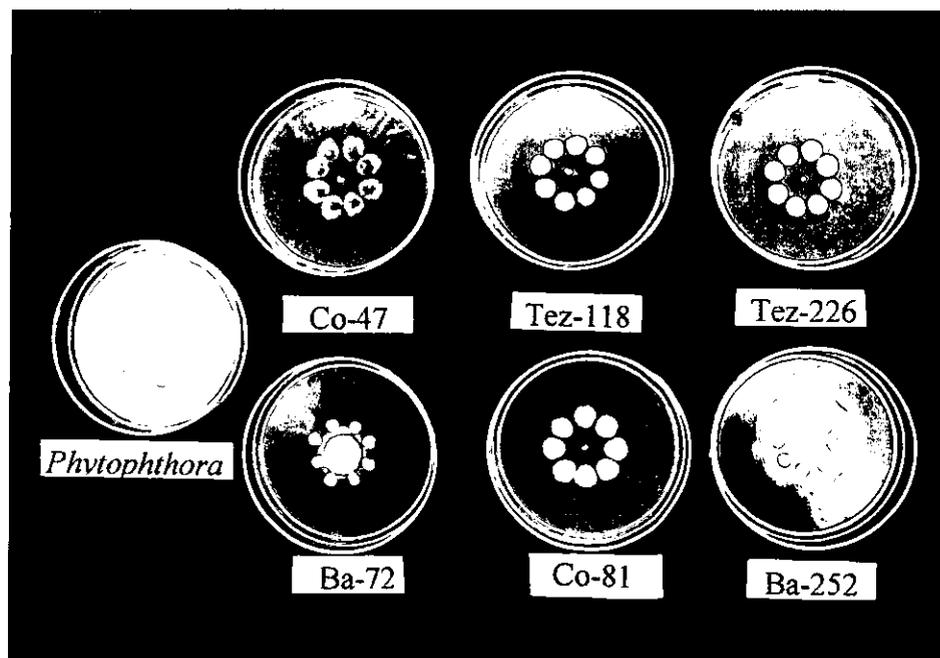


Figura 15. Inhibición del desarrollo de *Phytophthora cinnamomi* por bacterias antagónicas en medio PDA.

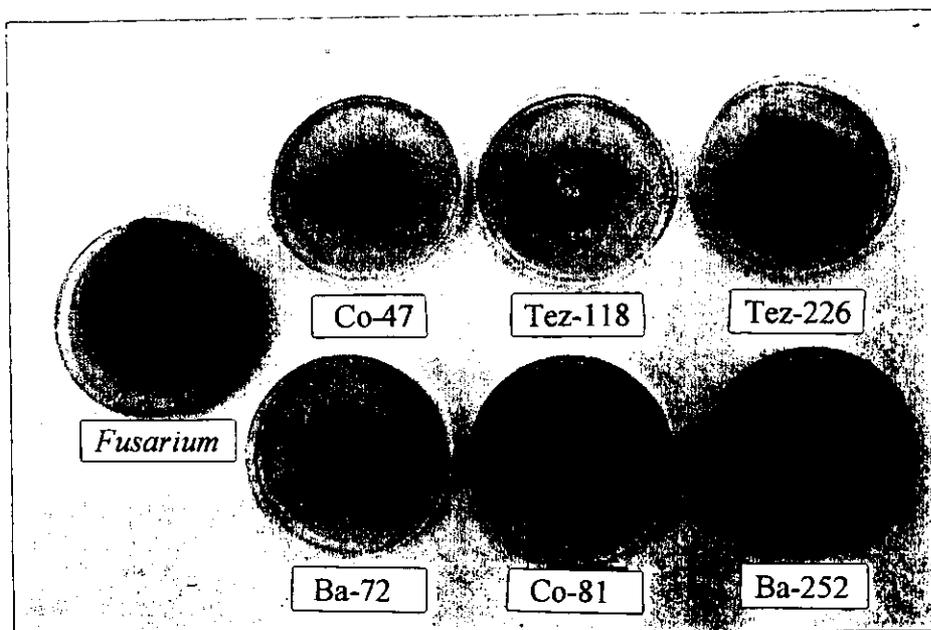


Figura 16. Inhibición del desarrollo de *Fusarium* por bacterias antagónicas.

En control biológico, una característica deseable es que los microorganismos antagónicos posean un amplio espectro de actividad inhibitoria contra hongos fitopatógenos, pero esto no es frecuente en la naturaleza (Broadbent and Baker, 1975).

Se obtuvieron resultados interesantes con hongos de importancia fitopatológica cuya acción dañina se centra en la raíz de las plantas, como *Phytophthora cinnamomi* que afecta las raicillas del árbol de aguacate y produce una muerte lenta del árbol; *Rhizoctonia solani* que afecta tubérculos y raíz de papa produciendo papas de ínfima calidad; *Sclerotinia sclerotiorum* que produce "pudrición del pie" en plantas de girasol y lechuga; *Sclerotium cepivorum* que pudre el bulbo de la cebolla. Estos hongos se consideran de suelo y su acción infectiva sobre las plantas dependerá de factores ambientales, así como de las poblaciones de microorganismos benéficos o antagónicos presentes en el suelo.

*Phytophthora cinnamomi* y *Sclerotium cepivorum* fueron totalmente inhibidos por los aislamientos bacterianos Co-47, Co-81, Tez-118 y Tez-226. Según Cook (1991), la inhibición observada en el laboratorio, puede tener la misma efectividad al suelo que en plantas. Esta capacidad de inhibición tan efectiva en placa, debe tomarse en cuenta para realizar bioensayos y pruebas de campo para determinar si ese potencial inhibitorio se incrementa, mantiene o si disminuye cuando las bacterias se encuentran actuando en un medio natural. Tomando en cuenta que las bacterias trabajadas provienen de suelo de rizosfera, estas tienen grandes posibilidades de adaptarse a un sistema rizosférico, como el de las plantas que son atacadas por estos hongos, lo que dependerá de las condiciones de humedad, temperatura, pH, poblaciones microbianas presentes en la rizosfera del aguacate y la cebolla.

Tabla 10. Inhibición por bacterias antagonicas sobre hongos fitopatogénos.

Hongos	Diámetro de colonias de hongos fitopatogénos con acción de las bacterias antagonicas.						
	Co-47	Co-81	Tez-118	Tez-226	Ba-72	Ba-252	Testigo
<i>Aspergillus flavus</i>	1.3	1.6	1.6	1.7	1.9	7.2	8.5
	1.6	1.6	1.7	1.8	1.9	7.3	8.5
	1.6	1.6	1.7	1.9	1.7	7.2	8.5
<b>Promedio</b>	<b>1.5</b>	<b>1.6</b>	<b>1.7</b>	<b>1.8</b>	<b>1.8</b>	<b>7.2</b>	<b>8.5</b>
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	1.3	1.3	1.4	3.4	4.5	8.5	8.5
	1.2	1.3	1.3	3.5	4.6	8.5	8.5
	1.2	1.3	1.2	3.6	4.4	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>1.2</b>	<b>1.3</b>	<b>1.3</b>	<b>3.5</b>	<b>4.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
<i>Fusarium sp.</i>	0.8	8.5	3.2	8.5	8.5	8.5	8.5
	0.7	8.5	3.2	8.5	8.5	8.5	8.5
	0.9	8.5	3.0	8.5	8.5	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>0.8</b>	<b>8.5</b>	<b>3.1</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
<i>Helminthosporium maydis</i>	0.0	1.3	0.5	1.4	3.0	8.5	8.5
	0.0	1.2	0.6	1.2	3.0	8.5	8.5
	0.0	1.0	0.6	1.2	3.0	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>0.0</b>	<b>1.1</b>	<b>0.6</b>	<b>1.3</b>	<b>3.0</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
<i>Penicillium sp.</i>	0.0	0.6	0.0	1.3	1.4	8.5	8.5
	0.0	0.5	0.0	1.2	1.7	8.5	8.5
	0.0	0.4	0.0	1.4	1.6	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>0.0</b>	<b>0.5</b>	<b>0.0</b>	<b>1.3</b>	<b>1.6</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
<i>Pestalotia sp.</i>	0.1	2.2	2.4	3.5	8.5	8.5	8.5
	0.1	2.1	2.1	3.4	8.5	8.5	8.5
	0.1	2.2	2.1	3.6	8.5	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>0.1</b>	<b>2.2</b>	<b>2.2</b>	<b>3.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
<i>Phoma sp.</i>	0.2	1.5	1.0	1.2	0.5	8.5	8.5
	0.4	1.5	1.4	1.2	0.6	8.5	8.5
	0.3	1.5	1.4	1.2	0.5	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>0.3</b>	<b>1.5</b>	<b>1.3</b>	<b>1.2</b>	<b>0.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	8.5	8.5
	0.0	0.0	0.0	0.0	4.6	8.5	8.5
	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>4.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
<i>Rhizoctonia solani</i>	1.0	0.6	1.2	4.4	0.8	8.5	8.5
	1.0	0.9	1.4	4.6	0.7	8.5	8.5
	1.0	0.9	1.2	4.5	0.8	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>1.0</b>	<b>0.8</b>	<b>1.3</b>	<b>4.5</b>	<b>0.7</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
<i>Sclerotium cepivorum</i>	0.0	3.4	0.0	0.0	0.0	8.5	8.5
	0.0	3.6	0.0	0.0	0.0	8.5	8.5
	0.0	3.6	0.0	0.0	0.0	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>0.0</b>	<b>3.5</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0.0	1.2	0.7	2.1	1.1	8.5	8.5
	0.0	1.2	0.8	2.1	1.2	8.5	8.5
	0.0	1.2	0.4	2.3	1.3	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>0.0</b>	<b>1.2</b>	<b>0.6</b>	<b>2.2</b>	<b>1.2</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>

Tabla 11. Antibiosis promedio por bacterias antagonicas sobre el desarrollo de hongos fitopatogenos en medio PDA.

Hongos	Promedio del diámetro de crecimiento (cm) de los hongos fitopatogenos con acción de las bacterias antagonicas.						
	Co-47	Co-81	Tez-118	Tez-226	Ba-72	Ba-252	Testigo
<i>A. flavus</i>	1.5	1.6	1.7	1.8	1.8	7.2	8.5
<i>Colletotrichum</i>	1.2	1.3	1.3	3.5	4.5	8.5	8.5
<i>Fusarium</i>	0.8	8.5	3.1	8.5	8.5	8.5	8.5
<i>Helminthosporium</i>	0.0	1.2	0.6	1.3	3.0	8.5	8.5
<i>Penicillium</i>	0.0	0.5	0.0	1.3	1.6	8.5	8.5
<i>Pestalotia</i>	0.1	2.1	2.2	3.5	8.5	8.5	8.5
<i>Phoma</i>	0.3	1.5	1.3	1.2	0.5	8.5	8.5
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	8.5	8.5
<i>Rhizoctonia solani</i>	1.0	0.8	1.3	4.5	0.8	8.5	8.5
<i>Sclerotium</i>	0.0	3.5	0.0	0.0	0.0	8.5	8.5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0.0	1.2	0.6	2.2	1.2	8.5	8.5

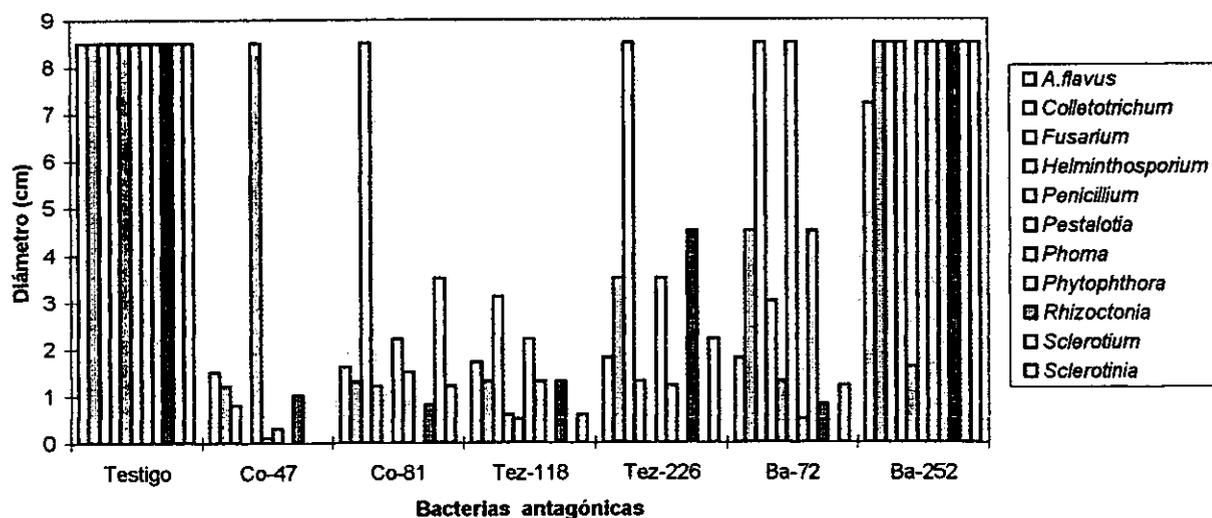


Figura 17. Antibiosis de los aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de hongos fitopatogenos.

Se han realizado trabajos de control biológico con bacterias, contra *Phytophthora megasperma* y *Phytophthora cactorum* (Tu, 1978; Utkhede, 1984; Utkhede and Gaunce, 1983) y contra *Phytophthora cinnamomi* (Broadbent and Baker, 1975; Linderman *et al.*, 1994; Malajczuk *et al.*, 1977). En relación con *Sclerotium cepivorum* se ha intentado su control mediante *Bacillus subtilis* (Utkhede and Rahe, 1980), pero no mediante *Pseudomonas fluorescens* donde el aislamiento Co-47 inhibió a este hongo efectivamente.

Los porcentajes de inhibición sobre *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* fueron altos por efecto del aislamiento Co-47, Co-81, Tez-118 y Ba-72, su control también se ha intentado mediante el uso de *Trichoderma* y bacterias antagónicas (Elad *et al.*, 1987; Hadar *et al.*, 1979; Howel and Stipanovic, 1979; Meshram and Jager, 1983; Rothrock and Gottlieb, 1984; Merriman *et al.*, 1974) con resultados prometedores al igual que los obtenidos en el presente trabajo. El comportamiento antagónico de las bacterias puede variar en el campo, sin embargo existen posibilidades de éxito por la procedencia de los aislamientos, cuya acción está dirigida para proteger el sistema radicular de las plantas de papa, girasol y lechuga.

Respecto a los hongos que afectan las partes aéreas de las plantas de limón, maíz, hortalizas y frutales como son *Colletotrichum gloeosporioides*, *Helminthosporium*, *Pestalotia* sp. y *Phoma* sp. éstos fueron inhibidos con efectividad por los aislamientos Co-47, Co-81 y Tez-118. Sin embargo, las posibilidades de éxito para el control de estos hongos son mínimas debido a que estas cepas proceden del sistema rizosférico cuyas condiciones son diferentes a las que se presentan en la superficie de las plantas, por lo que su adaptación a la filósfera es poco probable (Andrews, 1992; Blakeman and Fokkema, 1982; Weller, 1988); sin embargo convendría no descartarlas y realizar experimentos para probar si se adaptan o no y logran inhibir a los hongos del follaje en los cultivos correspondientes.

Los hongos *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp., considerados anteriormente de almacén, fueron inhibidos parcialmente por todos los aislamientos, excepto por el Ba-252, en este caso hay que considerar el comportamiento de estos aislamientos en condiciones de campo; así como las condiciones en que se almacenan los granos y determinar si se mantiene la efectividad de inhibición de las bacterias observada *in vitro*, lo cual sería benéfico, debido a que hasta el momento no se cuenta con sistemas de control biológico para hongos en granos almacenados.

*Fusarium* es considerado un género heterogéneo y versátil por su capacidad de adaptación al ambiente (Booth, 1971), lo podemos encontrar produciendo 'Damping off', pudriciones radiculares, germinación prematura y contaminación de granos almacenados. *Fusarium* manifestó la mayor resistencia a ser inhibido por los aislamientos bacterianos, donde sólo se observó inhibición efectiva con el aislamiento Co-47, parece que el hongo tiene mecanismos que contrarrestan el efecto inhibitorio de las bacterias como una resistencia a las condiciones adversas. El hecho de haber encontrado sólo un aislamiento con efecto antagónico sobre *Fusarium* indica la capacidad del hongo para neutralizar el efecto inhibitorio o bien de que existen pocas poblaciones bacterianas con capacidad para inhibirlo.

La Tabla 13 muestra una inhibición total (0%) de germinación de los conidios tratados con la cepa Co-47, contra 91.9% de germinación de los conidios no tratados, a las 8 horas. A las 24 horas los conidios no tratados tuvieron 100% de germinación, y los conidios tratados se mantuvieron en 0% de germinación. No hubo desintegración de las paredes conidiales al microscopio compuesto y no hubo desarrollo del tubo germinativo, lo que significa una inhibición total de la germinación (Figura 18).

c. **Esclerocios.** El aislamiento Co-47 inhibió un 99% la germinación de los esclerocios, los aislamientos Co-81, Tez-118, Tez-226 y Ba-72 no la inhibieron, el hongo se desarrolló; pero finalmente fue inhibido hasta su muerte. Los esclerocios testigos con 100% de germinación al igual que los esclerocios tratados de igual forma pero con *Erwinia carotovora*. La inhibición total de la germinación de los esclerocios de *A. flavus*, por acción del aislamiento Co-47 es importante por ser éstos estructuras de resistencia y fuente de inóculo primario presente en el suelo, para iniciar la infección. Los resultados de esta tesis ofrecen un microorganismo capaz de inhibir no sólo la fase vegetativa y reproductiva del hongo, sino que además inhibe los estados de resistencia, esto implica un control total de *A. flavus*.

Los diferentes ensayos realizados para establecer el mecanismo que opera en el proceso de inhibición, indican claramente una antibiosis con cada uno de los aislamientos bacterianos antagónicos probados, en la que existe un componente inhibitorio difusible en el medio. Esto comprueba que la antibiosis es el mecanismo más ampliamente reconocido que inactiva y/o destruye propágulos (Papavizas and Lumsden, 1980). Fue interesante el efecto fungicida del aislamiento Co-47 sobre conidios y esclerocios. Thompson (1991) probó el efecto del butilato de hidroxinasol sobre la germinación de conidios de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* y encontró inhibición parcial (21%) cuando fueron sometidos a 100 mg/mL y una inhibición total cuando se sometieron a 200 mg/mL. La diferencia con el aislamiento Co-47 es que no se observa pérdida gradual de la actividad fungicida como sucedió con el trabajo de Thompson cuando empleó el butilato a una concentración de 100 mg/mL en el que después de 24 horas perdió actividad en un 75%.

Debido a que los esclerocios representan el estado de resistencia del hongo y son los responsables de las infecciones primarias en el campo (Diener and Davis, 1986), la destrucción de éstos reducirá en buena medida las posibilidades de infección a nivel de campo. El efecto del aislamiento Co-47 sobre la inhibición de esclerocios (100%) fue superior al obtenido por Will *et al.* (1994) quienes obtuvieron el 16% de inhibición de la germinación de los esclerocios mediante el uso de *Paecilomyces lilacinus*, quitina y celulosa. Estos resultados comparativos ponen de manifiesto el potencial inhibitorio del aislamiento Co-47 y brinda una buena alternativa para la inactivación de propágulos de *A. flavus*, de alto riesgo para el desarrollo de infecciones primarias.

### c. Efecto sinérgico.

#### a. Mezcla de suspensiones bacterianas en proporción 1:1.

La Tabla 14 muestra el promedio del diámetro alcanzado por *A. flavus* cuando se

Tabla 12: Efecto de las bacterias antagónicas contra *Aspergillus flavus* en mezcla de suspensiones 1:1 v/v.

Cepa	Crecimiento	Cepa	Crecimiento
Testigo	+	Tez-118	-
Co-47	-	Tez-226	-
Co-81	-	Tez-227	+
Co-165	+	Es-169	+
Ba-205	-	Es-383	+
Ba-72	-	Br-576	+
Ba-53	-	11Ps	+
Ba-252	-	B-4	+

Concentración de  $3 \times 10^7$  bacterias/mL y  $3 \times 10^5$  conidios/mL.

Co = Cocotitlán    Tez = Tezoyucan    Br = Brácteas    B-4 = *Bacillus*  
 Ba = Bajío        Es = Estigmas    11 Ps = *Pseudomonas sp.*

b. Efecto del aislamiento Co-47 sobre el micelio, conidios y esclerocios de *A. flavus*.

i. **Micelio.** No se observó efecto micolítico con el aislamiento bacteriano antagónico Co-47 sobre *A. flavus*, bajo el microscopio óptico se vió una ligera pérdida de turgencia respecto al testigo, y un detenimiento del desarrollo del hongo, pero no se observó desintegración del micelio por efecto de alguna enzima.

ii. **Conidios.** No se detectaron cambios morfológicos drásticos en los conidios (desintegración de las paredes) bajo microscopio óptico; no hubo desarrollo del tubo germinativo, y hubo una inhibición total (0 %) de germinación de los conidios tratados con la cepa Co-47 (Figura 18), en comparación con una germinación del 91.9 % de los conidios no tratados a las 8 horas (Tabla 13). A las 24 horas, el 100 % de los conidios no tratados germinaron, mientras que los tratados se mantuvieron completamente inhibidos (0 %).

El comportamiento del aislamiento Co-47 sobre el micelio y conidios de *A. flavus* indica una antibiosis donde posiblemente esté involucrado un antibiótico o compuesto similar con muy buen potencial antagónico.

Tabla 13. Efecto de la bacteria antagonica Co-47 sobre la germinación de conidios de *Aspergillus flavus*.

Microcultivo	Número de conidios observados bajo el microscopio			
	Conidios	Germinados	Conidios A.f./Co-47	Germinados
1	38	35	45	0
2	55	49	36	0
3	41	40	59	0
4	52	47	48	0

A.f. = *Aspergillus flavus*.

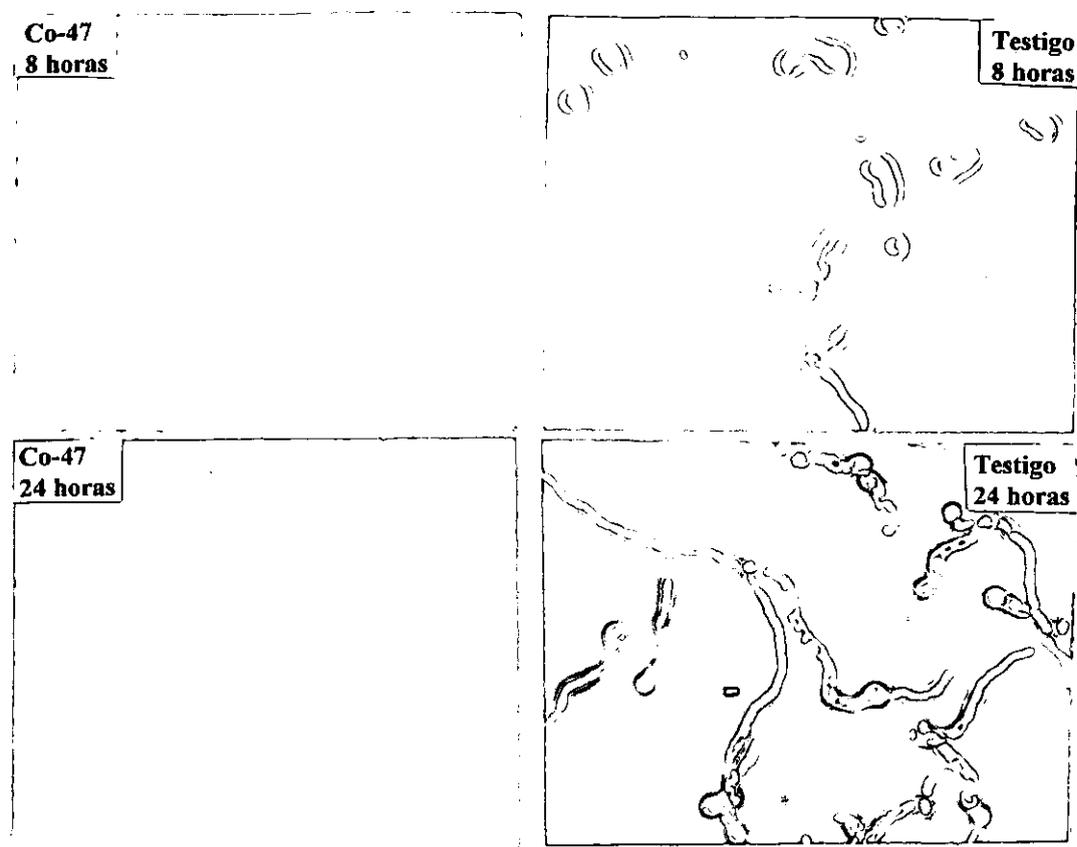


Figura 18. Efecto del aislamiento Co-47 sobre la germinación de conidios de *A. flavus* a diferentes tiempos de incubación.

La Tabla 13 muestra una inhibición total (0%) de germinación de los conidios tratados con la cepa Co-47, contra 91.9% de germinación de los conidios no tratados, a las 8 horas. A las 24 horas los conidios no tratados tuvieron 100% de germinación, y los conidios tratados se mantuvieron en 0% de germinación. No hubo desintegración de las paredes conidiales al microscopio compuesto y no hubo desarrollo del tubo germinativo, lo que significa una inhibición total de la germinación (Figura 18).

iii. **Esclerocios.** El aislamiento Co-47 inhibió un 99% la germinación de los esclerocios, los aislamientos Co-81, Tez-118, Tez-226 y Ba-72 no la inhibieron, el hongo se desarrolló; pero finalmente fue inhibido hasta su muerte. Los esclerocios testigos con 100% de germinación al igual que los esclerocios tratados de igual forma pero con *Erwinia carotovora*. La inhibición total de la germinación de los esclerocios de *A. flavus*, por acción del aislamiento Co-47 es importante por ser éstos estructuras de resistencia y fuente de inóculo primario presente en el suelo, para iniciar la infección. Los resultados de esta tesis ofrecen un microorganismo capaz de inhibir no sólo la fase vegetativa y reproductiva del hongo, sino que además inhibe los estados de resistencia, esto implica un control total de *A. flavus*.

Los diferentes ensayos realizados para establecer el mecanismo que opera en el proceso de inhibición, indican claramente una antibiosis con cada uno de los aislamientos bacterianos antagónicos probados, en la que existe un componente inhibitorio difusible en el medio. Esto comprueba que la antibiosis es el mecanismo más ampliamente reconocido que inactiva y/o destruye propágulos (Papavizas and Lumsden, 1980). Fue interesante el efecto fungicida del aislamiento Co-47 sobre conidios y esclerocios. Thompson (1991) probó el efecto del butilato de hidroxinasol sobre la germinación de conidios de *A. flavus* y *A. parasiticus* y encontró inhibición parcial (21%) cuando fueron sometidos a 100 mg/mL y una inhibición total cuando se sometieron a 200 mg/mL. La diferencia con el aislamiento Co-47 es que no se observa pérdida gradual de la actividad fungicida como sucedió con el trabajo de Thompson cuando empleó el butilato a una concentración de 100 mg/mL en el que después de 24 horas perdió actividad en un 75%.

Debido a que los esclerocios representan el estado de resistencia del hongo y son los responsables de las infecciones primarias en el campo (Diener and Davis, 1986), la destrucción de éstos reducirá en buena medida las posibilidades de infección a nivel de campo. El efecto del aislamiento Co-47 sobre la inhibición de esclerocios (100%) fue superior al obtenido por Will *et al.* (1994) quienes obtuvieron el 16% de inhibición de la germinación de los esclerocios mediante el uso de *Paecilomyces lilacinus*, quitina y celulosa. Estos resultados comparativos ponen de manifiesto el potencial inhibitorio del aislamiento Co-47 y brinda una buena alternativa para la inactivación de propágulos de *A. flavus*, de alto riesgo para el desarrollo de infecciones primarias.

### c. Efecto sinérgico.

#### i. Mezcla de suspensiones bacterianas en proporción 1:1.

La Tabla 14 muestra el promedio del diámetro alcanzado por *A. flavus* cuando se

desarrolló con las diferentes mezclas de bacterias antagónicas. En la mayoría de las mezclas estudiadas hubo diferencias estadísticamente significativas negativas, esto es que el hongo creció más cuando fue puesto a desarrollar con los aislamientos bacterianos mezclados, que cuando se desarrolló sólo con uno de ellos. La mezcla Tez-118 + Tez-226 tuvo una diferencia significativa positiva respecto a Tez-118, es decir el diámetro de la colonia del hongo fue menor al crecer con la combinación bacteriana; el mismo efecto se observó con la mezcla Co-47 + Tez-118 y con la Co-81 + Tez-118, la combinación de éstas fue mejor que cuando se trató al hongo solo con el aislamiento Tez-118. Asimismo, la combinación Co-47 + Tez-226 tuvo una diferencia estadísticamente significativa positiva respecto a Tez-226 solo (Tabla 15).

Valores superiores a 1.000 indican que el hongo creció más que cuando se sometió a un solo aislamiento, la combinación fue menos efectiva (efecto negativo).

Ninguna de las mezclas superó el efecto antagónico de la cepa Co-47 por sí sola, que inhibió el crecimiento de *A. flavus* permitiendo crecer la colonia hasta un diámetro de 2.63 cm; el valor más cercano es el obtenido con la mezcla Co-47/Tez-226 con la que se obtuvo un valor de 2.8 cm superando la actividad de la cepa Tez-226 por sí sola que fue de 3.4 cm pero no superó la actividad de la cepa Co-47.

Tabla 14. Efecto de las mezclas de bacterias antagónicas sobre el diámetro (cm) de crecimiento de *Aspergillus flavus*.

Mezclas de bacterias antagónicas y su acción sobre <i>A. flavus</i>						
Aislamientos	Co-47	Co-81	Tez-118	Tez-226	Ba-72	Ba-253
Co-47	2.6					
	2.7					
	2.6					
Promedio	2.6					
Co-81	5.4	3.1				
	5.0	3.1				
	5.5	3.0				
Promedio	5.3	3.1				
Tez-118	3.9	3.4	4.0			
	3.9	3.4	4.7			
	4.0	3.5	4.8			
Promedio	3.9	3.4	4.5			
Tez-226	2.9	3.5	3.4	3.4		
	2.7	3.6	3.4	3.4		
	2.8	3.8	3.4	3.4		
Promedio	2.8	3.6	3.4	3.4		
Ba-72	4.0	4.0	4.8	4.3	3.7	
	4.0	3.8	4.8	4.5	4.3	
	4.0	3.8	5.0	4.3	4.4	
Promedio	4.0	3.9	4.9	4.4	4.1	
Ba-252	4.9	5.1	5.3	5.1	6.5	4.5
	4.8	5.3	5.1	5.4	6.6	4.7
	5.0	5.3	5.1	5.4	6.3	4.4
Promedio	4.9	5.2	5.1	5.3	6.5	4.5

Tabla 16. Diámetro alcanzado por *Aspergillus flavus* por efecto de la combinación alternada de bacterias antagónicas.

Aislamientos	Co-47	Co-81	Tez-118	Tez-226	Ba-72
Co-47	3.0				
	3.1				
	1.6				
<b>Promedio</b>	<b>2.5</b>				
Co-81	3.0	4.0			
	2.9	4.0			
	2.6	4.0			
<b>Promedio</b>	<b>2.8</b>	<b>4.0</b>			
Tez-118	2.8	3.7	3.7		
	2.7	3.7	3.8		
	2.9	3.7	3.6		
<b>Promedio</b>	<b>2.8</b>	<b>3.7</b>	<b>3.7</b>		
Tez-226	3.2	3.7	3.7	4.5	
	3.0	4.3	3.8	4.2	
	3.8	3.7	3.6	4.5	
<b>Promedio</b>	<b>3.3</b>	<b>3.9</b>	<b>3.7</b>	<b>4.4</b>	
Ba-72	2.6	3.8	3.4	4.0	3.8
	2.6	3.9	3.9	4.2	3.7
	2.9	3.9	3.7	4.2	3.7
<b>Promedio</b>	<b>2.8</b>	<b>3.8</b>	<b>3.6</b>	<b>4.1</b>	<b>3.7</b>

En la mayoría de las combinaciones alternadas no hubo diferencias significativas con excepción de las combinaciones Co-47 + Co-81 respecto a Co-81; Co-47 + Tez-118 respecto a Tez-118; Co-47 + Tez-226 respecto a Tez-226 y Co-47 + Ba-72 respecto a Ba-72; en estas combinaciones hubo diferencias significativas positivas, esto significa que el diámetro del hongo creció menos que cuando fue tratado con los aislamientos bacterianos solos (Tabla 17).

En ambos ensayos de sinergismo (mezcla de suspensiones e inoculación alternada), no se observó un efecto inhibitorio importante sobre el hongo, que es lo que se buscó al mezclar dos cepas con capacidad antagónica para mejorar la actividad que se obtiene al utilizar una sola cepa.

Tabla 17. Comportamiento sinérgico de los aislamientos bacterianos antagónicos sobre el crecimiento de *A. flavus*.

	Aislamientos bacterianos antagónicos				
	Co-473	Co-81	Tez-118	Tez-226	Ba-72
Co-47	T	+	+	+	+
Co-81	ns	T	ns	ns	ns
Tez-118	ns	ns	T	ns	ns
Tez-226	ns	ns	ns	T	ns
Ba-72	ns	ns	ns	ns	T

T = Sólo un aislamiento bacteriano contra *A. flavus*

ns = Estadísticamente no significativo ( $P < 0.05$ )

+ = Efecto estadísticamente significativo positivo ( $P < 0.05$ )

El mejor método para determinar un efecto sinérgico de las bacterias involucradas, fue la siembra directa alternada; debido a que no hay competencia por nutrientes, como cuando se siembran las bacterias mezcladas en suspensión.

#### 4.7. Identificación de las bacterias en biocontrol.

Todos los aislamientos bacterianos antagónicos se identificaron como *Pseudomonas fluorescens*: la Ba-72 fue Biovar II; Tez-118, Tez-226 y Co-81 fueron Biovar III y la cepa Co-47 fue Biovar IV (Tabla 18).

Los códigos de las lecturas de API 20 E (de 1157455) y de 20 NFT (de 2206004) para el aislamiento Co-47, en la tabla de API ubican al aislamiento Co-47 como *Pseudomonas fluorescens* (Figura 19). Las cepas de referencia *P. putida* y *P. aureoginosa* dieron los resultados correspondientes a la taxonomía establecida en el Manual de Bergey.

Estos resultados coinciden con las pruebas bioquímicas tradicionales donde se identificó la cepa Co-47 como *P. fluorescens* con la particularidad de no producir fluorescencia en medios de cultivo King A y B tampoco en FN específicos para determinar la producción de fluoresceína. Este fenómeno de pérdida de fluorescencia ha sido observado en *Pseudomonas* del grupo *fluorescens* donde aislamientos que fluorescían posteriormente perdieron dicha capacidad. Se desconoce la razón de pérdida de esta actividad; quizá las presiones ambientales tan fluctuantes en algunas regiones, hacen que muten los microorganismos para adaptarse a nuevos ambientes, y modifican su metabolismo, además hay cambios producidos por los pesticidas en la microflora.

Tabla 18. Pruebas para identificar a los aislamientos bacterianos antagonicos.

Bioquímica	Cepas bacterianas antagonicas					
	Ba-72	Tez-118	Tez-226	Co-81	Co-47	P.f.
Fluorescencia: King A, B y FN	+	+	+	+	-	+
Tinción de Gram	-	-	-	-	-	-
O/F	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
Producción de:						
β hidroxibutirato	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
Levana	+	-	-	-	+	+/-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de:						
Almidón	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-
Lípidos	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Arginina	+	+	+	+	+	+
Ácido a partir de:						
Celobiosa	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	+	-	-	-	+	-
Xilosa	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	-
Inositol	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Trealosa	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a:						
41° C	+	+	+	+	+	+
5° C	-	-	-	-	-	-

O/F = Oxidación fermentación; P.f. = *Pseudomonas fluorescens*

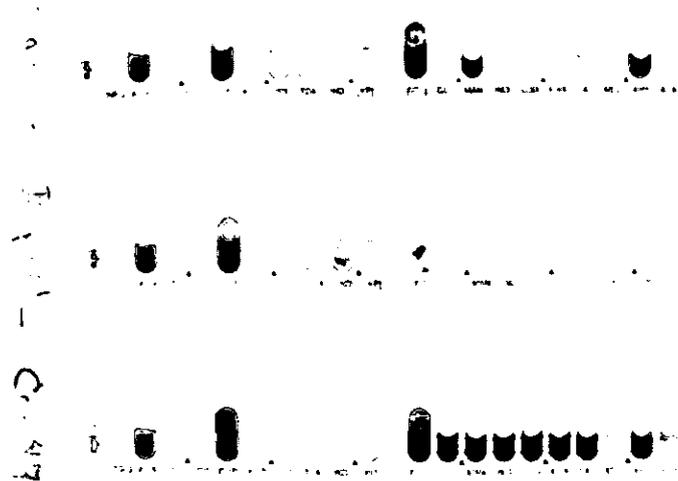


Figura 19. Pruebas de API 20 E y 20 NFT de *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens* (Co-47), después de 48 horas de incubación.

#### 4.8 Identificación del aislamiento Co-47 mediante la homología de ADN.

Con base en la secuenciación del gen 16s rARN para determinar la similitud del aislamiento Co-47 con especies de *Pseudomonas* del grupo *fluorescens*, se encontró una homología posicional con *P. putida* (80 %) y *P. fluorescens* (90 %). Hay que realizar pruebas de homología con otras especies cercanas entre sí para poder establecer con mayor precisión la homología al 100%.

La posibilidad de que el aislamiento Co-47 se pueda clasificar dentro del género *Burkholderia* propuesto por Yabuuchi *et al.* (1992) ó *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.*, 1995) es nula debido a que estos nuevos géneros propuestos agrupan especies de *Pseudomonas* relacionadas con *Pseudomonas solanacearum* (Brett *et al.*, 1998) sus características bioquímicas y fisiológicas son muy diferentes a las observadas en el aislamiento Co-47. Los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia* reúnen especies patógenas de plantas, animales y del hombre, por lo que considerando el origen del aislamiento Co-47, a partir de la rizosfera del maíz, y su inocuidad comprobada en plantas y semillas de diferentes especies vegetales, se considera una bacteria saprófita. Por otra parte, con excepción de *Burkholderia cepacia* ninguna de las especies dentro de este género es capaz de crecer en cloruro de sodio al 5 %; mientras que el aislamiento Co-47 sí logra desarrollarse en estas condiciones.

La producción de pigmento azul y amarillo por el aislamiento Co-47 no permite

ubicarlo dentro del género *Burkholderia*, debido a que las especies de este género no son capaces de producir estos pigmentos.

Las características anteriores sumadas a la diferencia en la utilización de carbohidratos y la no producción de  $\beta$ -hidroxibutirato definitivamente no permiten agrupar al aislamiento Co-47 dentro del género *Burkholderia* o *Ralstonia*, pero sí la ubican dentro del género *Pseudomonas fluorescens*.

#### 4.9 Efecto de las bacterias antagonicas sembradas a diferente tiempo respecto a *A. flavus*.

El efecto de los aislamientos bacterianos sembrados a diferente tiempo respecto a *A. flavus*, incrementó la actividad antagonica al aumentar el tiempo de incubación de las bacterias y la siembra posterior de *A. flavus* (Figura 20); sin embargo después de 48 horas de incubación de las bacterias esta actividad tiende a estabilizarse y ya no se percibe un aumento importante en el antagonismo.



Figura 20. Incubación del aislamiento Co-47 a diferentes tiempos y su efecto sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus*.

No aumentó significativamente la actividad inhibitoria entre los seis aislamientos probados, no se requirió incubar más tiempo las bacterias para ensayos de inhibición *in vitro*, el comportamiento de los diferentes aislamientos fue similar, pero con diferente actividad (Tabla 19).

El aislamiento Co-47 produjo más componente activo inhibitorio y requirió menor tiempo para inhibir el crecimiento del hongo, le siguieron en efectividad los aislamientos Tez-118 y Tez-226 (Figura 21). Con una incubación de 48 horas de las bacterias antagonicas y la siembra posterior de *A. flavus*, la actividad inhibitoria de los seis aislamientos no aumentó significativamente, no tuvo caso incubar más tiempo las bacterias para ensayos de antagonismo *in vitro*.

Estos datos indican una alta eficiencia de los aislamientos antagonicos Co-47, Tez-118, Tez-226 para producir el metabolito inhibitorio, y en poco tiempo (48 horas) produjeron la inhibición total del crecimiento del hongo. Estos datos son útiles para el análisis fisico-químico y la producción del metabolito.

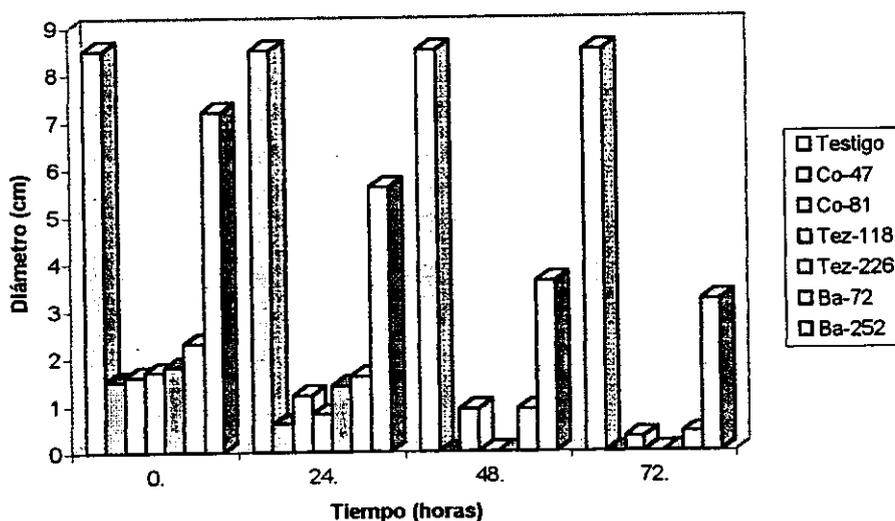


Figura 21. Inhibición de *Aspergillus flavus* por efecto de las bacterias antagonicas a diferente tiempo de incubación.

Tabla 19. Inhibición de *A. flavus* sembrado a diferentes tiempos respecto a las bacterias antagonicas.

Bacterias antagonicas	Tiempo de incubación de las bacterias antagonicas respecto al diámetro (cm) de la colonia de <i>A. flavus</i> .			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Testigo	8.5	8.5	8.5	8.5
	8.5	8.5	8.5	8.5
	8.5	8.5	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
Co-47	1.3	0.2	0.0	0.0
	1.6	0.0	0.0	0.0
	1.6	0.0	0.0	0.0
<b>Promedio</b>	<b>1.5</b>	<b>0.6</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
Co-81	1.6	1.2	0.3	0.9
	1.6	1.2	1.2	0.0
	1.6	1.1	1.2	0.0
<b>Promedio</b>	<b>1.6</b>	<b>1.2</b>	<b>0.9</b>	<b>0.3</b>
Tez-118	1.7	1.4	0.0	0.0
	1.7	0.2	0.0	0.0
	1.6	0.9	0.0	0.0
<b>Promedio</b>	<b>1.7</b>	<b>0.8</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
Tez-226	1.7	1.6	0.0	0.0
	1.8	1.6	0.0	0.0
	1.9	1.1	0.0	0.0
<b>Promedio</b>	<b>1.8</b>	<b>1.4</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
Ba-72	2.1	1.5	1.4	0.4
	2.3	1.8	0.6	0.4
	2.4	1.6	0.6	0.4
<b>Promedio</b>	<b>2.3</b>	<b>1.6</b>	<b>0.9</b>	<b>0.4</b>
Ba-252	7.2	5.5	3.5	3.2
	7.3	5.8	3.6	3.1
	7.2	5.5	3.7	3.2
<b>Promedio</b>	<b>7.2</b>	<b>5.6</b>	<b>3.6</b>	<b>3.2</b>

#### 4.10 Bioensayos en mazorca de maíz con granos en estado lechoso, para determinar el efecto protector de las bacterias antagónicas.

En el ensayo preliminar para obtener un alto porcentaje de infección, se encontró que la inoculación del hongo en granos de maíz previa herida, tuvieron un 100 % de daño; en los granos sin herida no se presentó infección, esto pone de manifiesto la importancia que pueden tener los insectos o daños ocasionados durante la cosecha para crear condiciones propicias para la entrada del hongo.

El comportamiento de las bacterias antagónicas a diferente concentración en los granos de maíz en estado lechoso fue variable, dependió del aislamiento y concentración. Conforme aumentó la concentración de las bacterias antagónicas disminuyó el porcentaje de infección, y la cepa Co-47, redujo la infección de 35.8 % (con concentración de  $3 \times 10^7$  bacterias/mL) a 3.2% (al emplear una concentración de  $3 \times 10^9$  bacterias/mL)(Figura 22); con la cepa Co-81 (Figura 23) se redujo de 54.8 % a 15.6 %, con la cepa Tez-118 la reducción fue de 54.4 % a 4.2 %; con la Tez-226 se redujo de 69.8 % a 3.4 y con la cepa Ba-72 de 61.4 % a 13.6 %. La cepa Ba-252 perdió actividad, en las tres concentraciones probadas la infección fue de 97.2 %, 88.0 % y 82.0 %, el resultado de este aislamiento concuerda con los de antagonismo a diferentes tiempos y con la pruebas de espectro de acción contra diferentes hongos, en las que perdió actividad antagónica (Tabla 20, 21).

Los tratamientos con las bacterias antagónicas y *A. flavus* redujeron la infección que fue directamente proporcional a la concentración de la suspensión bacteriana. El aislamiento Co-47 tuvo mayor capacidad antagónica a la concentración de  $3 \times 10^9$  bacterias/mL al inhibir en un 96.8% la infección del hongo; sin embargo los aislamientos Ba-72, Tez-226, Tez-118 y Co-81 a la misma concentración redujeron la infección en porcentajes de 85.4 %, 95.4 %, 94.8 % y 83.4 % respectivamente. Hubo efecto estadísticamente significativo del aislamiento ( $F_{(5,27)} = 57.23$ ,  $P = 0.0001$ ), concentración ( $F_{(2,72)} = 73.605$ ,  $P = 0.0001$ ), e interacción entre ambos factores ( $F_{(10,72)}$

$= 83$ ,  $P = 0.0051$ ). Está claro que una mayor concentración del inóculo bacteriano disminuye la cantidad de grano infectado. Los aislamientos Co-81 y Ba-72 fueron los menos eficientes para inhibir al hongo y el Ba-252 fue el menos útil, se confirmó la pérdida de actividad de este aislamiento y que no fue posible recuperar (Tabla 21).

A mayor concentración de la suspensión de bacterias antagónicas, hay mayor actividad antagónica, la infección de los granos inoculados se redujo. La cepa de bacteria antagónica Co-47 dió mejor protección, seguida por la Tez-226 y Tez-118.



Figura 22. Bioensayo en mazorcas inoculadas en herida con el aislamiento Co-47 y *Aspergillus flavus*, testigo inoculado con agua destilada.

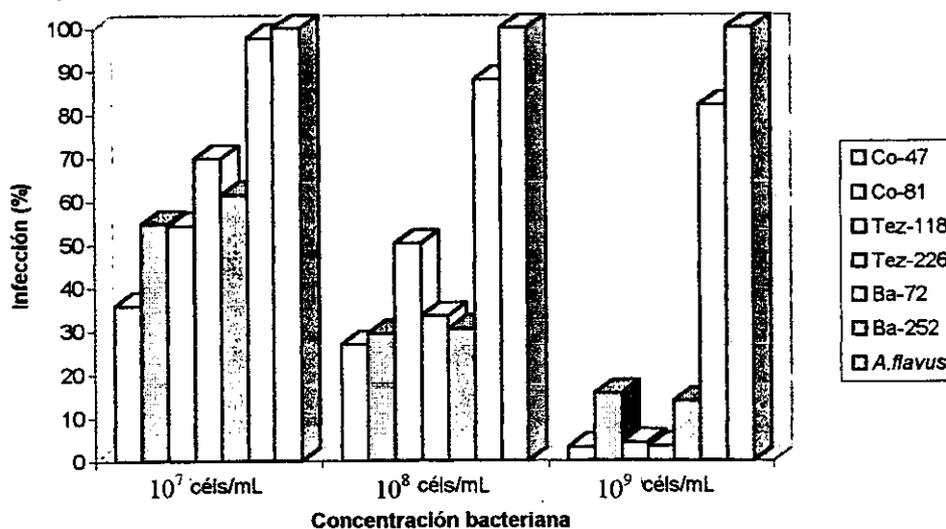


Figura 23. Comportamiento de los aislamientos bacterianos según su concentración sobre la inhibición de *Aspergillus flavus* en mazorcas de maíz.

Tabla 20. Porcentaje de infección por *Aspergillus flavus* en mazorca de maíz con granos en estado lechoso previa protección con bacterias antagónicas.

Tratamientos	Porcentaje de infección en granos de maíz		
	Concentración de la suspensión bacteriana		
	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>
Co-47	17	24	7
	45	25	3
	49	39	1
	38	20	2
	30	26	3
Promedio	35.8	26.8	3.2
Co-81	94	22	16
	43	16	6
	49	44	23
	41	25	15
	47	40	18
Promedio	54.8	29.4	15.6
Tez-118	64	46	1
	35	45	4
	73	60	7
	46	49	5
	54	51	4
Promedio	54.4	50.2	4.2
Tez-226	70	56	2
	80	15	6
	78	35	1
	76	33	5
	45	28	3
Promedio	69.8	33.4	3.4
Ba-72	37	46	8
	79	12	12
	51	30	20
	66	36	17
	74	28	11
Promedio	61.4	30.4	13.6
Ba-252	90	82	45
	100	80	92
	100	94	94
	96	95	87
	100	89	92
Promedio	97.2	88	82

Tabla 21. Porcentaje de infección por *Aspergillus flavus* en mazorcas de maíz protegidas por bacterias antagónicas.

Aislamientos bacterianos	Concentración de la suspensión bacteriana		
	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>
Co-47 + <i>Af</i>	35.8(sd 12.75)	26.8(sd 6.71)	3.2(sd 2.28)
Co-81 + <i>Af</i>	54.8(sd 22.14)	29.4(sd 12.03)	15.6(sd 6.19)
Tez-118 + <i>Af</i>	54.4(sd 14.88)	50.2(sd 5.97)	4.2(sd 2.17)
Tez-226 + <i>Af</i>	69.8(sd 14.35)	33.4(sd 14.84)	3.4 (sd 2.07)
Ba-72 + <i>Af</i>	61.4(sd 17.27)	30.4(sd 12.44)	13.8(sd 6.09)
Ba-252 + <i>Af</i>	97.7(sd 4.36)	88.0(sd 6.80)	82.0(sd 20.84)
Control <i>Af</i>	100		

Control *Af* = *Aspergillus flavus* inoculado a  $3.5 \times 10^8$  conidios/mL  
sd = desviación estándar.

#### 4.11 Determinación del efecto inocuo de las bacterias antagónicas sobre especies vegetales.

**Hipersensibilidad en tabaco.** Ninguna de las bacterias antagónicas dió positiva la prueba de hipersensibilidad en tabaco a las concentraciones 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> células/mL, la zona del tejido de la hoja del tabaco infiltrada con la suspensión bacteriana se mantuvo siempre turgente y sin cambio de color lo que no sucedió con el tabaco testigo con *Pseudomonas phaseolicola* que en 12 horas comenzó a dar positiva la reacción de hipersensibilidad con necrosis oscura que mata al tejido. Las bacterias antagónicas no producen daño, son inocuas y se pueden utilizar para el control biológico.

**Pudrición de tubérculos de papa.** No se observó pudrición de las rodajas de papa por efecto de las cepas antagónicas; mientras que cuando se usó como testigo positivo a una rodaja de papa inoculada con *Erwinia carotovora*, a las 48 horas ya la había podrido completamente por las enzimas pectolíticas.

#### 4.12 Efecto de las bacterias antagónicas sobre la germinación de semillas de diferentes especies vegetales.

Cuando se aumentó la concentración, de  $3 \times 10^7$  a  $3 \times 10^9$  bacterias/mL, de las suspensiones Co-47, Ba-72, Tez-226, aumentó la germinación de las semillas de maíz, calabaza y coliflor. Con las semillas de frijol se observó el mismo comportamiento,

excepto con la cepa Co-47 que redujo su germinación de 69.5 % a 63.3 %. Los porcentajes de germinación de las semillas de chícharo disminuyeron respecto al testigo, en todas las concentraciones manejadas, esto significa que estas semillas presentan baja tolerancia a las bacterias antagonicas (Tabla 22).

**Tabla 22. Efecto de las bacterias antagonicas sobre el porcentaje de germinación de semillas de diferentes especies vegetales.**

Tipos de vegetales	Testigo	Bacterias antagonicas					
		Co-47		Tez-226		Ba-72	
		10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>
Maíz	83	80	71	93	89	86	83
	87	70	85	85	91	75	78
	75	78	81	87	90	80	92
	80	72	87	89	85	79	87
Frijol	63	67	61	58	64	59	66
	66	70	63	60	67	57	67
	60	72	69	61	60	61	70
	70	69	60	63	65	57	65
Calabaza	52	42	44	55	54	38	55
	54	47	48	50	56	40	50
	57	40	52	57	54	47	56
	52	46	49	53	58	49	58
Chícharo	55	32	42	45	23	34	45
	50	36	44	47	25	31	42
	61	30	41	44	28	28	45
	60	35	42	41	30	36	39
Jitomate	47	25	50	33	19	40	35
	39	24	48	25	21	44	36
	40	27	37	38	24	38	30
	35	20	40	30	18	41	31
Coliflor	67	67	83	72	72	75	76
	69	60	85	71	75	79	78
	66	68	80	69	70	71	78
	70	69	37	74	72	76	76

La Tabla 22 muestra que las cepas Co-47 y Ba-72 no tienen un efecto deletéreo sobre la germinación de las semillas de maíz, coliflor, frijol y calabaza. A pesar de que la semilla de chícharo disminuye su germinación respecto al testigo, hay un aumento en el número de semillas germinadas al aumentar la concentración de bacterias antagonicas. Esto indica que las bacterias antagonicas favorecen la germinación de las semillas de maíz, coliflor, frijol y calabaza quizá debido a algún metabolito o proteina, queda por estudiar si es a nivel de fitohormonas o no.

El efecto sobre la germinación de las semillas de diferentes especies fue variable, en ninguna se presentó pérdida total de la capacidad de germinar.

El tipo de cepa y la concentración tuvieron un efecto significativo sobre la germinación de las especies probadas ( $X^2 = 42.43$ ,  $P < 0.0001$ );  $X^2 = 6.91$ ,  $P = 0.0086$  respectivamente). El aislamiento Co-47 aumentó la germinación del frijol, pero no del chícharo y tomate que disminuyeron su germinación de manera importante a una concentración de  $10^7$ ; mientras que a la concentración  $10^9$  este efecto fue menor.

El aislamiento Tez-226 afectó poco la germinación de las especies, excepto el chícharo y el jitomate que aumentaron su germinación a una concentración de  $10^7$ . Al comparar especies, el maíz, la coliflor y el frijol no se afectaron por las bacterias; mientras que el chícharo y el jitomate fueron los más susceptibles. Altas concentraciones del aislamiento Tez-226 disminuyeron las germinaciones de chícharo y jitomate, y ayudaron a la germinación de la coliflor (Tabla 23).

**Tabla 23. Promedio del porcentaje de germinación de diferentes vegetales por efecto de aislamientos bacterianos a dos concentraciones.**

Tipos de vegetales	Control	Porcentaje de germinación de semillas por efecto de tres aislamientos bacterianos antagonicos					
		Tez-226		Ba-72		Co-47	
		$10^7$	$10^9$	$10^7$	$10^9$	$10^7$	$10^9$
Maíz	81.3	88.5	88.7	80.0	80.0	75.0	80.0
Chícharo	56.5	44.2	24.0	32.2	42.7	33.2	42.25
Jitomate	40.3	31.5	20.1	40.7	33.0	24.0	43.75
Coliflor	68.0	71.5	72.2	75.2	77.0	66.0	71.25
Frijol	64.8	60.5	64.0	58.5	67.0	69.5	63.25
Calabaza	53.8	53.7	55.5	43.5	54.7	43.7	48.25

Con base en los resultados negativos de reacción de hipersensibilidad en tabaco y pudrición de tubérculos de papa, así como el aumento en la germinación de las semillas de algunas especies vegetales, las cepas Co-47, Ba-72 y Tez-226 no fueron fitopatógenas, sí se pueden considerar como saprófitas, lo que las hace microorganismos apropiados para utilizarse como agentes de control biológico.

#### 4.13 Pruebas de antagonismo en plantas de maíz en invernadero y campo.

a. **Invernadero.** Las mazorcas cuyos estigmas fueron inoculados sólo con *A. flavus* dieron 8.8% de infección, que fue baja comparada con el 100% de infección producido en los bioensayos en mazorca de maíz con granos en estado lechoso, previa herida en los granos antes de inocular al hongo; esto muestra la importancia de las heridas producidas por insectos o por actividades de labranza, para crear sitios de entrada del hongo e inducir la infección. Aún cuando la infección por inoculación de estigmas fue baja, permitió determinar el grado de protección que los diferentes aislamientos bacterianos dan ante la infección del hongo, y además comprobar que los estigmas también son sitios de entrada para la infección natural de *A. flavus*, y quizá el más importante, por estar los estigmas expuestos al ambiente y que no requieren de heridas, para la entrada del hongo.

El aislamiento Co-47 fue el que más previno la infección por *A. flavus* al penetrar por los estigmas, y les brindó una protección de 88.6 % respecto al testigo; le siguió en capacidad de protección el aislamiento Co-81 con 84.1 %; mientras que el Tez-118 dió 61.4% y el Tez-226 dió 47.7% de protección. El aislamiento Ba-72 fue el menos efectivo con un 13.6 % de protección.

Los aislamientos Co-47 y Co-81 tuvieron efecto estadísticamente significativo sobre la protección a la infección por *A. flavus* ( $X_2 = 184.8$ ,  $P < 0.0001$ ) (Tabla 24). No hubo diferencias significativas entre el testigo y el aislamiento Ba-72 + *A. flavus* lo que muestra que es menos recomendable para el control biológico de *A. flavus*.

Tabla 24. Protección por los aislamientos bacterianos antagónicos contra la infección de *Aspergillus flavus* en invernadero.

Tratamientos	Porcentaje de infección de mazorcas de maíz					Promedio
	Mazorcas					
	1	2	3	4	5	
<i>A. flavus</i> testigo	8.0	10.0	8.0	7.0	11.0	8.8
Co47/ <i>Af</i>	1.0	0.0	0.0	3.0	1.0	1.0
Co81/ <i>Af</i>	1.0	3.0	0.0	1.0	2.0	1.4
Tez118/ <i>Af</i>	4.0	3.0	2.0	3.0	5.0	3.4
Tez226/ <i>Af</i>	5.0	7.0	4.0	3.0	4.0	4.6
Ba-72/ <i>Af</i>	8.0	6.0	8.0	7.0	9.0	7.6

*Af* = *Aspergillus flavus*.

b. **Campo.** Las mazorcas inoculadas con *A. flavus* en los estigmas únicamente dieron 24.4% de infección, que fue mayor al 15.6% obtenido bajo condiciones de invernadero, esto pone de manifiesto la importancia de las condiciones ambientales naturales para el proceso de infección del hongo.

Hubo efectos estadísticamente significativos de protección por los aislamientos Co-47 (65.6 %), Co-81 (73.78 %), Tez-118 (32 %) y Tez-226 (24.6 %) (Tabla 25).

Los resultados de invernadero y campo muestran diferencias significativas en la capacidad de infección. La infección por *A. flavus* en invernadero fue significativamente más baja al compararla con los valores de campo ( $X^2 = 141.5$ ,  $P < 0.0001$ ), en invernadero *A. flavus* sin bacteria antagónica infectó 8.8%; mientras que en campo la infección alcanzó casi 25% (Tabla 26). El aislamiento Co-47 mostró la mayor capacidad inhibitoria, en invernadero permitió 1% de infección de los granos; el aislamiento Co-81 en invernadero (1.4 % de infección) y al campo (6.4%), mostró una efectividad similar al Co-47; los aislamientos Tez-118 y Tez-226 mostraron un efecto antagónico intermedio; y el aislamiento Ba-72 con *A. flavus* no difirió significativamente, en porcentaje de infección, del *A. flavus* testigo solo (Figura 24) que produjo 8.8% de infección en invernadero y 24.2% en campo (Tabla 26). Las tasas de infección en campo fueron alrededor de tres veces mayores que en invernadero para todos los aislamientos probados.

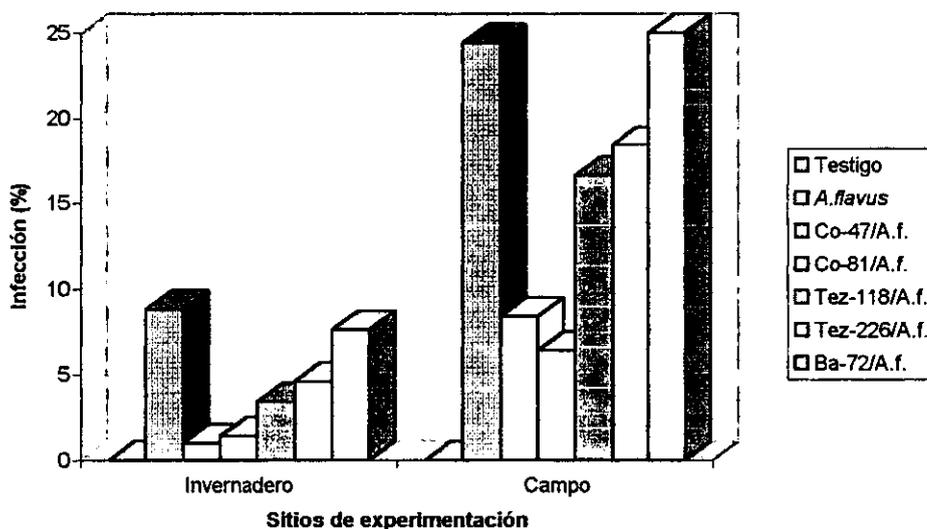


Figura 24. Inhibición de la infección de *A. flavus* por efecto de bacterias antagónicas en pruebas de invernadero y campo.

Los mejores aislamientos en las pruebas de campo fueron el Co-47 y Co-81, esta capacidad de inhibición sobre *A. flavus* quizá se debe a que se adaptaron mejor al clima de la zona (templado subhúmedo) por ser nativas del lugar donde se realizó el estudio de campo. Los aislamientos restantes fueron cepas introducidas de zonas con clima diferente (semicálido subhúmedo), por lo que están en desventaja con los aislamientos nativos.

La infección del grano en mazorcas en invernadero y campo mediante aspersión

de conidios de *A. flavus* sobre los estigmas, corrobora lo reportado por Jones *et al.* (1980) y comprueba la forma natural y capacidad que tiene *Aspergillus flavus* para colonizar e infectar al maíz a través de los estigmas.

La infección del testigo inoculado sólo con el hongo, fue baja en invernadero y campo, pero suficiente como fuente de inóculo y causar problemas graves cuando estos granos infectados se almacenan y mantienen en condiciones inapropiadas de humedad y temperatura, que permiten el desarrollo de hongo y la producción de aflatoxinas.

Cuando los estigmas se trataron con las bacterias antagónicas para brindar protección, la infección respecto al testigo se redujo de manera importante, especialmente con los aislamientos Co-47 y Co-81, por lo que se consideran como los más recomendables y prometedores para establecer un sistema biológico, para el control de *Aspergillus flavus*, especialmente en regiones donde son originarios o con condiciones ambientales similares.

**Tabla 25. Protección por bacterias antagónicas sobre la infección por *A. flavus* en mazorcas de maíz en campo.**

Tratamientos	Porcentaje de infección en mazorcas de maíz a nivel campo					
	Repeticiones					Promedio
	1	2	3	4	5	
<i>A. flavus</i> testigo	26	23	22	26	25	24.4
Co-47/ <i>Af</i>	8.0	5.0	5.0	11.0	9.0	8.4
Co-81/ <i>Af</i>	8.0	3.0	6.0	8.0	7.0	6.4
Tez-118/ <i>Af</i>	18	15	14	17	19	16.6
Tez-226/ <i>Af</i>	20	19	20	17	16	18.4
Ba-72/ <i>Af</i>	24	22	24	28	27	25.0

Estos resultados son similares a los reportados por Cuero *et al.* (1991) quienes trabajando con *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* lograron inhibir significativamente el desarrollo de *A. flavus* en mazorca de maíz antes de la cosecha. Otros estudios de control biológico de *A. flavus* realizados 'in vitro' mediante el uso de *Trichoderma* (Calistru *et al.*, 1997) han tenido resultados prometedores.

La capacidad inhibitoria de *Pseudomonas fluorescens* ha sido comprobada contra varios hongos fitopatógenos (Cook, 1991), sin embargo este es el primer trabajo en el que se prueban bacterias del género *Pseudomonas fluorescens* como agentes inhibidores para el control biológico de *Aspergillus flavus* a nivel de laboratorio, invernadero y de campo.

Tabla 26. Resumen del efecto protector de las bacterias antagónicas sobre el porcentaje de infección por *Aspergillus flavus* en mazorcas de maíz.

Tratamientos	Porcentaje de infección en mazorcas de maíz			
	Invernadero	Error estándar	Campo	Error estándar
<i>A. flavus</i> testigo	8.8	0.735	24.4	0.81
Co-47 + <i>A.f</i>	1.0	0.55	8.4	1.17
Co-81 + <i>A.f</i>	1.4	0.51	6.4	0.93
Tez-118 + <i>A.f</i>	3.4	0.51	16.6	0.93
Tez-226 + <i>A.f.</i>	4.6	0.68	18.4	0.81
Ba-72 + <i>A.f.</i>	7.6	0.51	25	1.1

#### 4.14 Caracterización del principio activo de la cepa Co-47.

a) **Medio mínimo.** Los aislamientos bacterianos antagónicos Co-47, Co-81, Tez-118 y Tez-226 produjeron un halo de inhibición del crecimiento de *A. flavus* al desarrollarse en medio adicionado de ión férrico; el mismo resultado se obtuvo cuando los aislamientos bacterianos y el hongo fueron cultivados en medio carente de ión férrico (Tabla 18, Figura 25).

En la Figura 25 no se observa halo de inhibición con los aislamientos Co-81 y Tez-226 debido que las bacterias no estaban viables, por lo que se repitió y ya se obtuvo el mismo resultado que con los aislamientos Co-47 y Tez-118 en ambos medios.

La producción de sideróforos se aprecia por la presencia del halo de inhibición en medio sin ión férrico, y además se infiere la presencia de otro componente (halo de inhibición en medio con ión férrico).

Como la prueba resultó positiva para sideróforos, para verificar y asegurar su producción, se corrió una prueba más específica y sensible con un medio Universal de Cromoazurol.

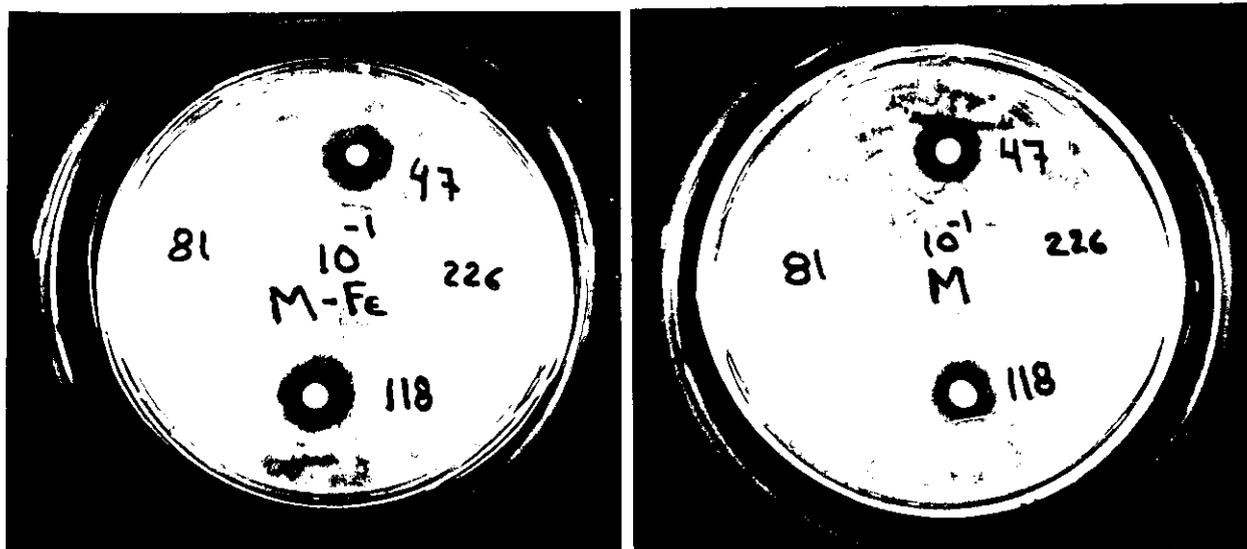


Figura 25. Inhibición de *Aspergillus flavus* por bacterias antagónicas en medio mínimo. M = Medio con ión férrico (derecha), M-Fe = medio sin ión férrico (izquierda). 47 = Co-47, 226 = Tez-226, 81 = Co-81, 118 = Tez-118.

Tabla 27. Estimulación de los aislamientos bacterianos para la producción de sideróforos en medio deficiente y adicionado de ión férrico.

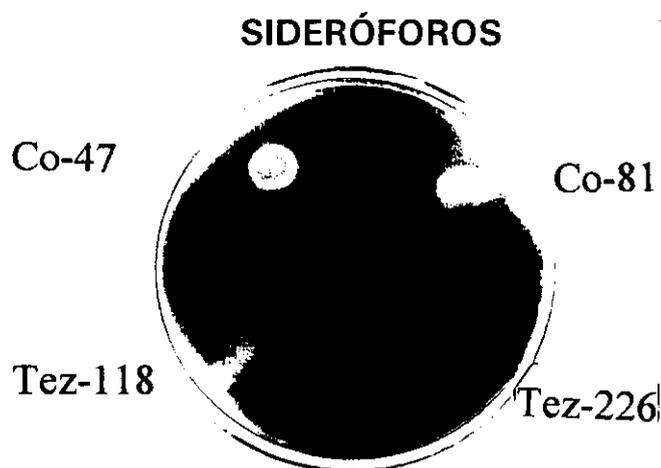
Medio	Diámetro del halo de inhibición de los aislamientos bacterianos sobre <i>A. flavus</i> .			
	Co-47	Co-81	Tez-118	Tez-226
M - Fe	1.6	1.4	1.5	1.6
	1.6	1.5	1.5	1.5
	1.6	1.5	1.5	1.5
	1.7	1.4	1.6	1.5
Promedio	1.6	1.4	1.5	1.5
M + Fe	1.6	1.6	1.6	1.6
	1.5	1.5	1.5	1.6
	1.6	1.5	1.5	1.5
	1.6	1.5	1.6	1.5
Promedio	1.6	1.5	1.5	1.5

M - Fe = Medio carente de ión férrico; M + Fe = Medio con ión férrico.

**b) Medio Universal para la detección de sideróforos Cromo-azurol (CAS).**

Después de 48 horas de incubación se observó un halo amarillo-naranja alrededor de los aislamientos bacterianos Co-47, Co-81 y Tez-118, esto significa que son capaces de producir sideróforos, mientras que los aislamientos Tez-226 y el testigo *Rhizobium melliloti* CP Mex-85 no manifestaron halo. El halo amarillo-naranja se forma porque los sideróforos capturan el ión férrico ligado al cromo-azurol, que es un quelante débil del ión férrico, este desplazamiento origina un cambio en la coloración del medio de azul a amarillo-naranja. Esta prueba se ha adoptado universalmente por su alta sensibilidad, para la detección de sideróforos producidos por microorganismos como bacterias y hongos. El testigo *R. melliloti* y la cepa Tez-226 no producen sideróforos ya que no formaron el halo amarillo naranja (Figura 26).

Con esta prueba se confirma que están involucrados sideróforos dentro del proceso de inhibición de los aislamientos Co-47, Co-81 y Tez-118 sobre *A. flavus* y con base en la prueba de medio adicionado de ión férrico se establece la presencia de otro componente con capacidad para inhibir el desarrollo del hongo.



**Figura 26.** Detección de sideróforos en medio de cromoazurol. El halo amarillo alrededor de las colonias bacterianas indica una reacción positiva, al centro *Rhizobium melliloti*.

**4.15 Constitución proteica del componente activo del aislamiento Co-47.**

- a) Selección del extracto del medio y concentración para la producción del componente activo.

Los valores de inhibición del hongo con cada extracto se presentan en la Tabla 19. El hongo testigo como control se desarrolló bien.

De acuerdo al análisis de varianza se presentaron diferencias significativas entre

los medios ( $F_{(2,30)} = 502.46$ ,  $P < 0.0001$ ), concentraciones ( $F_{(4,30)} = 130.77$ ,  $P < 0.0001$ ) así como medios y concentración ( $F_{(8,30)} = P < 0.0001$ ) lo que significa que el mejor medio inductor de mayor producción del componente activo es el PDA a 2% de concentración. Los otros dos extractos fueron menos efectivos, aunque mostraron buen comportamiento a una concentración de 1.5% (Figura 27).

Fue seleccionado el medio PDA, donde se produjo más componente activo, indicado por el valor promedio más bajo del desarrollo de *A. flavus*.

**Tabla 28: Efecto de diferentes extractos sobre la producción del componente activo del aislamiento Co-47.**

Extracto	Diámetro final alcanzado por la colonia de <i>A. flavus</i> a diferentes concentraciones de extractos.				
	0.25 %	0.5 %	1.0 %	1.5 %	2.0 %
Carne	4.3	4.0	3.8	3.0	3.8
	4.3	4.0	3.7	3.0	3.9
	4.2	4.1	3.7	3.2	3.6
<b>Promedio</b>	<b>4.3</b>	<b>4.0</b>	<b>3.7</b>	<b>3.0</b>	<b>3.8</b>
Testigo	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
Levadura	4.4	3.5	2.6	2.9	3.2
	4.2	3.5	2.6	2.8	3.0
	4.2	3.2	2.6	3.0	3.3
<b>Promedio</b>	<b>4.3</b>	<b>3.4</b>	<b>2.6</b>	<b>2.9</b>	<b>3.2</b>
Testigo	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>
Papa	2.8	2.6	2.5	2.3	2.2
	3.0	3.8	2.5	2.3	2.2
	3.0	2.4	2.4	2.4	2.3
<b>Promedio</b>	<b>2.9</b>	<b>2.6</b>	<b>2.5</b>	<b>2.3</b>	<b>2.2</b>
Testigo	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
<b>Promedio</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>	<b>8.5</b>

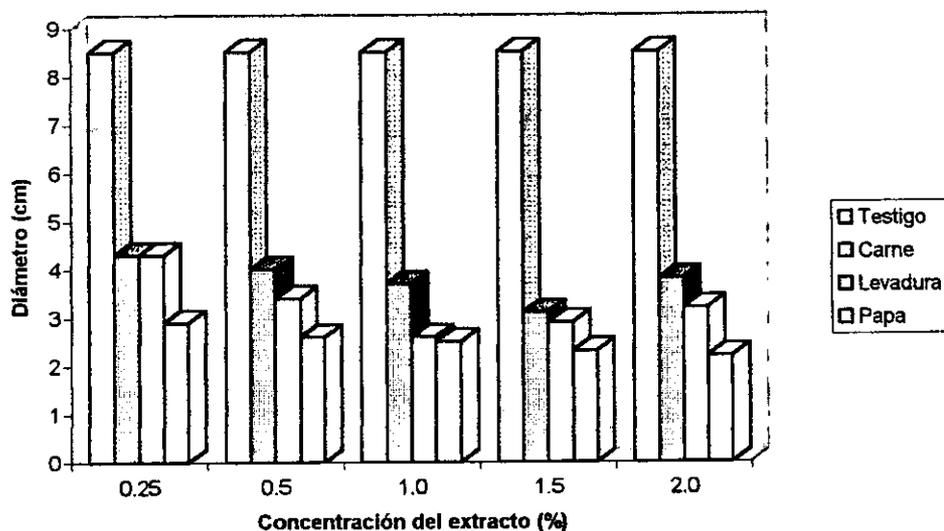


Figura 27. Efecto inhibitorio del aislamiento Co-47 sobre *A. flavus* en diferentes extractos.

**b) Extracción del componente activo.** Conforme al método de extracción propuesto por Shannahan (1992), fue obtenido un extracto acetona/agua de color ámbar, con el cual se realizaron bioensayos preliminares para comprobar y asegurar su actividad inhibitoria sobre *A. flavus*. Estos ensayos de inhibición resultaron positivos, por lo que el extracto fue almacenado en frascos en volúmenes de 200 mL a temperatura de 4°C (Apéndice 6).

**c) Efecto de la temperatura sobre el componente activo.** El componente activo presente en el extracto crudo, tuvo importantes cambios en su actividad inhibitoria sobre *A. flavus* al someterse a diferentes temperaturas, mostrando una pérdida total de actividad inhibitoria a 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C y 70°C; pero esta actividad se mantuvo cuando el extracto se sometió a temperaturas de 35°C y 40°C, esto significa que el componente activo que produce el aislamiento Co-47 es termolábil, debido a la temperatura tan baja de inactivación. Este carácter termolábil fue el responsable de que varios ensayos efectuados con diferentes aminoácidos en medio líquido para tratar de obtener el componente activo fracasaran debido a que la temperatura mínima de evaporación aplicada para concentrar el extracto fue de 50°C, bajo estas circunstancias el componente activo perdía su actividad de inhibición sobre *A. flavus*.

d) **Determinación del carácter proteico del componente activo.** Con la técnica de Lowry (1951) se estableció el carácter proteico del componente activo en el extracto crudo, con una concentración de 1073.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Apéndices 7 y 8). Este valor se obtuvo restando el valor del contenido proteico del extracto del medio PDA sin haber cultivado el aislamiento Co-47; es decir las proteínas presentes en la papa se restaron del contenido proteico del extracto obtenido del medio PDA en el que se cultivó la cepa Co-47, para así obtener sólo el contenido proteico del metabolito producido por la cepa bacteriana. Se hizo una curva de calibración para la albúmina (Tabla 29).

Tabla 29. Calibración para albúmina y determinación de proteína en el extracto crudo.

Albúmina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (mL)	Absorbancia			
	Observada	Esperada	Extracto crudo	Extracto papa
0.0	0.0	0.0		
0.1	0.167	0.1477	0.262	0.121
0.2	0.268	0.2697	0.479	0.253
0.3	0.427	0.3917		
0.4	0.506	0.5137		
0.5	0.621	0.6357		

Varios investigadores han estudiado la capacidad de *Pseudomonas fluorescens* para producir antibióticos (Shannahan *et al.*, 1992; Leisinger and Margraff, 1979) y se ha comprobado la posibilidad para inhibir hongos de importancia fitopatógena (Fravel, 1988). Los ensayos de antagonismo realizados con el aislamiento Co-47 identificado como *P. fluorescens*, indican la producción de un antibiótico capaz de difundirse en el medio de cultivo y su actividad inhibitoria quedó comprobada contra diversos hongos fitopatógenos. Los antibióticos producidos por *Pseudomonas* del grupo fluorescens han sido identificados como fenacinas, compuestos del tipo pirrol, y derivados del indol (Gerber, 1969; Thomashow *et al.*, 1990; Hashimoto *et al.*, 1966; Wratten *et al.*, 1977), en el presente trabajo sólo se comprobó el carácter antibiótico sin pretender caracterizar su estructura molecular.

Además de la producción del antibiótico, se comprobó la capacidad para producir sideróforos, en algunos aislamientos de *Pseudomonas* del grupo fluorescens, estas bacterias tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos fitopatógenos y contribuyen a un buen crecimiento vegetal (Leong, 1986); esto significa que el aislamiento Co-47 promete ser un buen candidato no sólo por su

carácter antagónico, sino también por su posible efecto promotor de crecimiento que requerirá ser más estudiada.

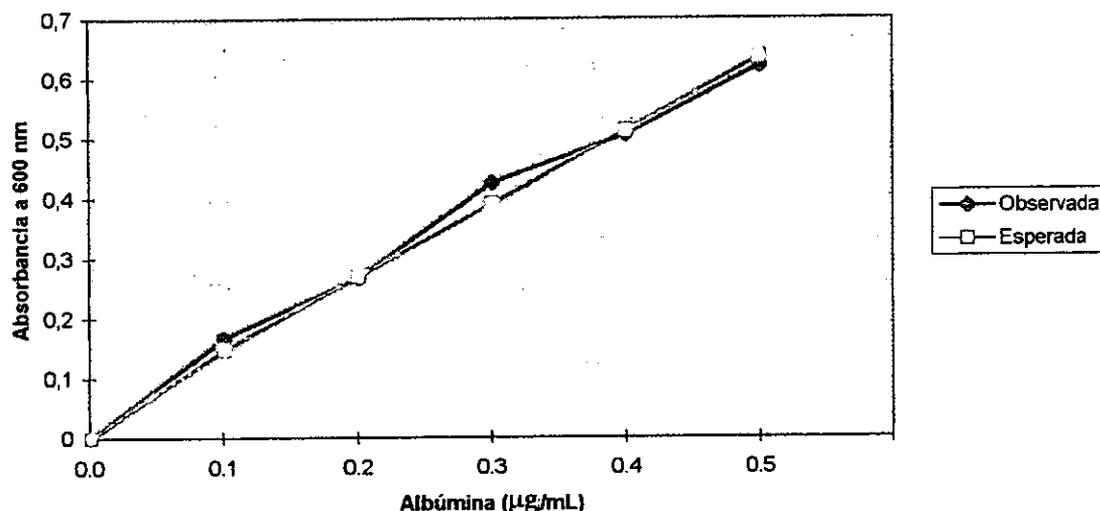


Figura 28. Curva de calibración de albúmina observada y esperada.

Con estos estudios se completa el presente trabajo que fue una investigación desde el muestreo de las bacterias en diferentes zonas geográficas y del cultivo del maíz, hasta el control biológico de *A. flavus* y la caracterización general del metabolito activo.

La presente tesis comprendió una investigación intensa sobre las bacterias que pueden utilizarse para el control biológico del mencionado hongo, estudios de taxonomía, identificación bacteriana, bioquímicos y de biología molecular.

Los datos aquí aportados pueden ser de utilidad para la producción industrial tanto de las bacterias, como del metabolito encontrado, una vez obtenidas ambas patentes.

El presente estudio es una contribución para tratar de sustituir el empleo de fungicidas y reducir la contaminación producida por los mismos.

## V. CONCLUSIONES

1. De un total de 3425 colonias bacterianas aisladas, fueron 2168 de la rizosfera del maíz y se obtuvieron cinco con capacidad antagónica contra *A. flavus*.
2. De los 1257 aislamientos de la filosfera del maíz (estigmas y brácteas), existen poblaciones bacterianas con poco potencial para el control de *A. flavus*.
3. Los cinco aislamientos bacterianos antagónicos de la rizosfera, fueron identificados como *Pseudomonas fluorescens*; Ba-72 como Biovar II, Tez-118, Tez-226 y Co-81 como Biovar III, y Co-47 como Biovar IV.
4. Se demostró el carácter saprófito de los aislamientos bacterianos antagónicos.
5. Los aislamientos Co-47 y Co-81 fueron los más eficientes para inhibir *A. flavus*.
6. No hubo un efecto sinérgico de antagonismo con los aislamientos bacterianos sobre *A. flavus*.
7. Los aislamientos Co-47, Co-81, Tez-118, Tez-226 y Ba-72 resultaron con actividad fungicida para destruir micelio, esclerocios y conidios de *A. flavus*.
8. La cepa Co-47 tuvo el mayor espectro de acción inhibitoria sobre los hongos fitopatógenos, excepto contra *Fusarium* que fue más resistente.
9. Los aislamientos Co-47 y Co-81 tuvieron potencial para el control de *A. flavus* con base en las pruebas de laboratorio, invernadero y campo.
10. La capacidad de los aislamientos se debe al efecto de sideróforos y además a un componente proteínico termolábil.
11. El componente antagónico es soluble en agua y difusible en medio PDA sólido.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P.B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 28:59-72.
- Agrios, N.G. 1997. *Plant pathology*. Academic Press.Inc. 756 pp.
- Allcroft, R. 1969. Aflatoxicosis in farm animals: Metabolism and excretion of aflatoxin. *In: Aflatoxin-scientific background, control and implications*. Goldblatt, L.A. Ed. Academic Press, New York. USA. 250-257 pp.
- Andrellos, P.J., Beckwith, A.C. and Eppley, R.M. 1967. Photochemical changes of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 50: 346-350.
- Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 603-635.
- Asao, T., Buchi, B. Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wich, E.L. and Wogan, G.N. 1965. Structures of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>. *Journal of American Chemical Society*, 87: 882-886.
- Askew, D.J. and Laing, M.D. 1994. The *in vitro* screening of 118 *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* and an evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as sources of aggressive strains. *Plant soil*, 159: 277-281.
- Armentrout, V.N. 1988. Isolation of fungi and bacteria. *In: Laboratory Exercise in Plant Pathology: and Instructional Kit*. Baudoin, A.B. Ed. American of Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. 196 pp.
- Ayres, T.T. 1935. Parasitism of *Dispira cornuta*. *Mycologia*, 27: 235-261.
- Backman, P.A. and Rodríguez-Kabana, R. 1975. A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. *Phytopathology*, 65: 819-821.
- Baker, R. 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annual Review of Phytopatolgy*, 6: 263-294.
- Baker, K. F. 1962. Principles of heat treatment of soil and planting material. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, 28: 118-126.
- Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25: 67-85.

- Baker, R. 1986. Biological control: an overview. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8: 218-221.
- Baker, K.F. and Cook, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society. St. Paul MN, USA. 1982 pp.
- Barnett, H.L. and Lilly, V.G. 1958. Parasitism of *Calcarisporium parasiticum* on species of *Phylospora* and related fungi. West Virginia University Agricultural Experiment Station Bulletin, 420: 36 pp.
- Biffen, R.H. 1905. Mendel's law of inheritance and wheat breeding. *Journal of Agricultural Science*, 1: 4-48.
- BioMérieux, 1990. Sistema de identificación de bacilos Gram negativos, API 20NE. Ficha Técnica. Versión B. Biomérieux, S.A. France, 24 pp.
- Blakeman, J.P. and Fokkema, N.J. 1982. Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 20: 167-192.
- Blanc, M. 1987. Segunda Conferencia Internacional Conjunta FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas: Prevención y control de las aflatoxinas. Bangkok, Tailandia. 10 pp.
- Blazevic, D.J. and Ederer, G.M. 1975. Principles of biochemical test in diagnostic microbiology. John Wiley and Sons, New York, USA. 45-49 pp.
- Boosalis, M.G. 1964. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopatology*, 2: 363-376.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 237 p.
- Bothast, R.J. and Fennel, D.I. 1974. A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. *Mycologia*, 66: 365-369.
- Box, J.E. and Hammond Jr, L.C. 1990. Rhizosphere dynamics. Westview Press. Boulder Colorado, USA. 322 pp.
- Brandes, G.A. 1971. Advances in fungicide utilization. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 363-386.
- Brett, P.J., DeShazer, D., Woods, D.E. 1998. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 317-320.

- Broadbent, P. and Baker, K.F. 1974. Behavior of *Phytophthora cinnamomi* soils suppressive and conducive to root rot. *Australian Journal of Agricultural Research*, 25:121-137.
- Broadbent, P. and Baker, K.F. 1975. Soil suppressive *Phytophthora* root rot in eastern Australia. *In: Biology and control of soil-borne plant pathogens*. Bruehl, G.W. Ed. American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, 152-157.
- Brock, D.T. and Madigan, T.M. 1991. *Microbiología*. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México. 956 pp.
- Burr, T.J., Schroth, M.N. and Suslow, T. 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology*, 68: 1377-1388.
- Burrage, S.W. 1971. The microclimate at the leaf surface. *In: Ecology of leaf surface microorganisms*. Preece, T.F. and Dickinson, C.H. Eds. 1971. Academic Press. London, U.K. 91-101.
- Burrage, S.W. 1976. Aerial microclimate around plant surfaces. *In: Microbiology of aerial plant surfaces*. Preece, T.F. and C.H. Dickinson Eds. 1976. Academic Press, London, U.K. 173-184.
- Butler, W.H. and Barnes, J.M. 1963. Toxic effects of groundnut meal containing aflatoxin to rats and guinea pigs. *British Journal of Cancer*, 17: 699-710.
- Caetano-Anollés, G. and Gresshoff, P.M. 1977. DNA Markers. Protocols, Application and Overviews. Wiley-VCH, New York, U.S.A. 364 pp.
- Calistru, C., McLean, M. and Berjak, P. 1997. *In vitro* studies on the potencial for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, 139 (2): 115-121.
- Carnaghan, R.B.A., Hartley, R.D. and O'Kelly, J. 1963. Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 200: 1101.
- Carrillo, F.J.A., Cruz, J.O. y Ley, J.F. 1991. Búsqueda de microorganismos antagonistas a *Alternaria carthami* Chow, causante del tizón foliar del cártamo. *Memorias VIII Congreso Nacional de Fitopatología*. Puebla de los Angeles, Pue., México. 181 p.
- Carrión, G., Ruiz, F.B. y Mora, R.A. 1992. Control biológico de la roya del cafeto por *Verticillium lecanii* en México. VI Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Torremolinos, España. 194 p.

- Casarrubias, U. y Frías, G.A. 1992. Evaluación de la eficacia de *Bacillus subtilis* para el control de la marchitez del chile en condiciones de invernadero. Memorias XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Buenavista, Saltillo, Coah. 165 p.
- Castañeda, R.P. 1990. El maíz y su cultivo. A.G.T.S.A. México. 460 pp.
- Castrejón, S.A. y González, R.M. 1994. Posibilidad de control biológico de *Puccinia striiformis f. sp. hordei* en cebada, bajo condiciones de invernadero. Memorias XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Cuernavaca, Mor. 33 p.
- Clark, W.A. 1976. A simplified Leifson flagella stain. *Journal of Clinical Microbiology*, 632-634.
- Codebook Analitab Products Inc. 1985. Analitab Profile Index. BioMérieux, France. 550 pp.
- Cook, J.R. 1984. Biological control of root pathogens: New technologies and the potential for impact on crop productivity. Agricultural Research Service, U.S.D.A. Washington. Technical Bulletin, 201: 9.
- Cook, J.R. 1990. Twenty-five years of progress towards biological control. *In: Control of soil-borne plant pathogens*. Hornby, D. Ed. C.A.B. International U.K. 545 pp.
- Cook, J.R. 1991. Biological control of plant disease: Broad concepts and applications. Food and Fertilizer Center. Technical Bulletin, 123: 29 pp.
- Cooksey, D.A. and Moore, L.W. 1982. Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter*. *Phytopathology*, 72: 919-921.
- Coomes, T.J., Crowther, P.C., Fevell, A.J. and Francis, B.J. 1966. Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. *Nature*, 209: 406-407.
- Crawley, M.J. 1993. GLIM for ecologist. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K. 379 pp.
- Curl, E.A. 1963. Control of plant disease by crop rotation. *Botanical Review*, 29: 413-479.
- Cuero, R.G., Duffus, E., Osuji, G. and Pettit, R. 1991. Aflatoxin control in preharvest maize: effects of chitosan and two microbial agents. *Journal of Agricultural Science*, 117: 165-169.

- Chang, I. and Kommedahl, T. 1968. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathology*, 58: 1395-1401.
- Chang, S.B., Abdel-Kader, M.M., Wick, E.L. and Wogan, G.N. 1963. Aflatoxin B<sub>2</sub>: Chemical identity and biological activity. *Science*, 142: 1191-1192
- Davin-Regli, A., Abed, Y., Charrel, R.N., Bollet, C. and De-Micco, P. 1995. Variations in DNA concentrations significantly effect the reproductibility of RAPD fingerprint patterns. *Research of Microbiology*, 146: 561-568.
- Diener, L.U. and Davis, N.D .1986. Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *In*: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. and Renfro, B.L. Eds. 1987. Aflatoxin Maize. A Proceedings of the workshop. CYMMYT, Mexico, D.F. 33- 40.
- De longh, J., Beerthuis, R.K., Vles, R.O., Barrett, C.B. and Ord, W.O. 1962. Investigation of the factor in groundnut meal responsible for turkey X disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 65: 548-551.
- Duffus, C. and Slaughter, C. 1985. Las semillas y sus usos. AGT Editor, S.A. México, D.F. 188 pp.
- Du Plessis, H.J., Hattingh, M.J. and Van Vuuren, H.J. 1985. Biological control of crown gall in South Africa by *Agrobacterium radiobacter* strain K84. *Plant Disease*, 69: 302-305.
- Eckert, J.W. and Sommer, N.F. 1967. Control of diseases on fruits and vegetables by postharvest treatment. *Annual Review of Phytopathology*, 5: 391-432.
- Elad, Y. and Baker, R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium spp.* by *Pseudomonas spp.* *Phytopathology*, 75: 1053-1059.
- Elad, Y., Chet, I. and Baker, R. 1987. Increased growth response of plants induced by rhizobacteria antagonistic to soil-borne pathogenic fungi. *Plant Soil*, 325-330.
- Evans, E. 1968. Plant diseases and their chemical control. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh. 288 pp.
- Erwin, D.C. 1973. Systemic fungicides: Disease control, traslocation and mode of action. *Annual Review of Phytopathology*, 11:389-422.

- Fiala, V., Glad, C., Martin, M., Jolivet, E. and Derridj, S. 1990. Occurrence of soluble carbohydrates on the phylloplane of maize (*Zea mays* L.): variations on relation to leaf heterogeneity and position on the plant. *New Phytologist*, 115:609-615.
- Fischbach, H. and Campbell, A.D. 1965. Note on detoxification of aflatoxins. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 48: 28.
- Flores, A., Chet, I. and Herrera-Estrella, A. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* strains by overexpression of the proteinase encoding gene *pyb1*. *Current Genetics*, 31: 30-37.
- Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 75-91.
- F.A.O. 1990. Manuals of food quality control. 10. Training in mycotoxins analysis. 14/10. Rome, Italy. 113 pp.
- Fridlender, J.M., Inbar, J. and Chet, I. 1993. Biological control of soil-borne plant pathogens by AB-1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry*, 25 (9): 1211-1221.
- Fucikovsky, Z.L., López, C. and Luna, I. 1989. Bacterial antagonists to *Pseudomonas solanacearum* in potatoes and some other plant pathogens. 7th. International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. 43 p.
- Gaber, B.A. and Hutchinson, T. C. 1988. Chemical changes in simulated raindrops following contact with leaves of four boreal forest species. *Canadian Journal of Botany*, 66: 2445-2451.
- García, T.A. 1981. Experimentos en microbiología del suelo. Compañía Editorial Continental. México. 75 pp.
- Gerber, N.N. 1969. New microbial phenazines. *Journal Heterocyclic of Chemistry*, 6: 297-300.
- Gottlieb, D., Siminoff, P. and Martin, M.M. 1952. The production and role of antibiotics in soil. IV Actidione and clavacin. *Phytopathology*, 42: 493-496.
- Gram, E. 1960. Quarantines. *In*: Plant pathology. Horsfall, J.G. and Dimond, A.E. Eds. Vol. 3. Academic Press, New York. 314-356.
- Hadar, Y., Chet, I. and Henis, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 69: 64-68.

- Hartley, C. 1921. Damping-off in forest nurseries. U.S. Department of Agriculture Bulletin, 934: 1-99.
- Hashimoto, M. and Hattori, K. 1966. Oxipyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas* Chemical Pharmaceutical Bulletin, 14: 1314-1316.
- Herrera-Estrella, A. and Chet, I. 1998. Biological control of bacteria and phytopathogenic fungi. *In*: Agricultural Biotechnology. Arie Altman Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A. 263-282.
- Holt, G.J., Krieg, R.N., Sneath, A.H.P., Stanley, T.J. and Williams, T.S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Williams & Wilkins Co. Baltimore, USA 754 pp.
- Homma, Y., Sato, Z., Hirayama, F., Koono, K., Shirama, H. and Susui, T. 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soil-borne plant pathogens. Soil Biology and Biochemistry, 21: 723-728.
- Hornby, D. 1978. Microbial antagonisms in the rhizosphere. Annals of Applied Biology, 89: 97-100.
- Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology, 69: 480-482.
- Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. Phytopathology, 70: 712-715
- Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. Canadian Journal of Microbiology, 29: 321-324.
- Hugh, R. and Leifson, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacilli. Journal of Bacteriology, 62: 24-26.
- Innes, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H. and Brown, M.A. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. Proceeding National of Academy Science. USA, 85: 9436-9440.
- Jelinek, F.Ch. 1987. Segunda conferencia internacional conjunta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas: Distribución de las micotoxinas: Segunda Conferencia Internacional Mixta Sobre Micotoxinas. Bangkok, Tailandia. 31 pp.

- Jemmali, M. 1987. Segunda conferencia internacional conjunta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas: Aspectos económicos y comerciales de las micotoxinas. Bangkok, Tailandia. 21 pp.
- Jewers, K. 1987. Segunda Conferencia Internacional sobre Micotoxinas: Problemas relacionados con la toma de muestras de los envíos para la determinación del contenido en micotoxinas y con la interpretación de los resultados. Bangkok, Tailandia. 16 pp.
- Jiménez, D.R. 1996. Aislamiento selección e identificación de rizobacterias antagonicas contra *Rhizoctonia solani* y cuantificación de su actividad antagonica. Tesis. I.P.N. México, D.F. 131 p.
- Jones, R.K., Duncan, H.E., Payne, G.A. and Leonard, K.J. 1980. Factors influencing infection by *Aspergillus flavus* in silk inoculated corn. *Plant Disease*, 64: 859-863.
- Johnson, L.F., Curl, E.A., Bond, J.H. and Fribourg, H.A. 1960. Methods for studying soil microflora plant. Burgess Publishing Co. 178 pp.
- King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal Laboratory of Clinical Medical*, 44: 301-307.
- Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. *Plant Disease*, 64: 25-30.
- Khalil, G. 1991. Biocontrol de *Pseudomonas solanacearum* en papa bajo condiciones de invernadero. Memorias XXI Congreso Nacional de Fitopatología. Puebla de los Angeles, Pue. 17 p.
- Klement, Z. and Goodman, R. 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 5: 17-44.
- Kloepper, J.W. and Schroth, M.N. 1981. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*, 71:10, 1020-1024.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N. and Miller, T.D. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70: 1078-1082.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R. and Sommers, H.M. 1985. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, México. 533 pp.

- Lalande, R., Leyns, F., Rooyen, L., Gossele, F., Papon, Y. and Swins, J. 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil*, 115: 7-11.
- Lambert, B., Leyns, F., Van Rooyen, L. Gosselé, F., Papon, Y. and Swings, J. 1987. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1866-1871.
- Leben, C., Daft, G.C., Wilson J.D. and Winter, H.F. 1965. Field test for disease control by an epiphytic bacterium. *Phytopathology*, 55: 1375-1376.
- Lee, L.S., Cucullu, A.F., Franz, A.O. and Ponds, W.A. 1969. Destruction of aflatoxins in peanuts during dry and oil roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17: 451-453.
- Leisinger, T. and Margraff, R. 1979. Secondary metabolites of the fluorescent Pseudomonads. *Microbiological Reviews*. 43 (3): 422-442.
- Leonard, A., Deknut, G.H. and Linden, G. 1975. Mutagenicity test with aflatoxins in the mouse. *Mutation Research*, 28:137-139.
- Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 187-209.
- Leyns, B.L., Lambert, B., Joos H. and Swings, J. 1990. Antifungal bacteria from different crops. *In: Control of soil-borne plant pathogens*. Hornby, D. Ed. C.A.B. International. U.K. 548 pp.
- Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F., Horner, E.S., Widstrom, N.W., Josephson, L.M., Franz, A.O. and Catalano, A. 1980. Aflatoxin contamination of preharvest corn: Role of *Aspergillus flavus* inoculum and insect damage. *Cereal Chemistry*, 57: 255-257.
- Linderman, R.G. 1983. Strategies for detecting and characterizing systems for biological control of soil-borne plant pathogens. *Plant Disease*, 67 (10): 1058-1064.
- Linderman, R.G., Marlow, J.L., Blackburn, B. and McDaniel, H.W. 1994. Evaluation of bacterial antagonists against *Phytophthora cinnamomi* in the closed-insulated pallet system (CIPS). *Phytopathology*, 84 (10): 1137.
- López, B.S. y González, A.M.. 1990. Control biológico de *Phymatotrichum omnivorum* (Schear) Duggar con *Bacillus subtilis*. *Memorias XVII Congreso Nacional de Fitopatología*. Culiacán Sin. 105 p.

- Louws, F.J., Rademaker, J.L.W. and Brujin, F.J. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection and disease diagnosis. *Annual Review of Phytopatology*, 37: 81-125.
- Lowry, H.O, Rosebrough, J.N., Lewis, F. A. and Randal, J.R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- MacFaddin, J.F. 1976. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore, Williams and Wilkins, U.S.A. 142-149.
- Malajczuk, N., Nesbitt, H.J., Glenn. A.R. 1977. A light and electron microscope study of the interaction of soil bacteria with *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Canadian Journal of Microbiology*, 23: 1518-1525.
- Mann, G.E., Codifer, L.P. and Dollear, F.G. 1967. Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals. *Journal and Agricultural and Food Chemistry*, 15: 1090-1092.
- Mannon, J. and Johnson, E. 1985. *New Scientist*, 105: 12-6. *In*: Jemmali, M. 1987. Segunda conferencia internacional conjunta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas: Aspectos económicos y comerciales de las micotoxinas. Bangkok, Tailandia. 21 pp.
- Marsh, S.F. and Payne, G.A. 1984. Preharvest infection of corn silks and kernel by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 74: 1284-1289.
- Mc Gullagh, P. and Nelder, J.A. 1983. *Generalized linear models*. Chapman and Hall, London, U.K. 511 pp.
- Mc Keen, C.D., Rolly, C.C. and Pusey, P.L. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 76: 136-139.
- Merriman, P.R., Price, R.D. and Baker, K.F. 1974. The effect of inoculation of seed with antagonists of *Rhizoctonia solani* on the growth of wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 25: 213-218.
- Merriman, P.R., Price, R.D., Baker, K.F., Kollmorgan, J.F., Piggott, T. and Ridge. E.H. 1975. Effect of *Bacillus* and *Streptomyces* spp. applied to seed. *In*: *Biology and control of soil-borne plant pathogens*. American Phytopatological Society, St. Paul Minnesota, U.S.A. 130-133.
- Meshram, S.U. and Jager, G. 1983. Antagonism of *Azotobacter chroococcum* isolates to *Rhizoctonia solani*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 89: 191-197.

- Miklas, P.N., Afanador, L. and Kelly, J.D. 1996. Recombination-facilitated RAPD marker- assisted selection for disease resistance in common bean. *Crop Science*, 36: 86-90.
- Mitchell, J.E. 1973. The mechanisms of biological control of plant disease. *Soil Biology and Biochemistry*, 5: 721-728.
- Mitchell, R. and Alexander, M. 1963. Lysis of soil fungi by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 9: 169-177.
- Montes, B.R. 1997. Detección y manejo de extractos vegetales para el control de *Aspergillus flavus*. Tesis Doctoral. UNAM. 108 pp.
- Montes, B.R., Pérez, R.P., Arce, F.G. y García, J.G. 1992. Reducción del daño del chino del jitomate, mediante extractos vegetales acuosos. Memorias XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Buenavista Saltillo, Coah. 160 p.
- Morgan, F.L. 1963. Infection, inhibition and germ-tube lysis of three cereal rust by *Bacillus pumilus*. *Phytopathology*, 53: 1346-1348.
- Oedjijono, M., Line, A. and Dragar, C. 1993. Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. *Soil Biology of Biochemistry*, 25: 247-250.
- O.P.S. 1979. Criterios de salud ambiental: Micotoxinas. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la Organización Mundial de la Salud. 131 pp.
- Ong, T.M. 1975. Aflatoxin mutagenesis. *Mutation Research*, 32: 35-53.
- Papavizas, G.C. and Lumsden, R.D. 1980. Biological control of soil-borne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology*, 18: 389-413.
- Patterson, P.S.D. 1977. Aflatoxin and related compounds. *In: Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. Vol.1* Wyllie, D.T. and Morehouse, G.L. Eds. Marcel Dekker, New York. 538 p.
- Payne, G.A. 1987. *Aspergillus flavus* infection of maize: silks and kernels. *In: Zuber, M.S., E.B. Lillehoj and B.L. Renfro Eds. 1987. Aflatoxin in Maize: A proceedings of the workshop, CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico.* 119-129.
- Pickett, M.J. and Petersen, M.M. 1970. Characterization of saccharolytic nonfermentative bacilli associated with man. *Canadian Journal of Microbiology*, 16: 351-362.

- Puyesky, M., Benhamov, N., Ponce-Noyola, P., Bauw, G., Ziv, T., Van-Montagu, M., Herrera-Estrella, A. and Horwuts, B.A. 1999. Developmental regulation of *cmpl*, a gene encoding a multidomain conidiospore surface protein of *Trichoderma*. *Fungal Genetic of Biology*, 27 (1): 88-89.
- Rambo, G.W., Tuite, J. and Crane, P. 1974. Preharvest inoculation and infection of dent corn with *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Phytopathology*, 64: 797-800.
- Raper, K.B. and Fennel, D.I. 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, Maryland, USA. 685 pp.
- Ricard, J.L. 1981. Commercialization of a *Trichoderma* based mycofungicide: Some problems and solutions. *Biocontrol News Information*, 2: 95-98.
- Rothrock, C.S. and Gottlieb, D. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 1440-1447.
- Rouatt, J.W. and Katznelson, H. 1961. A study of the bacteria on the root surface and in rhizosphere soil of crop plants. *Journal of Applied Bacteriology*, 24: 164-171.
- Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta, E. M. y Gómez, O. 1994. Efecto de la asociación cempazúchil-jitomate, en el daño producido por *Alternaria solani* en jitomate. *Memorias XXI Congreso Nacional de Fitopatología*. Cuernavaca, Mor. 25 p.
- Roncal, O.M., Fucikovsky, L. y Khalil, A. 1991. Biocontrol de *Pseudomonas solanacearum* en papa bajo condiciones de invernadero. *Memorias XV Congreso Nacional de Fitopatología*. Puebla de los Angeles, Pue. 17 p.
- Salazar, G.M., Virgen, G.C., Anguiano, G.L., Hernández, R.D., Jiménez, R. y Olalde, V.P. 1994. Inhibición *in vitro* de *Fusarium* sp. y *Verticillium* sp. con bacterias antagónicas de la rizosfera. *Memorias XVIII Congreso Nacional de Fitopatología*. Puebla de los Angeles, Pue. 17 p.
- Samaniego, J. 1991. La actividad microbiana en pajas de trigo inoculado con *Trichoderma* sp. y suelos complementados con glucosa y su relación con la viabilidad de los esclerocios de *Phymatotrichum omnivorum*. *Memorias XVIII Congreso Nacional de Fitopatología*. Puebla de los Angeles, México. 180 p.
- Scher, F.M. and Castagno, J.R. 1985. Biocontrol: a view from industry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8: 222-224.

- Schwyn, B. and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160: 47-56.
- Schaad, N.W. 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society, 72 pp.
- Shannahan, P.D., O'Sullivan, D., Simpson, P.S., Gennon, J.D. and O'Gara, F. 1992. Isolation and characterization of an antibiotic like compound from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 353-358.
- Sharvelle, E. G. 1969. Chemical control of plant diseases. University Publishing College Station, Texas, USA. 340 pp.
- Shenker, M., Hadar, Y. and Chen, Y. 1995. Rapid method for accurate determination of colorless siderophores and synthetic chelates. *Soil Science Society of American Journal*, 59: 1612-1618.
- Schoental, R. and White, A.F. 1965. *Nature*, 57: 205. *In*: F.A.O. 1990. Manuals of food quality control.10. Training in mycotoxins analysis. 14/10. Rome, Italy. 113 pp.
- Shurtleff, M.C. 1980. A compendium of corn diseases. American Phytopathological Society. Saint Paul, Minnesota, U.S.A. 325 pp.
- Stevens, R.E. 1960. Cultural practices in disease control. *In*: Plant pathology. Horsfall, G. and A.E. Dimond Eds. Vol 3. Academic Press, New York. 357-430.
- Stoloff, L. and Trager, W. 1965. Recommended decontamination procedures for aflatoxin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 48: 681-682.
- Suslow, T.V. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. *In*: Phytopathogenic Prokaryotes. Mount, M.S. and G.H. Lacy Eds. Academic Press, London, UK. 187-223.
- Taylor, W.I. and Achanzer, D. 1972. Catalase test as an aid to the identification of *Enterobacteriaceae*. *Applied Microbiology*, 24: 58-61.
- Teitell, L. 1958. Effects of relative humidity on viability of conidia of *Aspergillus*. *American Journal of Botany*, 45: 748-753.
- Thom, C. and Church, M.B. 1926. The Aspergilli. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, U.S.A. 272 pp.

- Thom, C. and Raper, K.B. 1945. A manual of Aspergilli. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, U.S.A. 373 pp.
- Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F. and Pierson, I.S. 1990. Production of the antibiotic phenazine 1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. Applied Environmental Microbiology, 56:908-912.
- Thompson, D.P. 1991. Effect of butylated hydroxyanisole on conidial germination of toxigenic species of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Journal of Food Protection, 54 (5): 375-377.
- Tovar, A.R. y Gaona, A. 1993. Efecto de *Glaumus* sp. (MV-A) sobre la pudrición de la raíz por *Phytophthora* en naranjo. XX Congreso Nacional de Fitopatología. Zacatecas, Zac. 56 p.
- Torres-Barragán, A., Zavaleta-Mejía, E., González, M.C. 1994. Interacción de hongos micorrícicos-cebolla y su relación con la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla. Memorias XXI Congreso Nacional de Fitopatología. Cuernavaca, Morelos, México. 29 p.
- Trager, W. and Stoloff, L. 1967. Possible reactions for aflatoxin detoxification. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 15: 679-681.
- Tu, J.C. 1978. Protection of soybean from severe *Phytophthora* root rot by Rhizobium. Physiology of Plant Pathology, 12: 233-240.
- Tucker, D.H. Jr. Trevathan, L.E., King, S.B. and Scott, G.E. 1986. Infection and aflatoxin contamination of resistant and susceptible corn hybrids inoculated with *Aspergillus flavus* using four inoculation techniques. Phytopatology, 76: 290-293.
- Tukey, H.B. Jr. 1970. The leaching of substances from plants. Annual Review of Plant Physiology, 21: 305-324.
- Utkhede, R.S. and Gaunce, A.P. 1983. Inhibition of *Phytophthora cactorum* by a bacteria antagonist. Canadian Journal of Botany, 61: 3343-3348.
- Utkhede, R.S. 1984. Antagonist of isolates of *Bacillus subtilis* to *Phytophthora cactorum*. Canadian Journal of Botany, 61: 1032-1035.
- Van der Zijden, A.S.M., Koelensmid, W.A.A.B., Boldingh, J., Barret, W.O.O. and Philp, J. McL. 1962. Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey X disease. Nature, 195: 1060-1058.

- Vázquez-Garcidueñas, S., Lea-Morales, C.A. and Herrera-Estrella, A. 1998. Analysis of the  $\beta$ -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1442-1446.
- Virgen, C.G. y García, J.C. 1990. Resultados preliminares sobre control biológico de *Fusarium oxysporum f. sp. niveum* con *Bacillus subtilis* en sandía, bajo condiciones de campo. *Memorias XVII Congreso Nacional de Fitopatología*. Culiacán, Sinaloa, México. 106 p.
- Vracko, R. and Sherris, J.C. 1963. Indole-spot test in bacteriology. *American Journal of Clinical Pathology*, 39: 429-432.
- Weaver, D.K., Lee, E.K.H. and Leahy, M.S. 1968. Comparison of reagent impregnated paper strips and conventional methods for identification of *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Clinical Pathology*, 49: 494-499.
- Weller, D.M. 1985. Application of a rapid screening test for selection of bacteria suppressive to take-all of wheat. *Plant Disease*, 69: 8, 710-713.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 379-407.
- Wellhausen, E.J. 1937. Effect of the genetic constitution of the host on the virulence of *Phytophthora stewartii*. *Phytopathology*, 27: 1070-1089.
- Wilson, C.L. and Pusey, P.L. 1985. Potential for biological control of post harvest plant disease. *Plant Disease*, 69: 375-378.
- Wilson, F. and Huffaker, C.B. 1976. The philosophy, scope and importance of biological control. *In: Theory and practice of biological control*. Huffaker, C.B. and Messenger, P.S. Eds. Academic Press, New York, U.S.A. 3-15.
- Will, M.E., Wilson, D.M. and Wicklow, D.T. 1994. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus*, chitin and cellulose amendments in the biological control of *Aspergillus flavus*. *Biology and Fertility of Soils*, 17 (4): 281-284.
- Winship, P.R. 1989. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Research*, 17: 1266.
- Wood, R.K.S. and Tveit, M. 1955. Control of plant disease by use of antagonistic organisms. *Botanical Review*, 21: 441-492.

- Wicklow, D.T., Horn, B.W., Burg, W.R. and Cole, R.J. 1984. Sclerotia dispersal of *Aspergillus flavus* from maize during harvest. Transactions of the British Mycological Society, 83: 299-303.
- Widstrom, N.W., Wilson, D.M. and McMilliam, W.W. 1981. Aflatoxin contamination of preharvest corn as influenced by timing and method of inoculation. Applied and Environmental Microbiology, 42: 249-251.
- Wratten, S. J., Wolfe, M.S., Andersen, R.J. and Faulkner, D.J. 1977. Antibiotic metabolites from a marine pseudomonad. Antimicrob. Agents Chemother., 11: 411-414.
- Wyllie, T.D. and Morehouse, L.G. 1977. Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicosis: An Encyclopedic Handbook. Vol. 3 Marcel Dekker, Inc. New York. 202 pp.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiology and Immunology, 36 (12): 1251-1275.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Hotta, H. and Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. *Ralstonia piketti* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanaceraum* (Smith 1896) comb.nov. and *Ralstonia eutophia* (Davis 1969) com. nov. Microbiology and Immunology, 39: 897-904.
- Yi-Wei, T. and Persing, D.H. 1999. Molecular detection and identification of microorganisms. In: Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. Eds. Manual of Clinical Microbiology, 7th Ed. ASM Press, Washington, D.C., U.S.A. 215-239.
- Young, J.P.W., Downer, H.L. and Eardly, B.D. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAil by polymerase chain reaction-based sequencing of 16S rRNA gene segment. Journal of Bacteriology, 173 (7): 2271-2277.
- Young, J.P.W. and Wexler, M. 1988. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. Journal of Genetic Microbiology, 134: 2731-2739.
- Zar, J.H. 1985. Biostatistical Analysis. 2nd. Ed. Prince Hall, Englewood, U.K. 718 pp.

- Zavaleta-Mejía, E. y Rojas-Martínez, R.I. 1989. Antagonismo de *Serratia marcescens* Bizio, sobre *Fusarium oxysporum* Schlect. f.sp. *lycopersici* (Sacc) Snyder & Hans. Revista Mexicana de Fitopatología, 7: 113-118.
- Zavaleta-Mejía, E. y Ochoa, M.L. 1992. Efecto de diferentes formas de asociación jitomate-cempazúchil en la producción de jitomate e infección por *Nacobbus aberrans*. Memorias XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 140 p.
- Zavaleta-Mejía, E., Gardezi, O.A.K., Gómez, R. y Juárez, P.C. 1993 a. Asociación cempazúchil-chile combinada con otras estrategias para el manejo de virosis en chile. Memorias XX Congreso Nacional de Fitopatología. Zacatecas, Zacatecas, México. 55 p.
- Zavaleta, M. E., Khalil, A., Ferrera-Cerrato, R., y Pérez, C.A. 1993 b. Efecto de micorriza (V-A) en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Memorias XX Congreso Nacional de Fitopatología. Zacatecas, Zacatecas, México. 50 p.

## VII. APÉNDICES

## Apéndice 1: Medios de cultivo para bacterias y hongos.

## a) Papa dextrosa agar

Trozos de papa	200 g
Dextrosa	15 g
Agar	15 g
Agua	1000 mL

Utilidad: Para pruebas de antagonismo entre hongos y bacterias.

## b) Tinción de Gram

Solución cristal violeta

Cristal violeta	0.5 g
Fenol	2.5 g
Etanol 97%	20.0 mL
Glicerina	80.0 mL
Agua destilada	100.0 mL

Utilidad: Para teñir las paredes de las bacterias Gram +.

**Solución Lugol**

Yodo	1.0 g
KI	2.0 g
Agua destilada	100.0 mL

Utilidad: Forma un complejo con el colorante para contrastar la tinción.

## c) Tinción de flagelos.

Mordente:

Acido tánico	20.0 g
Fenol	2.5 g
Etanol 97%	20.0 mL
Glicerina	80.0 mL
Agua destilada	100.0 mL
Cristal Violeta	0.5 g

Utilidad: Tiñe los flagelos por la formación del complejo mordente/colorante.

d) **Medio de cultivo B de King para la detección de fluorescencia.**

Proteosa peptona # 3	20.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5 g
Glicerol	15.0 mL
Agar bacteriológico	15.0 g
Agua destilada	1 L

Utilidad: Produce fluoresceína, en bacterias con capacidad para hacerlo.

e) **Medio FN para fluorescencia.**

Proteosa peptona #3	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.15 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15 g
KNO <sub>3</sub>	0.2 g
NaNO <sub>2</sub>	1.5 g
Agua destilada	100 mL

Los ingredientes se adicionan en el orden descrito, teniendo cuidado de disolver cada uno conforme se van adicionando. Una vez mezclados, el medio se esteriliza a 15 libras/pulgada cuadrada (lb/plg<sup>2</sup>) de presión durante 15 minutos.

Utilidad: Permite determinar la producción de fluoresceína por las bacterias que tienen capacidad para hacerlo.

f) **Medio de Hugh and Leifson O/F.**

Glucosa	10.0 g
Peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3 g
Agar	3.0 g
Bromotimol azul (solución acuosa al 1%)	3.0 mL
Agua destilada	1 L

**g) Producción de ácidos a partir de carbohidratos.**

Peptona . . . . .	2.0 g
Bromotimol azul . . . . .	0.03 g
Carbohidrato . . . . .	10.0 g
Agua . . . . .	1.0 L

El medio se esteriliza a 15 lb/plg<sup>2</sup> durante 15 minutos excepto el carbohidrato, el cual se esteriliza por filtración con membrana Millipore 0.45  $\mu$  y adiciona al medio en forma aséptica, y se distribuye en tubos de ensaye en volumen de 5 mL/tubo.

Cada ingrediente se disuelve, mezcla y ajusta a pH a 7.0, se esteriliza a 15 libras de presión por 15 minutos. El medio se deja enfriar a 60°C y se le adiciona la solución de glucosa filtrada para llevarla a una concentración final de 1 %.

Utilidad: Identifica las bacterias que son oxidativas, fermentativas u oxidativas/fermentativas.

**h) Reducción de nitratos a nitritos.**

Nitrato de potasio . . . . .	1.0 g
Extracto de carne . . . . .	3.0 g
Peptona . . . . .	5.0 g
Agua destilada . . . . .	1.0 L

Reactivos para la reducción de nitratos a nitritos.

Reactivo A:

Ácido acético glacial . . . . .	100.0 mL
Ácido sulfanílico . . . . .	2.8 g
Agua destilada . . . . .	250.0 mL

Reactivo B:

Disolver 5 g de dimetil-alfa-naftilamina en 1 L de ácido acético 5 N.

Utilidad: Determinar la capacidad para producir enzimas nitrato reductasas por las bacterias capaces de hacerlo.

i) **Producción de ácido sulfhídrico.**

NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O . . . . .	0.2 g
NaCl . . . . .	5.0 g
Extracto de carne . . . . .	5.0 g
Agua destilada . . . . .	1 L

Se esteriliza por separado y adiciona 0.5 g de peptona ó 0.5 g de tiosulfato de sodio 0.1 g de clorhidrato de cisteína.

Las tiras de papel filtro se impregnan con una solución saturada de acetato de plomo y cuando se encuentran completamente secas son colocadas en los matraces. En las tiras de papel se adhiere el H<sub>2</sub>S y al ponerse en contacto con el acetato de plomo se tornan negras por la formación de sulfuro de plomo, esta reacción identifica la presencia de H<sub>2</sub>S.

Utilidad: Determina la capacidad de las bacterias para producir ácido sulfhídrico.

j) **Detección de enzimas proteolíticas.**

Agar nutritivo . . . . .	23 g
Gelatina . . . . .	100 g
Agua destilada . . . . .	1 L

Utilidad: Determina la capacidad de las bacterias para producir enzimas que licúan la gelatina.

k) **Medio de Thornley para la detección de dihidrolasa de arginina.**

Peptona . . . . .	1.0 g
NaCl . . . . .	5.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0.3 g
Agar . . . . .	3.0 g

Utilidad: Sirve para indicar la capacidad de las bacterias para la producción de dihidrolasa de arginina.

l) **Hidrólisis de almidón.**

Papa	250 g
Almidón	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L

Utilidad: Para detectar la producción de enzimas que hidrolizan al almidón.

m) **Producción de oxidasa.**

Solución de NNdimetil-p-fenilenediamina-monoclorhidro al 1%. Se impregnan tiras de papel filtro con esta solución, se pueden usar inmediatamente o deshidratarlas para su uso posterior.

Utilidad: En un minuto es posible establecer si la bacteria es capaz de producir la enzima oxidasa.

n) **Producción de levana.**

Extracto de carne	1.0 %
Agar	1.5 %
Sacarosa	10.0 %

o) **Producción de indol.**

Caldo triptofano	1.0 %
Peptona	2.0 g
NaCl	0.5 g
Agua destilada	100 mL

**Reactivo de Kovak**

Alcohol isoamílico	150 mL
p-dimetilaminobenzaldehido	10 g
HCl concentrado	50 mL

Utilidad: Permite determinar la capacidad de las bacterias para producir indol mediante un sustrato adecuado.

p) **Producción de enzimas lipolíticas.**

Peptona	10.0 g
NaCl	5.0 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Se ajusta a pH 7.4 y se esteriliza a 15 lb/plg<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos, por otro lado, se esterilizan 10 mL de Tween 80 y se adicionan al medio base. Utilidad: Detecta la capacidad de las bacterias para producir enzimas capaces que hidrolizan lípidos.

Apéndice 2: Tablas de lectura de resultados de: (A) API 20 E y (B) 20 NE

(A).

API 20 E				
Prueba	Substratos	Reacciones/Enzimas	Resultados	
			Negativo	Positivo
ONGP	orto-nitrofenol galactósido	$\beta$ -galactosidasa	incoloro	amarillo
ADH	arginina	dihidrolasa de arginina	amarillo	rojo/naranja
LDC	lisina	lisina descarboxilasa	amarillo	naranja
ODC	ornitina	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo naranja
CIT	citrato sódico	utilización de citrato	verde/ amarillo	azul-verde
H <sub>2</sub> S	tiosulfato sódico	producción de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	incoloro/ grisáceo	depósito negro
URE	urea	ureasa	amarillo	rojo/naranja
TDA	triptófano	triptofano desaminasa	Inmediato amarillo	Inmediato marrón
IND	triptófano	producción de indol	incoloro	rosa
VP	piruvato sódico	producción de acetoina	incoloro	rosado/rojo
GEL	gelatina de Köhn	gelatinasa	sin difusión de pigmento negro	difusión de pigmento negro
GLU	glucosa	fermentación/oxidación	azul verdoso	amarillo
MAN	manitol	fermentación/oxidación	azul verdoso	amarillo
INO	inositol	fermentación/oxidación	azul verdoso	amarillo
SOR	sorbitol	fermentación/oxidación	azul verdoso	amarillo
RHA	ramnosa	fermentación/oxidación	azul verdoso	amarillo
SAC	sacarosa	fermentación/oxidación	azul verdoso	amarillo
MEL	melobiosa	fermentación/oxidación	azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	fermentación/oxidación	azul verdoso	amarillo
ARA	arabinosa	fermentación/oxidación	azul verdoso	amarillo
OX	en papel filtro	citocromo oxidasa	incoloro	violeta
NO <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	tubo GLU	Producción de NO <sub>2</sub> reducción a gas N <sub>2</sub>	amarillo rojo	rojo amarillo
MOB	APIM	movilidad	inmóvil	amarillo
MCC	Mac Conkey	crecimiento	ausencia	presencia
OF	glucosa	fermentación/oxidación	verde	amarillo

(B).

API 20 NE				
Pruebas	Sustratos	Reacciones/Enzimas	Resultados	
			Negativo	Positivo
NO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio	reducción de nitratos a nitritos	incoloro	rosa/rojo
		reducción de nitratos a azoe	rosa	incoloro
TRP	triptófano	formación de indol	incoloro	rosa
GLU	glucosa	fermentación	azul verde	amarillo
ADH	arginina	dihidrolasa de arginina	amarillo	rosa rojo
URE	Urea	Ureasa	Amarillo	rosa rojo
ESC	esculina	hidrólisis	amarillo	gris negro
GEL	gelatina	hidrólisis	licuefacción	sin licuefacción
PNGP	p-nitrofenil β D-galacto piranósido	β-galactosidasa	incoloro	amarillo
GLU	glucosa	asimilación	transparencia	turbidez
ARA	arabinosa	asimilación	transparencia	turbidez
MNE	manosa	asimilación	transparencia	turbidez
MAN	manitol	asimilación	transparencia	turbidez
NAG	acetil/ glucosamida	asimilación	transparencia	turbidez
MAL	maltosa	asimilación	transparencia	turbidez
GNT	gluconato	asimilación	transparencia	turbidez
CAP	caprato	asimilación	transparencia	turbidez
ADI	adipato	asimilación	transparencia	turbidez
MLT	malato	asimilación	transparencia	turbidez
CIT	citrato	asimilación	transparencia	turbidez
PAC	fenil-acetato	asimilación	transparencia	turbidez
OX	tetra fenil diamina	citocromo oxidasa	incoloro/ violeta	

**Apéndice 3: Escala de Mac Farland para la preparación de suspensiones bacterianas.**

Se prepararon siete tubos de ensaye con los volúmenes y concentración de  $\text{BaCl}_2$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , establecidos en la siguiente tabla:

Tubo	mL de $\text{BaCl}_2$ 1%	mL de $\text{H}_2\text{SO}_4$ 1%	Bacterias/mL
1	0.01	9.99	$3.0 \times 10^7$
2	0.05	9.95	$1.5 \times 10^8$
3	0.1	9.9	$3.0 \times 10^8$
4	0.15	9.85	$4.5 \times 10^8$
5	0.2	9.8	$6.0 \times 10^8$
6	0.3	9.7	$9.0 \times 10^8$
7	0.4	9.6	$1.2 \times 10^9$

La solución formada por la mezcla de reactivos manifiesta una turbidez similar a la que presentan las bacterias en suspensión. Esta escala de Mac Farland se utiliza para preparar suspensiones bacterianas y es una manera semicuantitativa para determinar la concentración de bacterias en suspensión.

**Apéndice 4: Medio mínimo para la detección de sideróforos.****Soluciones Stock:**

L-Ácido glutámico al 10% disuelto con solución de KOH 5M y ajustado a pH 6.5 con agua deionizada.

Manitol al 10%

$\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$  3 g c/u en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 1%

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 5%

**Solución de elementos traza:**

Se pesó 1 g de cada uno de los siguientes reactivos y se disolvieron por separado en 100 mL de agua desionizada:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Solución final de elementos traza:

Adicionar a 88 mL de agua deionizada esterilizada 10 mL de solución  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 1 mL de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.5 mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.5 mL de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 0.1 mL de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Medio mínimo final:

Adicionar a 900 mL de agua desionizada esterilizada 10 mL de cada una de las soluciones Stock, así como 10 mL de la solución final de elementos traza. Si se quiere preparar menor volumen se hace una adición proporcional de las soluciones al volumen de agua original.

**Apéndice 5: Medio Universal de Cromo Azurol (CAS) para la detección de sideróforos.**

Cromo azurol . . . . .	60.5 mg
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O (1 mM) . . . . .	10.0 mL
HDTMA . . . . .	72.9 mg
MM9 10X . . . . .	100.0 mL
Agar . . . . .	15.0 g
Pipes (Piperazine-N, N'-bis [2-ethanesulphonic acid] . . . . .	30.24 mg
Casaminoácidos (10%) . . . . .	10.0 mL

**Preparación de soluciones:****Solución A.**

Se disuelven 60.5 mg de CAS en 50 mL de agua desionizada y se mezclan con 10 mL de solución férrica (1mM · 6 H<sub>2</sub>O, 10 mM HCl). En agitación constante se adicionan 72.9 mg de HDTMA previamente disuelto en 40 mL de agua destilada desionizada; la solución resultante deberá tener un color azul oscuro.

**Solución B.**

Se colocan 750 mL de agua desionizada en un matraz y se añaden 100 mL de sales MM9, 15 g de agar y 30.24 g de Pipes; así como 12 g de una solución de NaOH al 50%, se esterilizan y dejan enfriar a 50°C y adicionan 30 mL de casaminoácidos al 10 %.

La solución A se adiciona a la solución B teniendo cuidado de que resbale por las paredes, para no formar burbujas. Un volumen aproximado de 30 mL de la mezcla obtenida se distribuye en cada caja de Petri.

**Apéndice 6: Método de Lowry para cuantificar proteínas.**

1. Pipetear 0.5 mL de solución de albúmina de cada una de sus concentraciones, así como de los extractos problema y del obtenido del medio solo.
2. Adicionar a cada tubo 0.5 mL de NaOH 1 N, incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 5 mL de reactivo C y dejar actuar durante 10 minutos.
4. Agregar 0.5 mL de reactivo D y mezclar vigorosamente e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente para un cambio de color (transparente a azul).
5. Leer la absorbancia a 600 nm contra el blanco de la curva tipo.

**Reactivos**

Todos los reactivos deben prepararse en el momento de ser utilizados.

Reactivo A.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%.

Reactivo B.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  al 5% en citrato de sodio al 1%.

Reactivo C. Preparado al momento de usarse. 50 mL de reactivo A + 1 mL de reactivo B.

Reactivo D. Reactivo de Follin diluido 1:3 con agua destilada.

**Apéndice 7: Método de extracción del componente activo en solución acuosa.**

1. Crecer el aislamiento bacteriano en medio de cultivo PDA e incubar durante 72 horas.
2. Eliminar las bacterias de la superficie del medio de cultivo, con agua destilada esterilizada.
3. Fragmentar el medio de cultivo que contiene el componente activo y someterlo a molienda en licuadora, durante 1 minuto, con la adición de acetona al 80%.
4. Filtrar el agar con manta de cielo, para separarlo del componente acuoso.
5. Centrifugar el componente acuoso a 8000 rpm y conservar el sobrenadante.
6. Evaporar a 40° C para eliminar el exceso de acetona o bien obtener el extracto acuoso con el componente activo.

### Apéndice 8: Cálculos para la cuantificación de proteínas presentes en el extracto crudo.

El factor de concentración proteica de una sustancia será el inverso de la pendiente representado por  $1/m$  por lo tanto:

$m$  = pendiente

$$m = y_2 - y_1 / x_2 - x_1;$$

$$y_2 = 0.6 \text{ absorbancia}; y_1 = 0.2 \text{ absorbancia}; x_2 = 490; x_1 = 140$$

$$m = 0.6 \text{ Abs} - 0.2 \text{ Abs} / 490 - 140 = 0.001139601 \text{ Abs}/\mu\text{g}$$

El inverso de la pendiente será el factor de concentración, por lo tanto:

$$1/m = \text{factor de concentración } F = 1/0.001139601 = 877.5 \mu\text{g}/\text{abs.}$$

(F) (Absorbancia extracto crudo) = concentración de la proteína

(F) (Absorbancia del extracto de papa) = concentración de la proteína

Proteína extracto crudo - Proteína extracto de papa = Proteína real en el extracto crudo.

Para 0.1 mL de extracto:

$$(877.5 \mu\text{g}/\text{Abs})(0.262 \text{ Abs}) = 229.9 \mu\text{g}$$

$$(877.5 \mu\text{g}/\text{Abs})(0.121 \text{ Abs}) = 106.2 \mu\text{g}$$

$$229.2 \mu\text{g} - 123.7 \mu\text{g} = 123.7 \mu\text{g de proteína}$$

Para 0.2 mL de extracto:

$$(877.5 \mu\text{g}/\text{Abs})(0.479 \text{ Abs}) = 420.3 \mu\text{g}$$

$$(877.5 \mu\text{g}/\text{Abs})(0.253 \text{ Abs}) = 222.0 \mu\text{g}$$

$$420.3 - 222.0 = 198.3 \mu\text{g de proteína}$$

$$123.7 + 198.3 = 322.0/3 \text{ mL} = 107.33 \mu\text{g}/0.1 \text{ mL}$$

$$(107.33 \mu\text{g})(10 \text{ mL}) = 1073.33 \mu\text{g}/\text{mL de proteína}$$