

ANÁLISIS POBLACIONAL DE CÉLULAS VEGETATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* EN INTERACCIÓN *in vitro* CON BACTERIAS DEL SUELO

POPULATION ANALYSIS OF *Bacillus thuringiensis* IN INTERACTION *in vitro* WITH SOIL BACTERIA

Norma E. Rojas-Ruíz*, Candelario Vázquez-Cruz*, Patricia Sánchez-Alonso, Estibaliz Sansinenea-Royano

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 72570. Puebla, Puebla, México. (normaelena_rojas@yahoo.com.mx).

RESUMEN

La bacteria *Bacillus thuringiensis* se usa como bioinsecticida agrícola, pero se conoce poco sobre su persistencia en el suelo. El objetivo de este trabajo fue analizar la interacción de las células vegetativas o no esporuladas de *B. thuringiensis*, con 11 microorganismos nativos de suelo. Las bacterias fueron confrontadas por cocultivo de pares en condiciones controladas, y se evaluaron cinéticas de crecimiento por conteo celular en placa de los microorganismos estudiados. Los resultados mostraron que el desarrollo de *B. thuringiensis* es afectado por siete de los 11 microorganismos de suelo evaluados. De estos antagonistas, *Pseudomonas fluorescens* fue uno de los que redujeron más la población de células vegetativas de *B. thuringiensis*, a 28 °C versus 37 °C; esto sugiere un posible mecanismo de termorregulación del antagonismo. El efecto antagónico de *P. fluorescens* también se observó sobre otros *B. thuringiensis* del suelo, aislados en este trabajo, incluso en medio libre de células de *P. fluorescens*, lo que indica susceptibilidad de *B. thuringiensis* a las sustancias antibacterianas de *P. fluorescens*. Esto sugiere que el suelo es un ambiente poco apropiado para la multiplicación celular de *B. thuringiensis* por un posible antagonismo microbiano.

Palabras clave: Antagonismo microbiano, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*.

INTRODUCCIÓN

B*acillus thuringiensis* es uno de los agentes de control biológico más exitosos, porque posee una especificidad alta contra insectos plaga o vectores de enfermedades (Meadows, 1993; Aguilar e Ibarra, 1995). El principal factor de patogenicidad de

ABSTRACT

The bacteria *Bacillus thuringiensis* is used as a biological insecticide in agriculture, but little is known about its persistence in the soil. The objective of this study was to analyze the interaction of the vegetative, or non-sporulated, cells of *B. thuringiensis*, with 11 native soil microorganisms. The bacteria were confronted by paired co-culture under controlled conditions, and growth kinetics of the studied microorganisms was evaluated by cell count on plates. The results showed that the development of *B. thuringiensis* is affected by seven of the 11 soil microorganisms. Of these antagonists, *Pseudomonas fluorescens* was one of those that most reduced the population of *B. thuringiensis* vegetative cells at 28 °C but not at 37 °C. This suggests a possible mechanism of thermoregulation in the antagonism. The antagonistic effect of *P. fluorescens* was also observed on other soil *B. thuringiensis* strains isolated during this study, even in medium that was free of *P. fluorescens* cells, indicating *B. thuringiensis* susceptibility to antibacterial substances of *P. fluorescens*. This suggests that the soil is not an environment that favors the multiplication of *B. thuringiensis* cells because of possible microbial antagonism.

Key words: Microbial antagonism, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*.

INTRODUCTION

B*acillus thuringiensis* is one of the most successful agents of biological control because it is highly specific against insect pests or disease vectors (Meadows, 1993; Aguilar and Ibarra, 1995). The main pathogenicity factor of these bacteria is the specific protein Cry, which alters the gut integrity of the insects (Crickmore *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001). Because of its specific infective capacity, *B. thuringiensis* is

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Agosto, 2009. Aprobado: Octubre, 2010.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 941-953. 2010.

esta bacteria es la proteína Cry específica, que altera la integridad del intestino de los insectos (Crickmore *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001). Debido a la capacidad infectiva específica, *B. thuringiensis* se considera un entomopatógeno, aunque también se ha considerado un microorganismo nativo de suelo, porque se puede aislar frecuentemente de muestras de este hábitat (Martin y Phillis, 1994). Sin embargo, la información de la persistencia de *B. thuringiensis* es poco clara por la complejidad del sistema suelo y porque con frecuencia se hace el monitoreo de células esporuladas o inactivas metabólicamente. Estas células no permiten observar condiciones favorables de crecimiento, ni las desfavorables como la carencia de nutrientes específicos o el antagonismo microbiano. La situación es aún más controvertida cuando se pretende estudiar la supervivencia de *B. thuringiensis* introduciendo esporas en el suelo (Petras y Casida, 1985; West *et al.*, 1985). El objetivo del presente estudio fue analizar las fluctuaciones poblacionales de *B. thuringiensis* cuando interactúa como célula vegetativa con otros microorganismos nativos del suelo y determinar la posible relación benéfica o antagónica entre estos microorganismos. Lo cual nos permitiría conocer mejor las condiciones fisiológicas microbianas que existen en el suelo y que rigen la desaparición de los microorganismos considerados bioinsecticidas del tipo *B. thuringiensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron cepas de *B. thuringiensis* de referencia, con actividad bioinsecticida, y varios aislados de *B. thuringiensis* y *B. cereus* del ambiente (Cuadro 1). Estas cepas fueron confrontadas con las bacterias señaladas en el Cuadro 2, con el fin de determinar el tipo de convivencia (mutualismo o antagonismo) entre ellas.

Medios de cultivo

Se usaron cuatro medios de cultivo (Cuadro 3). Los medios DSM y TrisG favorecen la esporulación de *B. thuringiensis* y GGM la inhibe. El medio LB se usó para el cultivo de todas las bacterias y para evaluar la resistencia a cloranfenicol. La determinación de la resistencia a cloranfenicol fue necesaria para facilitar el conteo celular en las cinéticas de cocultivo en líquido, para esto se usaron diluciones seriadas del antibiótico (de 10

considered an entomopathogen, although it has also been considered a native soil microorganism because it is frequently isolated from soil samples (Martin and Phillis, 1994). However, information on *B. thuringiensis* persistence is not altogether clear because of the complexity of the soil system and because sporulated, or metabolically inactive, cells are often monitored. These cells do not exhibit growth and so the conditions that favor their development cannot be observed, nor those that do not, such as specific nutrient deficiency or microbial antagonism. The situation is even more controversial when *B. thuringiensis* survival is to be studied by introducing spores into the soil (Petras and Casida, 1985; West *et al.*, 1985). The objective of this study was to analyze the fluctuations in *B. thuringiensis* populations when it acts as a vegetative cell in interaction with other native soil microorganisms. This allows us to determine possible beneficial, or antagonistic, relationships among these microorganisms and, in turn, to identify microbial physiological conditions that exist in the soil and that condition the disappearance of the microorganisms considered bioinsecticides, such as *B. thuringiensis*.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

B. thuringiensis reference strains with bioinsecticide activity, as well as several isolates of *B. thuringiensis* and *B. cereus* from the environment (Table 1), were confronted with the bacteria listed in Table 2, in order to determine the type of relationships (mutualism or antagonism) existing between them.

Culture media

Four culture media were used (Table 3). The media DSM and TrisG favored sporulation of *B. thuringiensis*, while GGM inhibited it. The LB medium was used to culture all of the bacteria and to evaluate resistance to chloramphenicol. Determining resistance to chloramphenicol was necessary to facilitate cell count in the kinetics of liquid co-culture, for which a series of dilutions of the antibiotic (from 10 to $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$) was used; with these dilutions, the antibiotic concentration each bacterial strain resisted was determined and which concentration was appropriate for selecting the bacteria according to requirements of the confrontation tests.

Cuadro 1. Cepas de *Bacillus* sp. utilizadas en este trabajo.**Table 1. Strains of *Bacillus* sp. used in this study.**

Nombre de la cepa	Referencia/origen
<i>B. thuringiensis</i>	
HD73	Kurstak (1962)
HD1	Dulmage (1970)
IPS82	<i>Bacillus</i> Genetic Stock Center, 1999
45IV, 51II, 65IV y 71I.	Suelo de Izúcar de Matamoros, Acatzingo, Huaquechula y Tehuizingo, Pue., respectivamente
NRB15 y NRB25	Suelo de Tehuacán, Pue.
NRB2	Cadáver de chinche
NRB33	Estiércol de conejo, Zimetepec, Tlax.
<i>Bacillus cereus</i>	
NRB1	Cadáver de chinche
NRB3-NRB6	Suelo de Chachapa, Pue.
NRB7- NRB14, NRB16-NRB24, NRB26-NRB28	Suelo de Tehuacán, Pue.
NRB29 y NRB30	Estiércol de cerdo. Zimetepec, Tlax.
NRB31 y NRB32	Estiércol de pollo. Zimetepec, Tlax.
NRB34	Estiércol de conejo. Zimetepec, Tlax.
NRB35 y NRB36	Estiércol de vaca. Zimetepec, Tlax.
NRB37, NRB40, NRB43 y NRB46	Raíz de cebada. Libres, Pue.
NRB38, NRB41, NRB44 y NRB47	Tallo de cebada. Libres, Pue.
NRB39, NRB42, NRB45 y NRB48	Rizósfera de cebada. Libres, Pue.

Cuadro 2. Bacterias de la colección ATCC y otras bacterias de suelo utilizadas en este trabajo.**Table 2. Bacteria of the ATCC collection and other soil bacteria used in this study.**

Nombre de la cepa	Referencia
<i>Bacillus sphaericus</i> 4526	ATCC
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 49838	ATCC
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 4352	ATCC
<i>Bacillus cereus</i> 10876	ATCC
<i>Serratia marcescens</i> 8100	ATCC
<i>E. coli</i> Top 10	Invitrogen
<i>Pseudomonas</i> sp. NR1, NR2, NR3, NR4, NR5, NR6	Colección CICM-BUAP

Cuadro 3. Medios de cultivo utilizados.**Table 3. Culture media used.**

Medio de cultivo	Composición química
TrisG	CaCl ₂ ·H ₂ O 0.008 %, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.00025 %, CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.0005 %, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.0005 %, MnSO ₄ ·H ₂ O 0.005 %, MgSO ₄ 0.02 %, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2 %, Glucosa 0.2 %, Tris 50 mM pH=7.5, Extracto de levadura 0.15 %, K ₂ HPO ₄ 0.05 %, agar 1.5 % (opcional para medio gelificado).
DSM	Caldo nutritivo Difco® 0.8%, NaOH 0.5 mM, MgSO ₄ 1 mM, KCl 13.4 mM, MnCl ₂ 0.01 mM, Ca(NO ₃) ₂ 1 mM, FeCl ₃ 0.001 mM, agar 1.5%.
GGM	MOPS 100 mM pH=7.0, (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 mM, KH ₂ PO ₄ 5 mM, MgCl ₂ 2 mM, glucosa 100 mM, casaminoácidos 0.1 %, MnCl ₂ 50 mM, CaCl ₂ 0.7 mM, ZnSO ₄ 1 mM, Tiamina 2 mM, FeCl ₃ 0.5 mM, agar 1.5 %.
LB	Peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.5 %, agar 1.5 % (opcional para medio gelificado), pH=7.0.

a $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$), con lo que se determinó la concentración de antibiótico que resiste cada cepa bacteriana y que es apropiada para la selección bacteriana según se requiriera en los ensayos de confrontación.

Confrontación de *B. thuringiensis* con bacterias del suelo

La relación biológica entre *B. thuringiensis* y los microorganismos de suelo (Cuadro 2) fue evaluada cualitativamente. Se prepararon cultivos en suspensión de todas las bacterias con 5 mL de caldo LB, incubándolos a 28 °C con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm) durante 8 h, para alcanzar una densidad celular aproximada de 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. De los cultivos en suspensión se prepararon diluciones para sembrar cajas Petri en ensayos de confrontación bacteriana por pares. Las bacterias retardoras se sembraron con asa de manera rectangular (Figura 1) en los medios TrisG, DSM y GGM. La suspensión de *B. thuringiensis* se inoculó atravesando el rectángulo, en forma de línea diagonal para crear un gradiente poblacional en la estría simple. Las diluciones se usaron para crear pruebas de “rectángulos cruzados” con tres proporciones de poblaciones bacterianas 2:1, 1:1 y 1:10 de *B. thuringiensis* vs la cepa retardora respectivamente (modificaciones de Cafferkey *et al.*, 1989; Sibide *et al.*, 1993). Las cajas sembradas se incubaron a 28 °C por 14 h y se registró el tipo de inhibición de crecimiento de *B. thuringiensis*.

Análisis de la difusión del antibacteriano de *P. fluorescens* y susceptibilidad de *B. thuringiensis*

Para determinar si el efecto antagónico de *P. fluorescens* es general contra *B. thuringiensis*, o si está restringido a las bacterias de las cepas de productos comerciales como HD1, HD73 o IPS82, el ensayo de confrontación se amplió con mayor número de cepas de *Bacilli* en un sistema de difusión de tóxicos en placa. Para ello, se sembraron homogéneamente 1×10^5 y 1×10^7 UFC de *P. fluorescens*, en medio TrisG sólido que tenía cubierta la superficie con una membrana estéril de celofán dulce. Estas cajas se incubaron durante 12 h a 28 °C, y se retiró el celofán junto con las bacterias. Las placas inoculadas nuevamente en la superficie libre de colonias con 1×10^5 UFC de células vegetativas de las cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus* (Cuadro 1) para determinar su capacidad de crecimiento.

Efecto del cultivo mixto de *B. thuringiensis* y *P. fluorescens* en medio líquido

Debido a que los medios sólidos presentan dificultad para observar la interacción celular, por la falta de movilidad celular, y

Confrontation of *B. thuringiensis* with soil bacteria

The biological relationship between *B. thuringiensis* and soil microorganisms (Table 2) was evaluated qualitatively. Cultures of all of the bacteria were prepared by suspension in 5 mL of liquid broth (LB) and incubated at 28 °C with constant shaking at 200 rpm for 8 h to reach a cell density of approximately 1×10^6 colony forming units (CFU) per milliliter. With the cultures in suspension, dilutions were prepared to seed the Petri dishes for the paired bacterial confrontation trials. The challenging bacteria were seeded with a bacteriological loop forming a rectangle (Figure 1) in TrisG, DSM and GGM media. The *B. thuringiensis* suspension was seeded in a straight line crossing the rectangle diagonally to create a population gradient in the simple streak. The dilutions were used to create “crossed rectangle” tests with three proportions of *B. thuringiensis* to challenger strains: 2:1, 1:1 and 1:10, respectively (modifications from Cafferkey *et al.*, 1989; Sibide *et al.*, 1993). The inoculated Petri dishes were incubated at 28 °C for 14 h and the type of *B. thuringiensis* growth inhibition was recorded.

Diffusion analysis of the antibacterial *P. fluorescens* and *B. thuringiensis* susceptibility

To determine whether the antagonistic effect of *P. fluorescens* against *B. thuringiensis* is general or restricted to strains contained in commercial products such as HD1, HD73 or IPS82, the confrontation trial was extended to include a larger number of *Bacillus* strains in a diffusion system of toxic substances on a plate. To this end, 1×10^5 and 1×10^7 CFU of *P. fluorescens* were seeded uniformly on solid TrisG medium, whose surface was covered with a sweet sterile cellophane membrane. These Petri dishes were incubated for 12 h at 28 °C, after which the cellophane was removed together with the bacteria. The plates were again inoculated on the colony-free surface with 1×10^5

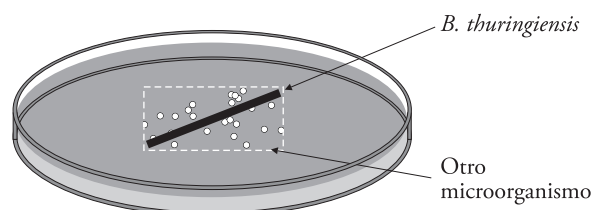


Figura 1. Siembra del rectángulo cruzado usado para la evaluación cualitativa de la interacción de *B. thuringiensis* con bacterias del suelo.

Figure 1. Striking in the crossed rectangle used for the qualitative evaluation of *B. thuringiensis* interaction with soil bacteria.

que sólo aportan información cualitativa, se prepararon cultivos líquidos en los que se inocularon cantidades conocidas de células vegetativas y se monitoreó la fluctuación poblacional, como un indicador de la relación biológica de bacterias potencialmente antagonicas. Para ello, se cultivaron por separado las cepas *B. thuringiensis* HD73, HD1, IPS82 y NRB34 y *P. fluorescens* en medio TrisG por 10 h a 28 °C con agitación constante. En matraces de 250 mL se sembraron mezclas de bacterias en proporciones 1:1 y 10:1 de *B. thuringiensis* vs *P. fluorescens* respectivamente, en un volumen final de 30 mL. Los cultivos mixtos se incubaron a 28 °C con agitación constante a 200 rpm. Cada hora se tomaron muestras y se hicieron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) para sembrarlas en placas de LB por el método de gota, y determinar las UFC sobrevivientes de *B. thuringiensis* respecto al tiempo de interacción homogénea en medio líquido. El recuento de la población de *P. fluorescens* se efectuó en medio LB adicionado de 5 µg de cloranfenicol. La población de *B. thuringiensis* fue determinada por la morfología cerosa de las colonias en medio sin antibiótico. La incubación de las mezclas bacterianas por 24 h se efectuó con el fin de determinar si *B. thuringiensis* esporulaba y la proporción de células esporuladas de la población total en la condición de cocultivo.

Evaluación del extracto de *P. fluorescens* en el crecimiento de *B. thuringiensis*

Se prepararon extractos líquidos libres de células antagonicas para establecer si las bacterias más antagonicas a *B. thuringiensis* liberaban sustancias tóxicas y si éstas se acumulaban. La bacteria *P. fluorescens* se cultivó en medio TrisG líquido por 12 h con agitación a 28 °C. La suspensión bacteriana se centrifugó a 12 000 rpm y el sobrenadante se filtró con membranas Millipore® con diámetro de poro de 0.45 µm. El extracto libre de *P. fluorescens* se agregó al medio TrisG líquido nuevo en las proporciones: 1:1, 3:1 y 1:3, para tener una evaluación cualitativa de la inhibición de crecimiento. En estas mezclas se sembró *B. thuringiensis* y como control se cultivó a *B. thuringiensis* en medio TrisG nuevo y mezclado con medio TrisG libre de *B. thuringiensis*. El ensayo fue efectuado en matraces de 250 mL que contenían 30 mL de cada una de las mezclas que se inocularon con aproximadamente 5×10^5 UFC de células vegetativas de *B. thuringiensis*. Los matraces se incubaron a 28 °C con agitación constante; debido a que en la proporción 1:1 con inóculo de 1×10^6 UFC de *B. thuringiensis* se registró crecimiento, se efectuó la cuantificación de las UFC de las cepas IPS82, 45IV, 51II, 65IV y 71I en la mezcla 1:1 para fines comparativos de supervivencia. Cada hora se tomaron muestras de 1 mL para hacer diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) y sembrarlas en placas de LB por el método de gota. Así se contó el número de UFC sobrevivientes de *B. thuringiensis*

CFU of vegetative cells of the *B. thuringiensis* and *B. cereus* strains (Table 1) to determine their growth capacity.

Effect of the *B. thuringiensis* and *P. fluorescens* mixed culture in liquid medium

Because in solid medium the cells do not move, it is difficult to observe cell interaction, and so only qualitative information can be obtained. For this reason, cultures were prepared in liquid media. These were inoculated with known amounts of vegetative cells, and population fluctuations were monitored as an indicator of the biological relationship of potentially antagonistic bacteria. For this test, the *B. thuringiensis* strains HD73, HD1, IPS82 and NRB34 and *P. fluorescens* were cultured separately in TrisG medium for 10 h at 28 °C shaking constantly. Bacterial mixtures of *B. thuringiensis* and *P. fluorescens* were made in proportions 1:1 and 10:1, respectively, and used to inoculate 250 mL flasks containing 30 mL liquid medium. Mixed cultures were incubated at 28 °C shaking constantly at 200 rpm, and samples were taken every hour. A series of dilutions was made (10^{-1} to 10^{-6}) to inoculate LB plates using a drop method and to quantify surviving *B. thuringiensis* CFU, relative to the time of uniform interaction in the liquid medium. Quantification of the *P. fluorescens* population was done in LB medium supplemented with 5 µg of chloramphenicol. The *B. thuringiensis* population was determined by the waxy morphology of the colonies in the medium without the antibiotic. The bacterial mixtures were incubated for 24 h to determine whether *B. thuringiensis* sporulated, and to quantify the proportion of sporulated cells of the total population in the condition of co-culture.

Effect of *P. fluorescens* extracts on growth of *B. thuringiensis*

Liquid extracts free of antagonistic cells were prepared to establish whether the bacteria that are most antagonistic toward *B. thuringiensis* released toxic substances and whether these substances accumulated in the medium. The bacteria *P. fluorescens* was cultured in TrisG liquid medium for 12 h at 28 °C with shaking. The bacterial suspension was centrifuged at 12 000 rpm and the supernatant was filtered through 0.45 µm pore diameter Millipore® membranes. The extract free of *P. fluorescens* was added to new unused TrisG liquid medium in proportions of 1:1, 3:1 and 1:3 to assess growth inhibition qualitatively. *B. thuringiensis* was seeded in these mixtures, and as a control, *B. thuringiensis* was cultured in new TrisG medium mixed with *B. thuringiensis*-free TrisG. The test was conducted in 250 mL flasks containing 30 mL of each of the mixtures, which were inoculated with approximately 5×10^5 CFU of *B.*

respecto al tiempo de tratamiento con extractos bacterianos libres de células antagonicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de condiciones para los ensayos de confrontación bacteriana

Las cepas de *B. thuringiensis* crecieron cuando se cultivaron en medio TrisG a 28 °C. En esta condición el tiempo de generación fue de 20 min para las cepas HD73, HD1 e IPS82. De estas tres cepas, la IPS82 mostró tiempos de incubación mayores para esporular, por esta característica la cepa fue elegida para llevar a cabo la mayor parte de los experimentos de confrontación bacteriana, porque con ella se aseguraba el estado vegetativo de *B. thuringiensis*. También se determinó la resistencia bacteriana a cloranfenicol, que es de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ en *P. fluorescens*, *B. cereus*, *S. marcescens*, *B. cepacia*, y en las cepas NR1, NR3, NR4, NR6. La resistencia es de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, en *B. sphaericus* y *K. pneumoniae*. Mientras que las cepas HD1, HD73, IPS82, 45IV, 51II, 65IV, 71I, NR2 y NR5, escasamente resistieron $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. El fenotipo de resistencia en *P. fluorescens* se usó para el recuento celular en placa durante las cinéticas de crecimiento microbiano, en tanto que para *B. thuringiensis* fue suficiente usar la morfología colonial cerosa característica para su conteo.

Análisis de la confrontación de *B. thuringiensis* con bacterias de suelo

Las condiciones de cultivo descritas en este trabajo favorecen el crecimiento de *B. thuringiensis*, por lo que las interacciones *B. thuringiensis* con cualquier bacteria habitante del suelo, en un modelo de reto por pares, podrían ser benéficas o antagonicas en dependencia de la abundancia del crecimiento en placas de Petri con los medios sólidos propuestos. Para la prueba de confrontación cualitativa se diseñó un experimento de rectángulo cruzado (Figura 1) porque el antagonismo se observó mejor que al hacer una sola intersección de estrías en siete de 11 cepas probadas contra *B. thuringiensis*. Se observaron varios tipos de crecimiento en el sembrado de modelo de rectángulo cruzado (Cuadro 4) los cuales fueron desde la inhibición de *B. thuringiensis* en la primera zona de interacción con las bacterias de

thuringiensis vegetative cells. The flasks were incubated at 28 °C with constant shaking. Because growth was observed in the 1:1 proportion with 1×10^6 *B. thuringiensis* CFU, the CFU of the strains IPS82, 45IV, 51II, 65IV and 71I in the 1:1 mixture were quantified in order to compare survival rates. Samples of 1 mL were taken every hour and seeded on LB plates by the drop method. In this way, the number of surviving *B. thuringiensis* CFUs were counted along a treatment timeline and compared with those growing in medium free of antagonistic cells.

RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of conditions for the bacterial confrontation trials

The *B. thuringiensis* strains grew when they were cultured in TrisG medium at 28 °C. Under these conditions, the generation time was 20 min for the strains HD73, HD1 and IPS82. Of these three strains, IPS82 required longer incubation times to sporulate. Because this characteristic assured a vegetative stage in *B. thuringiensis*, this strain was selected for most of the bacterial confrontation experiments. Resistance of the bacteria to chloramphenicol was also determined: $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *P. fluorescens*, *B. cereus*, *S. marcescens*, and *B. cepacia* and for the strains NR1, NR3, NR4, NR6, while for *B. sphaericus* and *K. pneumoniae* resistance is $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. In contrast, the strains HD1, HD73, IPS82, 45IV, 51II, 65IV, 71I, NR2 and NR5 barely resisted $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. The resistance phenotype of *P. fluorescens* was used for cell count on plates during microbial growth kinetics, while for *B. thuringiensis* it was sufficient to use the characteristic waxy colony morphology for its count.

Analysis of the confrontation of *B. thuringiensis* against soil bacteria

The culture conditions described in this study favored growth of *B. thuringiensis*, and thus the interactions it has with other soil inhabiting bacteria in a paired challenge model could be either beneficial or antagonistic, depending on the abundance of growth in Petri dishes with each solid media used in this study. For the qualitative confrontation test, a crossed rectangle experiment (Figure 1) was designed since the antagonism is better observed than when the design is a single intersection of streaks in seven of 11 strains tested against *B. thuringiensis*. Several

Cuadro 4. Efecto del cocultivo de *B. thuringiensis* con otros microorganismos de suelo, modelo del rectángulo cruzado.
Table 4. Effect of co-culture: *B. thuringiensis* with other soil microorganisms. Crossed-rectangle model.

Cepa	Proporciones de <i>B.thuringiensis</i> IPS82 : otro microorganismo								
	2:1			1:1			1:10		
	Tris G	GGM	DSM	Tris G	GGM	DSM	Tris G	GGM	DSM
<i>B.sphaericus</i>	†	†	¶	¶	†	¶	□	†	††
<i>P.fluorescens</i>	†	†	¶	§	Ⓟ	¶	††	□	††
<i>K. pneumoniae</i>	†	†	¶	†	Ⓟ	¶	Ⓟ	††	Ⓟ
<i>S. marcescens</i>	†	†	¶	¶	Ⓟ	¶	□	Ⓟ	Ⓟ
<i>B. cereus</i>	¶¶	¶¶	¶¶	¶¶	¶¶	¶¶	¶¶	¶¶	¶¶
NR1	†	†	¶	¶	††	Ⓟ	††	††	††
NR2	†	†	†	†	†	†	†	Ⓟ	¶
NR3	†	†	†	¶	††	¶	††	††	††
NR4	†	†	¶	¶	□	¶	□	††	††
NR5	†	†	†	†	†	†	†	†	¶
NR6	†	†	†	†	†	†	†	†	¶

† No inhibición del crecimiento de *B. thuringiensis* IPS82; ¶ Estrangulamiento en las intersecciones; § Interrupción en la segunda Intersección; Ⓟ Dilución del inoculo; □ Inhibición franca en la segunda estría; †† Inhibición franca en la primera estría; ¶¶ Idéntica morfología colonial en ambas cepas
 † No inhibition of growth in *B. thuringiensis* IPS82; ¶ Strangulation at the intersections; § Interruption at the second intersection; Ⓟ Dilution of the inoculum; □ Frank inhibition in the second streak; †† Frank inhibition in the first streak; ¶¶ Identical colonial morphology in both strains.

suelo hasta la ausencia de inhibición a lo largo de la estría.

El fenómeno de antagonismo hacia *B. thuringiensis* fue más claro con el uso de tres medios de cultivo, porque en función de éste se afecta su manifestación. Lo anterior se debe, probablemente a la composición nutricional del medio y su relación con la expresión de funciones de competitividad metabólica. Como una aproximación a los diferentes ambientes donde puede variar la población de microorganismos, también se usaron varias proporciones bacterianas en los ensayos de confrontación. Así, se observó que el antagonismo es más marcado cuando existe una población menor de *B. thuringiensis* respecto a otras bacterias, entre ellas las del género *Pseudomonas* (proporción 1:10; Figura 2).

La clase de interacción de *B. cereus* con *B. thuringiensis* no fue observada, porque la morfología colonial de ambos es similar. El crecimiento de *B. cepacia* fue insuficiente en los tres medios de cultivo empleados, por lo que no se presentan estos resultados. Las bacterias con mayor desarrollo mostraron antagonismo contra *B. thuringiensis*, con excepción de las cepas NR2, NR5 y NR6. En el medio DSM la inhibición antagónica se observó en cualquier proporción de microorganismos, mientras que este efecto

other types of growth were observed in the crossed rectangle model (Table 4), from inhibition of *B. thuringiensis* in the first zone of interaction with soil bacteria to absence of inhibition along the entire streak.

The phenomenon of antagonism toward *B. thuringiensis* was clearer with the use of three culture media, since it was in function of the medium that the

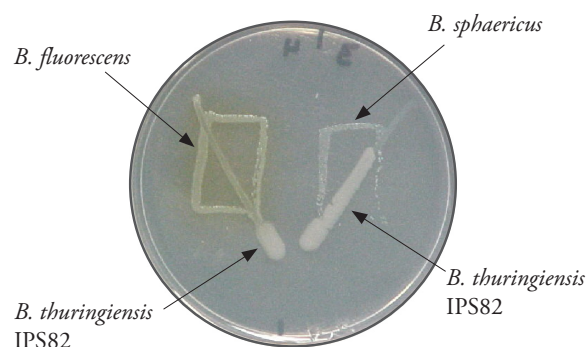


Figura 2. Efecto de *P. fluorescens* y *B. sphaericus* sobre el crecimiento de *B. thuringiensis* IPS82 en medio TrisG con proporción bacteriana 1:10.

Figure 2. Effect of *P. fluorescens* and *B. sphaericus* on *B. thuringiensis* IPS82 growth in TrisG medium with bacterial proportion of 1:10.

fue notorio sobre el medio GGM en las proporciones 1:1 y 1:10. En los experimentos de interacción bacteriana destaca el antagonismo de *P. fluorescens* sobre *B. thuringiensis*, pues la inhibición del crecimiento es evidente desde la primera interacción de las estrías, igual que con las cepas pigmentadas de verde NR1, NR3 y NR4 (Figura 2).

El efecto antagónico ejercido por bacterias pigmentadas de verde puede deberse a la producción de sustancias tóxicas para *B. thuringiensis*. Este es el caso de *P. fluorescens*, que produce antibióticos, como metabolitos secundarios, y cuya expresión está sujeta a termorregulación (Duffy y Défago, 1999; Budde y Ullrich, 2000). La inhibición de *B. thuringiensis* en presencia de *P. fluorescens* fue dependiente de la temperatura (Cuadro 5). La prueba del rectángulo cruzado con la proporción 1:1, en dos temperaturas de incubación (28 y 37 °C), mostró que la mayoría de las cepas redujeron el efecto antagónico contra *B. thuringiensis* a 37 °C respecto al producido a 28 °C. Inclusive a 37 °C se redujo o desapareció la pigmentación característica de *P. fluorescens*. Por tanto, la temperatura relativamente alta parece ser un factor que regula la supervivencia de *B. thuringiensis*.

Análisis de la difusión antibacteriana de *P. fluorescens* y susceptibilidad de *B. thuringiensis*

La susceptibilidad de varias cepas de *B. thuringiensis* a *P. fluorescens* resultó ser novedosa. Sin

degree of antagonism was affected. This is probably due to the composition of nutrients in the media and its relationship to the expression of functions of metabolic competitiveness. As an approximation to the different environments in which microbial populations can vary, different proportions of bacteria were also used in the confrontation trials. In this way, it was observed that antagonism is more marked when there is a population of *B. thuringiensis* that is smaller than that of other bacteria, such as those of the genus *Pseudomonas* (proportion 1:10; Figure 2).

The type of interaction between *B. cereus* and *B. thuringiensis* could not be distinguished because their colony morphologies are similar. Growth of *B. cepacia* was insufficient in the three culture media, and therefore these results are not presented. The bacteria with better development exhibited antagonism against *B. thuringiensis*. Exceptions were the strains NR2, NR5 and NR6. In DSM antagonistic inhibition was observed with all proportions of microorganisms, and in GGM medium it was notorious in the proportions 1:1 and 1:10. In the experiments of bacterial interaction, the antagonism of *P. fluorescens* against *B. thuringiensis* is outstanding; growth inhibition is evident from the first interaction of the streaks, as occurred with the green-pigmented strains, NR1, NR3 and NR4 (Figure 2).

The antagonistic effect exerted by green bacteria could be due to toxic substances produced to act

**Cuadro 5. Efecto de la temperatura en el fenómeno de antagonismo contra *B. thuringiensis* IPS82 (proporción 1:1).
Table 5. Effect of temperature on the phenomenon of antagonism against *B. thuringiensis* IPS82 (1:1 proportion).**

Cepa	TRIS G		GGM		DSM	
	28 °C	37 °C	28 °C	37 °C	28 °C	37 °C
<i>B. sphaericus</i>	¶	†	†	†	¶	§
<i>P. fluorescens</i>	□	†	¶	†	¶	†
<i>K. pneumoniae</i>	†	†	¶	†	¶	¶
NR1	¶	†	††	¶	§	†
NR2	†	†	†	†	†	†
NR3	¶	†	††	¶	§	¶
NR4	□	¶	††	¶	¶	¶
NR5	†	†	†	†	†	†
NR6	†	†	†	†	†	†

† Sin inhibición del crecimiento de *B. thuringiensis* IPS82; ¶ Estrangulamiento en las intersecciones; § Interrupción en la segunda intersección; ¶ Dilución del inoculo; □ Inhibición franca en la segunda estría; †† Inhibición franca en la primera estría ¶ † No inhibition of *B. thuringiensis* IPS82 growth; ¶ Strangulation at the intersections; § Interruption at the second intersection; ¶ Dilution of inoculum; □ Frank inhibition in the second streak; †† Frank inhibition in the first streak.

embargo, como los *Bacilli* y *P. fluorescens* son habitantes nativos de suelo, posiblemente existen *Bacilli* resistentes a *P. fluorescens*. También, podía haber interferencia a la difusión y alcance de las sustancias producidas por *P. fluorescens*. El análisis en placa con celofán dulce mostró que las 48 cepas de *B. thuringiensis* evaluadas son resistentes a las sustancias difusibles de color verde-amarillo que produjeron 1×10^5 UFC de bacteria antagonista por placa, durante 12 h a 28 °C. Sin embargo, la resistencia no se mantuvo cuando se incrementó la cantidad de bacterias antagonistas sembradas en el celofán a 1×10^7 UFC, con excepción de la cepa NRB34, en esta condición se observó acumulación mayor de productos de color verdoso de *P. fluorescens*. Las sustancias producidas que difunden a través del celofán podrían evaluarse en medios de cultivo libres de células o extractos enriquecidos con tóxicos de *P. fluorescens*, como se muestra más adelante.

Análisis del cultivo mixto de *B. thuringiensis* y *P. fluorescens* en medio líquido

Para abordar el aspecto cuantitativo de la interacción antagonica en cultivo líquido de *B. thuringiensis* con otro microorganismo se eligió a *P. fluorescens*, dado que presenta un fenotipo de resistencia a cloranfenicol que contrasta con *B. thuringiensis*. Para esta prueba se analizaron las cepas *B. thuringiensis*, IPS82 y NRB34. La última se eligió porque el antagonismo cualitativo de *P. fluorescens* fue menor respecto a todo el grupo de *Bacilli* estudiado. La evaluación en medio líquido se llevó a cabo en condiciones intermedias de antagonismo, medio TrisG y proporción bacteriana (1:1). Aunque del análisis en medio sólido, se sabía que la proporción 1:10 era de antagonismo marcado, ésta se usó para la comparación de viabilidad de *B. thuringiensis*.

En la cinética de crecimiento en la mezcla 1:1 se observó tendencia de crecimiento de *B. thuringiensis* IPS82 hasta las 4 h, pero su crecimiento cesó con pérdida de la viabilidad a las 7 h (Figura 3). Para la cepa de *P. fluorescens* se observó desarrollo celular y la viabilidad se mantuvo a la séptima hora, aunque se observó que ese tiempo corresponde con el inicio de la fase estacionaria de crecimiento en el medio TrisG. La afectación de la viabilidad de *B. thuringiensis*, coincide con la fase estacionaria de crecimiento de *P. fluorescens*, la que se asocia con la producción de

against *B. thuringiensis*. This is the case of *P. fluorescens*, which produces antibiotics as secondary metabolites whose expression is subject to thermoregulation (Duffy and Défago, 1999; Budde and Ullrich, 2000). Inhibition of *B. thuringiensis* in the presence of *P. fluorescens* was dependent on temperature (Table 5). The crossed rectangle test, with the 1:1 proportion at two incubation temperatures (28 and 37 °C) showed that most of the strains had a smaller antagonistic effect against *B. thuringiensis* at 37 °C than at 28 °C. At 37 °C the characteristic pigmentation of *P. fluorescens* receded or even disappeared. Therefore, a relatively high temperature seems to be a factor that contributes to *B. thuringiensis* survival.

Analysis of the antibacterial diffusion of *P. fluorescens* and *B. thuringiensis* susceptibility

Susceptibility of several *B. thuringiensis* strains to *P. fluorescens* was new. However, since *Bacilli* and *P. fluorescens* are native inhabitants of the soil, it is possible that there are *Bacilli* resistant to *P. fluorescens*. There may also have been interference in the diffusion and scope of the substances produced by *P. fluorescens*. The analysis on the plates covered with sweet cellophane showed that the 48 *B. thuringiensis* strains evaluated are resistant to

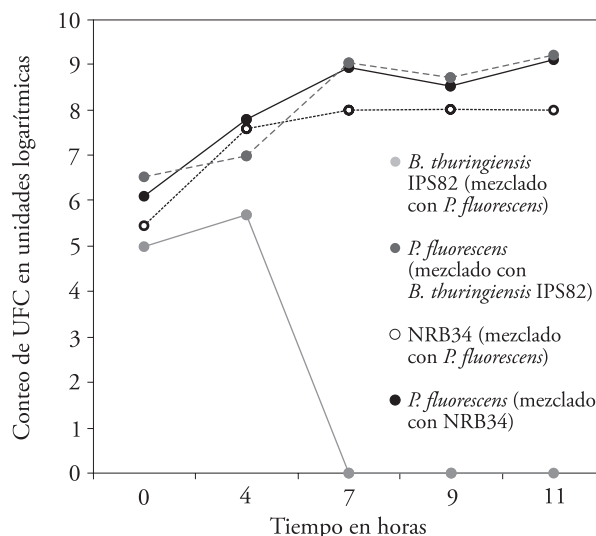


Figura 3. Supervivencia de *B. thuringiensis* y *Bacillus* spp. NRB34 en medio Tris G en condiciones de coinoculación con *P. fluorescens*.

Figure 3. Survival of *B. thuringiensis* and *Bacillus* sp. NRB34 in TrisG medium under conditions of coinoculation with *P. fluorescens*.

metabolitos secundarios. Entre estos están los clasificados como antibiótico y los de tipo bacteriocina (Nielsen *et al.*, 1998; Parret y De Mot, 2002; Riley y Wertz, 2002; Rojas *et al.*, 2005). La cepa NRB34 en el medio líquido mantuvo su población celular en la proporción 1:1 según el ensayo cualitativo en las placas de TrisG, incluso a las 11 h de contacto con *P. fluorescens*. La observación al microscopio de contraste de fases de los cultivos mixtos de la cepa IPS82 a las 11 h mostró destrucción celular. En tanto que la mezcla con la cepa NRB34 contenía esporas refringentes que se mantuvieron hasta por 24 h. Esta característica de diferenciación celular durante la confrontación podría explicar la ventaja competitiva de la cepa NRB34 respecto a IPS82. La condición de cultivo de la proporción 1:10 mostró que la cepa NRB34 de *B. thuringiensis* también muere, e indica que los *Bacilli* pueden ser sensibles a las sustancias liberadas por *P. fluorescens*. Aunque, el efecto antagónico se observa claramente cuando la población de antagonistas es mayor respecto a *B. thuringiensis* y cuando el tiempo y las condiciones para que la bacteria no esporule.

Evaluación del efecto del extracto de *P. fluorescens* en el crecimiento de *B. thuringiensis*

En estudios previos se determinó que el efecto antagónico es independiente de la diferencia del tiempo de generación entre *B. thuringiensis* IPS82 y *P. fluorescens*, porque fue de 20 min para ambas bacterias. También, podría ser consecuencia de un proceso mediado por la liberación y acumulación de sustancias tóxicas al medio. Por lo que, se evaluó la presencia de posibles tóxicos liberados al medio de cultivo por *P. fluorescens* y que afectan a *B. thuringiensis*. Para ello, el medio libre de células de *P. fluorescens* fue mezclado con medio nuevo de cultivo TrisG en diversas proporciones y se observó la alteración del desarrollo de *B. thuringiensis* (Cuadro 6). Los resultados indican que el inóculo de 1×10^5 UFC de *B. thuringiensis* IPS82 no sobrevivió en ninguna de las proporciones probadas. Mientras que, cuando se aumentó el inóculo a 1×10^6 UFC y disminuyó la cantidad de medio libre de células respecto al medio TrisG nuevo en las mezclas se observó desarrollo de *B. thuringiensis* IPS82. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que *P. fluorescens* libera tóxicos que

diffusible yellowish-green substances produced by 1×10^5 CFU of antagonistic bacteria per plate during 12 h at 28 °C. However, resistance did not persist when the number of antagonistic bacteria inoculated on sweet cellophane increased to 1×10^7 CFU, with the exception of the strain NRB34. Under this condition, an accumulation of more greenish colored products of *P. fluorescens* was observed. The produced substances that diffuse through the cellophane can be assessed in culture media free of *P. fluorescens* cells or extracts enriched with toxic substances, as shown below.

Analysis of *B. thuringiensis* and *P. fluorescens* mixed culture in liquid medium

To examine the quantitative aspect of the antagonistic interaction in liquid culture of *B. thuringiensis* with another microorganism, *P. fluorescens* was chosen since its phenotype is resistant to chloramphenicol, contrasting with *B. thuringiensis*. For this test, the *B. thuringiensis* strains IPS82 and NRB34 were analyzed. The latter was selected because the qualitative antagonism of *P. fluorescens* was less than the rest of the *Bacillus* group studied. The assessment in liquid medium was carried out under intermediate conditions of antagonism, TrisG medium and 1:1 bacterial proportion. Although the analysis in solid medium showed that the proportion 1:10 was of marked antagonism, this proportion was used to compare the viability of *B. thuringiensis*.

Growth kinetics in the 1:1 mixture showed a trend in which *B. thuringiensis* IPS82 grew for 4 h, but ceased to grow when it lost viability at 7 h (Figure 3). Cell development of the *P. fluorescens* strain was observed, and its viability persisted up to the seventh hour, although it was observed that at seven hours the stationary phase of growth begins in the TrisG medium. The period in which viability of *B. thuringiensis* is affected coincides with the stationary growth phase of *P. fluorescens*, which is associated with the production of secondary metabolites. Among these are those classified as antibiotic and the bacteriocin type (Nielsen *et al.*, 1998; Parret and De Mot, 2002; Riley and Wertz, 2002; Rojas *et al.*, 2005). The cell population proportion with the strain NRB34 in liquid medium remained at 1:1 in the qualitative trial in plates of TrisG, even after 11 h of contact with *P. fluorescens*. Observation of

Cuadro 6. Efecto del extracto de *P. fluorescens* sobre el crecimiento de *B. thuringiensis* IPS82.**Table 6. Effect of *P. fluorescens* extract on growth of *B. thuringiensis* IPS82.**

Proporción De Extracto †	<i>B. thuringiensis</i> IPS82 inóculo de 1×10^5 UFC	<i>B. thuringiensis</i> IPS82 inóculo de 1×10^6 UFC
Solo extracto 100%	¶	¶
3:1	¶	¶
1:1	¶	§
1:3	¶	§

† Las proporciones fueron mezclas de medio de cultivo libre de *P. fluorescens* con medio TrisG nuevo; ¶ Muerte como ausencia de turbidez en el matraz a las 24 horas; § Crecimiento celular como turbidez en el matraz 24 horas. ¶ † Proportions were mixtures of *P. fluorescens*-free culture medium and new unused TrisG; ¶ Death as absence of turbidity in the flask after 24 h; § Cell growth as turbidity in the flask 24 h.

se acumulan en el medio de cultivo y causan la muerte de *B. thuringiensis*.

También se analizó el efecto del extracto libre de células de *P. fluorescens* sobre otras cepas de *B. thuringiensis* de la colección con el objetivo de conocer la sensibilidad de *B. thuringiensis* IPS82 a los tóxicos del extracto. Los resultados de viabilidad indicaron susceptibilidad alta de los *Bacilli* probados en este ensayo, pues su población se disminuyó de 1 a 3 órdenes de magnitud en un lapso de 8 h (Figura 4). Con base en estos resultados se puede deducir que como consecuencia de la liberación y acumulación de sustancias tóxicas las células vegetativas de *B. thuringiensis* pueden desaparecer, incluso en ausencia temporal de bacterias antagonicas

the mixed cultures of the IPS82 strain under a phase contrast microscope revealed cell destruction after 11 h, while the NRB34 strain contained refringent spores that persisted up to 24 h. This characteristic of cell differentiation during confrontation could explain the competitive advantage of the strain NRB34 over IPS82. The 1:10 bacterial proportion of the culture revealed that the *B. thuringiensis* strain NRB34 also dies and that *Bacilli* may be sensitive to the substances released by *P. fluorescens*. Although the antagonistic effect is observed clearly when the population of antagonists is larger than that of *B. thuringiensis* and when the time and conditions do not favor sporulation.

Evaluation of the effect of the *P. fluorescens* extract on *B. thuringiensis* growth

Previous studies determined that the antagonistic effect is independent of the generation time difference between *B. thuringiensis* IPS82 and *P. fluorescens* since it was 20 min for both bacteria. It could also be a consequence of a process mediated by the release and accumulation of toxic substances in the medium. For this reason, the possible presence of toxic substances in the medium released by *P. fluorescens* and affecting *B. thuringiensis* was examined. For this reason, the *P. fluorescens*-free medium was mixed with fresh TrisG culture medium in different proportions, and alterations in *B. thuringiensis* development were observed (Table 6). The results indicate that the inoculum with 1×10^5 CFU of the *B. thuringiensis* strain IPS82 did not survive any of the proportions tested, but when the inoculum increased to 1×10^6 CFU and the amount of cell-free medium decreased with respect to fresh TrisG medium in the mixtures,

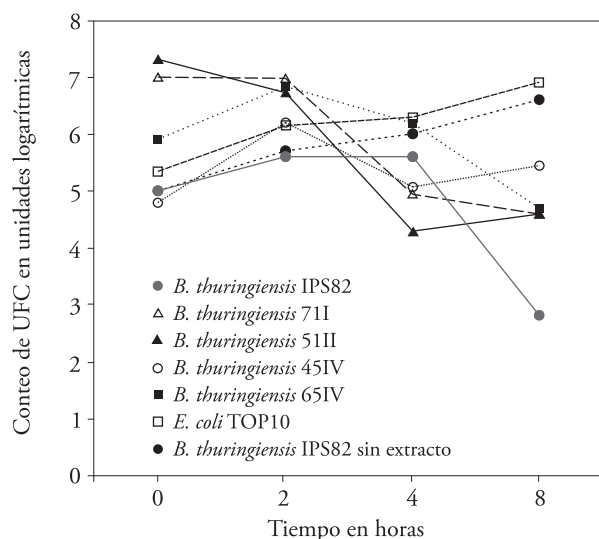


Figura 4. Inhibición de crecimiento de varias cepas de *Bacilli* con extracto de *P. fluorescens*.

Figure 4. Growth inhibition of several *Bacillus* strains by *P. fluorescens* extract.

en el ambiente. Los resultados confirman lo documentado en la literatura, respecto a que metabolitos secundarios involucrados en interacciones antagonistas pueden afectar el crecimiento y actividades de competidores para beneficio de sus productores (Firn y Jones, 2000; Notz *et al.*, 2002; Validov *et al.*, 2005; Karlovsky, 2008).

CONCLUSIONES

En los ensayos de confrontación cualitativa mostraron que 64% de los microorganismos evaluados ejercen efecto antagónico sobre cepas de *B. thuringiensis* empleadas como bioinsecticidas. Las bacterias de suelo que exhibieron claramente este fenómeno fueron: *P. fluorescens*, *K. pneumoniae*, *B. sphaericus* y *S. marcescens*. Se demostró la susceptibilidad de *B. thuringiensis* a la interacción con otros microorganismos metabólicamente activos del suelo. Se propone que el antagonismo ejercido por *P. fluorescens* sobre varias cepas de *B. thuringiensis* y otros *Bacilli in vitro* se debe a la secreción de algún compuesto tóxico del tipo de los antibióticos y su producción es favorecida por temperaturas cercanas a 28 °C, pero disminuida por las cercanas a 37 °C. En cuanto a las condiciones nutricionales de los medios de cultivo también hay afectación antagónica, quizás por la relación entre el tipo de nutrientes y el balance carbono-nitrógeno disponible para las bacterias que cohabitan un espacio temporal. Respecto a las condiciones ambientales, parece que *B. thuringiensis* en el suelo tiende a desarrollarse poco, o más bien sólo sobrevive a las condiciones adversas. Esto lo logra cuando alcanza a esporular y su contacto es bajo con altas poblaciones de bacterias antagónicas o sus metabolitos secundarios.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca de Doctorado en Ciencias Ambientales con número de registro 143058 y los recursos otorgados para la realización del proyecto SEP-2004-C01-47120.

LITERATURA CITADA

- Aguilar H., L., y J. Ibarra. 1995. Selección de cepas mexicanas de *Bacillus sphaericus* con actividad larvicida contra mosquitos vectores (Diptera: Culicidae). *Vedalia* 3: 3-9.
- Budde, I. P., and M. S. Ullrich. 2000. Interactions of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* with host and nonhost plants in relation

B. thuringiensis IPS82 did develop. These results coincide with the hypothesis that *P. fluorescens* releases toxic substances that accumulate in the culture medium and causes death of *B. thuringiensis*.

The effect of the extract free of *P. fluorescens* cells on other *B. thuringiensis* strains of the collection were also analyzed to determine *B. thuringiensis* IPS82 sensitivity to the toxic substances found in the extract. The results of viability tests indicated that the *Bacilli* tested in this trial are highly susceptible; population decreased 1 to 3 orders of magnitude in a lapse of 8 h (Figure 4). Based on these results, it can be deduced that, as a consequence of the release and accumulation of toxic substances, the vegetative cells of *B. thuringiensis* might disappear, even during temporary absence of the antagonistic bacteria in the environment. The results confirm what has been reported in the literature regarding secondary metabolites involved in antagonistic interactions, which can affect growth and the activities of competitors and benefit the producers (Firn and Jones, 2000; Notz *et al.*, 2002; Validov *et al.*, 2005; Karlovsky, 2008).

CONCLUSIONS

The qualitative confrontation trials showed that 64 % of the microorganisms evaluated exert an antagonistic effect on strains of *B. thuringiensis* used as bioinsecticides. The soil bacteria that clearly exhibited this phenomenon were *P. fluorescens*, *K. pneumoniae*, *B. sphaericus* and *S. marcescens*. It was demonstrated that *B. thuringiensis* is susceptible to interaction with other microorganisms that are metabolically active in the soil. It is proposed that the antagonism exerted by *P. fluorescens* against several strains of *B. thuringiensis* and other *Bacilli in vitro* is due to the secretion of an antibiotic-type toxic compound whose production is favored by temperatures close to 28 °C but decreases at temperatures close to 37 °C. In terms of the nutritional conditions of the culture media, there was also an antagonistic effect, which may be due to the relationship between the type of nutrients and the carbon-nitrogen balance available to the bacteria that co-inhabit the same temporal space. Regarding environmental conditions, it seems that *B. thuringiensis* in the soil tends to develop little, or rather it just survives, in adverse conditions when it achieves sporulation and has little contact with

- to temperature and phytotoxin synthesis. *Mol. Plant Microbe Interaction* 13: 951-961.
- Cafferkey, M. T., K. McClean and M. E. Drumm. 1989. Production of bacteriocin-like antagonism by clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 677-680.
- Crickmore, N., R. D. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and H. D. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.
- De Maagd, R. A., A. Bravo, and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17: 193-199.
- Duffy, B. K., and G. Défago. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2429-2438.
- Dulmage, H. T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. alesti. *J. Invertebr. Path.* 15: 232-39.
- Firn, R. D., and C. G. Jones. 2000. The evolution of secondary metabolism — a unifying model. *Mol. Microbiol.* 37: 989-994.
- Karlovsky, P. 2008. Secondary metabolites in soil ecology. *In: Karlovsky, P. (ed). Soil biology secondary metabolites in soil ecology.* Springer-Verlag-Heidelberg. pp: 1-17.
- Kurstak, E. 1962. Données sur l'épizootie bactérienne naturelle provoquée par un *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis* sur *Ephesia kubniella* Zeller. *Entomophaga Mem. Hors Ser.* 2: 245-247.
- Martin, W., and A. Phillis. 1994. An iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. *American Entomologist.* pp: 85-90.
- Meadows, M. P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. *In: Enwiwistle, P. F., J. S. Cory, M. J. Bailey, and S. Higgs (eds). Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory and Practice.* Wiley, New York, N.Y. pp: 193-220.
- Nielsen, M. N., J. Sorensen, J. Fels, and H. C. Pedersen. 1998. Secondary metabolite and endochitinase dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563-3569.
- large populations of antagonistic bacteria or their secondary metabolites.

—End of the English version—



- Notz, R., M. Maurhofer, H. Dubach, and G. Défago. 2002. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHAO *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2229-2235.
- Parret, A. H., and R. De Mot. 2002. Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other c-proteobacteria. *Trends Microbiol.* 10: 107-112.
- Petras, F. S., and E. L. Casida. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1496-1501.
- Riley, M. A., and J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Ann. Rev. Microbiol.* 56: 117-137.
- Rojas R., N. E., E. Sansinenea R., R. Marsch M., P. Sánchez A., y C. Vázquez C. 2005. Compuestos tóxicos de *Pseudomonas fluorescens* y su papel como agente de control biológico contra microorganismos de suelo. *In: Aragón, G. A., J. F. López O., y A. M. Tapia R. (eds). Manejo agroecológico de sistemas.* Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp: 175-187.
- Sibide, M., S. Messier, S. Larivière, M. Gottschalk, and K. R. Mittal. 1993. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Can. J. Vet. Res.* 57: 204-208.
- Validov, S., O. Mavrodi, L. De La Fuente, A. Boronin, D. Weller, L. Thomashow, and D. Mavrodi. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 242: 249-256.
- West, A. W., H. D. Burges, T. J. Dixon, and C. H. Wyborn. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biol. Bioch.* 17: 657-665.