

**BIOCONTROL DE *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* CON
MICROENCAPSULADOS DE *Bacillus subtilis* Y SU EFECTO EN EL
CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO DE TOMATE
(*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

MARCELA HERNÁNDEZ SUÁREZ

T E S I S

**Presentada Como Requisito Parcial para
Obtener el Grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**



**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
PROGRAMA DE GRADUADOS**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2008

**BIOCONTROL DE *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* CON
MICROENCAPSULADOS DE *Bacillus subtilis* Y SU EFECTO EN EL
CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO DE TOMATE
(*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

MARCELA HERNÁNDEZ SUÁREZ

T E S I S

**Presentada Como Requisito Parcial para
Obtener el Grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
PROGRAMA DE GRADUADOS**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2008

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIRECCIÓN DE POSTGRADO

**BIOCONTROL DE *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* CON
MICROENCAPSULADOS DE *Bacillus subtilis* Y SU EFECTO EN EL CRECIMIENTO
Y RENDIMIENTO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

TESIS

POR

MARCELA HERNÁNDEZ SUÁREZ

**Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como
requisito parcial para optar al grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor:

Dr. Gabriel Gallegos Morales

Asesor:

Dr. Ricardo Hugo Lira Saldívar

**Dr. Jerónimo Landeros Flores
Director de Postgrado**

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Diciembre de 2008

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Por darme la oportunidad de formarme en el área de Parasitología Agrícola y a todo el personal que en ésta labora. Especialmente a T.A. Cristina Sánchez Flores por la asesoría y el apoyo técnico en el laboratorio.

AL CONACYT

Por el apoyo económico para la realización del postgrado

AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA (CIQA)

Por proporcionarme las facilidades en el uso de las instalaciones y el equipo para la elaboración de mi proyecto de investigación y al personal que en éste laboran principalmente a M.C. Gabriela Padrón, Dr. Antonio Ledezma por la asesoría y apoyo técnico en el área de microbiología. QFB. Miriam Lozano y QFB. Josefina Zamora por el apoyo en el área de microscopía. Al departamento de Agropásticos al Ing. Felipe Hernández e Ing. Eduardo Treviño por la asesoría en el trabajo de campo.

A FOMIX CAMPECHE

Por el apoyo financiero para el comienzo de mi proyecto.

A GREENCORP BIORGANIKS DE MÉXICO

Por el apoyo con el material biológico y financiamiento para la realización de esta investigación.

AL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE (CIBNOR)

Al Dr. Yoav Bashan, por la asesoría y apoyo en el proyecto, especialmente a M.C. Juan Pablo Hernández Sánchez.

A MIS PROFESORES

Por guiarme con sus conocimientos en mi formación y en particular a mis asesores por el apoyo y la confianza que siempre me mostraron.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Bertha, Isabel, Leonel, Hugo, Víctor, Miguel Ángel, Cesar, Rebeca, Claudio, Paulina, Claudia, Irma, Juanita, Desireé, Olivia y a Guillermo Molina. Gracias por estar conmigo.

DEDICADA

A:

LUISH ERMAN

Mi esposo e hijo, porque son el motivo de mi superación

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
El Cultivo de Tomate y su Importancia	4
Clasificación y Descripción Botánica	5
Daños Causados por Enfermedades	5
Daños Causados por <i>Rhizoctonia</i>	6
Daños Causados por <i>Fusarium</i>	6
Biocontrol con Agentes Antagónicos	6
Factores que Afectan a las Bacterias Benéficas del Suelo	7
Condiciones de Estrés que Afectan las Comunidades Microbianas del Suelo	8
Efecto de Prácticas Agrícolas y Disturbios Ecológicos en las Rizobacterias.....	9
Características de las Plantas que Afectan la Asociación Bacteria-Raíz.....	10
Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (RPCP)	11
Mecanismos de Acción de las RPCP	13
Mecanismos Directos	14
Mecanismos Indirectos	14

Rizobacterias Promotoras de la Germinación de Semillas y del Crecimiento de Plantas.....	15
Influencia de las Rizobacterias en la Germinación de Semillas y el Crecimiento de las Plantas	16
Las Rizobacterias como Antagonistas de Fitopatógenos	17
Control Biológico con Rizobacterias	19
Ventajas y Desventajas del Control Biológico.....	21
<i>Bacillus subtilis</i> como Agente de Control Biológico.....	22
Mecanismos de Acción del Control Biológico	23
Competencia	23
Parasitismo	24
Antibiosis	24
Microencapsulación	25
 ARTÍCULO: Biocontrol de <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> con Microencapsulados de <i>Bacillus subtilis</i> y su Efecto en Crecimiento y Rendimiento de Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	27
LITERATURA CITADA	57

COMPENDIO**BIOCONTROL DE *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. CON MICROENCAPSULADOS DE *Bacillus subtilis* Y SU EFECTO EN EL CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.)****Por****MARCELA HERNÁNDEZ SUÁREZ****MAESTRÍA****PARASITOLOGÍA AGRICOLA****UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO****BUENAVISTA, SALTILLO COAHUILA. DICIEMBRE 2008.****Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo – Asesor-**

Palabras clave: Control biológico; Bioplaguicidas; Biofertilizantes; Solanáceas.

Las rizobacterias del género *Bacillus* tienen la propiedad de promover el crecimiento de plantas, ser antagonistas de fitopatógenos y que pueden ser microencapsuladas dentro de una matriz biopolimérica. Nuestros objetivos fueron: adaptar un equipo y evaluar una técnica para elaborar microcápsulas de alginato de sodio en las que se incorporaron rizobacterias de *Bacillus subtilis*;

analizar el biocontrol contra hongos fitopatógenos del suelo y determinar la promoción del crecimiento de plantas de tomate en invernadero. Se utilizaron cepas de *B. subtilis* identificadas como B1, J1, M2 y la mezcla de ellas; las microcápsulas conteniendo las cepas bacterianas fueron adheridas a semillas de tomate cv. Floradade. Una vez que se tuvieron las plántulas se realizó otra aplicación de microcápsulas con *B. subtilis* a las macetas que previamente fueron inoculadas con propágulos y esporas de los hongos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sp.* respectivamente. Las variables analizadas fueron: incidencia y severidad de la enfermedad; crecimiento de plantas; peso seco aéreo y radicular; área foliar y rendimiento de frutos. Los resultados mostraron que el aparato construido y adaptado para elaborar microcápsulas fue eficaz para su producción; las cepas de *B. subtilis* mostraron su biocontrol ya que redujeron la incidencia y severidad de la enfermedad al inhibir significativamente la actividad infectiva de los fitopatógenos; además las microcápsulas con *B. subtilis* estimularon el crecimiento de plantas y rendimiento de frutos. Se concluye que las microcápsulas conteniendo cepas bacterianas pueden ser un eficaz agente de biocontrol contra patógenos del suelo y tener actividad biofertilizadora, ya que estimularon notablemente el crecimiento y rendimiento de plantas de tomate en comparación con los tratamientos testigo. Se sugiere que estos resultados sean validados en campo para corroborar la efectividad mostrada en este trabajo.

ABSTRACT

Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. with Microcapsules Containing *Bacillus subtilis* and its Effect on Growth and Yield of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

BY

MARCELA HERNÁNDEZ SUÁREZ

MASTER OF SCIENCE

AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DECEMBER 2008.

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo – Adviser –

Key words: Biological control, Biopesticides, Biofertilizers, Solanaceae.

The rizobacter belonging to *Bacillus* genus has the property of promoting plant growth; to be antagonists of plant pathogens, and can be microencapsulated inside a biopolymeric matrix. Therefore, the objectives of this work were: to adapt an equipment and to evaluate a technique for microcapsules elaboration into a sodium alginate matrix in order to incorporate

rizobacter of *Bacillus subtilis*; to analyze the biocontrol by determining its antagonistic effect against pathogenic soil fungi; in addition, it was studied the effect of plant growth promotion on tomato plants. In this study *B. subtilis* strains identified as B1, J1, M2 and the mixture of them were used; microcapsules containing bacterial strains were attached to tomato seeds cv. Floradade. When seedlings were produced, a second application of microcapsules containing *B. subtilis* was made to the pots, which previously were inoculated with propagules and spores of the fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. Respectively. In this work the analyzed variables were: incidence and disease severity, plant growth, aerial and root dry weight, foliar area and fruit yield. Results obtained showed that the apparatus built and adapted to elaborate microcapsules with bacterial strains was capable to produce them; *B. subtilis* strains indicated an obvious biocontrol since incidence and disease severity was reduced, and because clearly inhibited the infective activity of inoculated plant pathogens, also microcapsules with bacterial strains stimulated plant growth and fruit yield. Based on these results it is concluded that microcapsules containing *B. subtilis* strains could be an efficient biocontrol agent against soil plant pathogens and could have a biofertilizer effect, since they noticeably stimulated growth and yield of tomato plants compared to control plants. It is suggested that these should be validated in a field crop to corroborate the effectiveness shown in this work.

INTRODUCCIÓN

Una alternativa para disminuir la contaminación ocasionada por el uso de agroquímicos sintéticos en el manejo de fitopatógenos, es la utilización de microorganismos antagonistas del género *Bacillus* que son considerados los más eficaces por sus propiedades de inhibición de fitopatógenos de raíces, así como por su capacidad para estimular la promoción del crecimiento de las plantas, induciendo así mayor rendimiento a corto plazo. Dada la gran diversidad y las potencialidades tanto en el suelo como en la rizósfera, se considera a este microorganismo como un colonizador eficaz. Por tal motivo, el uso de rizobacterias para el control biológico provee una herramienta potencial en el control de fitopatógenos (Chen *et al.*, 2000).

Es importante señalar que a nivel mundial la agricultura ecológica, u orgánica es el enfoque principal de la agricultura sustentable; y una de las alternativas de producción de alimentos que se enfoca a la inocuidad del ambiente. Asimismo, otras directrices de la agricultura sustentable son: promover el empleo de tecnologías amigables con el ambiente para desarrollar agroecosistemas sociales y ecológicamente sustentables, lo que significa diversificar y estabilizar los ingresos rurales; aumentar la biodiversidad y la sustentabilidad del entorno agrícola (Lira-Saldívar *et al.*, 2007).

El cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) es uno de los cultivos hortícolas con mayor área cultivada y producción global. México ocupó el noveno puesto en la producción con 2.1 millones de toneladas (mt), siendo China el mayor productor con 31.6 y Estados Unidos el segundo con 12.7 (mt). En cuanto a la exportación de tomate fresco, España, los Países Bajos y México se disputan las tres primeras posiciones con cifras que rondan mil millones de dólares (FAO, 2007).

Entre las enfermedades fungosas mas importantes por el daño causado a esta hortaliza destacan las ocasionadas por *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, ya que pueden disminuir hasta mas del 50% de rendimiento en el campo; debido a la pudrición radical severa y lesiones necróticas extensivas en el tallo, lo que finalmente ocasiona la muerte de la planta. El control de la enfermedad se ha intentado mediante diferentes estrategias (Hernández *et al.*, 2005).

Durante la década pasada se ha impulsado en la agricultura el uso de polímeros naturales como agentes inoculantes de bacterias promotoras de crecimiento. La microencapsulación con biopolímeros protege a los microorganismos de diferentes factores ambientales como el estrés y permite a la célula continuar con su desarrollo y metabolismo; estos microorganismos son liberados gradualmente cuando el biopolímero es degradado por la humedad y el pH del suelo. El alginato producido por *Macrocystis pyrifera* es el más comúnmente usado para la encapsulación de células por su gran estabilidad. Pueden ser almacenados a temperatura ambiente por periodos prolongados, manipularse fácilmente (Yabur, *et al.*, 2006).

Por lo antes mencionado, la microencapsulación de microorganismos ha demostrado su efectividad en el control de fitopatógenos de algunos cultivos; representan una alternativa viable para ser evaluados como control biológico para reducir la utilización de productos químicos y disminuir la incidencia y severidad de las enfermedades. Debido a lo anterior en esta investigación se planteó la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Los microencapsulados conteniendo *Bacillus subtilis* puedan representar una opción para el control biológico de enfermedades del suelo, así como servir de agentes orgánicos promotores del crecimiento en plantas de tomate

OBJETIVO GENERAL

Obtención de microencapsulados conteniendo *Bacillus subtilis* para analizar su efectividad biológica contra los hongos de suelo *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* y su posible acción promotora del crecimiento y desarrollo en plantas de tomate.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Adaptar una metodología para preparar microcápsulas de *B. subtilis* en una matriz de alginato.
- Determinar *in vivo* la acción biocontroladora de los microencapsulados contra *R. solani* y *F. oxysporum*.
- Evaluar el efecto de los microencapsulados bajo condiciones de invernadero en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate.

REVISIÓN DE LITERATURA

El Cultivo de Tomate y su Importancia

El cultivo del tomate en México tiene una trascendencia social muy importante, puesto que una parte considerable de la población económicamente activa se encuentra relacionada directa o indirectamente con este cultivo. Es una fuente de empleo para un gran número de familias; se estima que para la producción de 75,000 hectáreas de tomate se emplean a 172 mil trabajadores de campo. Además trae consigo una fuerte fluctuación migratoria de personas originarias de estados como Oaxaca, Zacatecas, Guanajuato, Guerrero y Veracruz, aportando una proporción considerable de trabajadores agrícolas a las principales regiones de cultivo del tomate (Alarcón,1993). El tomate es la hortaliza más importante en numerosos países y su popularidad aumenta constantemente, en la actualidad este cultivo ha adquirido importancia económica en todo el mundo (Nuez, 2001).

La exportación de tomate representa para nuestro país una importante fuente de divisas, al ser ubicado como el tercer país exportador de tomate en el mundo; en el periodo 1997/2001 la superficie promedio anual sembrada de tomate en México fue de 79,984 hectáreas anuales. En el mismo periodo, la superficie cosechada fluctuó alrededor de las 76,140 hectáreas anuales, en promedio, la producción de tomate registrada fue de 2'140,119 toneladas por año. Este cultivo representa el 41% del total de las exportaciones agrícolas, generando una fuente importante de empleos y generación de divisas por un monto de 462.6 millones de dólares en el año 2000 (INEGI, 2002).

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), por la demanda que tiene en el mercado local, nacional e internacional, es una de las hortalizas más rentables porque se usa en todas las cocinas del mundo. Sin embargo, su producción en campo abierto se hace cada vez más difícil, debido a condiciones ambientales adversas y a la incidencia de plagas y enfermedades que afectan la productividad de este cultivo (Dos Santos, 2005).

Clasificación y Descripción Botánica del Tomate

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las Solanáceas. Los miembros de esta familia presentan haces bicolaterales y sus flores son radiales con cinco estambres. El ovario, supero, bicarpelar, contiene numerosos primordios seminales, produciendo bayas polispermas. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor (Nuez, 2001).

Según el hábito de crecimiento, se pueden distinguir dos tipos distintos: los determinados y los indeterminados. La planta de crecimiento determinado es de tipo arbustivo, de porte bajo, pequeño y de producción precoz. Se caracteriza por la formación de las inflorescencias en el extremo del ápice. El tomate de tipo indeterminado crece hasta alturas de 2 metros o más, según el empalado o tutoreo que se utilice. El crecimiento vegetativo es continuo, aproximadamente en seis semanas después de la siembra inicia su comportamiento generativo, produciendo flores en forma continua y de acuerdo a la velocidad de su desarrollo. La inflorescencia es lateral. Este tipo de tomate tiene tallos axilares de gran desarrollo. Para la producción mecanizada se prefieren las variedades de tipo determinado, que son bajos o arbustivos. Los procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo de la planta de tomate dependen de las condiciones del clima, del suelo y de las características genéticas de la variedad (Estrada *et al.*, 2006).

Daños Causados por Enfermedades

Uno de los problemas que más afecta la producción de tomate en México es el control de plagas y enfermedades, no solo por aumentar los costos del cultivo sino también por la resistencia a los productos químicos por parte de las plagas cuando estas son controladas aceptablemente (Alarcón y Bolkan, 1994). A esto se debe agregar el mal manejo de agroquímicos y fertilizantes que han provocado una ecotoxicidad general del medio ambiente (Alvarado 1991).

Daños causado por *Rhizoctonia*

Este hongo es parte del complejo de fitopatógenos que provocan el Damping off, o ahogamiento de plántulas como consecuencia del estrangulamiento y necrosis del tallo a nivel de cuello en plantas recién emergidas. En plantas adultas los síntomas se caracterizan por presentar manchas secas bien delimitadas en raíces y lesiones hundidas (Santander *et al.*, 2003).

Daños Causado por *Fusarium*.

Dentro de las enfermedades más serias que afectan al cultivo del tomate en el estado de plántula se encuentra, *Fusarium oxysporum*; los síntomas comunes que presentan las plantas afectadas por este hongo son el aclaramiento de las venas en hojas jóvenes y subsecuentemente epinastía en hojas senescentes con el decaimiento simultaneo de los pecíolos. Las plántulas mueren al surgir los primeros síntomas. En plantas senescentes se observa aclaramiento de las venas, amarillamiento en las hojas de la parte basal de la planta, formación ocasional de raíces adventicias, marchitez de hojas y brotes jóvenes, defoliación, necrosis marginal en hojas, y finalmente la muerte de la planta (Agrios, 1998).

Biocontrol con Agentes Antagónicos.

La utilización excesiva de los fertilizantes sintéticos resulta en mayores costos de producción y en la contaminación de suelos y aguas; también ha ocasionado un proceso de deterioro de los escasos recursos y una creciente dificultad para renovarlos. En las dos últimas décadas, una de las áreas de estudio que actualmente están impactando en la agricultura, es la aplicación de biofertilizantes a través del empleo de microorganismos como bacterias y

hongos que viven en simbiosis con las plantas, lo cual ha resultado muy positivo para fertilizar de manera orgánica diversos cultivos. Algunos microorganismos con efecto benéfico en las plantas pueden tener un gran potencial como agentes biocontroladores y biofertilizantes (Rueda *et al.*, 2007); dentro de este grupo de microorganismos se distinguen tres grandes grupos:

- Hongos micorrízicos.
- Microorganismos fijadores de nitrógeno.
- Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (RPCP).

Factores que Afectan a las Bacterias Benéficas del Suelo

Las bacterias son diversos microorganismos procariotas que poseen diferente morfología y fisiología; pueden ser según su forma: esféricas (Cocos), bacilares (Bacilos) o retorcidas en hélice (Vibriones y Espirilos). Algunas poseen flagelos o cilios que les permite moverse, otras son fotosintéticas, como las Cianobacterias, que obtienen energía de la luz solar y carbono del dióxido de carbono. Otras bacterias obtienen energía del metabolismo de compuestos inorgánicos como el amonio y el sulfuro.

Se conoce un gran número de bacterias de vida libre o asociativa que fijan N_2 , pero solo algunas destacan por su potencial como biofertilizantes o promotoras de crecimiento. Entre los géneros más conocidos dentro del grupo de aerobias están *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia* y *Azospirillum*; en las aerobias facultativas se presentan *Enterobacter*, *Pseudomonas*, y *Bacillus* y los géneros de bacteria anaerobia *Metanobacterium*, *Clostridium* y *Desulfovibrio* (Ferrera-Cerrato, 1995 y Rodríguez, 1995).

La propuesta de la biotecnología ecológica es ofrecer alternativas al control químico de las enfermedades de las plantas, como los pesticidas o fertilizantes químicos (Dobbelaere *et al.*, 2003). Entre estas opciones

ecológicas, esta el desarrollo de inoculaciones de rizobacterias promotoras del crecimiento en la planta para incrementar su uso globalmente. Por ejemplo, actualmente hay cerca de 25 millones de ha de soya inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* en Sudamérica y cerca de 500,000 ha de trigo y maíz inoculados en Argentina y México con productos comerciales de *Azospirillum* (Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2007).

Condiciones de Estrés que Afectan las Comunidades Microbianas del Suelo

Los efectos en la producción fácilmente se observan cuando se presenta una alteración prolongada del medio. Factores externos o intrínsecos aplicados a los suelos pueden ser severos, como cuando el suelo se vuelve a contaminar con metales pesados o con hidrocarburos aromáticos volátiles que disminuyen tanto la biomasa como la variedad de las comunidades bacterianas (Yao *et al.*, 2006). Tales presiones pueden impactar en la calidad y la productividad del suelo y disminuir la estabilidad cuando se hace frente a un medio ambiente fluctuante (Girvan *et al.*, 2005).

Otro estrés severo como la deshidratación, la salinidad y los cambios en la temperatura, afectan la estructura de la población microbiana. La exposición a cambios con condiciones severas durante una estación seca o cambios de clima extremos alternan la actividad microbiana en el suelo, desde una disminución en el área foliar de *Tamarix aphylla* en un desierto, hasta una cubierta foliar baja de roble en un ecosistema Mediterráneo (Shamir y Steinberger, 2007). Otro ejemplo de cambios drásticos es cuando se presenta un aumento del 70 % en la concentración del CO₂ atmosférico, lo cual conduce a un cambio en la composición de la comunidad bacteriana de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, que afecta la competitividad de la cepas en ecosistemas de pastos (Montealegre *et al.*, 2000). Estos ejemplos pueden ser vistos cuando el estrés ambiental es extremo aunque no se sabe aun si

conduce a alteraciones transitorias o permanentes en la estructura de la comunidad (Smalla *et al.*, 2001).

Efecto de Prácticas Agrícolas y Disturbios Ecológicos en las Rizobacterias

Las prácticas agrícolas pueden no parecer severas, pero si conducen a graves alteraciones en los parámetros del suelo que afectan la rizósfera. Los cambios físicos en la estructura del suelo después de la labranza (Lupwayi *et al.*, 1998), la rotación de cultivos (Alvey *et al.*, 2003) y el riego con aguas residuales (Oved *et al.*, 2001) han mostrado un efecto muy significativo sobre el suelo y la asociación raíz-bacteria, por lo tanto, la rotación de cultivo incrementa la diversidad bacteriana en la rizósfera. No obstante, pastizales perennes sostienen más diversidad de las bacterias del suelo que la rotación de los cereales y la papa (van Elsas *et al.*, 2002).

La labranza reduce la diversidad bacteriana, pero esta reducción puede ser más alta en la mayor parte del suelo que en la rizósfera (Lupwayi *et al.*, 1998). Una respuesta similar es detectada cuando se aplican compostas al suelo (Inbar *et al.*, 2005). Algunos estudios han reportado que el tipo del suelo puede afectar la estructura asociativa de la comunidad microbiana con la raíz (Dalmastri *et al.*, 1999), esto fue señalado cuando se experimentó con tres especies de plantas, las que presentaron diferentes comunidades rizosféricas cuando se cultivaron en suelos con altos contenidos de arena y limo, pero estas diferencias se redujeron en dos de las tres especies cuando se cultivaron en un suelo arcilloso pesado (Marschner *et al.*, 2004). Tales efectos deberían por lo tanto ser considerados y no descuidarse cuando las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas son aplicadas al suelo (RPCP).

Características de las Plantas que Afectan la Asociación Bacteria-Raíz

Entre los factores de la planta que tienen mayor influencia sobre las comunidades microbianas se incluyen: la edad fenológica de la misma (Herschkovitz *et al.*, 2005), la especie vegetal o el genotipo (Dalmastri *et al.*, 1999) y los exudados de las raíces (Castro-Sowinski *et al.*, 2002). Lo antes señalado se puede observar entre las poblaciones asociadas con la raíz, ya que algunas plantas pueden ser más sensibles al cambio de los exudados producidos durante el crecimiento de la planta (Herschkovitz *et al.*, 2005).

Los procesos biológicos en la rizósfera son fuertemente influenciados por los exudados de las raíces de las plantas, los cuales consisten básicamente de compuestos de carbón orgánico fácilmente degradables que atraen y simulan crecimiento microbiano. La rizósfera se define como aquella porción de suelo que está fuertemente influenciada por las raíces de las plantas, la cual a su vez se divide en tres partes: (1) Rizoplano (microorganismos adheridos a la raíz), (2) endorizósfera (microorganismos dentro de la raíz) y (3) ectorizósfera (microorganismos que actúan de manera circundante a la raíz). Dicha asociación se inicia como respuesta al llamado “efecto rizosférico”, el cual sucede a través de un intercambio de señales que se disparan a partir de la interacción microbio-planta, con resultados claramente benéficos para los dos (Lynch, 1990).

Los aspectos más sobresalientes de los efectos en la rizósfera son los cuantitativos, como el tamaño de la población microbiana y el incremento de las actividades cerca de la zona rizosférica (Curl y Truelove, 1986). Una observación detallada de los componentes del espacio en la raíz revelan que la distribución de las poblaciones microbianas pueden ser afectados por su localización en el sistema radicular (Marschner *et al.*, 2004). Sin embargo, es difícil distinguir quien produce o quien altera los exudados radiculares en la asociación microorganismo-raíz. Por ejemplo, los flavonoides, tienen un papel destacado en las interacciones rizobia-leguminosa, ya que se ha reportado que

pueden contribuir como formadores de la estructura de la comunidad microbiana en la rizósfera (Shaw *et al.*, 2006).

Rizobacterias Promotoras de Crecimiento (RPCP).

El concepto de las rizobacterias promotoras de crecimiento (RPCP) o PGPR (*Promoting Growth Plant Rhizobacteria*) fue definido por Kloepper (1989) como las bacterias habitantes de la raíz que estimulan significativamente la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas e incrementan la tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades.

Las RPCP son bacterias exógenas introducidas en los agroecosistemas que actúan positivamente en la germinación de semillas y en el desarrollo de la planta. Para lograr una adecuada utilización del potencial de estos microbios se debe comprender en detalle las interacciones mutualistas entre inoculantes y los microorganismos requeridos residentes en la rizósfera. Los mecanismos usados por las RPCP pueden ser directos o indirectos; lo anterior conlleva a la secreción de biocompuestos reguladores de crecimiento, y lo último que ocurre durante la producción de estos compuestos antimicrobianos es la reducción de los efectos letales de los fitopatógenos que atacan a las plantas. Los diferentes modos de acción pueden conducir a relaciones heterogéneas entre un inoculante y las comunidades microbianas de la raíz. Las rizobacterias también son afectadas por factores endógenos de la planta, la ingeniería genética, el estrés ambiental y las prácticas agrícolas. Estos factores parece que tienen un efecto más determinante en la estructura de la comunidad de un agente activo exógeno introducido a las RPCP (Dos Santos, 2005).

La mayoría de las RPCP son activadas cuando se aproximan o entran en contacto con la raíz de la planta inoculada, es decir en la rizósfera. La mayoría de las comunidades de rizobacterias son atraídas hacia el suelo y pocas son

originadas de la asociación semilla-microorganismo (Costa *et al.*, 2006). La rizósfera es un complejo habitable para la acción del desarrollo radicular (principalmente a la residencia de los microorganismos) con componentes bióticos y abióticos del suelo, que también responden a estos medios. La introducción de una gran cantidad de bacterias exógenas como inóculo afecta el potencial de los microorganismos nativos, al igual, un inóculo puede ser afectado por estos. Tales interferencias pueden ser incrementadas y disminuir el efecto de las RPCP efectivas, de allí la necesidad de estudiar la ecología microbiana de la rizósfera siguiendo las aplicaciones de RPCP (Dos Santos, 2005).

La mayoría de las investigaciones realizadas en este ámbito se han enfocado a la precisión de los mecanismos involucrados en el control biológico y relativamente poco en el conocimiento relacionado con la promoción directa del crecimiento de las plantas. Esto ha dado pauta para realizar estudios que consideran principalmente la densidad del inóculo, fisiología de la cepa promotora, temperatura, propiedades del suelo, cultivo y genotipo de la planta; el objetivo ha sido entender de manera clara los mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas inducido por cepas de RPCP, con el propósito de aislar y seleccionar nuevas cepas que representen una fuente exitosa de inoculantes biológicos en la agricultura, así como en la elaboración de productos comerciales (Delgadillo *et al.*, 2001).

En años recientes ha emergido cierta controversia, ya que no se sabe hasta que punto se puede considerar una rizobacteria como RPCP, por lo que se han establecido cuatro características que definen a este grupo de bacterias benéficas:

1. Que no requieran de la invasión de tejidos de las plantas, como ocurre en hongos micorrízicos con la formación de arbusculos o nódulos, que es el caso de *Rhizobium*.

2. Que tengan una densidad poblacional elevada en la rizósfera después de su inoculación, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo.
3. Que presenten capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta.
4. Que no produzcan daño en el hombre ni a otros microorganismos.

Es importante señalar que en la actualidad el uso de microorganismos benéficos representa sólo el 1.4% (380 millones de dólares) del mercado global para el control de plagas y enfermedades. La bacteria más usada es *Bacillus thuringiensis*. Una de las causas de su éxito es su facilidad de formularse, a diferencia de los biofungicidas, donde el producto requiere del manejo del microorganismo vivo para obtener el efecto benéfico deseado (Delgadillo *et al.*, 2001).

Mecanismos de Acción de las RPCP.

Los mecanismos de los promotores de germinación de semillas y crecimiento de la planta (PGCP) pueden ser directos o indirectos. Los mecanismos directos de los PGCP conllevan a la secreción de reguladores de crecimiento como fitohormonas que se obtienen de la activación de los metabolitos de la raíz o del abastecimiento de los nutrientes derivados de las raíces (Burdman *et al.*, 2000). Los mecanismos indirectos de los PGCP ocurren cuando disminuyen los RPCP o evitan los efectos deletéreos de los fitopatógenos a través de la producción de compuestos antimicrobiales, compitiendo por hierro y nutrientes en los sitios de colonización, entre otros (Whipps, 2001). Esto no quiere decir que una RPCP pertenezca exclusivamente al primer o segundo grupo. Pueden también ser dotadas de ambas capacidades (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005). Estos modos diferentes de

acción pueden conducir a diferentes relaciones entre un inóculo y las comunidades microbiales en la raíz. Según Dos Santos (2005), los mecanismos del efecto de estas bacterias promotoras de germinación y crecimiento no son bien comprendidos, sin embargo, se ha sugerido un amplio rango de posibilidades que incluyen mecanismos directos e indirectos.

Mecanismos Directos:

Un efecto directo y quizás el más importante es la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas y etileno); otros mecanismos que han sido bien documentados son: solubilización del fósforo, disminución de la concentración de etileno, retención de hierro por sideróforos y fijación de nitrógeno.

Mecanismos Indirectos:

Consiste en un aumento en la movilización de nutrientes solubles, seguido por el mejoramiento de la absorción de plantas, la producción de antibióticos para hongos y bacterias. Los metabolitos pueden funcionar como determinantes antagónicos, que involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de los microorganismos perjudiciales, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas (glucanasas y quitinasas) o inducción de mecanismos de resistencia.

La conjunción de ambos mecanismos de acción, ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas; se ha observado un incremento en la germinación, la emergencia, el vigor y el peso de las plántulas, un desarrollo mayor de los sistemas radiculares y un incremento de hasta el 30% en el rendimiento de los cultivos de interés comercial tales como papa, rábano, tomate, trigo y soya. Dos Santos (2005) señala que para que un microorganismo antagónico se pueda utilizar en el desarrollo comercial de un biofungicida debe cumplir con lo siguiente:

- a) Eliminación efectiva del patógeno antes de que cause un daño económico importante.
- b) Consistencia de los resultados en condiciones de campo.
- c) Adaptación a un sistema de manejo integrado para el control de plagas y enfermedades.
- d) Precio competitivo con otras medidas de combate.
- e) Compatibilidad con otros tratamientos para el control con otras plagas o enfermedades.
- f) Adaptación al uso cotidiano de las prácticas agrícolas.
- g) Inocuidad a otras especies, al hombre y al ambiente.

Rizobacterias Promotoras de la Germinación de Semillas y Crecimiento de las Plantas

Algunas de las RPCP que mayor impacto han tenido en la promoción del crecimiento y que se han venido utilizando como biofertilizantes a nivel mundial son: *Azospirillum brasilense*, *A. amazonense*, *A. chroococcum*, *Bacillus licheniformis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. pumilis*, *B. macerans*, *B. subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *B. graminis*, *Enterobacter agglomerans*, *E. cloacea*, *Kluyvera ascorbata*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aerofaciens*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Serratia marcescens* y *Streptomyces griseoviridis* (Glick, 1995). Dentro de este grupo el género *Bacillus* es de gran interés y ha sido objeto de muchos estudios relacionados con la promoción de la germinación y crecimiento de plantas, debido a las ventajas que éstas ofrecen sobre otros géneros bacterianos.

Ensayos preliminares realizados con este género revelan que la aplicación de cepas de *Bacillus subtilis* a semillas de sorgo y frijol, tienen un efecto positivo y significativo sobre el crecimiento de estas plantas,

principalmente en el desarrollo de la raíz. En cuanto a la variable longitud de raíz se observó que las plantas tratadas con estas cepas incrementaron el 30 % más su longitud que las no tratadas; al igual que con el peso fresco de la planta, se observó un aumento de 411 % más de peso fresco en comparación con el testigo. Todo esto evidencia la capacidad de las RPCP de estimular de manera sustentable la germinación y desarrollo de las plantas, lo cual repercute directamente en el rendimiento del cultivo; los resultados sugieren que esto se debe a un posible sinergismo entre el hospedante y los simbiontes, lo que permitió una mejor absorción de los elementos esenciales como N y P (Chávez-Betancourt, 2005).

El incremento en el desarrollo de la raíz se ha adjudicado a la acción de las sustancias reguladoras de crecimiento como las auxinas y la acción de la enzima ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) como fuente de nitrógeno y que al disminuir el ACC de la raíz, no se produce suficiente etileno para detener el crecimiento de esta (Glick, 1995).

Influencia de las Rizobacterias en la Germinación de Semillas y el Crecimiento de las Plantas

La promoción del crecimiento en las plantas inoculadas con rizobacterias ocurre por varios factores; uno de ellos es por la síntesis de hormonas como giberelinas, citocininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas, lo que incrementa a su vez la capacidad de absorción de agua y nutrientes y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes en condiciones climáticas adversas, como las heladas o las sequías. Otro factor importante por el cual las rizobacterias ayudan a las plantas, es que existen ciertas especies que las hacen nutrirse mejor; un ejemplo son las *Pseudomonas* sp., las cuales, al solubilizar algunos nutrientes poco móviles del suelo como el fósforo, mejoran el ingreso de este macronutriente hacia la planta, lo que se traduce

en una mayor cantidad de biomasa. Otras especies, como *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., aumentan el aporte de nitrógeno, influyendo directamente en el crecimiento, desarrollo y rendimiento de la planta (Allen *et al.*, 2003).

Se tiene evidencia de que algunas especies de *Pseudomonas* incrementan la absorción de nutrimentos, como N, P y K, además de servir para el biocontrol de los hongos fitopatógenos y producir fitohormonas en la rizósfera, lo cual promueve mayor crecimiento de las plantas. En general *P. fluorescens* puede promover el crecimiento de las plantas, vía producción de sideróforos extracelulares que secuestran óxidos férricos para convertirlos en formas disponibles para las raíces, además incrementa el volumen radical (Peter *et al.*, 1987). Los compuestos inorgánicos insolubles de fósforo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ no están totalmente disponibles para las plantas, pero éstos pueden convertirse, por bacterias solubilizadoras de P, en fosfatos di y monobásicos, formas asimilables para las raíces de las plantas. Las principales especies activas en esta conversión pertenecen a los géneros: *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Flavobacterium* (Salih *et al.*, 1989).

Las Rizobacterias como Antagonistas de Fitopatógenos

Rizobacterias como las del género *Pseudomonas* sp., eliminan numerosos fitopatógenos del suelo, tales como bacterias, hongos y nematodos, mismos que pueden llegar a reducir los rendimientos de los cultivos establecidos en tanto en invernadero como en campo. Las rutas de control que estos organismos ejercen son a través de diversos mecanismos de defensa que involucran la producción de compuestos bacterianos como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y antibióticos. Incluso se ha comprobado que las rizobacterias inducen en algunos casos un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos patógenos del suelo al mismo tiempo (Bakker *et al.*, 2002).

Algunos de los compuestos que inducen al biocontrol de las enfermedades se presenta como el hierro al ser un elemento esencial para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos que habitan en el suelo debido a su función en la reacción enzimática de óxido-reducción que utilizan para su crecimiento y desarrollo, por lo que es importante para ellos contar siempre con fuentes constantes de este nutrimento (Castro-Sowinski *et al.*, 2007). Algunas rizobacterias aplican cierta estrategia para tratar de asimilar este elemento cuando se encuentran en el suelo en pequeñas cantidades; producen una sustancia de bajo peso molecular afín al ión hierro, llamado sideróforo, mismo que se encarga de atraparlo, impidiendo que este sea disponible para otros microorganismos que carezcan del sistema de asimilación, lo que asegura que sea el único capaz de utilizarlo, ejerciendo así el control biológico de enfermedades importantes, tales como *Fusarium sp.*, *Pythium sp.*, *Rhizoctonia sp.* y *Phytophthora sp.* (Chávez-Betancourt *et al.*, 2007).

Otro compuesto producido por estos microorganismos es el ácido cianhídrico (HCN), que tiene un papel muy importante en el control biológico de los agentes patógenos del suelo. Sin embargo, estas sustancias, producidas en grandes cantidades pueden alterar considerablemente la actividad fisiológica de la planta y llevarla a su muerte. En los últimos años se ha demostrado que la producción en pequeñas cantidades de HCN por las rizobacterias induce un sistema de resistencia en las plantas que las lleva a producir ciertos metabolitos que las ayudan a tolerar directamente el ataque de algunos patógenos del suelo y de las hojas; esto es lo que se ha denominado inducción de resistencia sistémica. Con relación a la producción de antibióticos, entre los casos más comunes de rizobacterias productoras de estas sustancias están las *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida*, las cuales tienen la capacidad de sintetizar algunos compuestos que causan la muerte de aquellos microorganismos (principalmente hongos) que entren en contacto con ellas (Montealegre, 2005).

Control Biológico con Rizobacterias

El control biológico ha surgido en las últimas décadas como una alternativa para el manejo de fitopatógenos y principalmente ha sido orientado al control de patógenos habitantes del suelo (rizósfera), ya que éste representa un hábitat heterogéneo, en donde la región del suelo en contacto con la raíz, es un hábitat rico en nutrimentos, de tal manera que el 40% de los fotosintatos trasladados a la raíz son perdidos en el suelo en forma de mucílago, células muertas, material de la pared celular y solutos orgánicos que incluyen azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos fenólicos (Lazarovits y Nowak, 1997). Todo esto implica procesos asociados con la competencia en la rizósfera, en donde los microorganismos que ahí residen interactúan entre sí y con las raíces de las plantas por vías que afectan su crecimiento y desarrollo. Estos procesos pueden ser considerados como neutros, dañinos o benéficos para el crecimiento de las plantas (Fenchel *et al.*, 2000).

Debido a lo antes señalado la rizósfera ofrece la primera línea de defensa contra el ataque de los patógenos, por lo que se considera que los microorganismos que crecen ahí son excelentes para usarse en programas de control biológico pues el amplio espectro de actividad antagónica de varios microorganismos contra los patógenos de las plantas hace que estas especies sean buenos candidatos (Podile y Prakash, 1996).

El control biológico de las enfermedades de plantas constituye una práctica ampliamente difundida y sigue siendo objeto de investigación y desarrollo; un concepto amplio de control biológico incluye nociones sobre las prácticas de cultivo y resistencia a las enfermedades. Desde esta perspectiva se acepta que el concepto de “control biológico” es el control de los patógenos por uno o más organismos, logrado de forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, huésped o antagonistas, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas (Aguilar-Espinosa, 2006).

Por otra parte, se encuentra el concepto clásico que se restringe a que el “control biológico es el uso deliberado de un organismo para controlar a otro”; sin embargo y en relación a este último concepto, es necesario considerar que las interacciones de múltiples variables presentes en el medio ambiente pueden modificar las interacciones entre los microorganismos y su entorno, muchas de las cuáles pueden favorecer o impedir un control biológico efectivo (McSpadden-Gardener, 2002).

El uso de microorganismos antagonistas de patógenos requiere de estudios previos que se inician con la selección de microorganismos potenciales controladores de fitopatógenos, para continuar con la identificación de los mecanismos que utilizan para ejercer el control biológico y posteriormente se pueda desarrollar una formulación para producirse a gran escala. Los procedimientos de aplicación de los bioantagonistas también son fundamentales para lograr los efectos de control deseados. En México son muy pocas las investigaciones que se han realizado sobre el control biológico de fitopatógenos mediante microorganismos antagonistas; la mayoría de estas investigaciones han sido efectuadas en el laboratorio o invernadero y muy pocas en campo. En la mayoría de los casos el modo de acción de los microorganismos con actividad de biocontrol ha sido la producción de metabolitos con actividad antibiótica, entre ellos, el género *Bacillus*, el cual es un promisorio candidato, ya que se caracteriza por sintetizar péptidos con actividad antibacteriana y antifúngica (Hernández-Castillo *et al.*, 2005).

Una de las alternativas es el uso de bacterias como agentes de control biológico, dada la diversidad genética de *Bacillus* tanto en el suelo como en la rizósfera, los cuales se consideran como colonizadores eficaces es en el tratamiento de semillas; su efecto benéfico no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos, sino que influye también positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas (Kim *et al.*, 1997).

Ventajas y Desventajas del Control Biológico

El empleo del control biológico ofrece ciertas ventajas en comparación con la aplicación de productos químicos. Los métodos de control biológico pueden ser empleados como parte de los programas de manejo integrado para reducir el uso de agroquímicos, así como lograr una disminución del daño ambiental, mejorar la calidad del agua y aumentar la seguridad de la salud pública. La aplicación coordinada de agentes de biocontrol con plaguicidas puede reducir las acciones deletéreas de microorganismos competitivos y puede además aumentar la producción de los cultivos, debido al posible efecto de los promotores de crecimiento de los biocontroladores. Estudios con *Brassica napus* tratadas con bacterias tolerantes a fungicidas combinadas con químicos tradicionales aumentaron la emergencia de plántulas en presencia de *Rhizoctonia solani*; esto puede ser debido al efecto de los aditivos promotores del crecimiento y al control de la enfermedad (Zablotowicz *et al.*, 1992).

Algunas medidas de control biológico pueden prevenir daños económicos a los cultivos; a diferencia de muchos plaguicidas, el biocontrol es específico para ciertas plagas. Con el uso de biocontroladores, otros organismos útiles, animales o personas no resultan afectados logrando que así un menor peligro en relación con el impacto ambiental y la calidad del agua. Sin embargo, también se presentan ciertas limitantes en el uso del control biológico ya que éste requiere de mayor investigación; la propiedad de especificidad del biocontrolador puede a su vez ser considerada como una desventaja ya que puede ser de utilidad restringida (Lark, 1999).

Aproximadamente 20 géneros de bacterias han mostrado su potencial antagonico contra muchos fitopatógenos, no obstante, son pocas las cepas que han mostrado consistencia bajo condiciones de campo; entre las cuales se destacan: *Agrobacterium radiobacter*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces griseoviridis*, *Bacillus subtilis*, *Amelomyces quiqualis*, *Cyida oleophila*, *Coniothyxium minitans*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocadium virens*, *Gliocadium catenulatum*, *Phthebia gigantea*, *Phythium oligyium* y

Trichoderma harzianum entre otros; estos ya se encuentran en el mercado en forma comercial para el biocontrol de patógenos de plantas (Fravel, 1999).

***Bacillus subtilis* como Agente de Control Biológico**

Una de las bacterias que más han sido estudiadas debido a su capacidad para la supresión de enfermedades en las plantas es el género *Bacillus*, éstos son considerados como menos competentes en la rizósfera comparados con especies del género *Pseudomonas* y quizá por esta razón muchos investigadores proponen el desarrollo de agentes de control biológico por introducción en la rizósfera con especies de *Pseudomonas* (Kim *et al.*, 1997). Sin embargo, especies de *Bacillus* como grupo, ofrece ciertas ventajas sobre cepas del género *Pseudomonas* y otras bacterias gram negativas para la protección contra hongos patógenos de raíz, debido a su capacidad de formar endosporas y a la actividad del amplio espectro de sus antibióticos, otra característica es que este grupo es capaz de utilizar una extensa cantidad de compuestos orgánicos simples además de ser anaeróbicos facultativos (Clements *et al.*, 2002).

Uno de los mejores ejemplos conocidos es la aplicación de *B. subtilis* A13, el cual se aisló en Australia hace 25 años; esta bacteria fue seleccionada por su capacidad de inhibición *in vitro* de 9 patógenos y su efecto promotor de crecimiento en diferentes cultivos como maíz, cereales y zanahoria. Otro ejemplo es la cepa de *B. subtilis* GB103 conocida comercialmente como Kodiak, la cual controla la enfermedad conocida como ahogamiento de cultivo de papa, esta funciona a través de lo que se llama “nicho de ocupación”. *B. subtilis* coloniza la raíz, al ocupar un espacio físico sobre ésta desplaza a los patógenos. Dicho producto tiene la ventaja a diferencia de otros biofungicidas, de perdurar toda la vida de la planta, ya que es un organismo vivo que convive con la raíz y se alimenta de los exudados de ésta.

Mecanismos de Acción del Control Biológico

Los mecanismos de acción por los cuales opera el control biológico son importantes conocerlos, ya que podrían explicar su justificación para utilizarlo, básicamente se han propuesto tres mecanismos: competencia, parasitismos y antibiosis (Viñas *et al.*, 2005).

Competencia

La competencia entre los microorganismos por nutrientes esenciales puede tener como resultado el desplazamiento del patógeno; un ejemplo de esto es la presencia de sideróforos. El término sideróforo se deriva del griego: transportador de hierro, por lo tanto, se refiere a un compuesto quelante de hierro secretado por microorganismos. El ion hierro Fe^{3+} tiene muy poca solubilidad a pH neutro, por lo que no puede ser utilizado por los organismos. Ejemplos de sideróforos producidos por bacterias y hongos son: ferricromo (*Ustilago sphaerogena*), pseudomonadaceae (*Pseudomona aeruginosa*), enterobactina (*Escherichia coli*), enterobactina y bacillibactina (*Bacillus subtilis*), ferrioxamina B (*Streptomyces pilosus*), fusarinina C (*Fusarium roseum*), yersiniabactina (*Yersinia pestis*), vibriobactina (*Vibrio cholerae*), azotobactina (*Azotobacter vinelyii*), pseudobactina (*Pseudomonas B 10*) y también la bacteria eritrobactina (*Saccharopolyspora erythraea*) (<http://es.wikipedia.org/wiki/Sider%C3%B3foro>).

Otro ejemplo de la competencia por nutrimentos es la de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* los cuales son hongos de postcosecha típicamente dependientes de los nutrimentos como los hongos necrotróficos ya que sus esporas requieren de estas sustancias para germinar y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar al sustrato. Estos nutrimentos se encuentran en las heridas de las frutas, donde la competencia microbiana actúa inhibiendo el desarrollo de estos patógenos (Díaz de Villegas *et al.*, 2002).

Parasitismo

Un segundo modo de acción del control biológico lo constituye el parasitismo, el cual opera por la acción de las enzimas extracelulares degradativas tales como quitinasas y gluconasas. La actividad de la quitinasa fue demostrada por la pérdida en la eficacia del biocontrol por mutantes de *Serratia marcescens*, en las que el gen *ChiA* había sido inactivado; así mismo, una recombinante de *Escherichia coli* expresó el gen *ChiA* de *S. marcescens*, la cual demostró su efectividad al disminuir la incidencia de las enfermedades causadas por los hongos *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* (Oppenheim y Chet, 1992).

Antibiosis

Este mecanismo de acción está involucrado con la eliminación de las enfermedades de las plantas; el papel que juegan los antibióticos es el de otorgar una ventaja competitiva a los microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos. El ejemplo más conocido sin duda ha sido la producción de penicilina por *Penicillium notatum* descubierta en 1929. Otro ejemplo es el de *Trichoderma* sp., un hongo antagonista del que se conocen más de 33 especies presentes en diversos hábitats. *Trichoderma*, actúa mediante diferentes mecanismos contra muchos patógenos de plantas (Monte, 2001).

Microencapsulación

La microencapsulación de organismos ha sido considerada como una alternativa de inmovilización de células, a fin de que éstas puedan ejercer sus funciones en forma gradual. Algunas propiedades típicas del sistema microencapsulado han sido estudiadas, tales como contenido de microorganismos, tamaño de partícula y tiempo de germinación, se preparan mediante el método de coaservación-separación de fases, utilizando una etapa intermedia de emulsión múltiple. Las condiciones de preparación han sido lo suficientemente benignas para no producir cambios en las propiedades biológicas generales del sistema, con la protección que le otorga la matriz del hidrogel (Bashan *et al.*, 2002).

Esta técnica puede ser considerada como una forma especial de empaquetar, en la que un material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente y de otros deterioros. En un sentido amplio, la microencapsulación provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su liberación posterior bajo condiciones controladas. Dentro del término de microencapsulación, se incluyen las microcápsulas, las micropartículas, nanocápsulas y sustancias activas atrapadas o embebidas, aunque existe una terminología específica dependiendo de la industria de aplicación, por ejemplo, la farmacéutica hace una distinción entre microcápsulas y microesferas dependiendo de cómo se encuentre distribuido el material encapsulado dentro de la partícula (Yoon y Kinam, 2004).

Diversos experimentos basados en polímeros han sido evaluados durante la década pasada, estos polímeros han demostrado ser portadores potenciales de bacterias siendo esta una gran ventaja práctica. La microencapsulación de células vivas las protegen contra diversos factores ambientales, además al ser incorporados al suelo son liberados gradualmente cuando el polímero es degradado (Yabur *et al.*, 2006).

Estas formulaciones presentan muchas ventajas, ya que pueden almacenarse secas a temperatura ambiente por períodos prolongados, pueden ser manipulados fácilmente, ofrecen una calidad constante y un mejor ambiente de acuerdo con las necesidades específicas de las bacterias o del cultivo. Estos inóculos pueden ser mejorados con nutrientes y mejorar la sobrevivencia de la bacteria, especialmente con bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP). El alginato es el material comúnmente usado en la encapsulación de microorganismos para varios propósitos industriales (Weinbrecky *et al.*, 2004).

Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. con Microencapsulados de *Bacillus subtilis* y su Efecto en Crecimiento y Rendimiento de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. with Microcapsules Containing *Bacillus subtilis* and its Effect on Growth and Yield of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Marcela Hernández-Suárez^{1*}, Francisco Daniel Hernández-Castillo¹, Ricardo Hugo Lira-Saldivar², Gabriel Gallegos-Morales¹. ¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología Agrícola, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. ²CIQA, Saltillo, Coah., México. *Autor responsable. E-mail: marcela_h_s@hotmail.com. Tel. (844) 431 74 61.

ABSTRACT

The rizobacter belonging to *Bacillus* genus has the property of promoting plant growth; to be antagonists of plant pathogens, and can be microencapsulated inside a biopolymeric matrix. Therefore, the objectives of this work were: to adapt an equipment and to evaluate a technique for microcapsules elaboration into a sodium alginate matrix in order to incorporate rizobacter of *Bacillus subtilis*; to analyze the biocontrol by determining its antagonistic effect against pathogenic soil fungi; in addition, it was studied the effect of plant growth

promotion on tomato plants. In this study *B. subtilis* strains identified as B1, J1, M2 and the mixture of them were used; microcapsules containing bacterial strains were attached to tomato seeds cv. Floradade. When seedlings were produced, a second application of microcapsules containing *B. subtilis* was made to the pots, which previously were inoculated with propagules and spores of the fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* sp. respectively. In this work the analyzed variables were: incidence and disease severity, plant growth, aerial and root dry weight, foliar area and fruit yield. Results obtained showed that the apparatus built and adapted to elaborate microcapsules with bacterial strains was capable to produce them; *B. subtilis* strains indicated an obvious biocontrol since incidence and disease severity was reduced, and because clearly inhibited the infective activity of inoculated plant pathogens, also microcapsules with bacterial strains stimulated plant growth and fruit yield. Based on these results it is concluded that microcapsules containing *B. subtilis* strains could be an efficient biocontrol agent against soil plant pathogens and could have a biofertilizer effect, since they noticeably stimulated growth and yield of tomato plants compared to control plants. It is suggested that these should be validated in a field crop to corroborate the effectiveness shown in this work.

RESUMEN

Las rizobacterias del género *Bacillus* tienen la propiedad de promover el crecimiento de plantas, ser antagonistas de fitopatógenos y que pueden ser microencapsuladas dentro de una matriz biopolimérica. Por lo tanto, nuestros objetivos fueron: adaptar un equipo y evaluar una técnica para elaborar microcápsulas de alginato de sodio en las que se incorporaron rizobacterias de *Bacillus subtilis*; analizar el biocontrol contra hongos fitopatógenos del suelo y determinar la promoción del crecimiento de plantas de tomate en invernadero. Se utilizaron cepas de *B. subtilis* identificadas como B1, J1, M2 y la mezcla de ellas; las microcápsulas conteniendo las cepas bacterianas fueron adheridas a semillas de tomate cv. Floradade. Una vez que se tuvieron las plántulas se realizó otra aplicación de microcápsulas con *B. subtilis* a las macetas que previamente fueron inoculadas con propágulos y esporas de los hongos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sp.* respectivamente. Las variables analizadas fueron: incidencia y severidad de la enfermedad; crecimiento de plantas; peso seco aéreo y radicular; área foliar y rendimiento de frutos. Los resultados mostraron que el aparato construido y adaptado para elaborar microcápsulas fue eficaz para su producción; las cepas de *B. subtilis* mostraron su biocontrol ya que redujeron la incidencia y severidad de la enfermedad al inhibir significativamente la actividad infectiva de los fitopatógenos; además las microcápsulas con *B. subtilis* estimularon el crecimiento de plantas y rendimiento de frutos. Con base en los resultados obtenidos se concluye que las microcápsulas conteniendo cepas bacterianas pueden ser un eficaz agente

de biocontrol contra patógenos del suelo y pueden tener actividad biofertilizadora, ya que estimularon notablemente el crecimiento y rendimiento de plantas de tomate en comparación con los tratamientos testigo. Se sugiere que estos resultados sean validados en campo para corroborar la efectividad mostrada en este trabajo.

Palabras clave: Control biológico, Bioplaguicidas, Biofertilizantes, Solanáceas.

Introducción

Una alternativa para disminuir la contaminación por el uso de agroquímicos sintéticos en el manejo de enfermedades del suelo es el uso de antagonistas del género *Bacillus*, ya que son considerados los más eficaces por sus propiedades de inhibición de fitopatógenos del suelo (Hernández-Castillo *et al.*, 2005), así como en la promoción del crecimiento de las plantas e induciendo mayor rendimiento de cultivos (Clements *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2004). Dada su gran diversidad en el suelo y en la rizósfera, se considera a este microorganismo como un colonizador eficaz. Por tal motivo, el uso de rizobacterias para el control biológico provee una herramienta sustentable para el control de fitopatógenos (Ait Barka *et al.*, 2002) El jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ocupa el tercer lugar en cuanto a volumen de producción mundial, ya que es la hortaliza que más se consume en todo el mundo, se cultiva en invernadero y campo, y alcanza precios elevados en el mercado internacional en ciertas épocas del año, pero es atacado por numerosos fitopatógenos (Estrada *et al.*, 2006). La pudrición de la corona de la raíz causada por *F. oxysporum* disminuye hasta el 50% de su rendimiento en el campo; además, este hongo causa pudrición radical severa y lesiones necróticas extensivas en la base del tallo, provocando una podredumbre en las raíces secundarias, marchites y finalmente la muerte de la planta (Hernández-Castillo *et al.*, 2005). La prevención y el control de esta enfermedad se han realizado mediante diferentes estrategias, basadas principalmente en la utilización de agroquímicos sintéticos que no logran erradicar a los patógenos

causantes de la enfermedad y generan resistencia debido al uso inadecuado de los pesticidas aplicados (Duijff *et al.*, 1997).

Debido a lo antes señalado y al severo problema ambiental causado por los agroquímicos sintéticos, a nivel mundial se están evaluando nuevas opciones orgánicas y biológicas que logren prevenir y controlar diversos fitopatógenos pero con menor impacto ambiental. Por esa razón, el uso de microorganismos antagonistas para el control de hongos patógenos como *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum* y *Phytophthora infestans*, que atacan el sistema radical del tomate y otros cultivos se han estudiado desde la perspectiva de opciones biológicas para realizar prácticas agrícolas sustentables y amigables con los ecosistemas (Lira-Saldívar y Medina-Torres, 2007).

Por otro lado, la utilización excesiva de fertilizantes sintéticos resulta en mayores costos de producción y en la contaminación de suelos y aguas, especialmente por los nocivos nitratos; éstos también han ocasionado un proceso de deterioro de los recursos naturales y una creciente dificultad para removerlos (Nolan, *et al.*, 1998). En las dos últimas décadas, una de las áreas de estudio que están impactando favorablemente la agricultura sustentable, es la aplicación de biofertilizantes (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado 2006) empleando bacterias y hongos que viven en simbiosis con las plantas, lo cual ha resultado muy positivo para fertilizar de manera orgánica cultivos de leguminosas, gramíneas y otros (Rueda *et al.*, 2007). Debido a los altos costos de los fertilizantes sintéticos el uso de microorganismos como rizobacterias y micorrizas se perciben como los biofertilizantes del futuro, debido a eso los

trabajos de investigación con esta orientación deberán alentarse y apoyarse (Shah *et al.*, 2006; Hernández Castillo *et al.*, 2008).

La encapsulación en una matriz biodegradable con base en quitosán, goma guar, goma arábiga, alginato de sodio y otros biocompuestos, han demostrado ser portadores de microorganismos; estos biocompuestos encapsulan las células vivas y protegen a los microorganismos contra estrés ambiental (Weinbrecky *et al.*, 2004). Adicionalmente cuando los biopolímeros son degradados por los microorganismos del suelo, se liberan de manera gradual pero en grandes cantidades. Estos microencapsulados (MIC's) presentan ventajas ya que pueden almacenarse secas a temperatura ambiente por periodos prolongados, ofrecen una calidad constante, un mejor ambiente para las bacterias y pueden ser manipulados fácilmente (González y Bashan, 2000).

El concepto de la inmovilización de células microbianas es atrapar microorganismos benéficos dentro de una matriz o microesfera. Esta técnica puede producir muchos compuestos útiles para la industria farmacéutica, agrícola, alimenticia y para aplicaciones de ácidos orgánicos, aminoácido, enzimas y para biodegradar materiales tóxicos (biorremediación) durante un extenso período de tiempo (Bashan *et al.*, 2002). Los MIC's son una forma especial de empaquetar, en la que un material de tamaño reducido puede ser cubierto de manera individual; en el término microencapsulación se incluyen MIC's, micropartículas, nanocápsulas y sustancias bioactivas atrapadas o embebidas en la matriz polimérica (Fery *et al.*, 2004). Las formulaciones con bacterias encapsuladas para usos agrícolas tienen al menos dos objetivos

diferentes que aquellas usadas por la industria: por una parte, protegen de manera temporal a los microorganismos encapsulados de factores abióticos adversos del suelo y de la competencia microbiana, y por otra parte, buscan liberarlos gradualmente de manera que colonicen eficientemente las raíces de las plantas cultivadas (Wiwattanapatapee *et al.*, 2004; Yoon y Kinam. 2004).

Debido a lo antes expuesto y a la necesidad de contar con opciones biológicas para la prevención y control de enfermedades fitopatógenas, se realizó un trabajo bajo condiciones de laboratorio e invernadero cuyos objetivos fueron: adaptar y evaluar el funcionamiento de un aparato para microencapsular; analizar el efecto de los MIC's contenido tres cepas de *B. subtilis* y la mezcla de las mismas, contra *R. solani* y *Fusarium* sp. e investigar el efecto de los MIC's de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento, rendimiento de tomate y su actividad antagónica.

Materiales y Métodos

Construcción del Equipo para Producir Microencapsulados.

La fabricación de MIC's conteniendo cepas de *B. subtilis* se realizó empleando el equipo originalmente diseñado por Carrillo y Bashan (1997), realizándole adecuaciones mecánicas (Figura 1) para mejorar su funcionalidad en cuanto a la aspersion de mezclas y purificación del aire, para así mejorar la formación de MIC's y evitar contaminaciones orgánicas e inorgánicas de las mismas. El equipo consta de un filtro regulador con un manómetro integrado para retener sólidos de hasta 0.04 mm; es alimentado con aire presurizado, una segunda unidad de filtro acoplada directamente recibe el aire ya filtrado y lo hace pasar por otro filtro para retener partículas pequeñas de hasta 0.01 mm.

El equipo completo para elaborar los MIC's consiste de un cuerpo de acero inoxidable con un diámetro interior de 1" con dos insertos de 1/4" para las conexiones roscadas (Figura 2). En un inserto se pueden hacer mediciones de la presión en el interior de la recámara, mientras que en el otro situado en la parte inferior, es donde se instala el contenedor con el hidrogel biopolimérico para luego asperjarlo a condiciones de temperatura ambiente y presión atmosférica para que se formen espontáneamente los MIC's conteniendo en su interior las cepas bacterianas.

Preparación de los Microencapsulados

Se utilizaron tres cepas de *B. subtilis* identificadas como B1, J1, M2 y su mezcla de las tres (B1J1M2); aisladas de parcelas comerciales de Chile (Hernández *et al.*, 2005). Para este trabajo las bacterias fueron cultivadas en agar nutritivo, posteriormente se sembraron en 50 mL de caldo nutritivo y se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm/24h. El cultivo bacteriano se centrifugó a 5000 rpm/10 min, se desechó el sobrenadante y el paquete o botón celular se resuspendió en 50 mL de solución salina al 0.85%; se agitó en vortex y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm/10 min, este lavado se realizó dos veces. Nuevamente se separó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en solución salina para ajustar la densidad óptica en espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu 2401 PC a 540 nm a 1 de absorbancia, determinando que la muestra contenía 1×10^9 ufc/mL, se realizó una dilución para obtener una concentración de 1×10^8 ufc/mL aproximadamente. Finalmente se tomaron 20 mL de la suspensión bacteriana 1×10^8 ufc/mL y se mezclaron con 80 mL de alginato de sodio al 2% previamente esterilizado, dejando en agitación por 15 min. se vaciaron al contenedor del microencapsulador y se inició la aspersion. Al hacer contacto la mezcla del alginato más el cultivo bacteriano con el CaCl_2 que previamente se había colocado en el fondo de una charola estéril de acero inoxidable se formaron las microcápsulas. A continuación las microesferas en la solución de CaCl_2 se vaciaron en un matraz estéril manteniéndose en agitación por una hora; después se separaron los MIC's de la solución utilizando papel filtro, se lavaron con solución salina al 0.85%, se retiró la solución salina, se adicionó

caldo nutritivo a la concentración de 1:50 (p/v) y se incubaron a 37°C/18 h con agitación constante. Después se realizó otro lavado siguiendo los pasos anteriores, se colocaron los MIC's en cajas Petri con papel filtro estéril y se secaron a 40°C/72h. Finalmente para el recuento de las ufc/mL se disolvió 0.01g de MIC's en un tubo conteniendo 1mL de solución salina y se sembraron por extensión con varilla de vidrio en cajas Petri con agar nutritivo y se incubaron a 37°C/24 h.

Inoculación de los Microencapsulados en Semillas.

Las semillas de tomate variedad Floradade fueron lavadas con agua potable se adicionó tween 20 al 2%, manteniéndolos en agitación durante 10 min; el tween se decantó y se adicionó NaClO₃ al 3% con agitación durante 5 min. Se decantó el cloro y adicionó de Na₂S₂O₃ 5H₂O al 2% agitándose 5 min, para luego lavarse cinco veces con agua destilada estéril. Las semillas secadas a temperatura ambiente se inocularon manualmente, se humedecieron con de resistol al 0.5% y se mezclaron con las MIC's para adherirlas a las semillas; posteriormente se realizó una observación microscópica para comprobarlo (Figuras 3a y 3b).

Producción de Plántulas e Inoculación de Fitopatógenos.

Las semillas inoculadas con MIC's de *Bacillus* se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades previamente desinfectadas con una solución de NaClO₃ al 3%; como sustrato se utilizó peat-moss y perlita (50:50 p/p) las charolas se colocaron sobre mesas metálicas en un invernadero. Ya

germinadas las semillas y cuando las plántulas alcanzaron una altura promedio de 10 cm se transplantaron a macetas de plástico de 10 L de capacidad las cuales contenían 5 kg de suelo que previamente fue infestado con 400,000 propágulos/mL de *R. solani* y la misma cantidad de esporas de *Fusarium sp.* Las macetas se colocaron en el invernadero durante 90 días a una temperatura promedio de 24-26 °C, con Tmax y Tmin de 36 y 22 ± 2 °C respectivamente. Se aplicaron riegos y fertilización de macro y micronutrientes con riego automatizado cada tres días. Las macetas se distribuyeron mediante un diseño completamente al azar con doce repeticiones y seis tratamientos, en los que se incluyeron las tres cepas bacterianas (B1, J1, M2) y la mezcla de las mismas (B1J1M2); también se incluyeron un testigo químico (tiabendazol a la dosis recomendada comercialmente) y un testigo absoluto (sin fungicida). La aplicación de los MIC`s con *B. subtilis* a las macetas se realizó previo al trasplante incorporando 0.01 g en una oradación hecha en el centro de las macetas que previamente fueron inoculadas con propágulos y esporas de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sp.*; posteriormente se realizó el trasplante.

Parámetros evaluados en plantas.

A los 30 y 60 días después del trasplante (ddt) se utilizaron cuatro plantas para evaluar el efecto de los tratamientos aplicados; por lo tanto, se midió altura, peso fresco y seco de raíz, tallo y hojas, así como el área foliar; al final del ciclo (90 ddt) se midieron los mismos parámetros, incluyendo diámetro y peso de frutos. También se determinaron incidencia y severidad de la enfermedad causada por los patógenos. Plantas libres de suelo y residuos orgánicos se

observaron para detectar el número de plantas sanas o enfermas; considerándose enfermas aquellas que mostraban síntomas típicos de tallos con lesiones necróticas, marchites de plantas, pardeamiento y destrucción de la corteza y del cilindro central de la raíz. La proporción de plantas con raíces dañadas se expresó en porciento. Para establecer el grado de severidad del daño de los hongos se determinó mediante la escala reportada por Engelhard (1986) la cual establece una escala de 0-5 que se relaciona con síntomas necróticos en hojas; haces vasculares dañados del tallo; síntomas de hojas marchitas, achaparramiento y muerte de la planta.

Resultados y Discusión

Efecto de los Microencapsulados con *Bacillus* en Crecimiento y Área

Foliar

Los tratamientos aplicados mostraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en las variables de altura y área foliar (Cuadro 1). En cuanto a altura de plantas la mezcla de las cepas (B1J1M2) mostró ser más eficaz para estimular crecimiento, ya que reportó el mayor valor promedio (121.05 cm), pero fue estadísticamente igual que las cepas B1 y J1. Las plantas tratadas con MIC's mostraron en promedio 18.2% mas altura que los Testigos químico (TQ) y testigo absoluto (TA) que son estadísticamente iguales entre sí. Un trabajo realizado en tomate por Terry y Leyva (2006) con otras rizobacterias reportó un efecto positivo con la coinoculación micorriza-rizobacteria en el crecimiento de

plántulas, siendo la altura superior en 23% respecto al testigo; también se logró una eficiencia del 40% respecto a la fertilización nitrogenada. Al realizar trabajos en condiciones de laboratorio y campo utilizando bacterias promotoras del crecimiento en el cultivo de lechuga Díaz-Vargas *et al.*, (2001) reportan que la cepa *Hafnia alvei* P-3 incrementó la germinación en 36.5% en comparación al testigo, mientras que en campo la misma cepa incrementó el peso seco en 371% y el volumen radical en 300%; además incrementó en 240% el área foliar. En nuestro estudio el área foliar de plantas de tomate también mostró ser influenciada por los tratamientos con MIC's ya que produjeron mas follaje que los tratamientos testigo (TQ y TA) reportando 48.4 y 44.6% menos área foliar respectivamente. Esto sugiere un efecto bioestimulador de las cepas bacterianas de *Bacillus* similar al producido por otras rizobacterias con actividad biofertilizadora como lo ha consignado Viera y Álvarez (2006), particularmente al utilizar la mezcla de *Bacillus* o la cepa de *Bacillus* J1

Cuadro 1. Altura y área foliar de plantas de tomate cv. Floradade sometidas a tratamientos de *Bacillus subtilis* en micoencapsulados.

Tratamientos	Altura (cm)	Área foliar (cm ²)
<i>Bacillus</i> B1	119.47 a	6857.01 b
<i>Bacillus</i> J1	118.65 a	7762.92 a
<i>Bacillus</i> M2	102.95 b	5393.32 b
Mezcla de <i>Bacillus</i>	121.05 a	7022.90 a
*TQ	99.05 b	4007.51 c
**TA	98.9 b	4302.63 bc
CV (%)	3.11	9.29

Testigo químico; **Testigo absoluto. Cifras con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.01$)

Efecto en Producción de Biomasa y Rendimiento

La biomasa seca de hojas por planta fue claramente estimulada con los MIC's de *Bacillus* (Cuadro 2), ya que las cepas B1 y J1 reportaron los máximos valores (116.41 y 107.57 gr), siendo estadísticamente superiores ($p < 0.01$) al resto de los tratamientos. El contraste entre la media de biomasa foliar seca fue notable entre el resultado de la cepa B1 y el testigo absoluto, el cual reportó sólo 26.21 gr, esto representa una diferencia de 77.5% menos peso seco de hojas. La biomasa producida en los tallos también resultó ser afectada favorablemente con la aplicación de MIC's ya que la mezcla de las cepas (B1J1M2) produjeron en promedio 34.69 gr resultando estadísticamente superior ($p < 0.01$) que los dos tratamientos testigo, ya que el TQ reportó 28.06 gr y el TA sólo 14.57 gr, esto representa 19.3 y 58% respectivamente, menos biomasa seca de tallos. Estos resultados son coincidentes con lo reportado por Hernández *et al.*, (2005) quien señala que los tratamientos con una mezcla de diferentes cepas nativas de *B. subtilis* produjeron significativamente raíces mas largas (144.5%). además, el peso seco fue 191.4% mayor con respecto al testigo. Resultados similares también fueron reportados por Iglesias *et al.*, (2000) utilizando Azotobacterias y *Endogone* sp. en el cultivo de trigo, ya que obtuvieron mayor altura, biomasa aérea y radicular de las plantas.

Cuadro 2. Peso de biomasa seca aérea y subterránea (gr) en plantas de tomate cv. Floradade sometidas a tratamientos de *Bacillus subtilis* en micoencapsulados.

Tratamientos	Hojas	Tallos	Raíces
<i>Bacillus</i> B1	116.41 a	30.31 ab	31.28 c
<i>Bacillus</i> J1	107.57 a	31.92 ab	38.76 b
<i>Bacillus</i> M2	87.67 b	27.90 b	32.04 c
Mezcla de <i>Bacillus</i>	94.51 b	34.69 a	96.63 a
*TQ	82.41 c	28.06 b	33.38 bc
**TA	26.21 d	14.57 c	13.92 d
CV (%)	6.54	8.32	6.97

Testigo químico; **Testigo absoluto. Cifras con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.01$)

Por lo que respecta a biomasa radicular la tendencia estimuladora de los MIC's también se pudo apreciar en este trabajo, ya que se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.01$); el tratamiento B1J1M2 produjo en promedio 96.63 gr mientras que el TA reportó solo 13.92 gr, esto significa una diferencia de 85.6% menor biomasa radicular en plantas testigo que no recibieron

aplicación de fungicida, en cambio el testigo químico con aplicaciones de tiabendazol reportó 33.38 gr; esto significa una disminución de 65% en la masa radicular en comparación con las plantas tratadas con la mezcla de *Bacillus*. En el caso específico de tomate, hay reportes de trabajos donde se ha combinado *Azotobacter* + *Pseudomonas* (Martínez *et al.*, 2002) y *Azotobacter* + *G. fasciculatum* (Pulido, 2002), sus resultados indican que esos microorganismos también estimularon la producción de biomasa radicular. En la Figura 4 se muestran los datos correspondientes a rendimiento de frutos de tomate. Los tratamientos con MIC's de *Bacillus* estimularon significativamente ($p < 0.01$) el rendimiento ya que la cepa J1 reportó en promedio 600 gr por planta, mientras que el TA solo 180 gr; esto significa una diferencia de 70% menor rendimiento. Resultados como estos evidencian el potencial de las rizobacterias de estimular de manera sustentable el crecimiento y producción de biomasa repercutiendo directamente en el rendimiento, por lo que puede considerarse que proporcionan grandes ventajas para su utilización en la agricultura sustentable o ecológica (Shah *et al.*, 2006).

Efecto de los Microencapsulados en Incidencia y Severidad.

La incidencia de la enfermedad al final de ciclo causado por *R. solani* y *F. oxysporum* que fueron inoculados al suelo de las macetas fue inexistente en los tratamientos con MIC's de *Bacillus* B1, J1 y la mezcla de las tres bacterias (Cuadro 3), lo que resultó estadísticamente inferior ($p < 0.01$) que la incidencia

observada en los TQ y TA (27% y 75%) respectivamente. En el mismo Cuadro 3 se muestra que la severidad del daño fue estadísticamente diferente entre tratamientos ($p < 0.01$), ya que el 100% de las plantas del TA y 65% de las del TQ resultaron severamente dañadas por los fitopatógenos; lo cual implicó la muerte total y parcial de esos tratamientos testigo. En cambio los MIC's que proporcionaron una protección total se observa en los tratamientos B1, J1 y la mezcla de las tres cepas bacterianas. En este sentido Vessey, (2003) también ha reportado que las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, además de mostrar un eficaz antagonismo contra hongos patogénicos resultan ser eficaces biofertilizantes en numerosos cultivos.

Cuadro 3. Efecto de microencapsulados de *Bacillus* sobre la incidencia de pudrición de raíz y severidad de la enfermedad en plantas de tomate al final del ciclo de cultivo

Tratamientos	Incidencia (%)	Severidad
<i>Bacillus</i> B1	0 d	0 c
<i>Bacillus</i> J1	0 d	0 c
<i>Bacillus</i> M2	12 c	1.5 c
Mezcla de <i>Bacillus</i>	0 d	0 c
*TQ	27 b	3.5 b
**TA	75 a	5.0 a
CV (%)	10.4	1.2

Testigo químico; **Testigo absoluto. Cifras con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.01$)

Conclusiones.

El aparato construido y adaptado fue eficaz para elaborar microcápsulas conteniendo cepas de *B. subtilis*, las que mostraron estimular el crecimiento de plantas, producción de biomasa y rendimiento de frutos; además ejercieron un claro biocontrol ya que redujeron la incidencia y severidad de la enfermedad al inhibir la actividad infectiva de *R. solani* y *F. oxysporum*. Estos resultados sugieren que las microcápsulas conteniendo cepas bacterianas pueden ser un eficaz agente de biocontrol contra patógenos del suelo y pueden tener actividad biofertilizadora en comparación con los tratamientos testigo. Sería recomendable que estos resultados sean validados en campo para corroborar la efectividad mostrada en este trabajo.

Agradecimientos.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo. Al CIBNOR, a CIQA por permitirme efectuar la investigación de laboratorio e invernadero; así como a la MC. Gabriela Padrón Gamboa y la TA Cristina Sánchez Flores por el apoyo brindado en las actividades de laboratorio.

Literatura Citada

- Aino, M., Y. Maekawa, S. Mayama and H. Kato. 1997. Biocontrol of bacterial wilt of tomato by producing seedlings colonized with endophytic antagonistic pseudomonas, pp. 120-123. *In* A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino (ed.), Plant growth promoting rhizobacteria: present status and future prospects. Nakanishi Printing, Sapporo, Japan.
- Ait Barka, E., S. Gognies, J. Nowak, J. C. Audran and A. Belarbi. 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biol. Control* 24:135-142.
- Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A. and Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carrier for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 35:359-368.
- Carrillo A. y Bashan Y. 1997. Microencapsulation as a potential carrier for plant growth-promoting bacteria. pp 460-463. *In*: Ogoshi A Kobayashi K, Homma Y, Kodama F, Kondo N, Akino S (eds) Plant growth-promoting rhizobacteria - present status and future prospects. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Clements, L., Miller, B. and Streips, U. 2002. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Escherichia coli*. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:284-286.

- De la Garza-Rodríguez, R. 2005. Inhibición *in vitro* de bacterias rizosféricas esporuladas sobre fitopatógenos asociados a la marchites de Chile. Tesis de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 45 p.
- Díaz V.P., Ferrera C.R. y Almaraz S.J. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19:327-335
- Dong, Y.H., X.F. Zhang, J.L. Xu and L.H. Zhang. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:954-960.
- Engelhard, A. 1986. Greenhouse evaluation of soil-applied fungicides for Fusarium wilt of chrysanthemum. pp. 30-31. *In*: Hickey, K.D. (Ed.) *Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens.*
- Estrada, B.M., M.N. Brito, L.E de la Cruz y V.A., Gómez. 2006. Producción de jitomate en condiciones protegidas. pp. 36-37. *In*: Memorias del IX Congreso Nacional Agronómico. 26-27 de abril de 2006. Texcoco, México.
- Fery A., F. Dubreuil and H. Möhwald. 2004. Mechanics of artificial microcapsules. *New Journal of Physics.* 6:18-22.
- Fuentes-Ramírez, L.E. y J. Caballero-Mellado. 2006. Bacterial biofertilizers. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* 143-172.

- Gonzalez, L.E. and Y. Bashan. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1527-1531.
- Hernández-Castillo, F.D., R. De la Garza-Rodríguez, G. Gallegos-Morales, E. Padrón-Corral, A., Sánchez-Arizpe, R.H. Lira-Saldívar. 2005. Efectividad biológica de bacterias rizosféricas esporuladas sobre el complejo de hongos de la marchites del chile *PHYTON* 2005: 171-180.
- Hernández-Castillo F.D., R.H. Lira-Saldivar, L. Cruz-Chávez, G. Gallegos-Morales, M.E. Galindo-Cepeda, E. Padrón-Corral, M. Hernández-Suárez. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *PHYTON. INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*. 2008. 77: 241-252.
- Iglesias M., S., González y T., Suárez. 2000. Utilización de inoculante mixto en trigo. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Argentina. 34 p.
- Lira-Saldivar, R.H. y J.G., Medina-Torres. 2007. ¿Agricultura sustentable o sostenible?: El reto es producir alimentos saludables utilizando productos y técnicas amigables con el ambiente. pp. 13-21 *In*: *Agricultura Sustentable y Biofertilizantes*. Eds. Lira-Saldivar, R.H. y Medina-Torres, J.G. Serna Editores, Monterrey. N.L., México.

- Martínez, R. y B. Dibut. 2002. Biofertilización y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas. p 45. *In*: XIII Congreso Científico del INCA. Programa y Resúmenes. La Habana, Cuba.
- Pulido, L. 2002. Hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: alternativas para la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y cebolla (*Allium cepa* L). Tesis Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA, La Habana, Cuba. 98 p.
- Rueda, E., Tarazón, M., Barrón, J., Corral, F., Murillo, B., García, J., Troyo, E., Holguín R., Larrinaga, J., Bashan, Y., González, E., Puente, M. y Hernández, J. 2007. Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas: ¿Biofertilizantes en la producción de halófitas con potencial agroindustrial y especies forestales nativas de ambientes árido-salinos? *In*: Agricultura Sustentable y Biofertilizantes. Eds. Lira-Saldivar R.H. y Medina-Torres J.G. Serna Editores. Saltillo, Coahuila, México.
- Shah, S.K., Shah, R.P., Xu, H.L., Aryal, U.K. 2006. Biofertilizers: An alternative source of nutrients for sustainable production of tree crops. *Journal of Sustainable Agriculture* 29: 85-95.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Viera, R.M. y Alvarez, B.D. 2006. Practical applications of bacterial biofertilizers and biostimulators. *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems* 113: 467-477

- Wiwattanapatpee, R., A. Pengnoo, M. Kanjanamaneesathian, W. Matchanavich. 2004. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice: formulation, viability and bacterial release studies. *Journal of Controlled Release*. 95:455-462.
- Yoon, Y., Kinam, P. 2004. A new microencapsulation method using an ultrasonic atomizer based on interfacial solvent exchange. *Journal of Controlled Release*. 100:379-388.

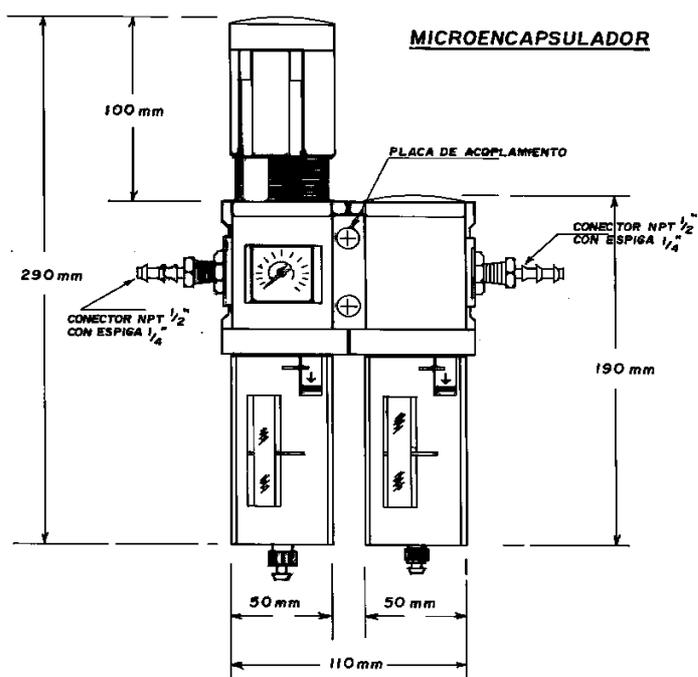


Figura 1. Unidad de filtrado con los componentes que conforman el dispositivo para microencapsular biocompuestos en una matriz biopolimérica.

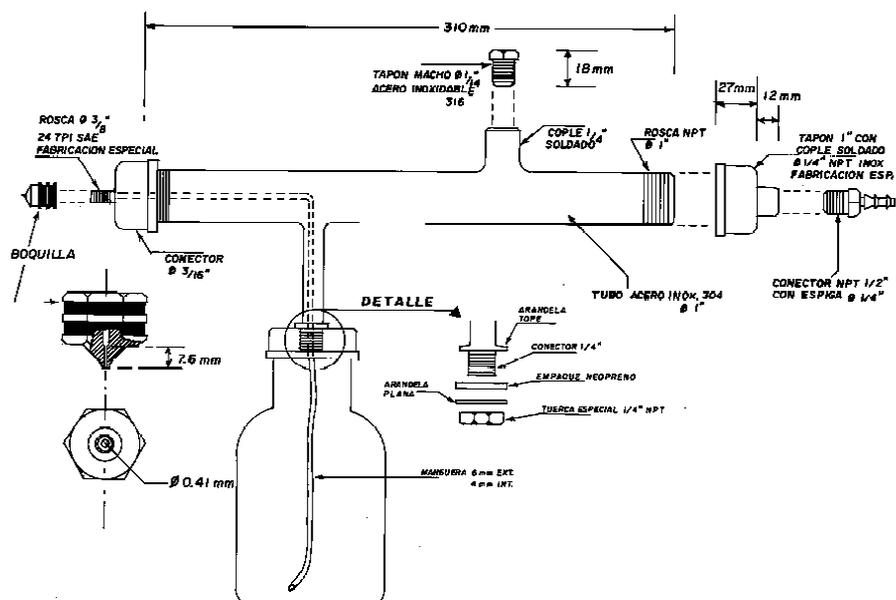
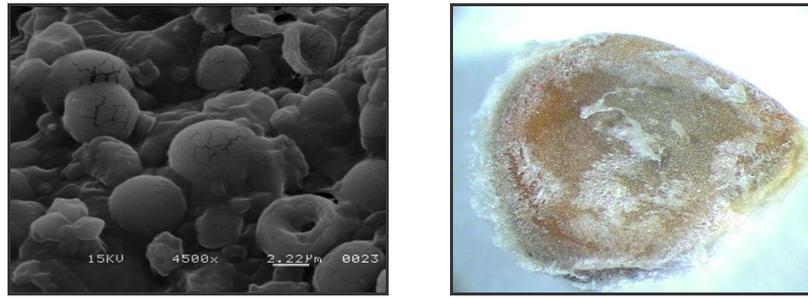


Figura 2. Dispositivo de acero inoxidable y contenedor presurizado de vidrio en el que se realizó el mezclado o combinación del hidrogel biopolimérico con las cepas bacterianas.



(a)

(b)

Figura 3. A la izquierda (a) se muestran los microencapsulados (4500 X) conteniendo las cepas bacterianas y a la derecha (b) se observa una semilla de tomaste cubierta con las microcápsulas (300 X).

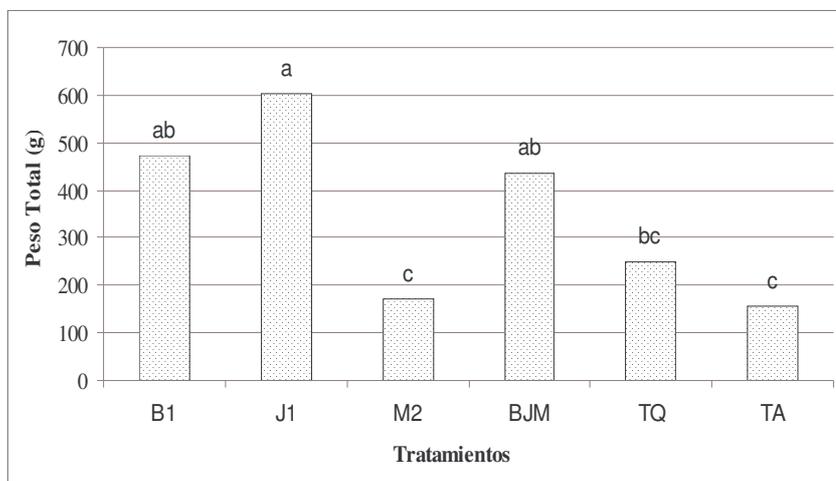


Figura 4. Rendimiento promedio de plantas de tomate sometidas a tratamientos de cepas bacterianas de *Bacillus subtilis* microencapsuladas. Testigo químico (TQ); Testigo absoluto (TA)

LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 1998. Plant Pathology. Academic Press. San Diego, California 813 p.
- Aguilar-Espinosa P. 2006. Supresión de hongos fitopatógenos de suelo mediante agentes de biocontrol en el cultivo del chile bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura, UAAAN 66 pp.
- Alarcón, M. S., (1993). Impacto del Manejo Integrado de Plagas en Cultivos de Tomate Industrial en Sinaloa. Resumen del Primer Congreso Internacional de Manejo de Plagas. Universidad Autónoma de Chapingo, México: 18-35.
- Allen, M.F., Swenson, W., Querejeta, J.I., Egerton-Warburton, L.M. y Treseder, K.K. 2003. Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plant and fungi. Ann. Rev. Phytopatol. 41:271-303.
- Alvey, S., Yang, C.H.; Buerkert A. and Drowley, D.E. 2003. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west African soils. Biol Fertil Soils 37: 73–82.
- Baker, K. F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 25:67-85.
- Bakker, P., Glandorf, DCM., Viebahn, M., Ouwens, T., Smit, E., Leeflang, P., Wernars, K., Thomashow, LS., Thomas-Oates J. and van Loon, L. 2002. Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2,4-diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat. Antonie van Leeuwenhoek 81: 617–624.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 2002. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. Trees. Vol. 16:159-166 (F.I. 1.122).
- Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A., and Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carrier for plant growth-promoting bacteria. Biology and Fertility of Soils. Vol. 35:359-368 (F.I. 1.307).

- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Gotz, M., Costa, R. and Smalla, K. 2006. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiol Ecol* 56:250–261.
- Burdman, S., Jurkevitch, E. and Okon, Y. 2000. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*, Vol. II. (Subba Rao NS & Dommergues YR, eds), pp. 229–250. Science Publishers, Enfield, NH.
- Castro-Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y. and Jurkevitch, E. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. Minireview. Federation of European Microbiological Societies Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved. *FEMS Microbiol Lett* 276: 1–11
- Cattelan, A., Harlet, R. and Fuhrmann, J. 1998. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1670-1680.
- Chávez-Betancourt, C. 2005. Uso de rizobacterias para el control de hongos fitopatógenos y promoción de desarrollo en plantas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah., México pp. 65.
- Chávez-Betancourt, C., Flores-Olivas, A. y Lira-Saldivar, R. 2007. Uso de Rizobacterias para el Control de Enfermedades y Promoción de Crecimiento en Plantas en: *Agricultura Sustentable y Biofertilizantes*. Edts. Lira-Saldivar y Medina-Torres. Serna Editores. Saltillo, Coahuila, México.
- Chen, C., R, R Gélanger, N. Benhamu, and T. C. Paulitz. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 56:13-23.

- Clements, L., Miller, B. and Streips, U. 2002. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, y *Escherichia coli*. Syst. Appl. Microbiol 25:284-286.
- Costa, R., Gotz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G. and Smalla, K. 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. FEMS Microbiol Ecol 56: 236–249.
- Curl, E. and Truelove, B. 1986. The Rhizosphere. Springer-Verlag, New York.
- Dalmastri, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A. and Tabacchioni, S. 1999. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated Burkholderia cepacia populations. Microbiol Ecol 38: 273–284.
- Delgadillo–Jiménez, R., Gil-Virgen, C., Tabares-Franco, S. y Olalde, P. 2001. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Avance y Perspectiva vol. 20. CINVESTAV. Irapuato, Gto. México.
- Díaz de Villegas, M., Villa, P. and Frías, A. 2002. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. Revista Latinoamericana de Microbiología 44:112-117.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. 2003. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. CRC Crit Rev Plant Sci 22: 107–149.
- Dos Santos, M.E. 2005. Hidroponía y promoción del crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con bacterias RPCP. UNQ Editorial SERIE DIGITAL Ciencia y Tecnología.
- Estrada, B.M., M.N. Brito, L.E de la Cruz y V.A., Gómez. 2006. Producción de jitomate en condiciones protegidas. pp. 36-37. In: Memorias del IX Congreso Nacional Agronómico. 26-27 de abril de 2006. Texcoco, México
- FAO (2007). FAOStat estadística databases, agricultura, <http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx>.

- Fenchel, T., King G. and Blackburn, T. 2000. Bacterial Biogeochemistry. The Ecophysiology of mineral Cycling. 2ed Academic Press, San Diego. pp 43-59, 117-161.
- Fravel, D.R. 1999. Commercial biocontrol products for use against soilborne crop diseases. [Http://barc.usda.gov/psi/bpd/bioprod.htm](http://barc.usda.gov/psi/bpd/bioprod.htm).
- Fuentes-Ramírez, L.E. and Caballero-Mellado, S. 2005. Bacterial biofertilizers. PGPR: Biological Control and Biofertilization (Sadiqui ZA, ed), pp. 143–172. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Gasoni, L., J. Cozzi and K. Kobayashi. 1998. Survival of potential biocontrol bacteria in various formulations and their ability to reduce radish damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. Journal of Plant Diseases and Protection 1: 41-48.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol 41:109-117.
- Glick, B., Patten, C., Holguin, O. and Penrose, D. 1999. Biocontrol mechanism. Chapter 7. in: Biochemical y genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria. Ontario Canada. Imperial Collage Press. pp. 215-248.
- Gonzalez, L.E. and Y. Bashan. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Applied and Environmental Microbiology 66:527-1531. (F.I. 3.541).
- Hernández-Castillo, F.D., De la Garza-Rodríguez, R., Gallegos-Morales, G., Padrón-Corral, E., Sánchez-Arizpe A., Lira-Saldívar R.H. 2005. Efectividad biológica de bacterias rizosféricas esporuladas sobre el complejo de hongos de la marchites del chile ΦYTON 171-180.

- Hernández-Castillo F.D., R.H. Lira-Saldivar, L. Cruz-Chávez, G. Gallegos-Morales, M.E. Galindo-Cepeda, E. Padrón-Corral, M. Hernández-Suárez. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus spp.* y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *PHYTON. INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 77: 241-252.
- Herschkovitz, Y., Lerner, A., Davidov, Y., Rothballer, M., Hartmann, A., Okon, Y. and Jurkevitch, E. 2005. Inoculation with the plant growth promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbiol Ecol* 50: 277–288.
- INEGI, (2002): El Sector Alimentario en México, Edición 2002, INEGI; con datos del Sistema de Información Agropecuaria de Consulta [SIACON, 1980-2001]).
- Inbar, E., Green, S., Hadar, Y. and Minz, D. 2005. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of Streptomycetes. *Microbiol Ecol* 50: 73–81.
- Kim, H., Yoon, B., Lee, C., Suh, H., Oh, H., Katsuragi, T. and Tani, Y. 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. Ferment. Bioeng* 84: 41-46.
- Kloepper, J.W. 1989. TIBTECH 7, 39. En: Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Avance y Perspectiva vol. 20. CINVESTAV. Irapuato, Delgadillo, R., Gil, V., Tabares, S. y Olalde P. 2001. Gto. México
- Lark, R. P. 1999. Plant disease y biocontrol FAQ.
- Lira-Saldivar, R.H. y Medina-Torres, J.G. 2007. Agricultura sustentable o sostenible?: El reto es producir alimentos saludables utilizando productos y técnicas amigables con el ambiente. En: Agricultura Sustentable y Biofertilizantes. Eds. Lira-Saldivar, R.H. y Medina-Torres, J. Serna Editores, Monterrey. N.L., México. pp. 13-21.

- Lupwayi, N., Rice, W. and Clayton, G. 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biol Biochem* 30: 1733–1741.
- Marschner, P., Crowley, D. and Yang, C. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* 261: 199–208.
- Mcspadden G. and Fravel, D. 2002. Biological control of plant pathogens: Research. Comercialization y application in the USA. Online. *Plant Health progress*. Doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.
- Monte, E. 2001. Understiygn *Trichoderma*: between biotechnology y microbial ecology. *Int Microbiol*. 4:1-4.
- Montealegre, A.J. 2005. Perspectivas y situación del uso de biofungicidas en Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.
- Montealegre, C., Van Kessel, C., Blumenthal, J., Hur H-G, Hartwig, U. and Sadowsky, M. 2000. Elevated atmospheric CO₂ alters microbial population structure in a pasture ecosystem. *Global Change Biol* 6: 475–482.
- Nuez, F., 2001. *El Cultivo del Tomate*, 1ª Edición 1995, Reimpresión 2001, Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona España. pp.191-203.
- Oppenheim, A.B. and Chet, I. 1992. Cloned chitinases in fungal plant pathogen control strategies. *Trends Biotechnol* 10:392-394.
- Peter, A., Barker, A., Marugg, J., Weisbeek, P. and Schippers, B. 1987. Bioassay for studying the role of siderophores in potato growth stimulation by *Pseudomonas* spp. in short potato rotations. *Soil Biol. Biochem* 19: 443-449.
- Podile, A. R. and Prakash, A. P. 1996. Lysis y biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF-1. *Can. J. Microbiol* 42:533-538.

- Rodríguez, M. 1995. Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. pp. 105-126. In: R. Ferrera-Cerrato y J. Pérez M. (eds.). Agromicrobiología. Elemento útil en la agricultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Rueda, E., Tarazón, M., Barrón, J., Corral, F., Murillo, B., García, J., Troyo, E., Holguín R., Larrinaga, J., Bashan, Y., González, E., Puente, M. y Hernández, J. 2007. Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas: ¿Biofertilizantes en la Producción de Halófitas con Potencial Agroindustrial y Especies Forestales Nativas de Ambientes Arido-Salinos? En: Agricultura Sustentable y Biofertilizantes. Eds. Lira-Saldivar y Medina-Torres. Serna Editores. Saltillo, Coahuila, México.
- Santander, C., J. Montealegre, y R. Herrera. 2003. Control biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate en suelos previamente sometidos a solarización y bromuro de metilo. Ciencia e Investigación Agraria 30: 107- 112.
- Schwencke, J. and Carú, M. 2001. Advances in actinorhizal symbiosis: Host plant-Frankia interactions, biology y applications in arid land reclamation: A review. Arid Ly Research y Management 15: 285-327.
- Shaw, K., Morris, P. and Hooker, J. 2006. Perception and modification of plant flavonoids signals by rhizosphere microorganisms. Environ Microbiol 8: 1867–1880.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, A., Kaiser, J., Roskot, N., Heuer, H. and Berg, G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. Appl Environ Microbiol 67: 4742–4751.
- van Elsas, J., Garbeva, P. and Salles, J. 2002. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. Biodegradation 13: 29–40.
- Viñas, I., Teixidó, N., Abadías, M., Torres, R. y Usall, J. 2005. Situación actual del control biológico en la postcosecha de frutas.

- Vlassack, K., Holm, L., Duchateau, J., Vyerleyden, and Mot, R. 1992. Isolation y characterization of *Pseudomona fluorescens* associated with the roots of rice, banana grown in Sri Lanka. *Plant Soil* 145: 51-63.
- Walker, T., Pal-Bais, H., Grotewold, E. and Vivanco, J. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132: 44–51.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 52: 487–511.
- Winding, A. 2004. Indicators of soil bacterial diversity. *Agricultural Impacts on Soil Erosion and Soil Biodiversity: Developing Indicators for Policy Analyses. Proceedings from an OECD Expert Meeting, Rome, Italy, 25–28 March 2003* (Francaviglia R, ed.), pp. 495–504. OECD, Paris.
- Wiwattanapatpee, R., A. Pengnoo, M. Kanjanamaneesathian, W. Matchanavnich. 2004. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice: formulation, viability and bacterial release studies. *Journal of Controlled Release.* 95:455-462.
- Yao, H., Liu, Y. and Huang, C. 2006. Effect of copper on phospholipids fatty acid composition of microbial communities in two red soils. *J Environ Sci FEMS* 18: 503–509.
- Zablotowicz, R., Press, C., Lyng, N., Brown, G. and Kloepper J. 1992. Compatibility of plant growth promoting rhizobacterial strain with agrochemicals applied to seed. *Caadian J. Microbiol.* 38:45-50.