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

**Marcela Hernández-Suárez[1*], Francisco Daniel Hernández-Castillo[1], Ricardo Hugo Lira-Saldivar[2], Gabriel Gallegos-Morales[1]**

[1]Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Colonia Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, México. [2]CIQA, Saltillo, Coah., México. Tel. (844) 431 74 61. E-mail: marcela_h_s@hotmail.com. (*Autor responsable).

**Abstract**

The research hypothesis is that rhizobacteria of the genus *Bacillus* have the property of promoting the growth of some plants, being antagonists of phytopathogens, and being microencapsulated in a biopolimeric matrix. Therefore, the objectives of this assay were: 1) adapting a piece of equipment, and evaluating a technique to elaborate sodium alginate microcapsules in which rhizobacteria of *Bacillus subtilis* could be incorporated; 2) analyzing the biocontrol against soilborne phytopathogenic fungi, and 3) determining the promotion of the growth of tomato plants in greenhouse conditions. Strains of *B. subtilis*, identified as B1, J1, M2, and a mixture of them all were used; the microcapsules containing the bacterial strains were attached to tomato seeds of Floradade cv. Once the seedlings sprouted, a second application with *B. subtilis* was done to the flowerpots previously inoculated with *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* sp. fungus propagules and spores. The analyzed variables were: incidence and severity of illness; plant growth; aerial dry and root weight and; foliage area and fruit yield. The results showed that the device built, and adapted for microcapsule elaboration was efficacious; *B. subtilis* strains showed its biocontrol activity when they reduced the incidence and severity of the illness by significantly inhibiting the activity of the phytopathogens; moreover, the *B. subtilis* microcapsules stimulated plant growth, and fruit yield. On the basis of the obtained results it may be concluded that the microcapsules containing bacterial strains can be an efficacious biocontrol agent against soil pathogens, and can have a biofertilizing activity, because they notably stimulated the growth, and yields of tomato plants, as compared with those of the witness treatment. It is suggested to validate these results in the field to corroborate the effectiveness of the process shown in this work.

**Key words** *:* Biological control; biopesticides; biofertilizer; solanaceous.

**Resumen**

La hipótesis de esta investigación es que las rizobacterias del género *Bacillus* tienen la propiedad de promover el crecimiento de algunas plantas, ser antagonistas de fitopatógenos, y de poder ser microencapsuladas en una matriz biopolimérica. Por lo tanto, los 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 que contenían 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 fueron inoculadas previamente 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; las cepas de *B. subtilis* mostraron su biocontrol ya que redujeron la incidencia y severidad de la enfermedad al inhibir significativamente la actividad de los

fitopatógenos; además las microcápsulas con *B. subtilis* estimularon el crecimiento de las plantas y el 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 del proceso mostrado 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 (Aino *et al*., 1997), 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 el mundo, se cultiva en invernadero y campo, y, en ciertas épocas del año, alcanza precios elevados en el mercado internacional, 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 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 severa 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.

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 *Phytophtora 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. 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 orgánicamente 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 vislumbran como los biofertilizantes del futuro, debido a eso los trabajos de investigación con esta orientación deberían alentarse y apoyarse (Shah *et al.*, 2006).

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 secos 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, aminoácidos, enzimas, y para biodegradar materiales tóxicos (biorremediación) durante un período extenso de tiempo (Bashan *et al.*, 2002). Los MICs son una forma especial de empacar, en la que un material de tamaño reducido puede ser cubierto de manera individual; en el término microencapsulación se incluyen MICs, micropartículas, nanocápsulas y sustancias bioactivas

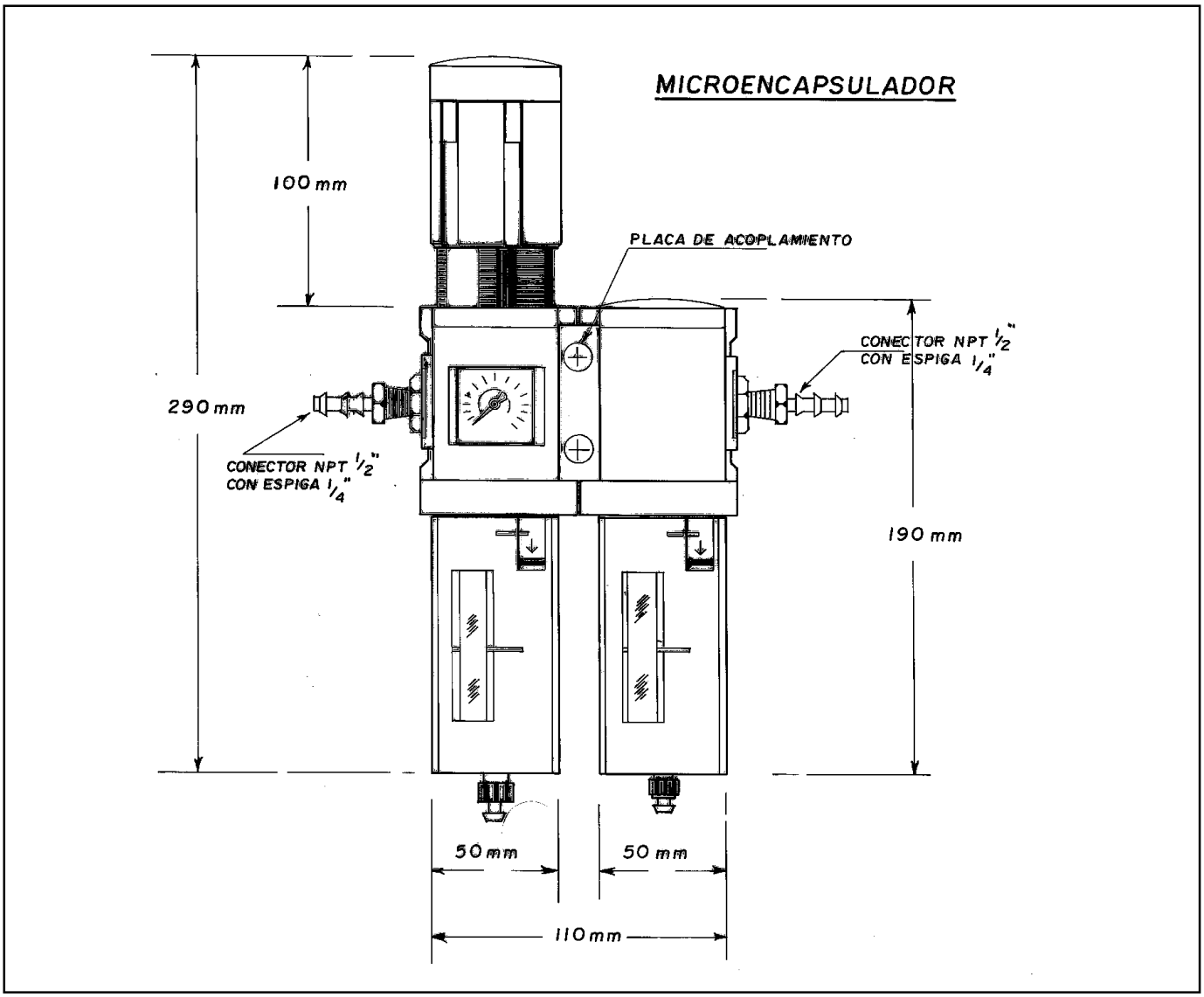


**Figura 1**. Unidad de filtrado con los componentes que conforman el dispositivo para microencapsular biocompuestos en una matriz biopolimérica.

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 a las 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 MICs conteniendo tres cepas de *B. subtillis* 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, y rendimiento de tomate y su actividad antagónica.

## Materiales y Métodos

### Construcción del equipo para producir microencapsulados

La fabricación de MICs 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 aspersión de mezclas y purificación del aire, para así mejorar la formación de MICs y evitar contaminaciones orgánicas e inorgánicas

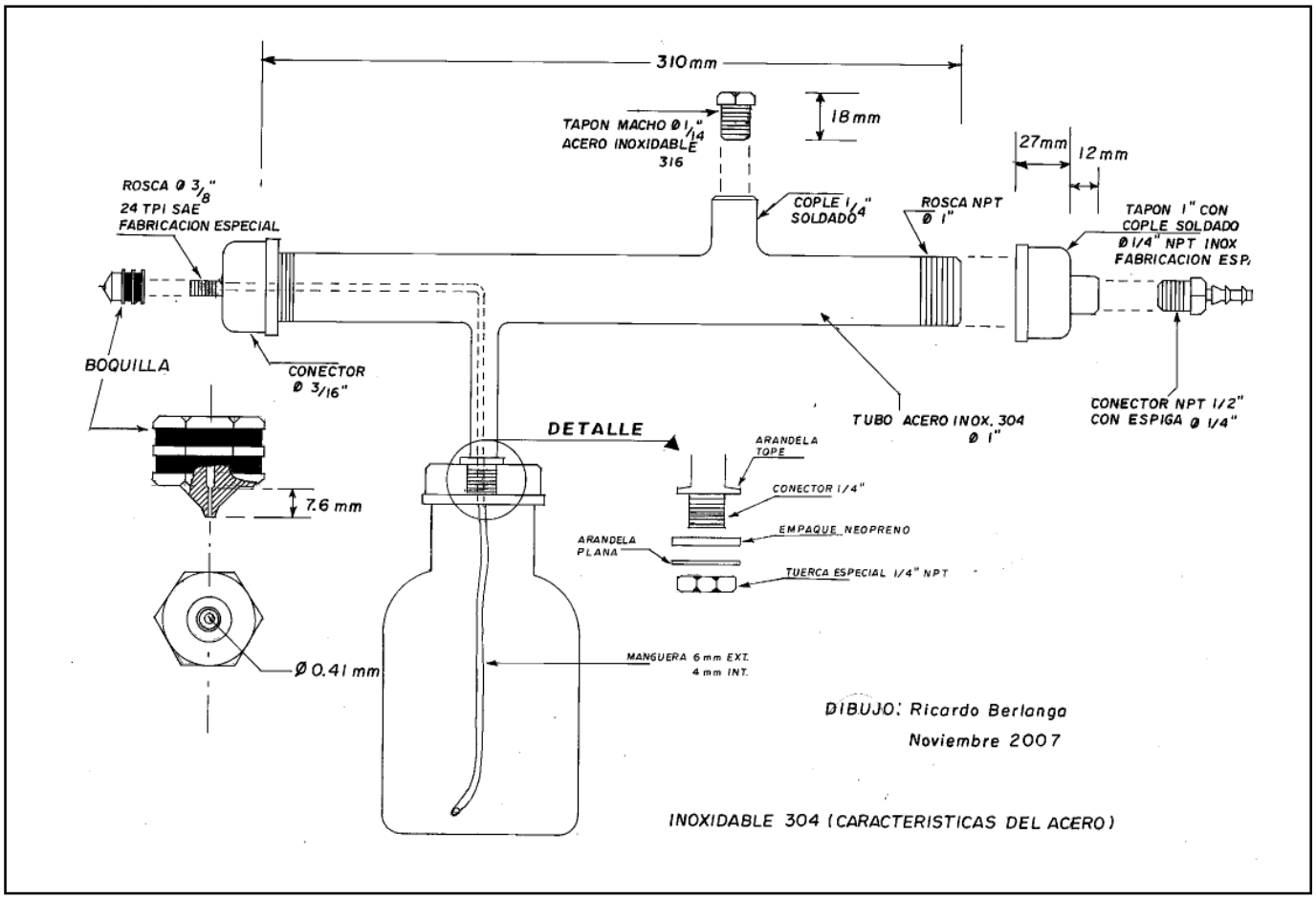


**Figura 2**. Dispositivo de acero inoxidable, y contenedor de vidrio, presurizado, en el que se realizó la combinación del hidrogel biopolimérico con las cepas bacterianas.

de las mismas. El equipo consta de un filtro regulador con un manómetro integrado para retener sólidos de hasta 0.04 mm, y 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 MICs consiste de un cuerpo de acero inoxidable con un diámetro interior de 1" con dos insertos de ¼" para las conexiones roscadas (Figura 2). En un inserto se pueden hacer mediciones de la presión en el interior de la recamara, 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 MICs conteniendo en su interior las cepas bacterianas.

### Preparación de los microencapsulados bacterianos

Se utilizaron tres cepas de *B. subtilis* identificadas como B1, J1, M2 y la mezcla de las tres (B1J1M2); las cepas anteriormente habían sido aisladas de parcelas comerciales (De La Garza, 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/24 h. 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 del espectrofotómetro UV-Visible Schimadzu 2401 PC a 540 nm a 1 de absorbancia, determinando que la muestra contenía $1x10^9$ UFC/mL aproximadamente. Finalmente se tomaron 20 mL de la suspensión bacteriana ajustada y se mezclaron con 80 mL de alginato de sodio al 2 % previamente esterilizado, dejando en agitación por 15 min. Los 100 mL conteniendo la mezcla de alginato de sodio y las cepas se vaciaron al contenedor del microencapsulador y se inició la aspersión. 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

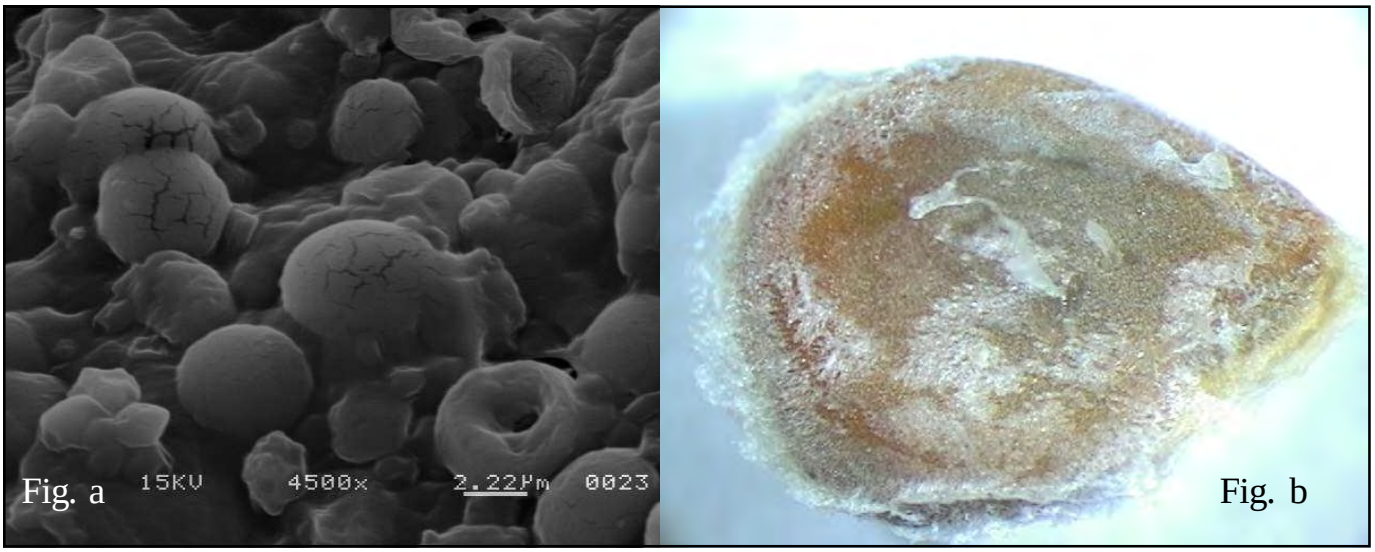


**Figura 3**. A la izquierda (Fig. a) se muestran los microencapsulados (4500 X) conteniendo las cepas bacterianas y a la derecha (Fig. b) se observa una semilla de tomaste cubierta con las microcápsulas (300 X).

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 MICs 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 MICs en cajas petri con papel filtro estéril y se secaron a 40 °C/72 h. Finalmente, para el recuento de las UFC/ mL, se disolvió 0.01g de MICs en un tubo conteniendo 1mL de solución salina, y se sembraron por extensión con varilla de vidrio en cajas petri, las cuales contenían 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 en un recipiente, se decantó el agua, y se adicionó una solución de tween 20 al 2 %, manteniéndolos en agitación durante 10 min; el tween se decantó, y se le adicionó una solución de $NaClO_3$ al 3% con agitación durante 5 min. Se adicionó una solución de $Na_2S_2O_3$ $5H_2O$ 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 una solución de pegamento vinílico (Resistol ®) al 0.5 % y se mezclaron con las MICs 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 *Bacillus* de MICs se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades previamente desinfectadas con una solución de $NaClO_3$ 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 por 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 MICs con *B. subtilis* a las macetas se realizó previamente al trasplante incorporando 0.01 g en una horadación 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. Por lo tanto se observaron plantas libres de suelo, y residuos orgánicos, para detectar el número de plantas sanas y enfermas; considerándose enfermas aquellas que mostraban síntomas típicos de tallos con lesiones necróticas, marchites, pardeamiento y destrucción de la corteza, y del cilindro central de la raíz. La proporción de plantas con raíces dañadas se expresó en porcentaje. Para establecer el grado de severidad del daño de los hongos se determinó el peso de raíz dañada; cuantificando el peso total de raíz dañada por los patógenos y se pesó. Con estos datos se determinó el porcentaje en peso de raíz dañada. La determinación de la severidad del daño se realizó 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 crecimiento y área foliar (Cuadro 1). En cuanto a altura de plantas la mezcla de las cepas (B1J1M2) mostró ser más eficaz para estimular el 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 MICs mostraron en promedio 18.2 % mayor altura que los TQ y TA. 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 *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 este estudio el área foliar de plantas de tomate también mostró ser influida por los tratamientos con MICs ya que produjeron más 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 han consignado Viera y Álvarez (2006).

**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 ($cm^2$) |
|---|---|---|
| *Bacillus* B1 | 119.47 a | 6857.01 b |
| *Bacillus* J1 | 118.65 a | 7762.92 a |
| *Bacillus* M2 | 102.95 b | 5393.32 b |
| Mezcla de *Bacillus* | 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, pd”0.01)

### Efecto en producción de biomasa y rendimiento

La biomasa seca de hojas por planta fue claramente estimulada con los MICs de *Bacillus* (Cuadro 2), ya que las cepas B1 y J1 reportaron los máximos valores (116.41 y 107.57 g), 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.

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

| Tratamientos | Hojas | Tallos | Raices |
|---|---|---|---|
| *Bacillus* B1 | 116.41 a | 30.31 ab | 31.28 c |
| *Bacillus* J1 | 107.57 a | 31.92 ab | 38.76 b |
| *Bacillus* M2 | 87.67 b | 27.90 b | 32.04 c |
| Mezcla de *Bacillus* | 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 d” 0.01)

La biomasa producida en los tallos también resultó afectada favorablemente con la aplicación de MICs ya que la mezcla de las cepas (B1J1M2) produjo, en promedio, 34.69 gr, resultando estadísticamente superior (P<0.01) a

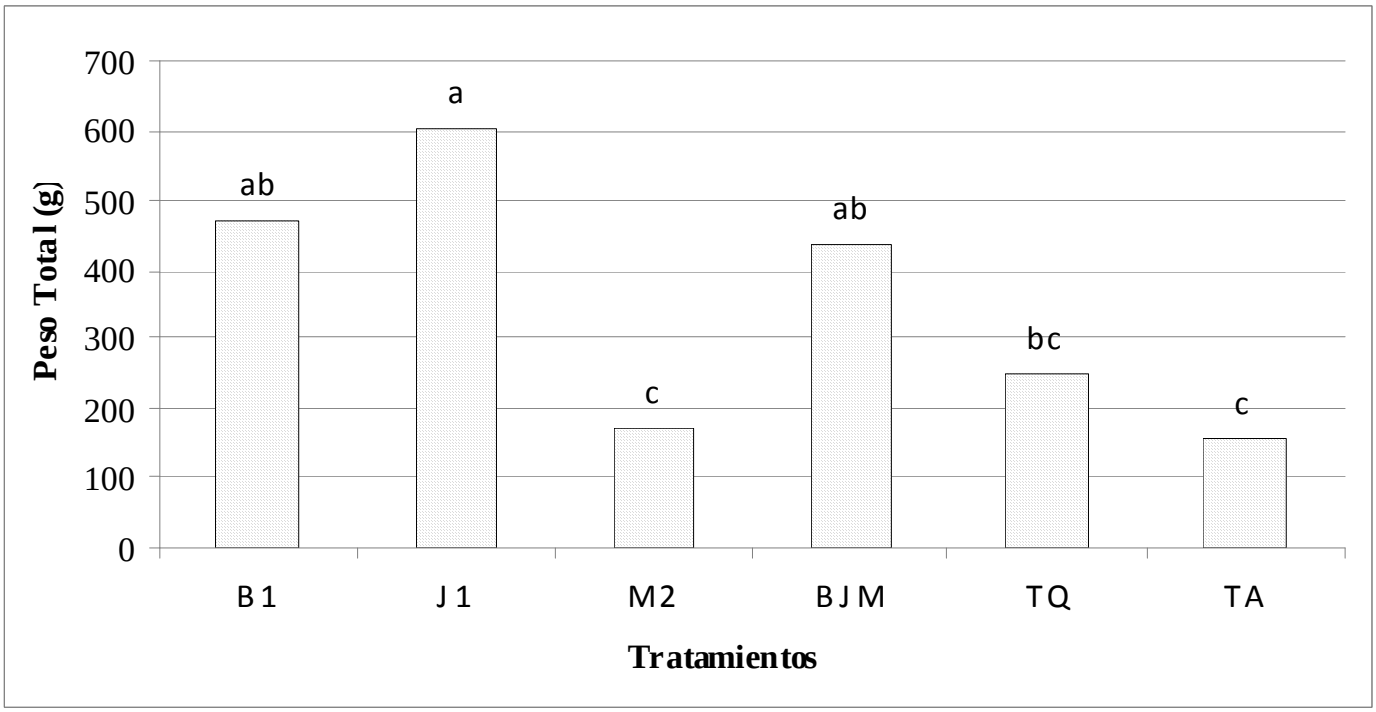


**Figura 4**. Rendimiento promedio de plantas de tomate sometidas a tratamientos de cepas bacterianas de *Bacillus subtilis* microencapsuladas. Testigo químico (TQ); Testigo absoluto (TA)

los dos tratamientos testigo, ya que el TQ reportó 28.06 g y el TA sólo 14.57 g. Esto representa 19.3 y 58 %, respectivamente, menos biomasa seca de tallos. Estos resultados son coincidentes con lo reportado por De la Garza-Rodríguez (2005) quien señala que los tratamientos con una mezcla de diferentes cepas nativas de *B. subtilis* produjeron raíces significativamente más 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, y biomasa aérea y radicular de las plantas.

Por lo que respecta a biomasa radicular la tendencia estimuladora de los MICs 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 g mientras que el TA reportó solo 13.92 gr, esto significa una diferencia de 85.6 % menos biomasa radicular, en plantas testigo que no recibieron aplicación de fungicida, en cambio el testigo químico, con aplicaciones de tiabendazol, reportó 33.38 g; 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 MICs de *Bacillus* estimularon significativamente ($P<0.01$) el rendimiento ya que la cepa J1 reportó en promedio 600 g por planta, mientras que el TA solo 180 g; 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 puede considerarse que proporcionan grandes ventajas para su utilización en la agricultura sustentable o ecológica (Shah *et al.,* 2006).

**Efecto de las cepas microencapsuladas en incidencia y severidad**

La incidencia del daño radicular al final de ciclo causado por *R. solani* y *Fusarium* sp. que fueron inoculados al suelo de las macetas fue inexistente en los tratamientos con MICs de *Bacillus* B1, J1 y la mezcla de las tres bacterias (Cuadro 3), lo que resultó estadísticamente inferior ($P<0.01$) a 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 MICs proporcionaron una protección muy evidente en los tratamientos B1, J1 y la mezcla de las tres. 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 |
|---|---|---|
| *Bacillus* B1 | 0 d | 0 c |
| *Bacillus* J1 | 0 d | 0 c |
| *Bacillus* M2 | 12 c | 1.5 c |
| Mezcla de *Bacillus* | 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, Pd• 0.01)

## Conclusiones

El aparato construido, y adaptado, fue eficaz para elaborar microcápsulas conteniendo cepas de *B. subtilis* que mostraron poder estimular el crecimiento de plantas, producción de biomasa y rendimiento de frutos; ejercieron, además, un claro biocontrol ya que redujeron la incidencia y severidad de la enfermedad al inhibir la actividad infectiva de *R. solani* y *Fusarium* sp. 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 y al FOMIX-Campeche por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo. Al CIQA por permitir 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.

González, 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 marchitez del chile Phyton Int. J. Exp. Bot..

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 Álvarez, B.D. 2006. Practical applications of bacterial biofertilizers and biostimulators. Biological Approaches to Sustainable Soil Systems 113: 467-477

Wiwattanapatapee, 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.

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.