

## SELECCIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS* Y OTROS GÉNEROS RELACIONADOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Yaritza Reinoso Pozo,<sup>1</sup> Daymara Vaillant Flores,<sup>2</sup> Luis Casadesús Romero,<sup>1</sup> Ernesto García Pérez<sup>1</sup> y Victoria Pazos Álvarez-Rivera<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad de La Habana, Departamento de Microbiología. Calle 25 no. 455 esq. a J, La Habana, CP 10400, yreinoso@fbio.uh.cu

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

### RESUMEN

Se aislaron del suelo cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados, y se determinó su efecto antagónico frente a los hongos fitopatógenos *Alternaria solani* Sor y *Rhizoctonia solani* Kühn mediante enfrentamiento de cultivos duales. El efecto antifúngico de los metabolitos producidos por los aislados antagonistas se evaluó in vitro por el método de envenenamiento del medio de cultivo. Aquellas cepas que mostraron los mejores resultados se identificaron hasta especie. Se aisló un total de 85 cepas bacterianas, de las cuales 18 mostraron efecto antagónico in vitro frente a *A. solani* y *R. solani*. Los metabolitos producidos por la mayoría de estas cepas inhibieron en más de 50% el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos. Fueron seleccionadas siete cepas como promisorias para el control biológico in vivo, las cuales pertenecen a las especies *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus licheniformis*.

Palabras claves: *Bacillus*, control biológico, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*

### ABSTRACT

Soil bacteria belonging to *Bacillus* and other related genera were isolated from soil and screened for antagonism against fungal pathogens *Alternaria solani* and *Rhizoctonia solani* by dual-culture assay. Antifungal effect of metabolites produced by antagonistic bacteria was evaluated in vitro using the method of culture media poisoning. Strains that showed best results were identified up to specie. A total of 85 bacterial strains were obtained, 18 of them showed antagonistic effect against *A. solani* and *R. solani* in vitro. Metabolites produced by most of strains inhibited the mycelia growth of pathogenic fungi in more than 50%. Seven strains were selected as good candidates for biological control in vivo; these belong to the species *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus licheniformis*.

Key words: *Bacillus*, biological control, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*

### INTRODUCCIÓN

*Alternaria solani* Sor y *Rhizoctonia solani* Kühn son hongos fitopatógenos que poseen un amplio rango hospedero que incluye algunos cultivos de importancia económica como la papa (*Solanum tuberosum* L.) y el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) [Krechel *et al.*, 2002].

Para el control de estos patógenos se aplican diversos fungicidas de acción protectora y también de carácter sistémico [Almandoz *et al.*, 2000]. Aunque el principal método de manejo de las enfermedades causadas por *A. solani* y *R. solani* ha sido el control químico, los problemas de contaminación ambiental que han impactado negativamente en la biodiversidad de los agroecosistemas, así como de seguridad y salud pública inherentes al uso inadecuado de los agroquímicos,

condujeron a la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas [Zavaleta-Mejía, 2000].

Actualmente se prefiere en la agricultura el uso de prácticas más ecológicas como el control biológico, mediante el uso de microorganismos antagonistas, los cuales pueden limitar la iniciación y propagación de las enfermedades causadas por patógenos vegetales mediante mecanismos de competencia, antibiosis, inducción de resistencia, entre otros [Fernández-Larrea, 2001].

Entre los agentes de control biológico más estudiados se encuentran los microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* [Whipps, 2001]. Estos últimos están considerados como excelentes candidatos para el desarrollo de bioproductos aplicables en el campo para el control de enfermedades de origen fúngico.

Los objetivos del presente trabajo fueron aislar, seleccionar e identificar hasta especie, cepas de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* con potencialidades para el biocontrol de *A. solani* y *R. solani*, y determinar el efecto inhibitorio de los metabolitos producidos por las cepas antagonistas sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos fitopatógenos antes mencionados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Como material biológico se emplearon cepas de los hongos *Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani*, conservadas en medio de cultivo PDA (OXOID), y la cepa *Bacillus subtilis* BS18, conservada en medio de cultivo agar nutriente, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana.

Se colectaron muestras de suelos de unos 100 g procedentes de regiones paperas de los municipios de Güines, San José de las Lajas y Quivicán, de la provincia de La Habana, tomadas a una profundidad de 2 a 5 cm, se colocaron en bolsas de plástico para trasladarlas al laboratorio y se conservaron en un lugar fresco hasta su utilización.

Para el aislamiento de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* se resuspendió asépticamente 1 g de suelo en 10 mL de agua destilada estéril, y se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^3$ , y esta última se sometió a un tratamiento térmico de 85°C durante 15 min. Se tomaron alícuotas de 100 µL de la dilución tratada y se sembraron con espátula de Drigalsky en placas Petri con medio de cultivo agar nutriente. Las placas se incubaron durante 72 h a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo se colectaron las colonias de morfología variada y se sembraron nuevamente para garantizar la pureza del cultivo. A las 24 h se realizó la prueba de la catalasa y a las 48 h una tinción simple con violeta cristal, y se observó al microscopio óptico con un aumento de 1000X. Los aislamientos que resultaron positivos a la catalasa y esporulados con morfología bacilar se conservaron en frascos con agar nutriente a 4°C hasta su posterior uso, y se les colocó un código de letras y números de acuerdo con el lugar de procedencia y al orden de aparición hasta su identificación a nivel de especie.

El efecto antagonista de las cepas aisladas frente a los hongos *A. solani* y *R. solani* se determinó por el método de enfrentamiento de cultivos duales, para lo que se sembraron las cepas bacterianas en un extremo de pla-

cas con medio de cultivo PDA, y en el extremo opuesto del crecimiento bacteriano se colocaron discos de 1 cm de diámetro de cultivos de los hongos fitopatógenos crecidos durante cinco días. Las placas se incubaron durante siete días para *A. solani* y cuatro para *R. solani* a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Los experimentos se realizaron por duplicado, y como control positivo se utilizaron placas con PDA sembradas con cada uno de los hongos fitopatógenos, en ausencia de las cepas bacterianas en el extremo opuesto al disco fúngico. Aquellas cepas bacterianas que no permitieron el pleno desarrollo micelial de los hongos fitopatógenos se seleccionaron para el experimento siguiente.

El efecto inhibitorio de los metabolitos producidos por las cepas antagonistas frente a *A. solani* y *R. solani* se determinó por el método de envenenamiento del medio de cultivo, a partir de cultivos de 24 h de crecimiento en medio agar nutriente en plano inclinado, se prepararon suspensiones de las cepas bacterianas correspondientes al patrón 0,5 ( $10^8$  UFC/mL) de la escala de MacFarland y se inocularon en frascos con 50 mL de medio de cultivo de caldo-papa-dextrosa. Los cultivos inoculados se colocaron en zaranda orbital termostataada durante 72 h a 120 rpm y  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Transcurrido este período se tomaron alícuotas de 1,5 mL de los cultivos bacterianos centrifugados durante 15 min, se desechó la biomasa bacteriana y el sobrenadante se filtró al vacío con filtros de 0,2 µm. Se añadió 1 mL de sobrenadante de cada una de las cepas bacterianas a 25 mL de medio de cultivo PDA fundido. Una vez solidificado el medio se colocaron en el centro de la placa discos de PDA de 1 cm de diámetro con crecimiento fúngico de los hongos fitopatógenos. Las placas se incubaron a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  durante los períodos de incubación establecidos para cada hongo fitopatógeno. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se utilizó como control positivo placas con los hongos fitopatógenos en medio PDA inoculado con 1 mL de medio de caldo-papa-dextrosa estéril. Posteriormente se midió el diámetro de las colonias y se determinó el porcentaje de inhibición mediante la fórmula descrita por Bashan *et al.* (1996):

$$\text{Inhibición}(\%) = \frac{DCC - DCT}{DCC} 100$$

donde:

DCC: Diámetro de la colonia control

DCT: Diámetro de la colonia tratada

Las cepas antagonistas que mostraron los mejores efectos inhibitorios se identificaron hasta especie según las pruebas fisiológicas y bioquímicas propuestas por Claus y Berkeley (1986) para el género *Bacillus* en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, y de acuerdo con la metodología descrita por Harrigan y McCance (1984). Se realizaron pruebas de producción de ácido, gas y acetoina a partir de la glucosa, producción de ácido a partir del manitol, hidrólisis del almidón, gelatina y caseína, crecimiento en agar nutriente suplementado con NaCl (7%), agar citrato de Simmons, agar Sabouraud, crecimiento anaerobio, prueba de reducción de nitratos y producción de lecitinasa. Se empleó además el sistema miniaturizado API 50CHB/E y como control la cepa *Bacillus subtilis* BS18.

Los datos se procesaron mediante análisis de varianza de clasificación simple, se verificó la normalidad y homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Kolmogorov Smirnov y Bartlett respectivamente, y las medias se analizaron mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) por el programa Statistica versión 6.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 85 aislados bacterianos con características morfológicas semejantes a las de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus*. Todas las cepas respondieron positivamente a la tinción de Gram y a la prueba de la catalasa, presentaron endosporas bacterianas y células vegetativas con morfología bacilar.

En estudios realizados por otros autores también se ha empleado el suelo para obtener aislados de estos géneros, ya que a pesar de la ubicuidad de estos microorganismos se plantea que el suelo es uno de sus principales hábitats. Garbeva *et al.* (2003) realizaron estudios de la microbiota de suelos agrícolas mediante técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y determinaron que aproximadamente 95% del ADN presente en ellos pertenecía a especies de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*.

Del total de cepas bacterianas aisladas solo 18 (21,17%) inhibieron el pleno desarrollo micelial de *A. solani* (Fig. 1A), mientras que 17 (20%) tuvieron este mismo efecto sobre *R. solani* (Fig. 1B).

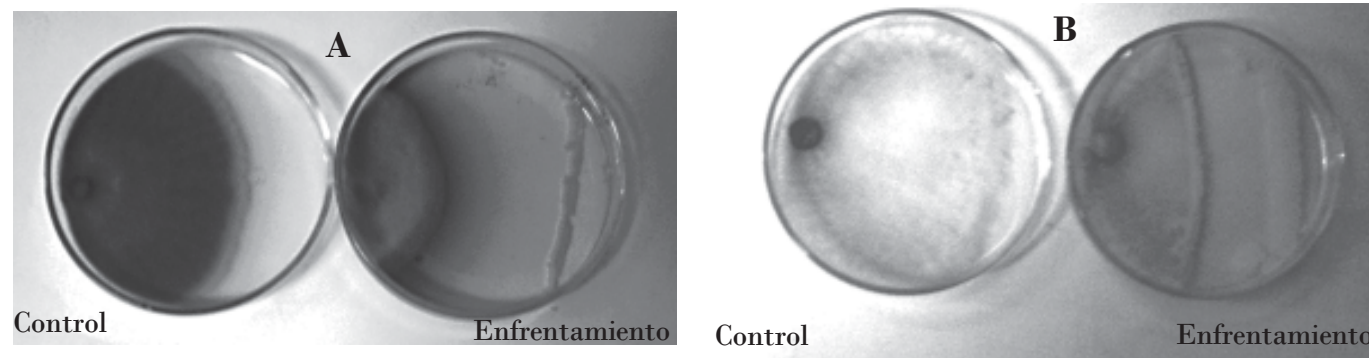


Figura 1. Antagonismo *in vitro* de las cepas bacterianas aisladas frente a *A. solani* y *R. solani*. A: Efecto inhibitorio de la cepa S6 frente a *Rhizoctonia solani*. B: Efecto inhibitorio de la cepa G23 frente a *Alternaria solani*.

De forma general existen diversas informaciones del efecto antifúngico *in vitro* de cepas del género *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos, entre los que se encuentran *Fusarium solani*, *A. solani*, *Pythium ultimum* y *R. solani* [Fernández-Larrea, 2001] [Yoshida *et al.*, 2001] [Moussa, 2002].

Okumoto *et al.* (2001) tuvieron resultados semejantes a los presentes en el control de *A. solani* *in vitro* mediante cepas de *Bacillus* spp., algunas de las cuales se consideraron por estos autores como aislados promisorios para el control *in vivo*, dados los efectos antagónicos observados *in vitro*. En la literatura se encuentra poca información actualizada relacionada con el uso de *Bacillus* y otros géneros afines para el

biocontrol de *A. solani*. Ello puede deberse a que actualmente existe la tendencia de emplear estos microorganismos para la inducción de resistencia sistémica en plantas, como un nuevo mecanismo de control biológico que provee una protección efectiva frente al ataque de hongos fitopatógenos, causantes de enfermedades foliares como el tizón temprano, provocado por *A. solani* [Silva *et al.*, 2004].

Entre los microorganismos empleados para el control biológico de *R. solani* se destacan *Pseudomonas fluorescens* y miembros del género *Bacillus* [Asaka y Shoda, 1996]. Los resultados del presente trabajo coinciden con otros reportados en la literatura sobre el biocontrol de *R. solani*, en los que utilizan cepas de *Bacillus*. Faltan

*et al.* (2004) desarrollaron una estrategia para probar las potencialidades de bacterias asociadas a plantas en el biocontrol de *R. solani*. Entre los principales aislados antagonistas hallaron cepas de *Bacillus* spp. De forma semejante Talbot y Larkin (2005) compararon la eficacia de diferentes agentes de control biológico para el control de *R. solani*, y demostraron que los tratamientos más efectivos fueron aplicaciones de una cepa de *Bacillus* y *Trichoderma viridens*. Estos estudios sugieren que los miembros de este género pueden em-

plearse de forma eficaz en el control de este hongo fitopatógeno.

Aproximadamente el 44,4% de las cepas produjo metabolitos que inhibieron al 100% el crecimiento de *A. solani*. Los metabolitos secretados por las cepas G10, G11, Q2, Q7, Q8, Q18 y S1 produjeron, en todos los casos, más de 60% de inhibición, y no se observaron diferencias significativas entre los efectos inhibitorios producidos por ellos (Fig. 2). Los metabolitos secretados por las cepas Q4 y G20 fueron los de menor actividad antagonista.

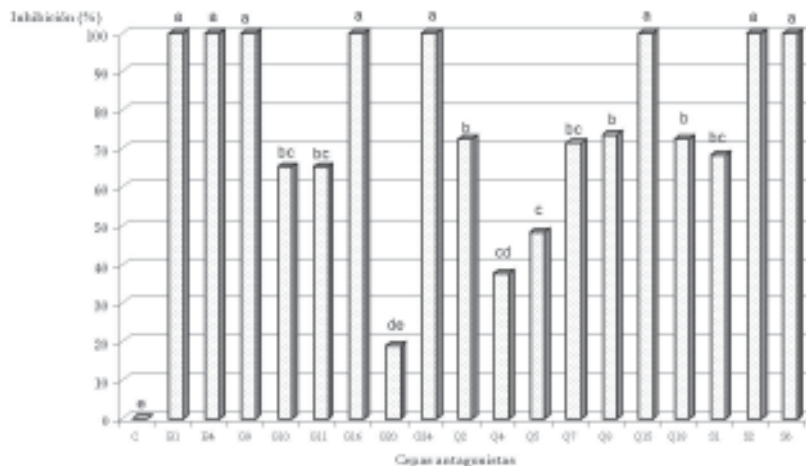


Figura 2. Efecto inhibitorio de los metabolitos producidos por las cepas antagonistas sobre el crecimiento micelial de *A. solani*.

Solamente los metabolitos producidos por la cepa Q15 inhibieron al 100% el crecimiento micelial de *R. solani* (Fig. 3). La mayoría de las cepas antagonistas produjeron metabolitos que inhibieron en más de 55% el crecimiento de *R. solani*. En estas condiciones experimentales los metabolitos producidos por las cepas Q4 y Q5 fueron los de menor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de este hongo fitopatógeno.

Algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* producen varios tipos de metabolitos, algunos de los cuales poseen actividad antifúngica. Estos compuestos tienen una importancia fundamental en el control biológico de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Gaeummanomyces*, *Pythium* y *Phytophthora*, y por su importancia muchos se han estudiado y caracterizado. Tal es el caso de los compuestos de naturaleza peptídica y lipopeptídica, entre los que se encuentran las micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, micosubtilinas y

fungistatinas [Souto *et al.*, 2004]. Existen cepas de estos microorganismos que pueden coproducir además metabolitos antifúngicos volátiles y enzimas quitinolíticas [Montealegre *et al.*, 2003; Sadfi *et al.*, 2001] con efecto antifúngico, lo que podría explicar el hecho de algunos de los aislados bacterianos empleados en este estudio inhiban totalmente el crecimiento micelial de *A. solani* y *R. solani*.

Estas propiedades de los miembros del género *Bacillus* se han aprovechado para la obtención de formulaciones líquidas comercializables, cuyo principio activo está constituido por los metabolitos antifúngicos producidos por estas bacterias, como el elaborado a partir de una cepa patentada de *Bacillus subtilis* (QST713), que contiene más de treinta compuestos bioquímicos de tipo lipopeptídico y que provee un control efectivo para un amplio espectro de enfermedades en frutales, hortalizas y flores causadas por hongos [McSpadden, 2002].



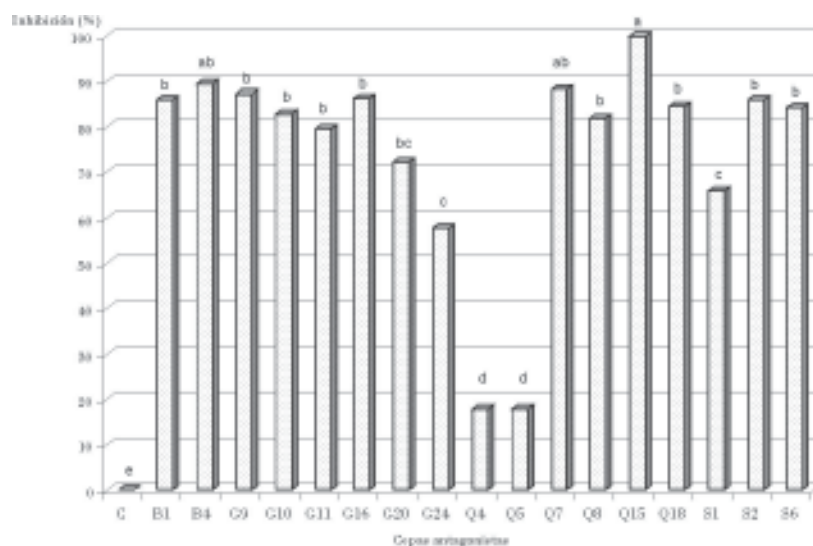


Figura 3. Efecto inhibitorio de los metabolitos producidos por las cepas antagonistas sobre el crecimiento micelial de *R. solani*.

Se identificaron hasta especie siete cepas antagonistas que inhibieron el crecimiento micelial de *A. solani* y *R. solani*

más de 80%. Los resultados de identificación mediante el sistema API 50 CHB/E se muestran en la *Tabla 1*.

**Tabla 1. Identificación de los aislados antagonistas con mejores resultados mediante el sistema API**

Cepas	Especie	Similitud (%)
B1	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,0
B4	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	98,7
G9	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	99,7
G16	<i>Bacillus subtilis</i>	98,7
Q15	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9
S2	<i>Bacillus subtilis</i>	97,6
S6	<i>Bacillus licheniformis</i>	93,3
BS18	<i>Bacillus subtilis</i>	99,9

Las cepas B1 y S6 se identificaron como *Bacillus licheniformis*. Drahos y West (2004) aislaron una cepa de esta especie del suelo que presenta efecto antagónico frente a un amplio grupo de hongos fitopatógenos de los géneros *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Bipolaris*, *Aspergillus* y *Pyricularia*, lo que demuestra las potencialidades de algunas cepas de esta especie para el biocontrol. Sin embargo, a pesar de que *Bacillus licheniformis* es muy abundante en el suelo, sus posibles aplicaciones como agente de control biológico de microorganismos fitopatógenos no se han estudiado con intensidad.

Las cepas B4 y G9 corresponden a la especie *Paenibacillus polymyxa*, antiguamente *Bacillus polymyxa*. Otros autores han empleado cepas de esta especie aisladas de diferentes ecosistemas para el control biológico de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* [Helbig, 2001], *Leptosphaeria maculans* [Beatty y Jensen, 2002], *Sclerotinia* spp., *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* spp., *Pythium* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. [Kharbanda *et al.*, 2003].

Las cepas G16, Q15 y S2 corresponden a la especie *Bacillus subtilis* que se encuentra ampliamente distri-

buida en ambientes naturales como el suelo. Entre el grupo de bacterias utilizadas como agentes de control biológico, quizás una de las especies más estudiadas sea *Bacillus subtilis*.

Las bacterias de esta especie muestran efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos como *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Monilinia* spp., entre otros [Lehman *et al.*, 2003], y producen varios tipos de metabolitos con efecto antifúngico y sideróforos que facilitan el mecanismo de competencia por el hierro con los microorganismos fitopatógenos [Leclerc *et al.*, 2005].

Existen bioproductos comercializables que contienen esta especie como componente biológico activo y se utilizan en campo para el control de enfermedades causadas fundamentalmente por hongos del suelo que atacan la raíz de las plantas [McSpadden, 2002].

## CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 85 aislados bacterianos con características semejantes a las de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus*.
- El 21,17% de las cepas bacterianas aisladas inhibió el pleno desarrollo micelial de *A. solani*, mientras que 20% tuvo este mismo efecto sobre *R. solani*.
- Siete cepas se seleccionaron como promisorias para el control biológico de los hongos fitopatógenos estudiados, correspondientes a las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Paenibacillus polymyxa*.

## REFERENCIAS

- Almandoz, J.; V. M. Pico; L. Pérez; F. Rodríguez; J. Parra: «Efectividad de nuevos fungicidas para el control de *Alternaria solani* Ellis y Martin en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.)», XIX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP), 28 febrero-3 marzo, La Habana, 2000.
- Asaka, O.; M. Shoda: «Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14», *Applied and Environmental Microbiology* 62:4081-4085, 1996.
- Bashan, J.; G. Holgueri; R. Ferrera: «Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos», *Terra* 14:159-192, 1996.
- Beatty, P.; S. Jensen: «*Paenibacillus polymyxa* Produces Fusaricidin-Type Antifungal Antibiotics Active Against *Leptosphaeria maculans*, the Causative Agent of Blackleg Disease of Canola», *Canadian Journal of Microbiology* 48:159-69, 2002.
- Claus, D.; R. Berkeley: «Genus *Bacillus*, Cohn 1872», *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., vol. 2, Baltimore, 1986, pp. 1105-1139.
- Drahoš, D.; L. West: «*Bacillus licheniformis* Biofungicide», United States Patent 6824772, 2004.
- Faltin, F.; J. Lottmann; R. Groch; G. Berg: «Strategy to Select and Assess Antagonistic Bacteria for the Biological Control of *Rhizoctonia solani* Kühn», *Canadian Journal of Microbiology* 50:811-820, 2004.
- Fernández-Larrea, O.: «Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario», *Revista Manejo Integrado de Plagas* 62:96-100, 2001.
- Garveba, P.; J. van Veen; J. van Elsas: «Predominant *Bacillus* spp. in Agricultural Soil Under Different Management Regimes Detected Via PCR-DGGE», *Microbial Ecology* 45:302-316, 2003.
- Harrigan, W. F.; M. MacCance: «Métodos de laboratorio en microbiología», *Técnicas de microbiología aplicada*, Ed. Academia León, 1968, pp. 122-180.
- Helbig, B.: «Biological Control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in Strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191)», *Journal of Phytopathology* 149:265-273, 2001.
- Kharbanda, P.; R. Coleman; P. Beatty; S. Jensen; J. Tewari; J. Yang: «*Paenibacillus polymyxa* strain ATCC 202127 for Biocontrol of Bacteria and Fungi», United States Patent 6602500, 2003.
- Krechel, A.; A. Faupel; J. Hallmann; A. Ulrich; G. Berg: «Potato-Associated Bacteria and Their Antagonistic Potential Towards Plant-Pathogenic Fungi and the Plant-Parasitic Nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood», *Canadian Journal of Microbiology* 48:772-786, 2002.
- Leclerc, V.; M. Bechet; A. Adam; J. Guez; B. Wathélet: «Mycosubtilin Overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 Enhances Theor-ganism's Antagonistic and Biocontrol Activities», *Applied and Environmental Microbiology* 7:4577-4584, 2005.
- Lehman, L.; R. McCoy; B. Messenger; D. Manker; J. Orjala; D. Lindhard; G. Pamela: «Strain of *Bacillus* for Controlling Plant Diseases», United States Patent 6586231, 2003.
- McSpadden, B.; B. Gardener; D. Fravel: «Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA», On line *Plant Health Progress* 94:316-322, 2002.
- Montealegre, J.; R. Reyes; L. Pérez; R. Herrera; P. Silva; X. Besoain: «Selection of Bioantagonistic Bacteria to Be Used in Biological Control of *Rhizoctonia solani* in Tomato», *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458, *Environmental Biotechnology* vol. 6, no. 2.
- Mousa, T.: «Studies on Biological Control of Sugarbeet Pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn», On Line *Journal of Biological Sciences* 2:800-804, 2002.
- Okumoto, S.; E. Bustamante; A. Gamboa: «Actividad de cepas de bacterias quitinolíticas antagonistas a *Alternaria solani* in vitro», *Revista Manejo Integrado de Plagas*, no. 59 (versión electrónica, resumen), 2001.
- Sadfi, N.; M. Chérif; I. Fliss; A. Bondabous; H. Antoun: «Evaluation of Bacterial Isolates from Salty Soils and *Bacillus thuringiensis* Strains for the Biocontrol of *Fusarium* Dry Rot of Potato Tubers», *Journal of Plant Pathology* 83:101-118, 2001.
- Silva, A.; R. Romeiro; R. Carrer; J. Pereira: «Induction of Systemic Resistance by *Bacillus cereus* Against Tomato Foliar Diseases Under Field Conditions», *Journal of Phytopathology* 152:371-375, 2004.
- Souto, G.; O. Correa; M. Montecchia; N. Kerber; N. Pucheu; M. Bachur; A. García: «Genetic and Functional Characterization of a *Bacillus* sp. Strain Excreting Surfactin and Antifungal Metabolites Partially Identified As Iturin-Like Compounds», *Journal of Applied Microbiology* 97:1247-1256, 2004.
- Talbot, M.; R. Larkin: «Efficacy of Several Potential Biocontrol Organisms Against *Rhizoctonia solani* on Potato», *Crop Protection* 21:123-138, 2005.
- Whipps, J.: «Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere», *Journal of Experimental Botany* 52:487-511, 2001.
- Yoshida, S.; S. Hiradate; T. Tsukamoto; K. Hatakeda; A. Shirata: «Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amylo-lifaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves», *Biological Control* 91:181-187, 2001.
- Zavaleta-Mejía, E.: «Alternativas del manejo de las enfermedades de las plantas», *Terra* 17:202-217, 2000.