



ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE *BACILLUS SP* FRENTE A *FUSARIUM OXYSPORUM*: UN APORTE A LA AGRICULTURA SOSTENIBLE

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *BACILLUS SP* AGAINST *FUSARIUM OXYSPORUM*: A CONTRIBUTION TO SUSTAINABLE AGRICULTURE

Cristian Alonso Rodríguez Gonzalez¹
Jhojan Estefan Buitrago²
Adrián David Betancurt³
Ronald Lara Cardenas⁴

Recibido: 13 de julio de 2017
Aceptado: 09 de octubre de 2017

Resumen

Fusarium oxysporum es un hongo fitopatógeno capaz de afectar una amplia variedad de cultivos de importancia económica, causando generalmente pudriciones vasculares. Para controlar este tipo de patógenos vegetales se emplean diversos fungicidas que generan problemas de contaminación ambiental, los cuales surgen de forma colateral impactando negativamente en la biodiversidad, por tal motivo, la comunidad científica se ha enfocado en la búsqueda de nuevas alternativas. Este trabajo procuró el aislamiento de bacterias del género *Bacillus* sp, que pudieran tener actividad antagonista frente a *Fusarium oxysporum*. Se aislaron 22 cepas microbianas del género *Bacillus* sp a partir de suelo, los microorganismos fueron aislados mediante diluciones decimales en agua peptonada y se sometieron a shock térmico a 80°C por 10 minutos, posteriormente se realizó siembra en superficie en agar nutritivo. Se seleccionaron las cepas que fueran positivas para tinción de Gram, oxidasa y presencia de esporas. Las cepas aisladas fueron evaluadas mediante la técnica de cultivos duales para comprobar si poseían actividad antagonista frente a *Fusarium oxysporum*. Se evaluó también la actividad quitinolítica de los microorganismos realizando siembra en agar quitina coloidal para determinar si

-
- 1. Colombiano. Esp. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA del Centro de Automatización Industrial, Facilitador Tecnoacademia SENA Regional Caldas. Bacteriólogo. Grupo EAYER. email: carodriguez880@misena.edu.co
 - 2. Colombiano. Aprendiz de la Tecnoacademia Manizales Servicio Nacional de Aprendizaje SENA del Centro de Automatización Industrial. Grupo EAYER. email: jhojanbuitrago3@gmail.com.
 - 3. Colombiano. Aprendiz de la Tecnoacademia Manizales Servicio Nacional de Aprendizaje SENA del Centro de Automatización Industrial. Grupo EAYER. email: adriandavid201500@gmail.com.
 - 4. Colombiano. Aprendiz de la Tecnoacademia Manizales Servicio Nacional de Aprendizaje SENA del Centro de Automatización Industrial. Grupo EAYER. email: ronalcardenas455@gmail.com.

la producción de quitinasas es el mecanismo implicado en la antibiosis frente al fitopatógeno. De las 22 cepas aisladas, *Bacillus* sp Tam_0013 mostró capacidad para inhibir en un 78% el desarrollo del fitopatógeno, presentando una diferencia estadísticamente significativa frente a los demás microorganismos ($p < 0,05$).

Palabras clave: *Bacillus* sp, antagonismo, *Fusarium oxysporum*, actividad quitinolítica.

Abstract

Fusarium oxysporum is a phytopathogenic fungus capable of affecting a wide variety of economically important crops, usually causing vascular decay. In order to control this type of plant pathogens, several fungicides are used which generate environmental contamination problems; these problems arise collaterally impacting negatively on biodiversity. For this reason, the scientific community has focused on the search for new alternatives. This work investigates the isolation of bacteria of the genus *Bacillus* sp, that could have antagonistic activity against *Fusarium oxysporum*. 22 microbial strains of the *Bacillus* sp genus were isolated from soil, the microorganisms were isolated by decimal dilutions in peptone water and they were subjected to thermal shock at 80 ° C for 10 minutes, Subsequently, sowing on the surface was carried out on nutritive agar. Positive Strains for Gram staining, oxidase and presence of spores were selected. The isolated strains were evaluated by the dual culture technique to check if they possessed antagonistic activity against *Fusarium oxysporum*. The chitinolytic activity of the microorganisms was also evaluated by performing seeding on colloidal chitin agar to determine if the production of chitinases is the

mechanism involved in the antibiosis against the phytopathogen. Of the 22 isolated strains, *Bacillus* sp Tam_0013 was able to inhibit the development of the phytopathogen by 78%, showing a statistically significant difference compared to the other microorganisms ($p < 0.05$).

Keywords: *Bacillus* sp, antagonism, *Fusarium oxysporum*, chitinolytic activity

Introducción

Fusarium oxysporum es un hongo fitopatógeno que posee un amplio rango hospedero que incluye cultivos de importancia económica como el banano, lulo, pepino cohombro, arveja, clavel y tomate, este hongo penetra por la raíz y *coloniza* el tallo de las plantas hasta afectar el sistema vascular (Correa- Peñuela, 2002).

En Colombia, en la zona bananera del Magdalena se registraron epidemias muy severas en la variedad "Gros Michel", de alta susceptibilidad a la enfermedad en los años cincuenta, esta enfermedad se conoce como "Mal de Panamá" y ha sido una de las enfermedades más limitantes de la producción de banano en el mundo (Burítica, 1999).

En diversas zonas productoras de tomate y de pepino cohombro en los departamentos de Cundinamarca y del Valle del Cauca se han presentado epidemias muy importantes en variedades susceptibles de estos dos vegetales.

En los cultivos del clavel para exportación en la Sabana de Bogotá, desde el año 1975, se han presentado epidemias bastante severas con pérdidas económicas muy significativas



(Arbeláez, 2000) y en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, se han presentado ataques progresivos del patógeno en cultivos de lenteja y garbanzo (Burítica, 1999).

Para controlar este tipo de patógenos se emplean diversos fungicidas de acción protectora y algunos de carácter sistémico (Almandoz et al., 2000). Aunque el método de elección para el manejo de las enfermedades causadas por *Fusarium* sp ha sido el control químico, los problemas de contaminación ambiental que surgen de forma colateral impacta negativamente en la biodiversidad, por lo que el uso inadecuado de los agroquímicos, han hecho reflexionar la comunidad científica hacia la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas (Benhamou et al., 2012). Según investigaciones realizadas por el Departamento de Agricultura de los EE.UU., cerca del 97% al 99% de los plaguicidas aplicados no alcanzaron los organismos que se desean combatir (ERF, 1991).

Como resultado de su aplicación y dispersión en el ambiente los plaguicidas han sido hallados en agua (Castillo et al., 1994; Ryan, 1991), alimentos de origen vegetal y animal (García, 1990; von Dörszeln, 1991; Ruiz y Rojas, 1994), suelos (Castillo et al., 1994; Abarca y Ruedert, 1993) y en fauna salvaje (Farrington y Tripp, 1994).

Debido a las nuevas políticas de producción limpia y sustentable, se vienen desarrollando investigaciones enfocadas al estudio y aplicación en la agricultura de microorganismos antagonistas como estrategia para el control biológico, los cuales pueden limitar el establecimiento y propagación de las enfermedades causadas por patógenos vegetales mediante mecanismos de antibiosis,

competencia, inducción de resistencia, entre otros (Fernández-Larrea, 2001).

Algunos microorganismos especialmente aquellos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum* han sido hallados en la rizosfera de plantas y han mostrado un alto potencial como antagonistas de fitopatógenos, debido a la capacidad que tienen de producir antibióticos y enzimas líticas como celulasas, hemicelulasas, xilasas y quitinasas las cuales pueden usarse en la protección de cultivos (Quiroga et al., 2012). El género *Bacillus*, pertenece a la familia Bacillaceae, una de las familias bacterianas que poseen mayor actividad bioquímica y la cual se encuentra bien referenciada en la literatura científica. Son bacilos grampositivos, catalasa positiva, producen endósporas con morfología oval que le permite resistir condiciones desfavorables en el ambiente, poseen flagelos laterales, presentan hemólisis variable y un crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5 - 8.5. Dentro de las especies más significativas de este género con propiedades de antagonismo contra fitopatógenos se encuentran *Bacillus brevis* y *Bacillus subtilis*.

La acción biocontroladora de este género microbiano esta mediada por la producción de metabolitos antibióticos como la gramicidina S en el caso de *Bacillus brevis* capaz de actuar sobre microorganismos de diversa etiología como *Fusarium oxysporum* (Bohg- Ristow, 1986). En el caso de *Bacillus subtilis*, se ha demostrado que tiene una eficiencia in vitro en el control de más de 23 fitopatógenos diferentes, como *Curvularia* sp., *Pyricularia grisea*, *Pythium* sp.

La actividad biocontroladora del género *Bacillus* se atribuye a la producción de lipopéptidos cíclicos antibióticos, de los cuales se destacan el surfactin y el Iturin A; estas sustancias poseen un amplio espectro de acción sobre patógenos de plantas, en los que se encuentran los géneros *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria* y *Verticillium* (Joshi-Gardener, 2006)

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue obtener microorganismos del género *Bacillus* con capacidad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*, como una alternativa para formulación de bioinsumos.

Metodología

A. Aislamiento del fitopatógeno.

Fusarium oxysporum fue aislado a partir de contaminaciones de medios de cultivo in vitro de plantas de *Moringa oleifera* de la línea de Biotecnología vegetal de la Tecnoacademia Manizales perteneciente al Centro de Automatización Industrial del SENA Regional Caldas.

La identificación del hongo se realizó mediante la técnica de microcultivo empleando Agar Sabouraud, se determinó el tipo de conidios, monofialides y clamidosporas producidas. Se visualizaron también características macroscópicas como, tipo de colonia, pigmentos y color del micelio; con la guía de las claves taxonómicas del Manual FUSKEY específico para la identificación de especies del género *Fusarium* (Seifert, 1996).

B. Aislamiento de bacterias del género *Bacillus*.

Bacillus spp fueron aislados a partir de tres muestras de suelo tomadas en las cercanías de la Tecnoacademia Manizales, al interior del colegio INEM Baldomero Sanín Cano. Se siguió la metodología propuesta por García et al. (2007) y Cortés et al (2005) con algunas modificaciones.

Se suspendieron 10 gramos de suelo en 9 ml agua peptonada al 0.1% y se hicieron diluciones hasta 10⁻³. Se realizó un choque térmico al material diluido a 80°C por 10 minutos con el fin de eliminar gran parte de la flora acompañante y beneficiar las comunidades de microorganismos esporulados García et al. (2007).

Posteriormente se realizó siembra en superficie con asa de Drigalsky, depositando 100 µL de dilución 10⁻³ en agar nutritivo, la siembra se realizó por triplicado. Las placas se incubaron a 30°C y se revisaron cada 24 horas hasta completar 72 horas. Transcurrido este tiempo se repicaron las colonias de morfología variada para garantizar la pureza del cultivo. A las 24 h se realizó la prueba de la catalasa y a las 48 h de tinción de Gram, y se observó en el microscopio óptico con un aumento de 1000X. Las bacterias que resultaron positivas a la catalasa y de morfología bacilar grampositivos fueron teñidas con verde de malaquita para verificar la presencia de endósporas. Las bacterias fueron criopreservadas en glicerol al 10% a -80°C, para ello se tomaron bacterias con 24 horas de crecimiento y se preparó una suspensión al patrón número 2 en la escala de McFarland.



C. Pruebas de Antagonismo

Las pruebas de antagonismo se realizaron por triplicado para cada una de las cepas bacterianas, el antagonismo se evaluó mediante el método de cultivos duales usando la metodología propuesta por Bashan et al (1996). El hongo se sembró previamente en medio de cultivo PDA y se incubó a 30°C durante 7 días. Posteriormente, se tomaron cuadrados de 5 mm de lado del microorganismo y fueron colocados en forma invertida en el centro de las placas.

Las bacterias fueron obtenidas de cultivos en caldo nutritivo con 24 horas de crecimiento y se ajustó para cada bacteria una solución al patrón de McFarland 0.5, posteriormente las bacterias fueron sembradas a 15 mm del centro, donde se encontraba el hongo, y fueron sembradas a lado y lado del fitopatógeno. Se realizó la incubación a 30°C durante 12 días. El efecto antagónico de las bacterias fue determinado a través de mediciones del diámetro de crecimiento del hongo (mm) en comparación con un control negativo donde se utilizó *Escherichia coli* como modelo de bacteria no antagonista.

El porcentaje de Inhibición se calculó como se indica en (1).

$$\%Inhibición = 100 - \left(\frac{d*100}{9}\right) \quad (1)$$

Donde *d* es el diámetro de crecimiento del hongo en centímetros.

A los datos obtenidos se les realizó un ANOVA, posterior a confirmar homogeneidad y normalidad.

D. Evaluación de actividad Quitinolítica de las bacterias aisladas.

Dado que muchas bacterias antagonistas de fitopatógenos pueden producir quitinasas como mecanismo de inhibición, se procedió a realizar una prueba cualitativa que permitiera evidenciar esta actividad enzimática en las bacterias aisladas, para ello se sembraron las bacterias en medio quitina coloidal (Lang et al., 2002), el cual se preparó de la siguiente forma : 0,2% de quitina coloidal, 0.1% de K₂HPO₄, 0.05% de MgSO₄.7H₂O 2% de Agar-agar y pH de 7.0.

La quitina fue obtenida como se describe por Jin y Kuen (2009), para esto se diluyeron 40g de quitina en 400 ml de HCl concentrado y se colocaron en agitación constante durante 2 horas, posteriormente se agregaron 2 litros de agua destilada fría y se agitó la mezcla rápidamente para formar el precipitado de quitina, la solución resultante se filtró para obtener la pasta de quitina coloidal a la que se le realizaron lavados sucesivos con agua destilada (200ml), con el fin de eliminar los residuos de ácido.

La pasta obtenida, se esterilizó durante 15 min y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

En esta prueba se utilizó *Serratia marsecens* como control positivo.

Resultados y discusión

Se aislaron un total de veintidós cepas bacterianas de *Bacillus* sp. Estos microorganismos fueron identificados hasta género mediante pruebas de oxidasa, tinción de Gram que permitieran observar bacilos grampositivos y con tinción

de endósporas. El cultivo en ambiente aerobio permitió eliminar los microorganismos esporulados anaerobios del género *Clostridium*.

La tabla 1 muestra el código interno que se le asignó a cada microorganismo una vez aislado.

Los resultados de este trabajo muestran que el porcentaje de inhibición de crecimiento de las cepas evaluadas respecto al control, fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) solamente para la cepa *Bacillus* sp Tam_0013, que obtuvo un porcentaje de inhibición del 78% (figura 1). La figura 2 muestra el control negativo y también, la cepa *Bacillus* sp Tam_0013, en la que es evidente su actividad inhibitoria contra *Fusarium oxysporum*. Las demás cepas no presentaron actividad antagonista.

Las pruebas realizadas para identificar las cepas degradadoras de quitina permitieron determinar que ninguna de las evaluadas posee actividad quitinolítica, la formación del halo se evidenció únicamente en el control positivo realizado con *Serratia marsecens*, bacteria que posee alta actividad quitinolítica, esto sugiere que la bacteria *Bacillus* sp Tam_0013 utiliza un mecanismo diferente para la inhibición de *Fusarium oxysporum*, probablemente, mediante la síntesis de sustancias antifúngicas como Iturin A o Surfactin (Joshi-Gardener, 2006).

El género *Bacillus*, tiene una amplia distribución en diferentes tipos de ambientes como el suelo (Aslim et al., 2002), los ecosistemas de agua dulce (Mandal et al., 2005) y los marinos (Miranda et al., 2008), así como en ecosistemas extremos (Kayode-Isola et al., 2008). Se ha aislado a partir de cultivos de importancia económica como el arroz (Thakuria et al., 2004), demostrándose que cepas de este género tienen la capacidad

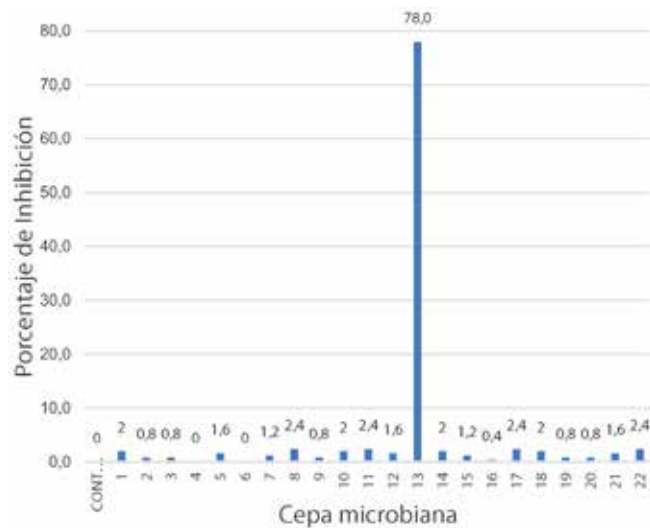
de solubilizar fósforo (Souchie et al., 2006), fijar nitrógeno (Beneduzi et al., 2008), producir auxinas (Gutierrez-Mañero et al., 1996) y sustancias antagonicas contra diferentes hongos fitopatógenos (Wipps et al., 2001).

Tabla 1. Código de identificación asignado a las veintidós cepas de *Bacillus* aisladas.

Microorganismo	Código
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0001
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0002
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0003
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0004
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0005
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0006
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0007
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0008
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0009
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0010
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0011
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0012
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0013
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0014
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0015
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0016
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0017
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0018
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0019
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0020
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0021
<i>Bacillus</i> sp	Tam_0022

Fuente: Los autores.

Figura 1. Porcentaje de inhibición de cada cepa



frente a *Fusarium oxysporum*.

Fuente: Los autores.



Figura 2. Antagonismo microbiano de la cepa Tam_0013 (centro). Control con *E. coli* (izquierda). Testigo absoluto sin bacteria (Derecha).

Fuente: Los autores

Diversas especies de *Bacillus* han sido bien reportadas con la capacidad de promover el desarrollo vegetal de cultivos de interés económico, a través de mecanismos como la solubilización de fosfatos, producción de auxinas y mediante mecanismos indirectos como el antagonismo de fitopatógenos (Cabrea et al., 2017).

Rodriguez et al. (2016), evaluaron microorganismos del género *Bacillus* y *Azotobacter* frente a *Cladosporium oxysporum*, *Corynespora*

cassiicola y *Fusarium chlamydosporum*, los autores encontraron porcentajes de inhibición micelial de 80% para ambos microorganismos frente a los fitopatógenos evaluados, valores muy similares a los hallados en este trabajo.

En otro trabajo, realizado por Rios et al. (2015), encontraron que *Bacillus methylotrophicus* y *Bacillus amyloliquefaciens* presentaron porcentajes de inhibición entre 41% y 69%, cuando fueron evaluados frente a *Fusarium Oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Alternaria*

alternata y *Aspergillus nidulas*, fitopatógenos que fueron aislados de la rizósfera del manzano.

Por otra parte, Becerra et al. (2016), aislaron microorganismos del género *Bacillus* a partir de suelo orgánico y evaluaron su capacidad antagonista frente a *Fusarium stilboides*, fitopatógenos causante de la pudrición del pimiento, en este estudio se encontraron cuatro aislamientos que presentaron porcentajes de inhibición de 63.5%, 71.0%, 68.6% y 73.7%.

Claramente el microorganismo aislado y evaluado en este trabajo tiene un alto potencial como antagonista de fitopatógenos, se pretende en estudios posteriores evaluar caracteres de promoción de crecimiento vegetal como producción de auxinas, solubilización de fosfatos y determinar si posee capacidad para la fijación de nitrógeno.

Conclusiones

Este trabajo, describe una metodología que puede implementarse en cualquier lugar de nuestra región y que permite el aislamiento de cepas nativas del género *Bacillus* sp. que puedan presentar potencial a nivel biotecnológico.

La cepa *Bacillus* sp Tam_0013, aislada en este trabajo mostró un potencial para poder utilizarse en formulaciones como bioinsumo, que permitan el control de *Fusarium oxysporum*, lo que implica que de ser usada en la agricultura podría ayudar a reducir el uso de pesticidas, lo que implica una contribución a la agricultura sostenible.

Las pruebas cualitativas realizadas a las 22 cepas para la detección de quitinasas, arrojaron resultados negativos, concluyendo así, que ninguna de las bacterias evaluadas muestra

capacidad de producir enzimas quitinolíticas, lo cual sugiere que los mecanismos involucrados en el antagonismo observado en este trabajo pueden estar relacionados con la producción de metabolitos antifúngicos y no con la producción de enzimas degradadoras de la quitina que conforma la pared celular de los hongos fitopatógenos.

Referencias

- Abarca, L.; Ruedert, C. (1993). Plaguicidas encontrados en el Valle de La Estrella: estudio preliminar. *Tecnología en Marcha* 12(3): 31-38.
- Almandoz, J.; V. M. Pico; L. Pérez; F. Rodríguez; J. Parra. (2012). «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.
- Arbeláez, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium Oxysporum*. *Agronomía Colombiana*. 17: 11-22.
- Aslim, M. (2002). Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turk J Biol*, v.26, p.41-48.
- Bashan Y, Holguín G, Ferrera R. (1996) .Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra*.14(2):159-192.
- Becerra Morales, Diana. ; Juarez Campusao, Yara Suhan. ; Pacheco Aguilar, Juan Ramiro. (2016). Caracterización de aislados de *Bacillus* spp. Obtenidos de un suelo orgánico



- que son antagonistas a *Fusarium stilboides*. Revista Ciencias de la Salud. 3 (9): 1-5.
- Beneduzi, A. (2008). Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogenfixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. Applied Soil Ecology, v. 39, p. 311.
- Benhamou N, Kloepper J, Tuzun S. (1998). Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. Planta. 204:153-168.
- Bohg, A. and Ristow, H. (1986), DNA-supercoiling is affected *in vitro* by the peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin. European Journal of Biochemistry, 160: 587–591.
- Burítica, P. (1999). Las enfermedades de las plantas y su ciencia en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Agronomía, Medellín.
- Cabra Cendales, Teresa, Rodríguez González, Cristian Alonso, Villota Cuásquer, Claudia Patricia, Tapasco Alzate, Omar Alberto, & Hernández Rodríguez, Annia. (2017). *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L). Acta Biológica Colombiana, 22(1), 37-44. <https://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n1.57375>
- Castillo, L.E.; Ruepert, C.; Solis, E.; Martinez, E. (1994). Environmental impact of pesticide use in a tropical aquatic ecosystem. Case study in a banana plantation in Costa Rica. Text of poster presented in 8th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry. Washington D.C. July 1994. 7 p.
- Correa, M., y Peñuela. A. (2002). Aspectos de la biología de un hongo del género *Rhizoctonia* y de su interacción *in vitro* con *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Acta Biológica Colombiana, 7 (1):41- 52
- Cortés Ramos, N.; Ferrer Salas, D.; González Giro, Z.; Orberá Ratón, T.; Pérez Portuondo, I.; (2005). Aislamiento de cepas del género *Bacillus* sp. Con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. Revista Cubana de Química, XVII. 189-195.
- ERF (Environmental Research Foundation) 1991. The false promise of pesticides. Rachel's Hazardous Waste News 247 (August 21).
- Farrington, J.W.; Tripp, B.W. 1994. International mussel watch project. Initial implementation phase. Final report. International mussel watch committee. UNESCO Intergovernmental Oceanographic Commission, United Nations Environment Programme, US National Oceanographic and Atmospheric Administration. Woods Hole, Massachusetts. 63 p. + 6 apéndices.
- Fernández Larrea, O.: «Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario», Revista Manejo Integrado de Plagas 62:96-100, 2001.
- García G., E. 1990. Residuos de plaguicidas en los alimentos: Aspectos introductorios. Tecnología en Marcha (Costa Rica) 10(4): 37-41.

- Garveba, P.; J. van Veen; J. van Elsas. (2003). Predominant *Bacillus* spp. In Agricultural Soil Under Different Management Regimes Detected Via PCR-DGGE», *Microbial Ecology* 45:302-316.
- García Pérez, Ernesto; Reinoso Pozo, Yaritza; Vaillant Flores, Daymara; Pazos Álvarez-Rivera, Victoria; Casadesús Romero, Luis; (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, Marzo-Sin mes, 35-40.
- Gutierrez, F., Mañero, J. (1996). The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) growth. II Characterisation and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. *Plant Soil*, v.182, p.67-74,.
- Jin, Y., YU, C. and Kuen, Y. (2009). Cloning and expres- sion of chitinase a from *Serratia marcescens* for large-scale preparation of n,n-diacetyl chito- biose. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 56(4), p. 688-695.
- Joshi, R. and Gardener, B.B.M. (2006) Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 96, 145–154.
- Lang. W., lung. I., How. C. Choan K., Teish. W., Kuo. Y., Jon. J., Lu. C. (2002). Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. *Enzyme and microbial Technology*. 31: 321-328.
- Mandal, M. (2005) . Plasmid-Mediated Dimethoate Degradation by *Bacillus licheniformis* Isolated from a Fresh Water Fish *Labeo rohita*. *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 3, p. 280.
- Miranda., C. A. C. (2008). Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths análisis. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 93, p. 297–304.
- Quiroga-Rojas, Luisa Fernanda; Lozano-Tovar, María Denis; Ruiz-Quiñones, Nataly; Muñoz-Motta, Guerly; (2012). Microorganismos rizosféricos, potenciales antagonistas de *Fusarium* sp. causante de la pudrición radicular de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims). *Acta Agronómica*, Sin mes, 265-272.
- Rios Velasco, C., Caro Cisneros, J.M., Berlanga Reyes, D.I., Ruiz Cisneros, M.F., Ornelas Paz, J.J., Salas Marina, M.Á., & Guerrero Prieto, V.M.. (2016). Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista mexicana de fitopatología*, 34(1), 85-99. <https://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Rodríguez Sánchez, Janet, Ríos Rocafull, Yoania, & Baró Robaina, Yamilé. (2016). Efectividad de cepas de *Azotobacter* sp. y *Bacillus* sp. para el control de especies fúngicas asociadas a hortalizas. *Cultivos Tropicales*, 37 (Supl. 1), 13-19. Recuperado en 13 de julio de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000500002&lng=es&tlng=es.



- Ruiz, O.V.; Rojas, J.L. 1994. Niveles de metales pesados en tejidos de ganado bovino. Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE), Dirección de Ganadería, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Enviado para su publicación a la Revista de Ciencias Veterinarias (Costa Rica).
- Ryan, D.K. (1991). Assistant Professor, Department of Chemistry, University of Lowell, Massachusetts, U.S.A. Results for the analysis of pesticides in samples collected in Canales de Tortuguero. Preliminar results. Letter to David Carr, Executive Director of the Caribbean Conservation Corp., Gainesville, Florida, U.S.A. August 19, 1991. 12 p.
- Seifert, K. (1996) Fuskey-*Fusarium* interactive key. Agriculture and AgriFood, Canada.
- Souchie, E. L. (2006). Communities of P Solubilizing Bacteria, Fungi and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil. An Acad Bras Cienc, v.78, n.1, p.183-193.
- Thakuria, D., (2004). Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. Current Science, v.86, n.7, p. 978-985.
- Von Döszeln, J. (1991). Pesticide contamination and pesticide control in developing countries: Costa Rica, Central America. In:Richardson, M.L. (ed.). Chemistry, agriculture and the environment. Royal Society of Chemistry. Cambridge, United Kingdom. p. 410-428.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, v.52, p.487-511.