

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

Formulación de la cepa S 111 de *Serratia liquefaciens* (Grimes y Hennerty 1931) Bascomb *et al.* 1971, en matrices de alginato y su efectividad para inhibir *in vitro* a *Rhizoctonia solani* Kühn

Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al grado
de Licenciado en Agronomía

Paula Alejandra Mujica Arrué

VALDIVIA – CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE:

Luigi Ciampi P.
Ing. Agr., M. Sc, Ph D.

PROFESORES INFORMANTES:

Renate Schöbitz T.
Tec. Med., M. Sc.

Ricardo Fuentes P.
Ing. Agr., M. Sc.

INSTITUTO DE PRODUCCION Y SANIDAD VEGETAL

A mi madre Eliana, mi hermana Emma y mi hermano Tito, por su constante dedicación,
preocupación, incentivo y apoyo a toda prueba, vitales durante mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su generosidad infinita.

A mi madre y hermanos, que con su incondicional apoyo han sido mi sostén en los momentos más difíciles.

A Renato y mis hijas, Emilia junto a mi y Martina en camino, que me han dado el empuje final para cerrar este ciclo.

A mis amigos, que de una u otra forma han colaborado en este camino, en especial José Milanca, Emilio Schnettler, José Dörner, Cecilia Ruiz y Mariana Salazar.

A María Luisa y Silvia, que no se limitan a su rol profesional si no que le imprimen a nuestra Escuela ese ambiente familiar que nos acoge con gran cariño, sin dejar de lado los tirones de oreja que tan merecidos nos tenemos algunas veces.

A mis profesores informantes, Renate Schöbitz y Ricardo Fuentes, por sus oportunos y acertados consejos.

A mis profesores Andrea Báez, Andrés Contreras, Fernando Mujica y Dante Pinochet, por guiarme desinteresadamente con aportes fundamentales.

Y finalmente a mi estimado profesor, Dr. Luigi Ciampi Panno, porque su excelencia como docente sólo es superada por su gran calidad humana.

**TRABAJO DE INVESTIGACION FINANCIADO POR EL PROYECTO
FONDECYT 1951105**

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1	El control biológico	3
2.1.1	Una visión histórica del control biológico en Chile	4
2.1.2	El control biológico en la agricultura orgánica	5
2.2	El cultivo de la papa en Chile	6
2.3	Enfermedades de la papa	8
2.4	Rhizoctoniasis o sarna negra de la papa	8
2.4.1	Control biológico de <i>Rhizoctonia solani</i> en Chile y el resto del mundo	9
2.5	La bacteria antagonista <i>Serratia liquefaciens</i>	11
2.6	Bioatrapamiento celular	11
2.7	Actividad de agua	11
3	MATERIAL Y METODO	14
3.1	Materiales	14
3.1.1	Cepas utilizadas para el ensayo.	14
3.1.2	Componentes de los medios de cultivo para la multiplicación y atrapamiento de la cepa S111.	15
3.1.3	Otros materiales	16
3.2	Método	17
3.2.1	Obtención, selección y determinación de los grupos AG3 de los aislamientos de <i>R. solani</i> .	17
3.2.2	Establecimiento de la virulencia de las cepas de <i>R. solani</i> .	21

Capítulo		Página
3.2.3	Confección de las biocápsulas	22
3.2.3.1	Preparación de Medios de cultivo	22
3.2.3.2	Cultivo masivo de la cepa S111	23
3.2.3.3	Bioencapsulación de la cepa antagonista S111	24
3.2.4	Deshidratación de las biocápsulas	24
3.2.5	Almacenamiento de las biocápsulas	25
3.2.6	Características de las biocápsulas	25
3.2.6.1	Mediciones de recuento de colonias	26
3.2.6.2	Determinación de la capacidad inhibitoria	27
3.2.6.3	Determinación de la Actividad de Agua	28
3.2.7	Otorgamiento de ventaja	29
3.2.8	Diseño experimental	30
4	PRESENTACION DE RESULTADOS	32
4.1	Aislamientos de <i>Rhizoctonia solani</i> y comprobación de su pertenencia al grupo de anastomosis AG-3.	32
4.2	Establecimiento de la virulencia de los aislamientos de <i>R. solani</i>	34
4.3	Determinación de las características de las biocápsulas mediante evaluaciones	34
4.3.1	Mediciones de recuento de colonias	34
4.3.2	Determinación de la capacidad inhibitoria	36
4.3.2.1	Determinación de la capacidad inhibitoria de las cápsulas deshidratadas	37
4.3.2.1.1	Capacidad inhibitoria de cápsulas con 24 h de deshidratación frente a los factores almacenaje y ventaja	39
4.3.2.1.2	Capacidad inhibitoria de cápsulas con 36 h de deshidratación frente a los factores almacenaje y ventaja	41
4.3.2.1.3	Capacidad inhibitoria de cápsulas con 48 h de deshidratación frente a los factores almacenaje y ventaja	43

Capítulo		Página
4.3.3	Determinación de la actividad de agua (aw)	46
5	DISCUSION DE RESULTADOS	47
6	CONCLUSIONES	66
7	RESUMEN	67
	SUMMARY	69
8	BIBLIOGRAFIA	71
	ANEXOS	87

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Actividad de agua mínima para el crecimiento de microorganismos, expresada en % de humedad (1=100%)	12
2	Composición del medio líquido N°1, el cual se emplea para promover la multiplicación de la cepa S111	15
3	Escala utilizada para la evaluación de la virulencia de <i>R. solani</i> inoculada en plántulas <i>in vitro</i> de papa (<i>S. tuberosum</i>)	22
4	Resumen de las fases evaluadas y detalle de las pruebas aplicadas en los procesos de fabricación, deshidratación y almacenaje de las biocápsulas	26
5	Aislamientos de <i>R. solani</i> obtenidos a partir de esclerocios presentes sobre <i>S. tuberosum</i>	33
6	Valores de recuento bacteriano obtenidos en cada una de las etapas que constituyen el experimento (promedio de tres matraces)	35
7	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (95%) para la variable área de avance diario del hongo por tratamiento	36
8	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (95%) para el área de crecimiento arrojada por las cápsulas de los tratamientos de 24 h, 36 h y 48 h de deshidratación	38
9	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (95%) para la variable tiempo de almacenaje de las cápsulas de 24 h de secado	40
10	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (95%) para la variable ventaja se siembra otorgada a las cápsulas con 24 h de secado	41

Cuadro		Página
11	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (95%) para la variable tiempo de almacenaje de las cápsulas de 36 h de secado	42
12	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (95%) para la variable ventaja de siembra otorgada a las cápsulas con 36h de secado	43
13	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (95%) para la variable tiempo de almacenaje de las cápsulas de 48h de secado	44
14	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (95%) para la variable ventaja de siembra otorgada a las cápsulas con 48h de secado	45
15	Resumen de valores expresados como área de crecimiento (cm ²) de cápsulas almacenadas de 0 a 60 días, con ventaja frente a <i>R. solani</i> de 0 a 3 días y con tres tiempos de secado	45
16	Valores de actividad de agua obtenidos en las distintas etapas de deshidratación de las cápsulas	46

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Pasos del proceso de proceso de bioatrapamiento desde la elaboración de medios hasta la obtención del homogenizado	18
2	Pasos del proceso de confección de las biocápsulas desde la obtención del homogenizado hasta la formación de las cápsulas, incluyendo factores evaluados	19
3	Esquema del molde utilizado en las pruebas de inhibición para realizar la siembra de la bacteria y del hongo siempre en el mismo lugar	28
4	Morfología de <i>R. solani</i> (CIAMPI, 2002). Fotografía digital, L. Ciampi Ph. D., Laboratorio de Fotopatología, Universidad Austral de Chile	32
5	Recuento de unidades formadoras de colonias (ufc) durante las etapas del proceso de bioatrapamiento (promedio de 3 matraces en fases líquidas y de 3 muestras de 1 g en el caso de las cápsulas).	35
6	Interacción presentada por las cápsulas con 24 h de deshidratación, respecto a los factores ventaja y almacenamiento	39
7	Interacción presentada por las cápsulas con 36 h de deshidratación, respecto a los factores ventaja y almacenamiento	41
8	Interacción presentada por las cápsulas con 48 h de deshidratación, respecto a los factores ventaja y almacenamiento	43

INDICE DE ANEXOS

Anexos		Página
1	Detalle de otros materiales utilizados en la tesis	89
2	Determinación de la capacidad inhibitoria del cultivo líquido, homogenizado, cápsulas frescas, deshidratadas y almacenadas	91
3	Determinación de la capacidad inhibitoria de las cápsulas secas	92
4	Determinación de la capacidad inhibitoria de cápsulas con 24 h de deshidratación, frente a los factores almacenaje y ventaja	93
5	Determinación de la capacidad inhibitoria de cápsulas con 36 h de deshidratación, frente a los factores almacenaje y ventaja	94
6	Determinación de la capacidad inhibitoria de cápsulas con 48 h de deshidratación, frente a los factores almacenaje y ventaja	95
7	Análisis de regresión múltiple para las variables inhibición, recuento y actividad de agua	96
8	Pruebas de inhibición	97

1 INTRODUCCION

El control biológico de enfermedades en plantas constituye una estrategia que se basa en la utilización de microorganismos, fundamentalmente bacterias y hongos, para ser empleados como enemigos naturales de patógenos causantes de infecciones.

A través de los años, numerosos investigadores han detectado diversas formas biológicas que se pueden utilizar para controlar patógenos y pestes que afectan a las plantas. Estos agentes, son conocidos como “antagonistas” e incluyen: virus, bacterias, actinomicetos, hongos, plantas superiores, y microfauna predadora, tales como protozoos, rotíferos, collémbola y ácaros.

Investigaciones realizadas en la Universidad Austral de Chile y en otros países, indican que bacterias antagonistas de variados patógenos vegetales, son habitantes normales de los suelos. Esta realidad demuestra la distribución mundial de estos microorganismos. Entre las cepas chilenas, ha sido posible seleccionar algunos antagonistas de excelente capacidad para inhibir a patógenos vegetales, entre los cuales se encuentra el agente causal de la sarna negra de la papa (*Solanum tuberosum* Linnaeus subsp. *tuberosum*), *Rhizoctonia solani* Khün. Esta enfermedad difícil de combatir químicamente sería factible de ser controlada biológicamente.

R. solani y otras especies de éste género son agentes fitopatógenos ampliamente distribuidos en el mundo y tienen una amplia gama de hospedantes. Se pueden desarrollar bajo un variado rango de temperaturas y se diseminan fácilmente sobre los tubérculos de papa, mediante los esclerocios. Los daños que ocasiona son considerables, atacando a los brotes emergentes. En la actualidad, este patógeno no tiene un control efectivo, y su tratamiento químico eleva los costos de producción y presenta mayor riesgo de contaminación del medio ambiente.

Uno de los mayores desafíos en la lucha biológica de enfermedades en plantas es la formulación, proceso mediante el cual células son puestas en un medio que las nutre y protege, lo que les permite ser transportadas desde el laboratorio a condiciones de campo, logrando una acción biológica efectiva.

En la actualidad, se está investigando activamente en la construcción de cápsulas a base de matrices de alginato. Estas esferas biológicas consisten en pequeños núcleos que contienen componentes de entre los cuales se pueden mencionar células antagonistas activas, osmoprotectantes, precursores de sustancias antagonistas, material inerte y material encapsulante.

En relación a lo expuesto anteriormente, esta investigación postuló como hipótesis que la bacteria *Serratia liquefaciens* cepa S111, sometida a un proceso de bioencapsulación, ejerce una acción antagónica hacia el patógeno *R. solani*.

El objetivo general fue construir y evaluar cápsulas biológicas obtenidas mediante una técnica de bioatrapamiento, y establecer su eficiencia para controlar al agente fitopatógeno *R. solani* bajo condiciones *in vitro*. La eficiencia fue medida en base al crecimiento diario del hongo, lo que se traduce en el área diaria de avance (cm²) de *R. solani* frente a la bacteria.

Los objetivos específicos fueron:

- Construir biocápsulas con la cepa S111 atrapada y describir el proceso general de atrapamiento.
- Realizar una descripción en términos cuantitativos de los procesos de atrapamiento, encapsulación y almacenamiento.
- Analizar la capacidad inhibitoria de la cepa S111 atrapada en relación a la deshidratación de la biocápsulas.
- Determinar si existe incidencia en los casos en que se le otorga una “ventaja” de 1, 2 y 3 días de siembra a la bacteria, para que actúe frente al hongo.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 El control biológico.

El control biológico es en esencia una reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedero o antagonista, o por la introducción de una población de uno o más antagonistas. El control biológico es, en consecuencia, un “manejo integral de poblaciones”, correspondiendo a una acción específica dirigida no tan sólo a un patógeno, como lo es al aplicar un producto químico (WILSON y HUFFAKER, 1976).

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Ellos son: antibiosis (producción de sustancias tóxicas), competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática), e inducción de resistencia (COOK y BAKER, 1983).

El control biológico ha sido una herramienta en el manejo de plagas en la agricultura, cuyos inicios se remontan a China 200 años A.C. En aquellos tiempos los agricultores utilizaban cañas de bambú para comunicar los árboles ente sí y permitir que las hormigas circularan de un árbol a otro comiendo insectos plagas (GERDING, 2005).

Ejemplos puntuales del uso de enemigos naturales para controlar pestes existen desde hace siglos. Sin embargo, el control biológico como tal emergió como método científico en el siglo IX. En el siglo XX, específicamente en 1919 por primera vez se usa el término “control biológico” por Smith, quien lo definió como “el uso de enemigos naturales para controlar pestes” (WILSON y HUFFAKER, 1976).

El control biológico ofrece una alternativa medioambientalmente amigable al uso de pesticidas para el control de enfermedades de las plantas. Desafortunadamente, los agricultores continúan usando el control químico sobre los

agentes de control biológico, y la falta de conocimiento a menudo contribuye a la disminución de los bioagentes de control (EMMERT y HANDELSMAN, 1999).

RODHAM *et al.* (1999), plantean que microorganismos pueden ser utilizados para proveer un efecto de protección a los cultivos, pero para explotar esto es necesario liberar microorganismos viables formulados como un producto apropiado para la aplicación agronómica, lo cual presenta un desafío significativo a la tecnología de la formulación.

2.1.1 Una visión histórica del control biológico en Chile. En el país, este sistema se ha desarrollado programando controlar insectos, ácaros, malezas y otros organismos problemáticos para las plantas. Históricamente la ejecución de estos controles ha estado a cargo de los departamentos de Sanidad Vegetal y de Investigación Agrícola, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) del Ministerio de Agricultura. También han participado la Universidad de Tarapacá (CICA), la Universidad de Chile, la Universidad Austral de Chile y el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) (ZÚÑIGA, 1985).

Los primeros intentos de control biológico se remontan hacia 1903, cuando se importó desde Estados Unidos, organismos antagonistas de insectos plagas en Chile. De todas las introducidas, solamente logró sobrevivir *Rhizobius ventralis* Erich, depredador de huevos de conchuela negra. Este insecto fue liberado directamente al campo por Teodoro Schneider, sin lograr éxito. Si bien hubo muchos intentos fallidos de control durante este tiempo, sí hubo importantes aciertos. Por ejemplo, los éxitos alcanzados con la introducción de *Aphelinus mali* Haldeman, controlador del pulgón lanífero del manzano; *Habrolepis dalmanni* Westwood, controlador de la conchuela dorada de la encina, además de *Rodolia cardinalis* Mulsant y *Cryptochaetum iceryae* Williston, enemigos naturales de la conchuela algodonosa de los cítricos (ZÚÑIGA, 1985).

A partir del año 1920, el Ministerio de Agricultura toma la responsabilidad y el manejo de las introducciones de insectos benéficos, y así en el año 1935, se inicia la construcción del Insectario de La Cruz en Quillota. Su finalidad fue iniciar en el país el

control biológico de plagas agrícolas, importando desde el extranjero los enemigos naturales de los organismos problemáticos y hasta la fecha, es un hito en el trabajo de cuarentena y multiplicación de enemigos naturales en Chile. Desde entonces, se han introducido más de 150 especies de insectos para controlar un número mayor de insectos plagas (ROJAS y RIPA, 1987; GERDING 2005).

Entre los años 1964 y 1974 se actualiza el control biológico sobre la base de conocimientos y técnicas creadas por países desarrollados; se da mayor énfasis al estudio de la ecología de plagas y enemigos naturales. El empleo de modernas técnicas aseguró el mayor éxito en el establecimiento de los enemigos naturales de diferentes plagas y enfermedades. Así, la Universidad Austral de Chile lleva a cabo el primer intento de controlar malezas mediante el hongo uredinal europeo *Phragmidium violaceum* Schultz, para detener el avance de la zarzamora. La Universidad del Norte (Tarapacá) introduce *Trichogramma evanescens* Westwood y *T. Fasciatum* Perkins desde Cuba y la Universidad de Chile importa *Phytoseiulus* sp., para el control de ácaros fitófagos (ZÚNIGA, 1985).

Desde 1975 en adelante, se ha ido desarrollando progresivamente el control biológico hasta alcanzar la posición actual. Principalmente la investigación es la base del sistema, desarrollado por las diferentes estaciones experimentales del Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA (ZÚNIGA, 1985).

El esfuerzo realizado por el Estado en la introducción de enemigos naturales durante el siglo XX, ha significado que en la producción agrícola se ahorren anualmente más de 30 millones de dólares, ya sea por la no aplicación de pesticidas o medidas de control alternativas, o bien, por la reducción de daños causados por los insectos, lo que incrementa la calidad y cantidad de los productos comerciables. Además, se ha ganado en aspectos difíciles de evaluar, como son la calidad de vida rural, la protección del medio ambiente, la protección de insectos benéficos y del ecosistema (GERDING, 2005).

2.1.2 El control biológico en la agricultura orgánica. La agricultura orgánica corresponde a uno de los diversos enfoques que la agricultura sostenible tiene. Es un

sistema global de gestión de la producción que fomenta y realiza la salud de los agroecosistemas, inclusive la diversidad biológica, los ciclos biológicos y la actividad biológica del suelo. Lo que distingue a la agricultura orgánica de la tradicional, es la reglamentación que prohíbe todo insumo sintético, además de ser obligatoria la rotación de cultivos para “fortalecer el suelo” (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, DEPARTAMENTO DE DESARROLLO SOSTENIBLE (FAO), 2005).

El control biológico de las plagas en las granjas orgánicas se basa en el hecho de mantener poblaciones sanas de predadores y parásitos de plagas. Un estudio que se llevó a cabo en California, en el que se comparaban los campos de tomates convencionales con los orgánicos, mostró la existencia de una mayor cantidad de enemigos naturales y una riqueza de especies más elevada en los campos de tomates orgánicos. El sistema orgánico alcanza los mismos niveles de control de plagas sin tener la necesidad de aplicar plaguicidas químicos sintéticos. Letourneau y Goldstein (2001) citados por FAO (2005).

En el anterior marco se inserta el control biológico como la herramienta más fiel y concuerda con los principios de la agricultura orgánica. Se utilizan métodos naturales para combatir las plagas y enfermedades y no de plaguicidas sintéticos que pueden eventualmente causar la disminución de poblaciones de organismos beneficiosos cuando no son empleados correctamente (WILSON y HUFFAKER, 1976).

2.2 El cultivo de la papa en Chile.

La papa (*S. tuberosum*) es el cuarto cultivo alimenticio en orden de importancia mundial luego del trigo, arroz y maíz, representando aproximadamente la mitad del total de producción de raíces y tubérculos. Los primeros cultivos se atribuyen a las zonas más elevadas de la cordillera de los Andes, en lugares cercanos al lago Titicaca, ya hace más de 1.000 años (FAO, 1995).

Hasta la década de 1990, la producción mundial de papa se ha mantenido relativamente estable, fluctuando entre 260 y 270 millones de toneladas desde inicios de la década de 1960. El área de cultivo en los países desarrollados ha disminuido desde 22 millones a 18 millones de hectáreas, lo cual se ha compensado por el incremento en la productividad hasta 15 t/ha promedio. En los países en vías de desarrollo en tanto, la participación en la producción mundial se ha elevado desde 11% entre 1961-63 hasta 31% en 1991-93, aumentando la proporción de superficie mundial del cultivo en África, América y Asia desde 16% a 37% en los mismos períodos. La producción en países subdesarrollados alcanza en promedio las 13 t/ha, mientras en los países desarrollados se presenta como promedio una producción de 17 t/ha (FAO, 1995).

Chile está considerado como un productor de papa de muy alta calidad debido en gran parte a las favorables condiciones fitosanitarias, de clima y suelo que se presentan. Esto ocurre en especial en la zona sur del país, que presenta interesantes expectativas en la exportación de tubérculos y semilla botánica, en la medida que las condiciones cuarentenarias y fitosanitarias se mantengan¹.

En Chile se encuentra el subcentro de origen de la papa: la Isla de Chiloé. Lo anterior debido a que son principalmente variedades antiguas de papa chilena, las que han influido en el mejoramiento de la papa a nivel mundial (CONTRERAS, 1991).

El cultivo en Chile es de escasa mecanización, lo cual ayuda a obtener regulares rendimientos que es aproximadamente de 220 q/ha, obtenidos en la X Región. Algunos productores llegan a rendimientos de 500 q/ha, considerados de muy buen nivel. En efecto, que sea poco tecnificado se suma a la realidad de que la mayoría de la producción nacional está en manos de pequeños agricultores que obtienen muy bajos rendimientos. Estos horticultores utilizan papa semilla de mala calidad, lo cual arrastra al país a presentar los magros niveles de producción (FAIGUENBAUM, 1987; ODEPA, 2005).

¹ CIAMPI, L. (2004). Ing. Agr. Ph. D. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Comunicación personal.

El principal uso de la papa en Chile es el consumo humano con un 63% de la producción total destinada para estos fines representando el consumo fresco un 49%, mientras que el industrializado está alrededor de un 14% de la producción total. Se destina, además, a un uso como papa semilla que representa el 19% del total de producción. La alimentación del ganado (basado en excedentes y desechos de venta) que se estima en 8%. Las pérdidas totales estimadas en Chile en el cultivo de papa son de alrededor de un 10% (CONTRERAS, 2002).

Durante la temporada 2004/05 se cultivaron 55.620 ha en el país, las cuales produjeron 1.115.736 t de papas, de las cuales 380.684 t se producen en la X región. Esto la convierte en la principal región productora de papas de Chile, con un 34% de la producción nacional (ODEPA, 2005).

2.3 Enfermedades de la papa.

Las principales enfermedades de la papa en Chile son causadas por bacterias, que en general producen pudriciones húmedas. Las causadas por hongos provocan pudriciones secas (AGRIOS, 1996; ALONSO, 1996). Las patologías más importantes son:

a) enfermedades causadas por bacterias: “pie negro” ocasionada por *Erwinia carotovora* Jones; “marchitez bacteriana” cuyo agente causal corresponde a *Pseudomonas solanacearum* EF Smith; “sarna común” producida por *Streptomyces scabies* Thaxter (AGRIOS, 1996; ALONSO, 1996).

b) enfermedades causadas por hongos: “tizón temprano” provocado por *Alternaria solani* Ell. y Mart.; “tizón tardío” causado por *Phytophthora infestans* Mont de Barry; “sarna negra” por *Rhizoctonia solani*; “sarna plateada” por *Helminthosporium solani* Durieu y Montagne; “sarna pulverulenta” inducida por *Spongospora subterranea* Wallroth (AGRIOS, 1996; ALONSO, 1996).

2.4 Rhizoctoniasis o sarna negra de la papa.

R. solani es un hongo que ataca a la generalidad de los cultivos y se presenta en la mayoría de las áreas productoras de papa, favoreciéndose su desarrollo en los

suelos húmedos y fríos (AGRIOS, 1996). Se presenta con frecuencia en suelos con elevados porcentajes de materia orgánica (CALDERÓN, 1978).

El patógeno causa problemas en los brotes, estolones y tallos subterráneos de la papa. Induce una baja brotación y debilitamiento del crecimiento, amarillez y enrollamiento foliar, además de formación de tubérculos aéreos. El agente forma esclerocios de color negro o castaño oscuro que pueden ser chatos y superficiales o grandes e irregulares. Estos se localizan sobre la piel de los tubérculos. Generalmente la piel no presenta anomalías por debajo de los esclerocios. Para diferenciarlos de aglomeraciones de tierra, se deben lavar: la tierra saldrá y los esclerocios quedarán adheridos (ALONSO, 1996).

Los aislamientos de *Rhizoctonia* se dividen en tres grupos: *Rhizoctonia* multinucleada, cuyos miembros tienen tres o más núcleos por célula, hifas grandes (6 a 10 µm de diámetro), y el telomorfo pertenece al género *Thanatephorus* Donk. El segundo grupo es *Rhizoctonia* binucleada, que tiene dos núcleos por célula (raramente uno o tres), hifas pequeñas (4 a 7 µm de diámetro), y el Telomorfo pertenece al género *Ceratobasidium* Rogers. El tercer grupo incluye a *Rhizoctonia oryzae* Ryker y Gooch y *Rhizoctonia zeae* Voorhees, los cuales son multinucleados y tienen el telomorfo en el género *Waitea* Warcup y Talbot (OGOSHI, 1987).

2.4.1 Control biológico de *Rhizoctonia solani* en Chile y el resto del mundo. La posibilidad de controlar la rhizoctoniasis mediante un agente biológico, es una alternativa a la tradicional estrategia de control químico y a la vez abarata costos siendo en ocasiones igualmente eficaz (ESCOBAR *et al.*, 2000). En Chile los mayores esfuerzos se han concentrado en el antagonista *Trichoderma* spp. Un ejemplo de ello fue la selección *in vitro* de cepas de *Trichoderma harzianum* Rifai, con el fin de utilizarlas en el control de *R. solani* en tomate, determinando la efectividad de la cepa en el control de este patógeno.

Muchos también han sido los esfuerzos a nivel mundial en investigaciones tendientes a seleccionar bioantagonistas efectivos contra *R. solani*. CUNDOM y MAZZA (2001), realizaron en Argentina, una evaluación de *Trichoderma* spp. contra *R.*

solani in vitro e invernadero, logrando establecer que el antagonista es viable para un eventual control en el cultivo de melones. Se pudo evidenciar una significativa reducción del crecimiento de *R. solani*. En el ensayo de invernadero, se logró reducir hasta en un 30% la muerte de plántulas.

Por otra parte, URIBE *et al.* (1999), investigando la diversidad de *Pseudomonas fluorescens* Migula, 1895 en suelos destinados al cultivo de papa en Colombia, encontraron cepas nativas con significativa actividad antagonista contra *R. solani* en los ensayos *in vitro* ejecutados. Se ha experimentado con otros agentes antagonistas, como *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872, *Pseudomonas putida* Trevisan y *Serratia marcescens* Bizio, en cultivos de haba, siendo *P. putida*, la que presentó los mayores efectos inhibitorios (KRISHNAMURTHY y GNANAMANICKAM, 1998).

En huertos orgánicos de papa han sido evaluados los antagonistas *T. harzianum* y una cepa de *Rhizoctonia* (np-R) no patogénica, contra *R. solani*. Los resultados evidenciaron que la aplicación de *T. harzianum* hecha a la superficie del suelo, tuvo escasos efectos contra *R. solani*. En cambio, en aquellos experimentos que incluyeron dos cepas de np-R, hubo una reducción significativa de tubérculos infectados (TSROR *et al.*, 2001).

Verticillium biguttatum Gams ha sido igualmente probado como una alternativa de control biológico contra *R. solani* en papa en la República de Yemen. Los resultados evidenciaron menor incidencia de *R. solani* en todos los ensayos. Concluyeron así DREPPER *et al.* (1996), que el control de *R. solani* en semillas de papa tratadas con *V. biguttatum*, ofrecería una franca alternativa a los controles químicos usuales en el control de este fitopatógeno.

HAGGAG y NOFAL (2000), utilizaron *T. harzianum*, *Coniothyrium minitans* Campbell y *Gliocladium virens* Miller *et al.* como agentes de control biológico de *R. solani* en papas. Estos agentes de biocontrol fueron usados con algunas formulaciones: alginato, alginato-almidón y almidón-talco.

2.5 La bacteria antagonista *Serratia liquefaciens*.

Estudios realizados, señalan a las especies del género *Serratia*, como un microorganismo establecido naturalmente en la región próxima a las raíces, a la cual se le ha adjudicado actividad antagonista a algunos hongos. KALBE *et al.* (1996), aislaron cepas de *S. liquefaciens*, *Serratia plymuthica* (Lehmann y Neumann 1896) Breed *et al.* 1948 y *Serratia rubidaea* (Stapp 1940) Ewing *et al.* 1973 desde la rizósfera de raps, alcanzando un 12,4% del total de las bacterias antifúngicas aisladas. Estas tres especies, mostraron actividad antagonista hacia diferentes hongos patógenos en experimentos *in vitro*. Su actividad antifúngica se atribuye a la producción de prodigiosina y pirrolnitrina, además de la secreción de enzimas líticas (quitinasas y beta-1,3 glucanasas).

2.6 Bioatrapamiento celular.

Es la inclusión de microorganismos en matrices de geles de cualquier tipo. El atrapamiento de células vivas en matrices de alginato consiste en realizar una suspensión éstas, mezclarlas con una solución de alginato de sodio, y hacer caer la mezcla gota a gota en una solución que contenga cationes multivalentes, usualmente Ca^{2+} . Las gotas se transforman en esferas inmediatamente, atrapando a las células en una matriz tridimensional de alginato iónicamente ligada. Esta biotecnología en la actualidad se este aplicando extensivamente en temas relacionados con el control biológico de agentes causantes de enfermedades en plantas. Asimismo, este proceso tiene aplicaciones para formulaciones de microorganismos benéficos para la agricultura (SMIDSRD y SKJAK-BRAEK, 1990; BREGNI *et al.*, 2000; CIAMPI, 2005).

2.7 Actividad de Agua.

La Actividad de Agua (aw) es la proporción de agua disponible para reacciones biológicas, químicas y bioquímicas (BEUCHAT, 2003). Según KESSLER (1981) la aw de un producto está directamente relacionada con la humedad relativa que lo rodea. En un producto cuya superficie está visiblemente seca, el agua existe en el interior en capilares muy pequeños, entre diminutas partículas, entre moléculas grandes y atadas a las mismas moléculas. Esta adhesión produce una considerable disminución en la presión de vapor. Tal producto puede entonces estar en equilibrio sólo con una

atmósfera externa en la cual la presión de vapor es también considerablemente disminuida.

Los factores que influyen el crecimiento de los microorganismos son la a_w (desde 0.61 a 0.999), temperatura, oxígeno, nutrientes, acidez y pH e inhibidores naturales o añadidos. La mínima a_w que requiere un microorganismo para el crecimiento depende de otros factores: temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, sustancias antimicrobiales y proceso de formulación (BEUCHAT, 2003).

Los límites de crecimiento son encontrados en los contenidos de humedad, los cuales están en equilibrio con las siguientes humedades relativas:

CUADRO 1 Actividad de agua mínima para el crecimiento de microorganismos, expresada en % de humedad (1=100%).

Rango de A_w	Microorganismos inhibidos por la a_w más baja en este rango
1 – 0.95	<i>Pseudomonas, Escherichia, Proteus, Shigella, Klebsiella, Bacillus, Clostridium perfringens</i> y algunas levaduras
0.95 – 0.91	<i>Serratia</i> , <i>Lactobacillus, Salmonella, V. parahaemolyticus, C. Botulinum, Pediococcus</i> , algunos mohos, levaduras (<i>Rhodotorula, Pichia</i>)
0.91 – 0.87	Muchas levaduras (<i>Candida, Torulopsis, Hansenula, Micrococcus</i>)
0.87 – 0.80	Mayoría de mohos (<i>micotoxigenic penicillia</i>), <i>Staphylococcus aureus</i> , mayoría de <i>Saccharomyces, Debaryomyces</i>
0.80 – 0.75	Mayoría de bacterias halófilicas, <i>micotoxigenic aspergilli</i>
0.75 – 0.65	Mohos xerófilicos (<i>Aspergillus chevalieri, A. candidus, Wallemia sebi</i>), <i>Saccharomyces bisporus</i>
0.65 – 0.61	Levaduras osmófilicas (<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>), unos pocos mohos (<i>Aspergillus echinulatus, Monascus bisporus</i>)
< 0.60	No hay proliferación microbial

FUENTE: Adaptado de BEUCHAT (2003).

La a_w es determinada equilibrando la fase líquida del agua en la muestra con la fase de vapor del agua en el espacio de una cámara cerrada y midiendo la humedad relativa de este espacio (AQUALAB, 2005). La importancia de este parámetro dentro de la formulación de biocápsulas, radica en que puede favorecer la supervivencia del microorganismo benéfico y evitar la colonización de microorganismos invasores, si se

logra obtener el valor óptimo de la aw, determinando el tiempo de deshidratación adecuado para las biocápsulas².

² CIAMPI, L. (2004). Ing. Agr. Ph. D. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Comunicación personal.

MATERIAL Y METODO

Los objetivos expuestos en la presente tesis procuran caracterizar y evaluar un método de formulación para llevar a cabo una experiencia de control biológico. El microorganismo biocontrolador de *R. solani* es una bacteria nativa de los suelos del sur del país, que presenta actividad antagonista hacia este hongo patógeno de la papa. La bacteria será bioatrapada en matrices de alginato, siguiendo una metodología previamente diseñada. Al coagularse el alginato origina las cápsulas biológicas, que serán evaluadas respecto de características deseables para esta formulación y en cuanto a su eficiencia inhibitoria frente a *R. solani*.

Para estas finalidades se utilizaron una serie de materiales, entre los cuales se cuentan implementos, reactivos para la confección de los medios de cultivos, y las cepas en estudio. Estos materiales y la forma que explica cómo fue realizado el experimento se detallan a continuación.

3.1 Materiales.

Estos se dividen en dos grandes grupos, las cepas de microorganismos, y los materiales utilizados para fabricar los medios de cultivo y de bioencapsulación.

3.1.1 Cepas utilizadas para el ensayo. Se emplearon dos cepas, una fue *R. solani*, hongo patógeno, entre otros cultivos, a papa (*S. tuberosum*). La otra cepa es *Serratia liquefaciens*, bacteria nativa de los suelos del sur de Chile, antagonista del patógeno. Esta cepa fue obtenida del cepario del laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Siete cepas de *R. solani* fueron aisladas a partir de esclerocios presentes sobre la piel de tubérculos de *S. tuberosum* cv. Atica y Desireé. El cv. Atica fue obtenido del

Fundo Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile, ubicado en la comuna de Valdivia, y el cv. Desireé de la localidad de Carahue, IX Región de La Araucanía.

3.1.2 Componentes de los medios de cultivo para la multiplicación y atrapamiento de la cepa S111. En el presente experimento se utilizaron dos medios principales para lograr que la bacteria se reactivara, se multiplicara y para proporcionarle un adecuado ambiente que le permitiera sobrevivir en óptimo estado al ser bioencapsulada.

El Medio Líquido N°1 fue el primero en elaborarse y otorga condiciones de crecimiento apropiadas para la cepa antagonista S111. También permite la multiplicación de la población bacteriana, la que después de ser cultivada fue concentrada por centrifugación y posteriormente resuspendida en este mismo medio. Su composición se detalla en el Cuadro 2.

CUADRO 2 Composición del Medio Líquido N°1, el cual se emplea para promover la multiplicación de la cepa S111.

Elemento	Cantidad
Cultivo madre ³	200 cc
Extracto de carne	5 g
Peptona de soya	5 g
Sacarosa	2 g
Acido succínico	4 g
Sulfato de amonio	5 g
Agua destilada	800 cc

FUENTE: Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile (2003).

El segundo medio utilizado fue el Homogeneizado, el cual es la base de la solución para bioatrapar las células. Su composición se especifica a continuación:

- Masa celular de 24 h de la cepa S111 resuspendida en medio líquido N°1, y cultivada inicialmente en el mismo medio.
- Material inerte.

³ Cultivo madre: se origina disolviendo 100 ml de melaza en 900 ml de agua. CIAMPI, L. Ing. Agr. Ph. D. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Responsable del Laboratorio de Fitopatología. Comunicación personal.

- Osmoprotectante.
- Precursor.
- Solidificante.

La masa celular de bacterias fue el componente básico, objeto del presente ensayo. Estas células se bioencapsularon dentro de matrices de alginato según el protocolo definido, con el fin de que no perdieran su efectividad inhibitoria contra *R. solani*. El osmoprotectante proporcionó protección contra los cambios de presión osmótica que se producen durante el proceso de deshidratación. El precursor quitina promueve la secreción de quitinasas, sustancias que inhiben el crecimiento del hongo, destruyendo la quitina presente en la pared celular del micelio.

El alginato de sodio reacciona con el gluconato de calcio 50mM presente en el recipiente que recibe la mezcla, provocando que el cultivo homogeneizado coagule al entrar en contacto estos dos componentes. Esto determina la transformación de cada gota del homogeneizado en una biocápsula.

3.1.3 Otros materiales. Además, se utilizaron durante este experimento materiales de vidrio; químicos para los medios de cultivo; campana de flujo laminar, que proporcionó un ambiente estéril para todo el proceso de confección de las cápsulas y su deshidratación; estufas para cultivar las cepas; autoclave para pasteurizar o esterilizar los medios; centrífuga refrigerada para la obtención del pellet bacteriano desde el cultivo líquido; horno Pasteur para esterilizar materiales; bomba peristáltica para bombear el cultivo homogeneizado a través de mangueras plásticas.

Finalmente, se utilizó el medidor de actividad de agua (a_w), que calcula la cantidad libre disponible de este elemento para microorganismos dentro de una determinada sustancia en estado sólido. En este caso específico, la a_w presente en las biocápsulas. El análisis de las muestras se realizó en dependencias de Laboratorio Quimatic S.A., en Santiago de Chile.

El detalle de otros materiales utilizados se encuentra en el Anexo 1.

3.2 Método.

La finalidad del experimento fue evaluar cápsulas biológicas construidas y obtenidas mediante una técnica de bioatrapamiento, y establecer su eficiencia para controlar al agente fitopatógeno *R. solani* bajo condiciones *in vitro*. Para este fin se requiere tener una cepa de *R. solani* patógena a papa, y que pertenezca al grupo de anastomosis AG3. Para este fin se realizaron aislamientos, pruebas de patogenicidad y se aplicó el método de determinación de AG3 de Stewart.

La cepa bioencapsulada S111 debió reactivarse ya que se encontraba liofilizada. Luego se bioencapsuló, procedimiento que tiene como fin llevar la bacteria desde el laboratorio a condiciones de campo.

Una vez finalizado el proceso de bioencapsulación, se evaluó el recuento bacteriano y la capacidad inhibitoria presentada por la bacteria en las diferentes etapas, desde la preparación de los medios hasta la obtención de las cápsulas, deshidratación y almacenamiento. Todo esto con el objetivo de caracterizar el método y evaluar la eficiencia del control biológico *in vitro*.

Con la finalidad de simplificar la comprensión del proceso de bioatrapamiento, se ilustrarán 2 figuras. La Figura 1 presenta un esquema desde la elaboración de medios hasta la obtención del homogeneizado. La Figura 2 muestra los pasos del experimento desde la obtención del homogeneizado hasta la formación de las biocápsulas, incluyendo los procesos de deshidratación y almacenamiento además del otorgamiento de “ventaja”.

La técnica empleada para realizar la presente experiencia se describe detalladamente a continuación.

3.2.1 Obtención, selección y determinación de los grupos AG3 de los aislamientos de *R. solani*. Se procedió a obtener y seleccionar aislamientos potencialmente patógenos del hongo para efectuar las evaluaciones *in vitro*, con la finalidad de determinar la efectividad del control ejercido por la cepa antagonista S111 de *S. liquefaciens* frente a *R. solani*.

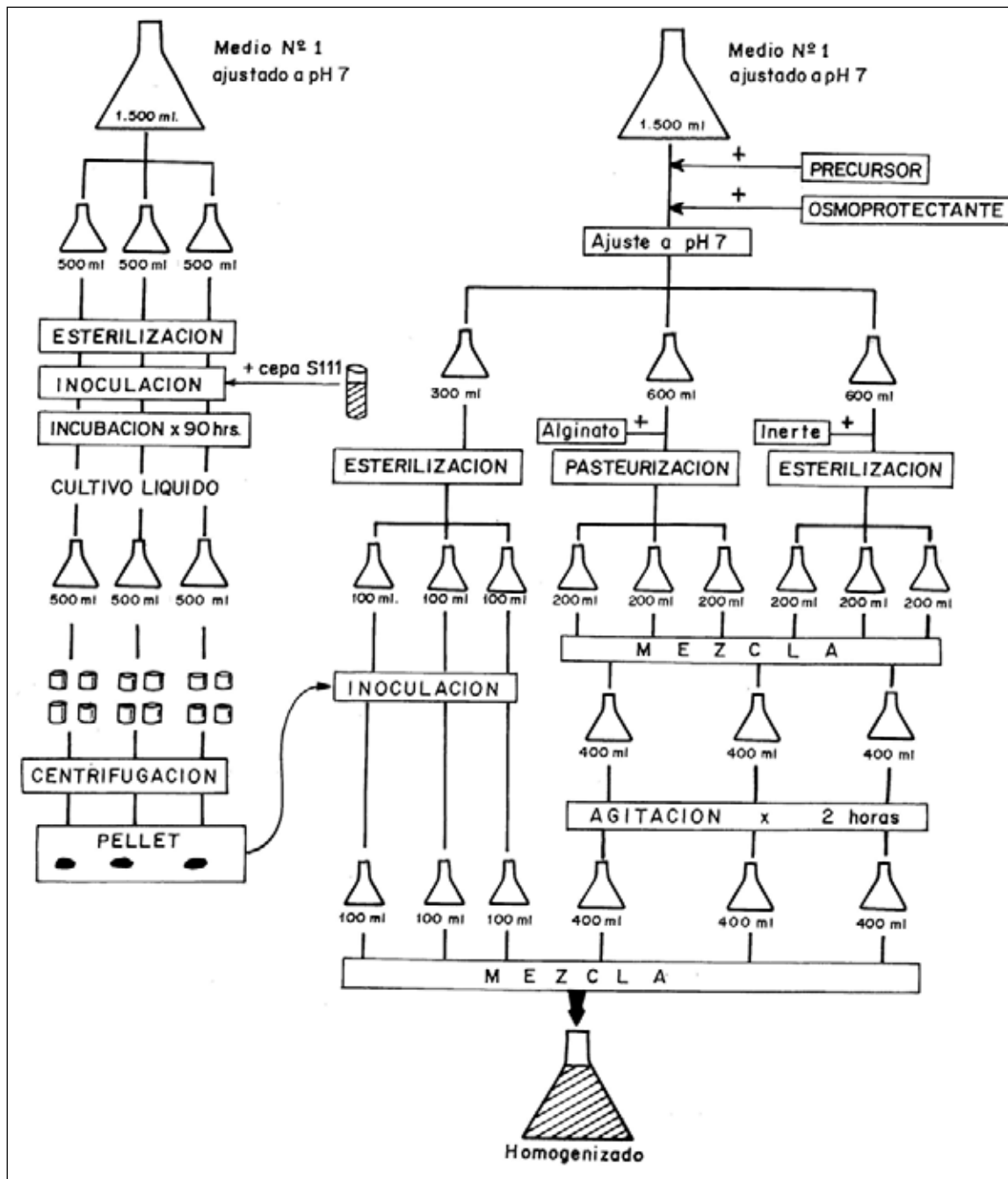


FIGURA 1 Pasos del proceso de bioatrapamiento desde la elaboración de medios hasta la obtención del homogeneizado. Los métodos utilizados en este desarrollo son los normales que se practican en microbiología.

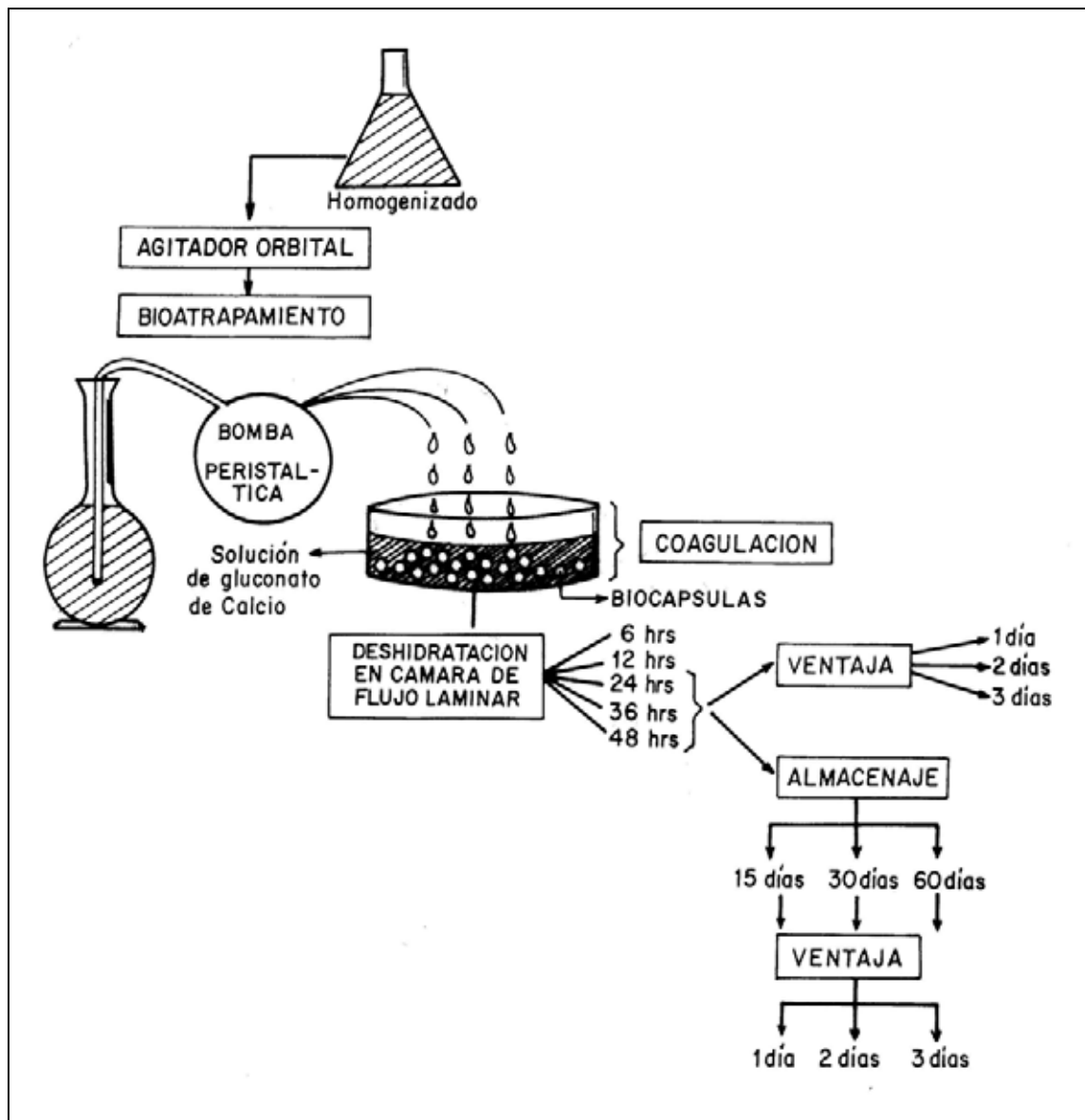


FIGURA 2 Pasos del proceso de confección de las biocápsulas, desde la obtención del homogeneizado hasta la formación de las cápsulas, incluyendo deshidratación, almacenaje y ventaja en días de crecimiento de la bacteria frente a *R. solani*.

La obtención de aislamientos de *R. solani* se efectuó a partir de esclerocios del hongo presentes en la superficie de los tubérculos de papa. Estos últimos fueron lavados con agua y escobillados, procediéndose luego a la extracción los cuerpos de resistencia con bisturí flameado previamente a cada extracción. Los esclerocios fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 2 min, al cabo de los cuales se enjuagaron con agua destilada estéril. Se secaron en papel absorbente estéril, enseguida se fragmentaron y cada sección obtenida se sembró, sumergiéndola en placas con medio de cultivo APD (agar papa dextrosa). Las placas fueron incubadas a 20°C, realizando cultivos puros de *R. solani*, previa comprobación microscópica de las características morfológicas determinantes de la especie (AGRIOS, 1996).

Los aislamientos provenientes de los tubérculos, se sembraron en placas con APD, cada uno con dos repeticiones. De cada aislamiento se hicieron otros dos en tubos con APD, con o sin ácido láctico dependiendo si en el cultivo se advertía la presencia o ausencia de bacterias, respectivamente.

Posteriormente se realizó la determinación de la pertenencia de los aislamientos obtenidos al grupo de anastomosis 3 (AG3) de *R. solani*, grupo que causa patogenicidad al cultivo de la papa. Se prepararon placas Petri con medio Stewart (STEWART, 1962). Este medio permite determinar en forma simple, si una cepa de *R. solani* pertenece al grupo AG3. Paralelamente se repicaron los aislamientos de *R. solani* en placas Petri con medio APD.

El medio Stewart se prepara en dos capas. La primera contiene 0,4 g de cloruro de calcio en 75 cc de agua destilada más 5,2 g de agar Mc Conkey. Esta solución se hizo hervir para su disolución y luego se introdujo en autoclave a 0,75 atm por 10 min. A cada placa Petri se le adicionaron 15 mL de la solución, dentro de una cámara de flujo laminar, para mantener las condiciones de asepsia. Sobre la solución anterior se agregó una capa de pectato que se preparó disolviendo 2 g de polipectato de sodio en 6 cc de etanol. La tercera capa consta de 0,1 g de ácido tetracético etilendiamina (EDTA) disuelto en agua destilada. Esta mezcla se ajustó a pH 7,4 y se autoclavó a 0,75 atm durante 10 min. El volumen que se adiciona para esta capa es de 5 cc. Posteriormente, desde la zona de crecimiento del micelio del hongo, con un

sacabocado N^o4 se procedió a sacar un disco de APD con micelio de *R. solani*, el cual se depositó en el centro de las placas Petri con el medio Stewart. A continuación las placas Petri inoculadas fueron incubadas en estufa de cultivo a un rango de temperatura de 20 a 22°C por 14 días en ausencia de luz total.

Pasadas dos semanas, la presencia de *R. solani* AG3 se reconoce por la tonalidad que adquiere el micelio. De color café pertenece al grupo AG-3, mientras que otros, permanecen completamente albinos (STEWART, 1962).

3.2.2 Establecimiento de la virulencia de los aislamientos de *R. solani*. Los aislamientos del patógeno fueron sometidos a pruebas de virulencia en el Laboratorio de Fitopatología⁴. A través de ellas se determinó el grado de patogenicidad presentado por cada uno, de acuerdo a una escala visual arbitraria que da una puntuación según los daños observados en la planta de papa al ser atacada por *R. solani*.

Para la realización de estas pruebas se utilizó plántulas de papa cultivar Panda® *in vitro*, proporcionadas por la empresa Semillas Taquihue de Osorno.

Dentro de la cámara de flujo laminar se abrieron las placas con las cepas de *R. solani*. Con una pinza desinfectada en alcohol y posteriormente flameada se sacó micelio de 24 h de crecimiento. Posteriormente se procedió a inocular las plantas *in vitro* con el micelio. Luego se abrieron los tubos sellados que contenían las plántulas *in vitro*, y se colocó en su interior trozos de agar con micelio de *R. solani* en la base de la plántula. Posteriormente se volvió a sellar los tubos. Estos fueron incubados en una cámara a temperatura ambiente y con el fotoperiodo controlado a 14 h luz.

Diariamente se realizó una evaluación visual bajo lupa, durante 20 días, estableciendo los síntomas de la enfermedad según la tabla que se presenta en el Cuadro 3, la que fue confeccionada en forma arbitraria.

⁴ CIAMPI, L (1999). Ing. Agr. Ph. D. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Responsable del Laboratorio de Fitopatología. Comunicación personal.

CUADRO 3 Escala utilizada para la evaluación de la virulencia de *R. solani* inoculada en plántulas *in vitro* de papa (*S. tuberosum*).

Valor	Respuesta de los tejidos
0	Sin síntoma
1	Infección puntual
2	Mancha necrótica
3	Necrosis aguda
4	Necrosis general
5	Muerte planta

FUENTE: SILVA (1999).

3.2.3 Confección de las biocápsulas. Con el fin de trasladar en óptimas condiciones el agente controlador cepa S111 de *S. liquefaciens* desde el laboratorio a condiciones de campo, se formularon las bacterias en matrices de alginato, resultando así un biopesticida en forma granular. La cepa S111 se encuentra liofilizada *in vitro* como parte de la colección de cepas del Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile y presenta una comprobada acción antagonista hacia *R. solani* (SCHNETTLER,1993). Esta cepa fue bioencapsulada en matrices de alginato para la posterior elaboración y evaluación de las bioesferas. Para la construcción de las biocápsulas se requirió la preparación de medios y adoptar un protocolo que se detallará a continuación.

3.2.3.1 Preparación de Medios de cultivo. En primer lugar se elaboró el cultivo madre, que constituye la base del medio N°1, utilizado para cultivar la cepa S111. Se disolvió 100 mL de melaza⁵ en 900 mL de agua destilada, el pH se ajustó a 7.0 y se esterilizó en autoclave a 1 atm por 20 min.

Luego se procedió a preparar el medio líquido N°1, que permite la multiplicación de la cepa S111. Se preparó disolviendo 5 g de sulfato de amonio, 4 g de ácido succínico, 2 g de sacarosa, 5 g de peptona de soya, 5 g de extracto de carne en 800 mL de agua destilada. Posteriormente se le adicionaron 200 mL del cultivo madre, sin la cepa S111, y se esterilizó en autoclave a 1 atm por 20 min.

⁵ Melaza: Obtenida desde Levaduras Collico S.A. CIAMPI, L. Ing. Agr. Ph. D. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Responsable del Laboratorio de Fitopatología. Comunicación personal.

3.2.3.2 Cultivo masivo de la cepa S111. Esta etapa consta de tres pasos: activación de la cepa antagonista, preparación del cultivo líquido y elaboración del homogeneizado.

Se inicia la activación de la cepa antagonista S111 con el objetivo de realizar su cultivo masivo. Se tomó una colonia aislada de 48 h, obtenida en una placa de agar peptona, mediante un asa de siembra previamente flameada dentro de la cámara de flujo laminar. La colonia se inoculó en un tubo de ensayo con 15 mL de caldo peptona previamente esterilizado. Para el cultivo del caldo, el tubo se incubó a 28°C por 24 h. Este es el cultivo puro que se utilizó para inocular y proliferar en el medio líquido N°1 (Cuadro 3), usando el 1% para el volumen conocido de medio líquido en matraz.

A continuación se procedió a realizar la preparación del cultivo líquido de la cepa S111. En 1500 mL del medio N°1 se inocula el caldo peptona con la cepa S111 bajo condiciones de asepsia, y se incuba por 90 h en un agitador orbital a 150 rpm y a 28°C, que es cuando la masa bacteriana alcanza su máximo desarrollo.

Para obtener el cultivo homogeneizado se preparó nuevamente el medio N°1, ahora para la resuspensión del pellet de la cepa antagonista, paralelamente a la incubación del cultivo líquido. Se tomaron 1500 mL de medio líquido N°1, al que se le incorporó el precursor quitina en polvo en una concentración del 0.5% y el osmoprotectante betaína al 1%. Luego se calibró el pH a 7.0 para proceder a la división de los 1500 mL en tres fracciones, una de 600 mL para disolver el alginato de sodio 250 cps al 2%, otra fracción de 600 mL para adicionar el material inerte al 7%, y otra de 300 mL para resuspender el pellet de la cepa S111. Una vez disuelto el medio base, en el agitador magnético, se colocan en matraces dentro de un autoclave. El medio con el material inerte se esterilizó a una atm por 20 min y el medio más el alginato se pasteurizó a 0.75 atm durante 10 min, tras lo cual se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Luego, en una campana de flujo laminar, se mezclaron los dos matraces y se agitaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 2 h, obteniéndose el medio fresco para el homogeneizado. Los 300 mL para resuspender el pellet fueron esterilizados.

Al mismo tiempo se tomó el primer matraz conteniendo el medio de cultivo líquido con la cepa ya multiplicada y se dividió en tres porciones de 500 mL, las que se colocaron en frascos de centrifugación esterilizados de 120 mL cada uno, procedimiento realizado en la campana de flujo laminar y balanceados en una balanza Ohaus® modelo Harvard Trip, siendo centrifugadas a 8.000 rpm por 30 min en la centrífuga refrigerada Damon® modelo IEC B-20A. El sobrenadante obtenido se eliminó y con una espátula metálica esterilizada se extrajo el pellet de células, resuspendiéndolo en los 300 mL del medio líquido N°1 esterilizado, el que posteriormente se adicionó a los matraces con alginato y material inerte, mezclándolos con un agitador orbital a 200 rpm por 18 h. Tras esta operación se homogenizó nuevamente mediante el uso de una batidora en velocidad 1 por 5 min, previamente esterilizado el vaso y las respectivas tapas desinfectadas con alcohol para luego proceder al encapsulado. Este cultivo homogeneizado resultante es el que se utiliza para el atrapamiento, ya que el alginato de sodio que contiene actúa como coagulante al entrar en contacto con gluconato de calcio.

3.2.3.3 Bioencapsulación de la cepa antagonista S111. Para este fin se hizo coagular el homogeneizado en una solución de gluconato de calcio 50 mM preparada con agua destilada estéril, disuelto por agitación magnética. El bioatrapamiento se realizó en el interior de una cámara de flujo laminar, mediante una bomba peristáltica que succionó la mezcla rehomogenizada, obtenida en el punto anterior. La mezcla pasó a través de una manguera C-Flex 14 con un diámetro interno de 1.6 mm con lo que se generaron gotas de tamaño uniforme. Las gotas cayeron directamente sobre la solución de gluconato de calcio, se coagularon y se generaron cápsulas de diámetro constante. Estas se dejaron 30 min en la solución para favorecer el endurecimiento y se sacaron del recipiente con un colador esterilizado.

3.2.4 Deshidratación de las biocápsulas. Los gránulos se recogieron y se deshidrataron con un flujo de aire de la cámara de flujo laminar durante los tiempos estimados para este estudio (6 h, 12 h, 24 h, 36 h y 48 h), y a una temperatura de 25°C.

Con la finalidad de conocer la evolución de los distintos parámetros en evaluación, en cada una de estas fases se midió a_w , recuento bacteriano y capacidad inhibitoria de la cepa S111. Sin embargo los tiempos de deshidratación evaluados para aplicaciones prácticas fueron tres: 24 h, 36 h y 48 h de secado en la cámara de flujo laminar. Esto se determinó de esta forma en ensayos preliminares, ya que en cápsulas con menores tiempos de deshidratación se evidenció una humedad excesiva.

Las cápsulas secadas durante estos tiempos de deshidratación se evaluaron adicionalmente con respecto al factor “ventaja”, en las pruebas de eficiencia inhibitoria, lo que se explicará más adelante.

3.2.5 Almacenamiento de las biocápsulas. Con respecto al estudio del comportamiento de las biocápsulas a través del tiempo, se realizaron pruebas con tres tiempos de almacenamiento a temperatura ambiente (18-25°C). A los 15, 30 y 60 días de almacenamiento se tomó una muestra de las cápsulas de cada uno de los tiempos de deshidratación (24h, 36h y 48 h) y se midió capacidad inhibitoria y recuento bacteriano. Dentro de estos ensayos de almacenamiento también se utilizaron las “ventajas” de 1, 2 y 3 días dados a la bacteria.

3.2.6 Características de las biocápsulas. Una parte relevante dentro del presente experimento fue conocer a cabalidad las características de las biocápsulas. La cantidad de agua en su interior, la variación de la población bacteriana de la cepa S111 a medida que se va perdiendo humedad y avanza el tiempo de almacenaje. Finalmente, cómo varía la capacidad de inhibir a *R. solani* de la cepa S111 a través de las distintas fases.

En cada fase de construcción de las bioesferas y en cada etapa de deshidratación y de almacenamiento se realizaron diferentes pruebas. En el Cuadro 5 se presenta un resumen de todas las fases con sus respectivas mediciones realizadas en este ensayo.

CUADRO 4 Resumen de las fases evaluadas y detalle de las pruebas aplicadas en los procesos de fabricación, deshidratación y almacenaje de las biocápsulas.

Fase	Recuento	Inhibición	AW
Cultivo líquido *	X	X	
Homogeneizado **	X	X	
Cápsulas frescas	X	X	X
Cápsulas deshidratadas por 6 h	X	X	X
Cápsulas deshidratadas por 12 h	X	X	X
Cápsulas deshidratadas por 24 h	X	X	X
Cápsulas deshidratadas por 36 h	X	X	X
Cápsulas deshidratadas por 48 h	X	X	X
Almacenaje de cápsulas desh. por 24 h, durante 15 días	X	X	
Almacenaje de cápsulas desh. por 24 h, durante 30 días	X	X	
Almacenaje de cápsulas desh. por 24 h, durante 60 días	X	X	
Almacenaje de cápsulas desh. por 36 h, durante 15 días	X	X	
Almacenaje de cápsulas desh. por 36 h, durante 30 días	X	X	
Almacenaje de cápsulas desh. por 36 h, durante 60 días	X	X	
Almacenaje de cápsulas desh. por 48 h, durante 15 días	X	X	
Almacenaje de cápsulas desh. por 48 h, durante 30 días	X	X	
Almacenaje de cápsulas desh. por 48 h, durante 60 días	X	X	
Ventaja de cápsulas desh. por 24 h, de 1 día		X	
Ventaja de cápsulas desh. por 24 h, de 2 días		X	
Ventaja de cápsulas desh. por 24 h, de 3 días		X	
Ventaja de cápsulas desh. por 36 h, de 1 día		X	
Ventaja de cápsulas desh. por 36 h, de 2 días		X	
Ventaja de cápsulas desh. por 36 h, de 3 días		X	
Ventaja de cápsulas desh. por 48 h, de 1 día		X	
Ventaja de cápsulas desh. por 48 h, de 2 días		X	
Ventaja de cápsulas desh. por 48 h, de 3 días		X	

*Cultivo líquido: medio N°1 más bacterias, cultivado por 90 h.

**Homogeneizado: cultivo líquido más osmoprotectante y precursor.

X= Actividad realizada.

A continuación se explicará en qué consiste cada una de las evaluaciones realizadas durante las fases de la construcción, deshidratación y almacenamiento de las biocápsulas.

3.2.6.1 Mediciones de recuento de colonias. A partir de la incorporación de células bacterianas de la cepa S111 al medio líquido, se efectuaron recuentos poblacionales. El recuento bacteriano consiste en realizar determinaciones de las poblaciones de bacterias en distintas etapas, mediante el recuento en placa. Se tomaron colonias de células, desde los medios acuosos o, en el caso de las cápsulas, provenientes de tres muestras de cápsulas por tratamiento, de 1 g cada una, se molieron. En ambos casos

se sometieron a diluciones decimales en agua destilada estéril. Se tomó la densidad óptica de cada muestra al momento del muestreo, lo que se utilizó como base para las diluciones. Los tubos con las diluciones fueron homogeneizados con un agitador orbital tipo "Vortex" (Vortex Supermixer Lab-Line Instruments Melrose Park, ill, U.S.A.).

El método de siembra en superficie utilizado está descrito por la INTERNATIONAL COMISIÓN ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF) (1988). Se siembra 0,1 cc de muestra sobre la superficie de una placa preparada con agar peptona, y se distribuye uniformemente con una varilla de vidrio.

Por cada dilución se sembraron dos placas, las que se incubaron a 25°C por 24 h. Para el recuento de colonias se utilizó un contador de colonias Leika Québec Darkfield Colony Counter (Leica INC. Búfalo, N.Y.) y un contador manual. Finalmente se seleccionaron las placas provenientes de las diluciones que mostraban entre 30 y 300 colonias, multiplicando el resultado por el exponente positivo de la dilución.

El recuento bacteriano es una medición necesaria para cuantificar las variaciones en los niveles poblacionales de la bacteria benéfica a través del proceso de encapsulación, deshidratación y almacenamiento de las cápsulas de alginato de sodio.

3.2.6.2 Determinación de la capacidad inhibitoria. En cada etapa de la construcción de las esferas de alginato (bacterias en estado líquido hasta cápsulas deshidratadas) se midió la capacidad inhibitoria *in vitro* de la cepa S111 frente *R. solani*, específicamente, a partir de la incorporación de células bacterianas de la cepa S111 al medio líquido.

Se sembró la bacteria y el hongo en una misma placa Petri con APD (agar papa dextrosa), localizándolos de acuerdo a un esquema único o molde (Figura) para todas las placas. Se inoculó la bacteria *S. liquefaciens* sobre cuatro puntos la placa (en cada punto una gota en el caso de las fases líquidas y una cápsula desde la formación de éstas), formando una media luna. Posteriormente se insertó un disco de 10 mm de diámetro de APD con *R. solani* proveniente de una placa cultivada por 24 h. La

temperatura de incubación de las placas fue de 25°C, constante, lo que se logró con estufas especiales de cultivo.

Este procedimiento se repitió para los distintos tratamientos en las pruebas de inhibición sembrando la bacteria y el hongo al mismo tiempo. Solamente se produjo un desfase en el momento de la siembra de la bacteria respecto al momento de la siembra del hongo en los tratamientos en que se pretendió evaluar el efecto del factor “ventaja”. Esto con el fin de evaluar la posibilidad de favorecer a la bacteria para contrarrestar el avance del hongo, lo que se explicará más adelante.

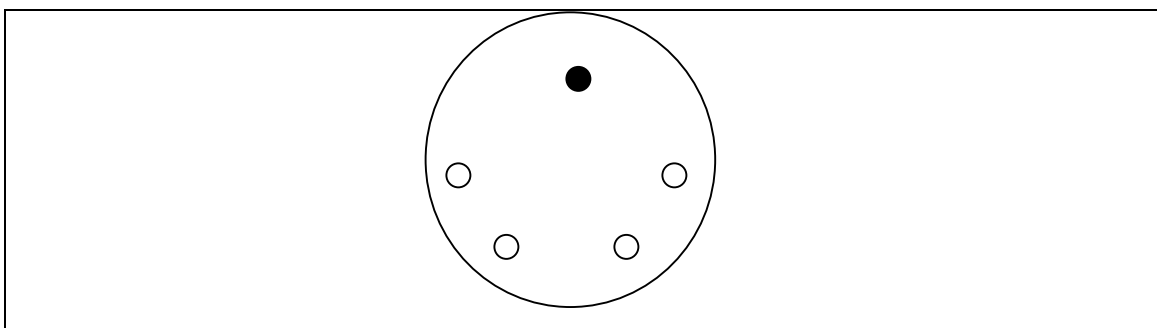


FIGURA 3 Esquema del molde utilizado en las pruebas de inhibición para realizar la siembra de la bacteria (blanco) y del hongo (negro), desde que las bacterias están en medio líquido hasta cápsulas deshidratadas.

Cada 24 h se midió el crecimiento diario del hongo, en cm² por día. Para llevar a cabo esta medición, se marcó cada placa con un lápiz indeleble el borde del crecimiento diario que presentó el hongo, dibujando tantas líneas como días en que creció el hongo. Una vez que el hongo dejó de crecer, se traspasó el dibujo de cada placa a papel mantequilla y posteriormente se midió el área de crecimiento diario de *R. solani* con un planímetro. Debido al error propio de este instrumento, se realizó tres veces cada medición y se trabajó con el promedio de estas tres. El testigo consistió en medir el crecimiento diario de *R. solani* en una placa Petri sin la siembra de bacterias, sólo el hongo.

3.2.6.3 Determinación de la Actividad de Agua (aw). Es la cantidad de agua libre presente en un determinado material en estado sólido, es decir, el agua que no está íntimamente comprometida. Su estimación se realiza con el fin de hacer un seguimiento a la evolución de los niveles de actividad de agua en las distintas etapas de la encapsulación, desde la formación de la cápsula. Así es posible comparar estos resultados con otros obtenidos por diversos investigadores, los que han determinado niveles óptimos de actividad de agua que debe estar presente en las cápsulas, para que el organismo benéfico pueda mantener su viabilidad y no proliferen organismos invasores en la cápsula misma.

La finalidad de esta medición fue determinar qué tiempo de deshidratación es el más adecuado en el proceso de fabricación de las biocápsulas, teniendo en cuenta que el rango óptimo de aw a lograr con estos tiempos es de 0.5 a 0.6⁶.

Se tomaron muestras de las cápsulas frescas, inmediatamente formadas. Se colocaron en una placa Petri esterilizada, y posteriormente sellada con cinta adhesiva, con el fin de evitar contaminación externa y deshidratación. El mismo procedimiento se efectuó con las cápsulas con 6 h, 12 h, 24 h, 36 h y 48 h de deshidratación.

Estas muestras fueron enviadas a Quimatic. S.A. en Santiago, para su análisis y obtención de los valores de aw.

3.2.7 Otorgamiento de ventaja. Las evaluaciones de la eficiencia inhibitoria se realizaron, como ya se mencionó, en cápsulas con los tiempos de deshidratación y de almacenamiento determinados para este estudio. El hongo y las bacterias se sembraban simultáneamente sobre la placa. Sin embargo la observación de algunas cápsulas que no alcanzaban a hidratarse y que finalmente se veían sobrepasadas por la invasión micelial del hongo, llevó a la determinación de otorgarle tiempos de “ventaja” a la bacteria. La cápsula se inoculó sobre la placa con APD con 1, 2 y 3 días antes de sembrar el hongo. Esto con la finalidad de observar si esta “ventaja” favorecía

⁶ CIAMPI, L. (2004). Ing. Agr. Ph. D. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Comunicación personal.

a la bacteria en su reactivación y mejoraba su eficiencia de control de crecimiento sobre el hongo.

Es así como finalmente el factor “ventaja” se evaluó sobre cápsulas con tiempos de deshidratación de 24 h, 36 h y 48 h y con períodos de almacenamiento de 15 días, 30 días y 60 días.

3.2.8 Diseño experimental. Primero se realizó un diseño completamente al azar para el testigo y las primeras ocho primeras fases nombradas en el Cuadro 5.

El modelo de este diseño experimental es el siguiente:

$$Y_{ijh} = u + T_i + e_{ij}$$

Y_{ijh} = variable dependiente (efecto de inhibición de la bacteria sobre *R. solani*)

u = media poblacional

T_i = efecto de i -ésimo tratamiento ($i = 1, 2, 3 \dots 9$)

e_{ijh} = error experimental

La finalidad de este diseño fue observar la evolución de la capacidad inhibitoria a través de las fases líquidas, cápsulas frescas y deshidratadas.

El segundo diseño experimental corresponde a un diseño completamente al azar con arreglo factorial de los tratamientos. Se realizaron ANDEVAS de doble entrada, para diseños con dos factores y su respectiva interacción. Previamente se comprobaron los supuestos correspondientes y en los casos en que se encontraron diferencias significativas o altamente significativas se recurrió a pruebas a posteriori, como la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Esto se utilizó para la variable área de avance. Se tomó como variable de respuesta el área de avance (sinónimo de efecto de inhibición), medida en cm^2 , la cual fue evaluada en los tratamientos de las cápsulas secas. A mayor área de avance del crecimiento del hongo, menor efecto inhibitorio de la bacteria y viceversa.

El modelo empleado fue el siguiente:

$$Y_{ijh} = u + V_i + A_j + (V * A)_{ij} + e_{ijh}$$

Y_{ijh} = variable dependiente (efecto de inhibición de la bacteria sobre *R. solani*)

u = media poblacional

V_i = efecto de la i -ésima ventaja ($i = 1,2,3,4$)

A_j = efecto del j -ésimo tiempo de almacenamiento ($i = 1,2,3,4$)

$(V*A)$ = efecto de la interacción entre V y A

e_{ijh} = error experimental

La finalidad del segundo diseño fue evaluar las cápsulas secas (a partir de 24 h de deshidratación). Se consideraron las cápsulas con tiempos de deshidratación de 24 h, 36 h y 48 h. Cada tiempo de deshidratación con sus respectivos tiempos de almacenamiento (0, 15, 30 y 60 días) y con las respectivas ventajas otorgadas (0,1,2 y 3 días).

Además, para determinar el grado de influencia de la actividad de Agua (a_w) sobre la capacidad inhibitoria, se realizó un análisis de regresión simple.

4 PRESENTACION DE RESULTADOS

4.1 Aislamientos de *Rhizoctonia solani* y comprobación de su pertenencia al grupo de anastomosis AG3.

Se obtuvieron siete aislamientos de *R. solani*, provenientes de esclerocios presentes sobre tubérculos de papa (*S. tuberosum*) cultivares Ática y Desireé. A la observación visual, estos órganos evidenciaron costras de sarna negra.

Al ver los aislamientos bajo una lupa, se verificó que la morfología corresponde a la descrita para esta especie por Parmenter y Whitney (1970), citados por SCHNETTLER (1993) y SNEH *et al.* (1994). Esta se refiere a células multinucleadas en hifas vegetativas jóvenes, algunas sombras de pigmentación café en las hifas, ramificaciones cerca del septo distal de una célula de hifas vegetativas jóvenes, constricción de las hifas y formación de un septo cerca del punto de origen de la ramificación de las hifas. Micelio carente de cualquiera de estas características no puede ser asignado a la especie *R. solani*.



FIGURA 4 Morfología de *R. solani* (CIAMPI, 2002). Fotografía digital, L. Ciampi Ph. D., Laboratorio de Fitopatología, Universidad Austral de Chile.

Los aislamientos obtenidos se designaron con letras desde la A hasta la G (Cuadro 5).

CUADRO 5 Aislamientos de *R. solani* obtenidos a partir de esclerocios presentes sobre tubérculos de papa (*S. tuberosum*).

Nº Placa	Nº Papa	Variedad / Procedencia	Aislamiento	Agar para aislar
1	1	Atica / Santa Rosa	A	APD*
2	2	Atica / Santa Rosa	B	APD
3	1	Desireé / Carahue	C	APD
4	4	Desireé / Carahue	D	APD*
5	2	Desireé / Carahue	E	APD*
6	3	Desireé / Carahue	F	APD*
7	4	Desireé / Carahue	G	APD*

APD* Agar papa dextrosa con ácido láctico

APD Agar papa dextrosa sin ácido láctico

La comprobación de la pertenencia de los aislamientos obtenidos al grupo de anastomosis AG-3, se realizó mediante la siembra de éstos sobre el medio Stewart. Después de los 14 días de incubación, se observó que todos los aislamientos presentaban una coloración café característica y determinante del AG-3. Esto se debe a la capacidad de este grupo patógeno a papa de romper la capa de pectato de este medio, y de nutrirse de la capa basal de agar McConkey, que le confiere el color café. Por lo tanto todos los aislamientos obtenidos pertenecen al grupo de anastomosis AG-3, patógeno al cultivo de la papa, y sirven al propósito esencial de evaluar la capacidad inhibitoria de la cepa S111 de *S. liquefaciens*.

El objetivo de obtener los aislamientos de *R. solani* patógenos a papa fue contar con una cepa adecuada para evaluar la capacidad inhibitoria de la cepa bacteriana a través de los procesos de elaboración, almacenaje y deshidratación de las biocápsulas. Al cumplir todos los aislamientos con los requisitos, se optó por escoger el aislamiento B.

4.2 Establecimiento de la virulencia de las cepas de *R. solani*

Posterior a la realización del ensayo, como parte práctica de otra investigación, los aislamientos de *R. solani* obtenidos fueron evaluados en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, concluyéndose que la cepa utilizada en la presente tesis es altamente virulenta a papa, obteniendo un puntaje de 5 puntos en la escala utilizada para la evaluación de la virulencia.

4.3 Determinación de las características de las biocápsulas mediante evaluaciones.

A continuación se presentan las pruebas realizadas en las diferentes etapas de la construcción de las bioesferas, desde la confección de los medios de cultivo hasta la coagulación del alginato con la cepa S111, deshidratación y almacenamiento de las biocápsulas. Se presenta cada evaluación con los respectivos resultados obtenidos.

4.3.1 Mediciones de recuento de colonias. Una serie de mediciones de recuento bacteriano a través de las distintas fases constituyentes del presente experimento, fueron obtenidas.

El Cuadro 6 y la Figura 5 muestran cómo evoluciona el recuento de la cepa S111 a través del proceso de confección de las cápsulas, su deshidratación y posterior almacenamiento.

El recuento bacteriano experimentó una leve disminución durante el proceso de bioatrapamiento y en las etapas de deshidratación y de almacenamiento. En el Cuadro 6 y en la Figura 5 se observa que el cultivo homogeneizado y el cultivo líquido presentan los mayores recuentos bacterianos. Por el contrario, las cápsulas almacenadas durante 60 días, el menor. Los recuentos van disminuyendo a medida que las cápsulas van perdiendo humedad y el tiempo de almacenamiento es mayor.

CUADRO 6 Valores de recuento bacteriano obtenidos en cada una de las etapas que constituyen el experimento (promedio de 3 matraces en fases líquidas y de 3 muestras de 1 g en el caso de las cápsulas).

Etapa de confección y almacenaje de cápsulas	Recuento bacteriano (ufc/ml)
Cultivo Líquido	$6,8 \times 10^{10}$
Homogeneizado	$4,5 \times 10^{11}$
Cápsulas frescas	$1,2 \times 10^{10}$
Cápsulas con 6 h de deshidratación	$1,1 \times 10^{10}$
Cápsulas con 12 h de deshidratación	$1,4 \times 10^{10}$
Cápsulas con 24 h de deshidratación	$3,4 \times 10^9$
Cápsulas con 36 h de deshidratación	$2,7 \times 10^9$
Cápsulas con 48 h de deshidratación	$1,1 \times 10^9$
Cápsulas con 15 días de almacenaje	$7,5 \times 10^8$
Cápsulas con 30 días de almacenaje	$6,6 \times 10^8$
Cápsulas con 60 días de almacenaje	$1,2 \times 10^8$

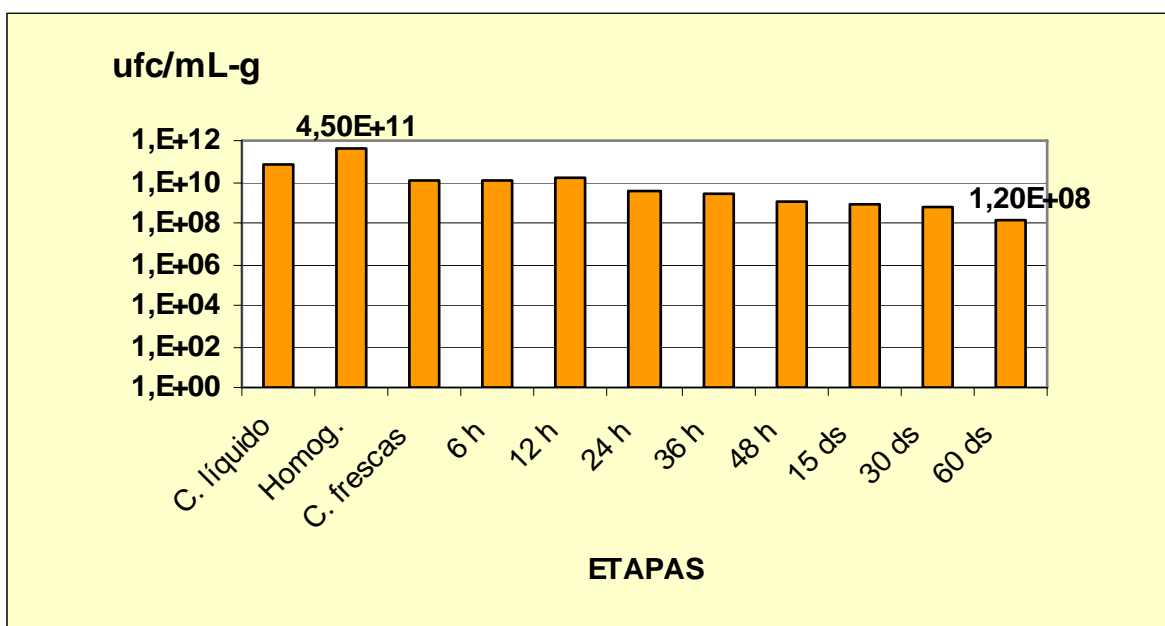


FIGURA 5 Recuento de unidades formadoras de colonias (ufc) durante las etapas del proceso de bioatrapamiento y conservación de las biocápsulas (promedio de 3 matraces en fases líquidas y de 3 muestras de 1 g en el caso de las cápsulas).

Es posible apreciar que los recuentos se pueden asignar a dos categorías. La primera es la etapa de cultivo y la segunda se refiere a las cápsulas confeccionadas. En esta última fase es donde la población de bacterias disminuye tanto en el proceso de deshidratación como en el de almacenaje.

4.3.2 Determinación de la capacidad inhibitoria. Se analizaron 9 tratamientos para establecer cuánto varía eficiencia inhibitoria de la cepa S111 hacia *R. solani*, al pasar de un estado o proceso a otro (primer diseño experimental). La inhibición se cuantificó en el testigo, cultivo líquido, homogeneizado, cápsulas frescas, cápsulas con 6 h, 12 h, 24 h, 36 h y 48 h de deshidratación, mediante pruebas de antagonismo *in vitro*.

Se realizó una ANDEVA (Anexo 2), previa comprobación de supuestos, la que evidenció diferencias altamente significativas entre los tratamientos. Para determinar cuál o cuáles de los tratamientos son similares o diferentes, se realizó la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey, que se presenta en el Cuadro 7.

CUADRO 7 Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey (95%) para la variable área de avance diario del hongo por tratamiento.

Tratamiento	Obs.	Area avance micelial (cm ²)*	Grupos Homogéneos	Avance micelial
Cultivo homogeneizado	5	29.75	g	43 %
Cultivo líquido	5	33.04	f	48 %
Cápsulas 00 h de deshidratación	5	38.48	e	56 %
Cápsulas 06 h de deshidratación	5	39.99	d e	58 %
Cápsulas 12 h de deshidratación	5	42.29	d	61 %
Cápsulas 24 h de deshidratación	5	52.70	c	76 %
Cápsulas 36 h de deshidratación	5	56.04	b	81 %
Cápsulas 48 h de deshidratación	5	58.28	b	85 %
Testigo (<i>R. solani</i> sola)	5	69.00	a	100 %
DHS (5%)		3.11		

Letras distintas denotan diferencias estadísticas, nivel de significación del 5%, según TUKEY.

* Area de crecimiento diario de *R. solani* en placas petri (punto 3.2.6.2 de Material y Método).

El Cuadro anterior presenta los ocho tratamientos evaluados, más el testigo. Estos están ordenados de menor a mayor área de crecimiento final del hongo, es decir, de mayor a menor eficiencia en la capacidad de inhibición de la bacteria frente al hongo.

De acuerdo a los datos anteriores, es posible apreciar que la mayor capacidad en inhibir el crecimiento micelial de *R. solani*, la presentó el cultivo homogeneizado. Esto se refleja con una menor área de crecimiento del hongo respecto de los otros tratamientos. Lo sigue el medio líquido y posteriormente las cápsulas frescas. Estos tres primeros tratamientos son diferentes entre sí. No obstante, el tratamiento de las cápsulas frescas presenta similitud en el área de crecimiento con respecto de las cápsulas con 6 h de deshidratación, y estas últimas presentan similitud con las cápsulas con 12 h de deshidratación.

Las cápsulas con 24 h de tiempo de secado presentan una mayor capacidad inhibitoria que las cápsulas con 36 h de deshidratación y menor con relación a las cápsulas que se deshidrataron por 12 horas. Sin embargo, hay similitud entre las áreas de crecimiento diario del hongo de los tratamientos de las cápsulas con 36 h y 48 h de deshidratación. El testigo presentó la mayor área de crecimiento del hongo, siendo diferente a todos los tratamientos.

Otra forma de entender la capacidad inhibitoria de la bacteria es observando el porcentaje de avance diario. El 100% de avance lo representa el testigo, tratamiento en el cual *R. solani* pudo crecer hasta abarcar la totalidad de la placa petri, es decir 69 cm² al no tener competencia. Se advierte entonces que el homogeneizado tiene el menor porcentaje de avance, siendo el de mayor eficiencia inhibitoria. De igual manera las cápsulas con 24 h de deshidratación presentan el menor porcentaje de avance del hongo entre los tratamientos de cápsulas secas (24 h, 36 h y 48 h de deshidratación).

4.3.2.1 Determinación de la capacidad inhibitoria de las cápsulas deshidratadas. Con la finalidad de determinar si hubo diferencia significativa específicamente entre los tratamientos de 24 h, 36 h y 48 h de tiempo de deshidratación, en cuanto a su efectividad de capacidad de inhibición, se realizó una ANDEVA de mayor especificidad (Anexo 3), previa comprobación de supuestos, considerando estos tratamientos más el

testigo, la cual muestra que hay diferencias significativas entre los tratamientos. El objetivo de realizar esta operación estadística más delimitada fue efectuar una selección práctica del mejor tratamiento para las condiciones de campo. Para terreno lo más adecuado es llevar cápsulas secas, condición que cumplen las cápsulas de 24 h, 36 h y 48 h de deshidratación. Se excluyen así las bacterias que se encuentran en medio líquido o en cápsulas húmedas al tacto. Esto tiene un fin práctico, pues la estructura granular seca se puede aplicar en condiciones de campo con implementos usuales en la agricultura.

La prueba de Tukey realizada (Cuadro 8), denota una disminución de la efectividad del control de inhibición de la bacteria frente al hongo a medida que aumenta el tiempo de deshidratación de las cápsulas, es decir, la cápsula de 24 h de deshidratación es la que presenta una mayor eficiencia en cuanto al control inhibitorio frente a *R. solani*. Las cápsulas con 36 h de deshidratación presentan una menor eficiencia inhibitoria que las de 24 h y mayor frente a las cápsulas de 48 h de deshidratación.

CUADRO 8 Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey (95%) para el área de crecimiento arrojada por las cápsulas de los tratamientos de 24 h, 36 h y 48 h de deshidratación.

Tratamiento	Obs.	Area avance micelial (cm ²)*	Grupos homogéneos
Cápsulas 24 h secado	5	52.70	d
Cápsulas 36 h secado	5	56.04	c
Cápsulas 48 h secado	5	58.28	b
Testigo	5	69.00	a
DHS (5%)		2.06	

Letras distintas denotan diferencias estadísticas, nivel de significación del 5%, según TUKEY.

* Area de crecimiento diario de *R. solani* en placas petri (punto 3.2.6.2 de Material y Método).

Con el propósito de verificar la importancia de los factores “ventaja” y almacenamiento, sobre los valores de control de inhibición, se realizaron ANDEVAS de doble entrada (segundo diseño experimental), las que se aplicaron a cada uno de los

tiempos de deshidratación empleados en el secado de las cápsulas, es decir, 24 h, 36 h y 48 h.

4.3.2.1.1 Capacidad inhibitoria de cápsulas con 24 h de deshidratación frente a los factores almacenaje y “ventaja”. La primera ANDEVA de doble entrada realizada (Anexo 4), demostró que hubo diferencias altamente significativas entre los tratamientos de las cápsulas de 24 h de deshidratación. Además evidenció una interacción positiva entre el factor almacenaje y “ventaja”, como lo muestra la Figura 6.

La gráfica de interacción muestra que la importancia del factor “ventaja” para cápsulas deshidratadas por 24 h, varía de acuerdo al tiempo de almacenaje al cual estuvieron sometidas estas cápsulas.

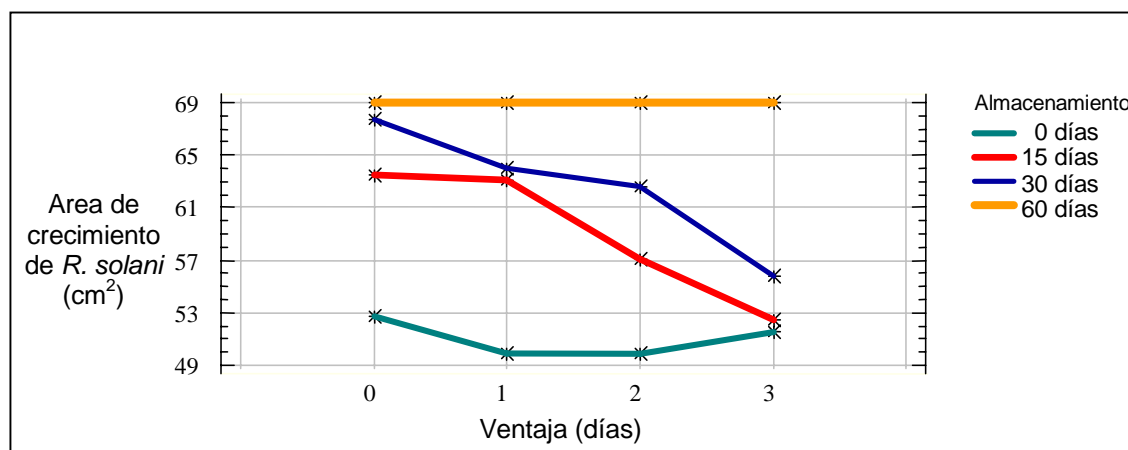


FIGURA 6 Interacción de la capacidad de inhibir a *R. solani* de las cápsulas con 24 h de deshidratación, respecto a los factores ventaja y almacenaje.

En la Figura 6 se observa que las cápsulas sin almacenaje tienden a mejorar su capacidad de inhibir a *R. solani* a medida que aumenta el factor “ventaja”. Las cápsulas con 15 y 30 días de almacenaje presentan una notoria mejoría en su capacidad de inhibir al hongo, a medida que se les otorga mayor “ventaja” para su reactivación. Sin embargo las cápsulas con 60 días de almacenaje no incrementan su eficiencia de control al aumentar la “ventaja”, si no que ésta permanece invariable.

El Test de Tukey de Rangos Múltiples (Cuadro 9) realizado para los tiempos de almacenamiento, evidencia diferencias altamente significativas entre la efectividad del control inhibitorio para los distintos tiempos de almacenaje para cápsulas con 24 h de deshidratación. El tratamiento que observó un mejor control fue el de 0 días de almacenaje, seguido por el de las cápsulas de 15 días de almacenaje.

Sin embargo, no hubo diferencias significativas a partir de los 30 días de almacenamiento, siendo similares los valores de control de inhibición entre los tratamientos de 30 y 60 días de almacenaje de cápsulas con 24 h de deshidratación.

CUADRO 9 Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey (95%) para la variable tiempo de almacenaje de las cápsulas de 24 h de secado.

Tratamiento	Obs.	Area avance micelial (cm ²)*	Grupos homogéneos
0 días de almacenaje	5	57.20	c
15 días de almacenaje	5	63.45	b
30 días de almacenaje	5	67.67	a
60 días de almacenaje	5	69.00	a
DHS (5%)		2.63	

Letras distintas denotan diferencias estadísticas, nivel de significación del 5%, según TUKEY.
* Area de crecimiento diario de *R. solani* en placas petri (punto 3.2.6.2 de Material y Método).

El Test de Tukey de Rangos Múltiples (Cuadro 10) realizado para el factor “ventaja” en cápsulas de 24 h de secado, denota diferencias altamente significativas entre los tratamientos. A medida que se le otorgan más días de “ventaja” a la bacteria frente al hongo, para rehidratarse y reproducirse, ésta ejerce un mejor control inhibitorio.

CUADRO 10 Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey (95%) para la variable ventaja de siembra otorgada a las cápsulas con 24 h de secado.

Ventaja	Obs.	Area avance micelial (cm ²)*	Grupos homogéneos
3 días	20	57.20	d
2 días	20	59.64	c
1 días	20	61.51	b
0 días	20	63.21	a
DHS (5%)		1.31	

Letras distintas denotan diferencias estadísticas, nivel de significación del 5%, según TUKEY.
* Area de crecimiento diario de *R. solani* en placas petri (punto 3.2.6.2 de Material y Método).

4.3.2.1.2 Capacidad inhibitoria de cápsulas con 36 h de deshidratación frente a los factores almacenaje y “ventaja”. La segunda ANDEVA de doble entrada realizada (Anexo 5), demostró que había diferencias altamente significativas entre los tratamientos de las cápsulas de 36 h de deshidratación. Esta ANDEVA también evidenció la existencia de una interacción positiva entre los factores “ventaja” y almacenamiento, como lo muestra el Figura 7.

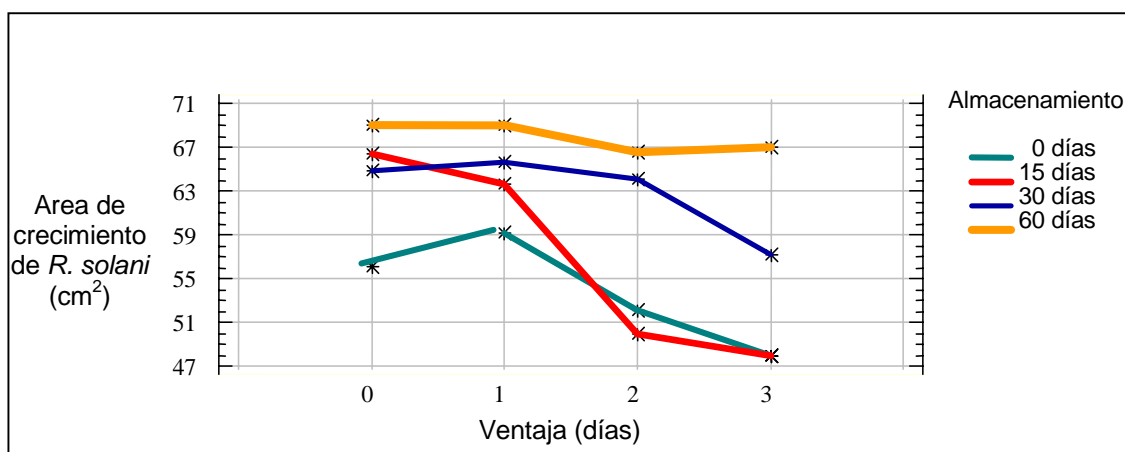


FIGURA 7 Interacción de la capacidad de inhibir a *R. solani* de las cápsulas con 36 h de deshidratación, respecto a los factores ventaja y almacenamiento.

Para los tiempos de almacenaje de 0, 15 y 30 días se presenta una tendencia clara que indica una mejoría en el control de inhibición a medida que se les otorga a las cápsulas una mayor “ventaja” en días para rehidratarse antes de la siembra del hongo. En las cápsulas con 60 días de almacenamiento la tendencia en el control de inhibición permanece prácticamente constante, sin percibirse una mejoría considerable al aumentar la “ventaja”.

El Test de Tukey de Rangos Múltiples (Cuadro 11) realizado para los tiempos de almacenamiento de las cápsulas de 36 h de secado, evidencia una clara tendencia a mejorar el control inhibitorio a medida que disminuye el tiempo de almacenaje para estas cápsulas.

CUADRO 11 Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey (95%) para la variable tiempo de almacenaje de las cápsulas de 36 h de secado.

Tratamiento	Obs.	Area avance micelial (cm ²)*	Grupos homogéneos
0 días de almacenaje	20	53.82	d
15 días de almacenaje	20	56.97	c
30 días de almacenaje	20	62.94	b
60 días de almacenaje	20	67.88	a
DHS (5%)		1.24	

Letras distintas denotan diferencias estadísticas, nivel de significación del 5%, según TUKEY.

* Area de crecimiento diario de *R. solani* en placas petri (punto 3.2.6.2 de Material y Método).

El Test de Tukey de Rangos Múltiples (Cuadro 12), realizado para el factor “ventaja”, demuestra que a medida que aumenta el factor “ventaja” hay una mejoría en la capacidad de inhibir a *R. solani* por parte de las cápsulas de 36 h de deshidratación.

CUADRO 12 Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey (95%) para la variable ventaja de siembra otorgada a las cápsulas con 36 h de secado.

Ventaja	Obs.	Area avance micelial (cm ²)*	Grupos homogéneos
3 días	20	55.00	c
2 días	20	58.18	b
1 días	20	64.09	a
0 días	20	64.33	a
DHS (5%)		1.24	

Letras distintas denotan diferencias estadísticas, nivel de significación del 5%, según Tukey.

* Area de crecimiento diario de *R. solani* en placas petri (punto 3.2.6.2 de Material y Método).

4.3.2.1.3 Capacidad inhibitoria de cápsulas con 48 h de deshidratación frente a los factores almacenaje y “ventaja”. La tercera ANDEVA de doble entrada realizada (Anexo 6), demostró que había diferencias altamente significativas entre los tratamientos de las cápsulas de 48 h de deshidratación. También, como en los casos anteriores, se evidenció una interacción positiva entre los factores “ventaja” y almacenamiento, como lo muestra el Figura 8.

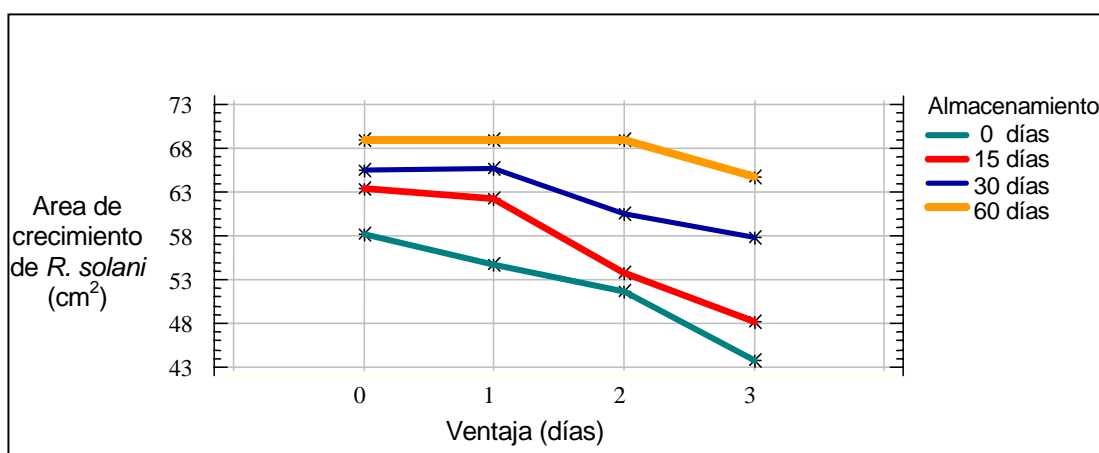


FIGURA 8 Interacción de la capacidad de inhibir a *R. solani* de las cápsulas con 48 h de deshidratación, respecto a los factores ventaja y almacenamiento.

Existe una tendencia a mejorar el control inhibitorio del crecimiento de *R. solani* por parte de la bacteria a medida que se le otorga mayor “ventaja” a esta última. Las cápsulas con 60 días de almacenaje tienden a mejorar su acción inhibitoria a medida que se les otorga una mayor “ventaja”, sin embargo la mejoría mostrada no marca una gran diferencia con respecto a lo revelado por las cápsulas con 60 días de almacenaje de los tiempos de deshidratación de 24 h y 36 h.

El Test de Tukey de Rangos Múltiples (Cuadro 13) realizado para los tiempos de almacenamiento, muestra una disminución de la efectividad del control inhibitorio a medida que avanza el tiempo de almacenamiento de las cápsulas con 48 h de deshidratación.

El Test de Tukey de Rangos Múltiples (Cuadro 14) realizado para el factor “ventaja” muestra que a medida que se adelanta más el tiempo de siembra de la bacteria con respecto a la siembra del hongo, mayor efectividad de control inhibitorio presenta frente a éste.

CUADRO 13 Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey (95%) para la variable tiempo de almacenaje de las cápsulas de 48 h de secado.

Factor	Obs.	Area avance micelial (cm ²)*	Grupos homogéneos
0 días de almacenaje	20	52.14	d
15 días de almacenaje	20	56.88	c
30 días de almacenaje	20	62.38	b
60 días de almacenaje	20	67.96	a
DHS (5%)		1.07	

Letras distintas denotan diferencias estadísticas, nivel de significación del 5%, según TUKEY.

* Area de crecimiento diario de *R. solani* en placas petri (punto 3.2.6.2 de Material y Método).

CUADRO 14 Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey (95%) para la variable ventaja de siembra otorgada a las cápsulas con 48 h de secado.

Ventaja	Obs.	Area avance micelial (cm ²)*	Grupos homogéneos
3 días	20	53.65	d
2 días	20	58.72	c
1 días	20	62.94	b
0 días	20	64.05	a
DHS (5%)		1.07	

Letras distintas denotan diferencias estadísticas, nivel de significación del 5%, según TUKEY.
* Area de crecimiento diario de *R. solani* en placas petri (punto 3.2.6.2 de Material y Método).

Con el fin de ilustrar los resultados anteriores de una forma más simple se presenta un cuadro resumen de los valores de inhibición de las cápsulas de 24 h, 36 h y 48 h de deshidratación, incorporando los factores almacenamiento y “ventaja”.

CUADRO 15 Resumen de valores expresados como área de crecimiento (cm²) de *R. solani* frente a cápsulas almacenadas de 0 a 60 días, con ventaja frente al hongo de 0 a 3 días y con tres tiempos de secado.

Almacenaje	Cap. 24 h secado	Cap. 36 h secado	Cap. 48 h secado
0 días	57.20 ⁽¹⁾ c	53.82 d	52.14 d
15 días	63.45 b	56.97 c	56.88 c
30 días	67.67 a	62.94 b	62.38 b
60 días	69.00 a	67.88 a	67.96 a
Ventaja			
3 días	57.20 d	55.00 c	53.65 d
2 días	59.64 c	58.18 b	58.72 c
1 días	61.51 b	64.09 a	62.94 b
0 días	63.21 a	64.33 a	64.05 a

Letras distintas por columna denotan diferencias estadísticas, nivel de significación del 5%, según TUKEY.

(1) Cada cifra es el promedio de 5 observaciones.

La tendencia general que se aprecia a partir del cuadro anterior es que a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento de las cápsulas, disminuye la eficiencia de la capacidad inhibitoria, y que a medida que aumentan los días de “ventaja” para la bacteria frente a la siembra del hongo, aumenta la capacidad inhibitoria de la bacteria. Además, en los tres casos, hubo una interacción positiva entre “ventaja” y almacenamiento, lo que se demuestra en los gráficos de interacción. En general a menor tiempo de almacenamiento tenga la cápsula, mejor responde al factor “ventaja”.

4.3.3 Determinación de la Actividad de Agua (aw). Los valores de actividad de agua fueron entregados por el laboratorio QUIMATIC S.A., en la ciudad de Santiago.

El Cuadro 16 evidencia una disminución de los valores de actividad de agua desde que la cápsula se forma, momento donde presenta máxima humedad, y a medida que ésta va experimentando el proceso de deshidratación mediante el flujo de aire en la cámara de flujo laminar.

CUADRO 16 Valores de Actividad de Agua obtenidos en las distintas etapas de deshidratación de las cápsulas.

Etapa de la deshidratación	Actividad de agua (aw)
Cápsulas frescas	0,998
Cápsulas con 6 h de secado	0,995
Cápsulas con 12 h de secado	0,993
Cápsulas con 24 h de secado	0,627
Cápsulas con 36 h de secado	0,432
Cápsulas con 48 h de secado	0,252

De un análisis de regresión simple realizado (Anexo 7), se desprende que el factor Actividad de Agua influye o explica en un 94,43% la inhibición del hongo por parte de la cepa S111 de *S. liquefaciens*. Es el factor que más influye en la actividad inhibitoria que presenta la bacteria hacia el hongo, resultó ser más importante que el recuento bacteriano (24,7%) para los valores observados en la presente tesis.

5 DISCUSION DE RESULTADOS

En los últimos años ha surgido un creciente interés por la protección del medio ambiente y por el consumo de alimentos sanos. Se pretende obtener insumos logrados a través de sistemas de producción sustentables y de bajo impacto ambiental. A raíz de esta situación, se ha producido un sustancial desarrollo en la formulación de productos biológicos para el control de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos agrícolas. Muchos de ellos se sustentan en cepas seleccionadas de microorganismos con roles antagonistas establecidos.

En la presente investigación se ha formulado, en matrices de alginato, la cepa S111 de *S. liquefaciens*. Esta bacteria ya ha demostrado características sobresalientes para controlar agentes fitopatógenos tales como *R. solani*, según lo establecido por SCHNETTLER (1993).

El proceso de formulación para la cepa S111, en este caso una bioencapsulación, tuvo como gran objetivo confeccionar un micro ambiente adecuado para que este microorganismo cumpla su rol inhibitorio frente a *R. solani* en condiciones *in vitro*.

Dentro del contexto del objetivo general de este trabajo, que consistió en construir cápsulas, surgen como consecuencia algunas medidas de evaluación. Estas mediciones se realizaron durante las diferentes etapas del proceso, durante y posterior a la bioencapsulación. Esto con el fin de determinar el mejor tiempo de deshidratación de las biocápsulas y evaluar su efectividad para controlar *in vitro* a *R. solani*.

Es relevante destacar que *R. solani* es un patógeno de notable importancia (CIAMPI, 2002; AGRIOS, 1996). Sin embargo, su control ha sido complejo y difícil (SCHNETTLER, 1993). *Rhizoctonia* spp. es uno de los grupos más importantes de

hongos fitopatógenos. Ellos son significativos agentes que afectan a las plantas durante la fase en el suelo. Asimismo, incitan enfermedades de cultivos de inundación como el arroz y de partes aéreas de cultivos tales como remolacha, fréjol y tabaco. Un considerable número de aislamientos y especies de *Rhizoctonia* son saprófitos, mientras otros son micorrizas en orquídeas y otras plantas (SNEH, 1999).

R. solani es el agente causal de un gran número de enfermedades que afectan a diferentes especies alrededor del mundo, ya que es un hongo ampliamente distribuido. Aislamientos virulentos causan la “sarna negra” de las papas, “tizón de la hoja” en tomate y “mancha foliar” del tabaco. También ha sido aislada de plántulas de remolacha y lechuga (Hooker, 1981; Habe y Tsuboki, 1978; Tu y Chang, 1978; Suresk y Mall, 1982; Chand y Logan, 1983; Otrysko *et al.*, 1985; Carling *et al.*, 1986; Bandy *et al.*, 1988; Anguiz y Martín, 1989; Date *et al.*, 1981; Meyer *et al.*, 1990; Naito *et al.*, 1975 y Wareing *et al.*, 1986, citados por SNEH *et al.*, 1994).

Esta especie está compuesta por numerosos tipos y formas patógenas, los que se han agrupado en los grupos AG (SNEH *et al.*, 1994). Frente a esta realidad fitopatológica, la cepa S111, esencialmente quitinolítica, sirve para el propósito de biocontrol a todas las formas de *R. solani*. Su acción biológica afecta enzimáticamente la composición de la pared celular del micelio, formada por quitina.

Este trabajo requirió contar con aislamientos frescos de *R. solani*, hongo fitopatógeno que en Chile es el agente causal de la sarna negra de la papa. Es una especie fácil de encontrar, es decir, es un patógeno abundante en material de papa. También es fácil de aislar, pues siguiendo un método simple, se pueden obtener rápidamente cepas a partir de esclerocios presentes en la piel de la papa.

Para facilitar la individualización de este patógeno, la determinación morfológica otorga una herramienta útil, pues es un método simple que permite realizar una identificación visual rápida y en forma satisfactoria. Este proceso se basa en comparar las características morfológicas de los aislamientos obtenidos con las descripciones que se tienen de esta especie.

La identificación visual de *R. solani* al microscopio realizada en el presente trabajo (Figura 8) se basó en una descripción realizada por SNEH *et al.* (1994). Este fitopatógeno posee las siguientes características: algunas sombras de pigmentación café en las hifas, ramificación cercana al septo distal en células de hifas vegetativas jóvenes, constricción de las hifas y formación de un septo a corta distancia del punto de origen de la ramificación de las hifas, un septo doliporo y células multinucleadas en hifas vegetativas jóvenes. En efecto, las características anteriormente mencionadas son tales elementos que permitieron establecer que todos los aislamientos obtenidos pertenecen a *R. solani*.

Del universo de cepas de *R. solani*, las que afectan a papa pertenecen en su gran mayoría al grupo de anastomosis 3 (AG-3). Este grupo incluye aislamientos de crecimiento lento, definidos como “tipo papa” (Watanabe y Matsuda, 1966 citados por SNEH *et al.*, 1994). Sin embargo, PETKOWSKI y BOER (2001), realizaron un estudio que mostró que en la enfermedad causada por *R. solani* en papas, están involucrados tanto los AG 2-1 como el AG-3.

Hay varias formas de establecer la categoría AG-3, entre ellas, el anastomosar las cepas con las hifas tipo, o bien métodos más directos y menos engorrosos. Los grupos AG o de anastomosis, se han utilizado para describir y reunir las cepas de *R. solani*, que afectan a diferentes hospederos. Esta forma de conglomerar al patógeno se realiza enfrentando cepas tipo, grupos AG previamente definidos, con la cepa en cuestión. Si las hifas se anastomosan son del mismo AG y si no se fusionan, la cepa pertenece a otro grupo. Para el caso de *R. solani* hay 20 AG, con algunos subgrupos (CIAMPI, 2002).

De acuerdo a lo señalado, se percibe la complejidad para establecer el grupo AG-3. En esta tesis se optó, para establecer este grupo específico de papa, por el método de Stewart (STEWART,1962). Este investigador ideó uno de los procedimientos más sencillos que se han elaborado para comprobar si una cepa de *R. solani* corresponde a un AG-3 y consiste en la elaboración de un medio de diagnóstico selectivo.

El medio consta de tres capas. La capa base contiene cloruro de calcio y agar Mc Conkey, la capa del medio es de pectato, y la capa superficial es de EDTA. Las cepas de *R. solani* en cuestión se siembran entonces en la capa superficial, donde comienzan a nutrirse y a crecer.

El AG-3 tiene la capacidad de romper la capa de pectato, por lo tanto puede traspasarla y obtener nutrientes de la capa base que contiene agar Mc Conkey, lo que torna la pigmentación de su micelio de color café. Es decir, la capacidad de licuación del pectato es la que permite que las hifas obtengan el color distintivo. Los otros AG no tienen esta capacidad, por lo tanto, permanecen albinos. *R. solani* posee una amplia gama de enzimas que degradan xilanos, galactanos, arabilanos, ácido poligaracturónico y carboxi-metil-celulosa (CIAMPI, 2002). Sin embargo, el AG-3 posee específicamente enzimas pectinolíticas, las mismas que degradan la pared celular de los tejidos de papa, lo que le permitió degradar la capa de pectato.

Al tornarse café el micelio del hongo al cabo de dos semanas de incubación, en el presente experimento, se demuestra que la cepa en cuestión pertenece al grupo de anastomosis 3.

En consecuencia y de acuerdo a lo expuesto en los párrafos precedentes, relacionado con el origen de las cepas, sus características microscópicas y su respuesta miceliar sobre el medio de Stewart, se concluye que todos los aislamientos utilizados en esta investigación pertenecen a *R. solani* AG-3, específicas de papa. Por lo tanto sirvieron a los propósitos esenciales de evaluar las biocápsulas con la cepa S111 bioatrapada.

Como complemento de la prueba de Stewart, se realizó la prueba de virulencia de la cepa seleccionada de *R. solani* hacia *S. tuberosum*. Esta quedó demostrada al observar el grado de daño que ocasionó el ataque del hongo inoculado *in vitro* sobre la plántula.

SCHNETTLER (1993), estudió detalladamente la acción antagonista de la cepa S111 de *S. liquefaciens* frente al hongo fitopatógeno *R. solani*. Esta cepa fue aislada

de esclerocios de papa del sur de Chile, estudiada como agente de biocontrol de patógenos vegetales y posteriormente liofilizada pasando a formar parte del cepario del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. No presenta problemas para trabajar con ella, es inocua y no afecta a plantas ni animales.

Esta cepa fue cultivada y reproducida en medios de cultivo para su posterior bioencapsulación. Según resultados de este trabajo, responde adecuadamente al utilizarla en la formulación, es decir, se puede bioencapsular, sobrevive y no pierde su capacidad de reproducirse e inhibir al patógeno.

Se ha explicado oportunamente el proceso de bioencapsulación de la cepa S111 (Figuras 1 y 2). Se puede apreciar que éste reúne diferentes pasos que confieren un cierto grado de complejidad para la obtención del producto final. Además de la cepa S111, las cápsulas confeccionadas contienen en su interior elementos que contribuyen a ser más eficiente su acción antagonista hacia el hongo.

La tecnología de encapsulación utilizada para la realización de las bioesferas se explica como una formación de matrices de cápsulas, según lo expuesto por PFÜTZE (2003). Los ingredientes activos y protectores forman gránulos homogéneos, componentes que están bien distribuidos dentro del gránulo y encerrados por la abundancia del material protector, formando una matriz.

La producción de cápsulas esféricas y monodispersas es de mayor interés para las industrias farmacéutica, química, de alimentos y de biotecnología, para resolver problemas de protección, almacenamiento o distribución (PFÜTZE, 2003; SAINZ *et al.*, 2003). Así es como en el campo de la producción vegetal, la bioencapsulación ha sido utilizada exitosamente para formular nemátodos entomopatógenos, bacterias antagonistas, hongos nematófagos (Vorlop *et al.*, 1987; Patel y Vorlop, 1994; Patel *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 2002), citados por PATEL (2003). En adición, también se han formulado hongos antagonistas de hongos fitopatógenos (LEWIS *et al.*, 1996).

Se ha experimentado con una variada gama de componentes en diferentes formulaciones, dependiendo del agente biológico y del medio donde debe desarrollar

su acción antagónica. Sin embargo, los elementos básicos que conciertan una formulación biológica son: el microorganismo a encapsular, una base nutricional, un precursor, un protector osmótico y material inerte. En el caso de las microcápsulas también es necesaria la utilización de un coagulante de la solución que posibilite la transformación de ésta al estado sólido de las esferas.

En el presente trabajo se utilizó como agente antagónico la cepa S111 de *S. liquefaciens*, betaína como protector osmótico, medio N°1 (Cuadro 3) como base nutricional, quitina como precursor y base nutricional (fuente de carbono) y gluconato de calcio como coagulante.

Para bioencapsular se debió obtener el cultivo líquido de la cepa S111 y luego un homogeneizado (matriz de las futuras biocápsulas). El homogeneizado alimenta, protege, promueve la multiplicación de la cepa S111, como así mismo estimula la secreción de inhibidores del crecimiento del hongo. Además, permite la transformación del estado acuoso del medio a un estado sólido, al coagularse y transformarse cada gota en un biopesticida granular, práctico al aplicar en situaciones de campo, donde se utiliza este tipo de formulaciones regularmente.

LEWIS *et al.* (1996), probaron variadas bases nutricionales (quitina, afrecho de trigo, mazorcas de maíz, cáscaras de maní, fibra de soya, pomaza de azúcar y cáscaras de cocoa) en búsqueda de una formulación para el control de *R. solani* con los agentes *Gliocladium virens* y *Trichoderma hamatum* (Bonorden) Bainier. Finalmente, concluyó que en biocontrol, las propiedades intrínsecas del bioagente seleccionado son más importantes que algunas variables de formulación.

Sin embargo, en su ausencia, la betaína es una de las variables limitantes en el éxito de la presente formulación por su rol de osmoprotectante. Es así como PATEL (2003), estudió los parámetros de secado de las cápsulas de alginato que contenían *P. fluorescens*. Este investigador determinó la importancia del protectante de secado u osmoprotector en la sobrevivencia bacterial durante el proceso de deshidratación. Sin osmoprotectante murió el 99.9% de las células dentro de la primera hora de secado. Por lo tanto, el incluir betaína en la formulación se justifica plenamente.

Otro elemento muy importante en la fabricación de las biocápsulas empleadas, es el alginato de sodio. Esta sustancia es ampliamente utilizada en la formulación de cápsulas para variados agentes biológicos a través del mundo. El alginato es un policarboxilato polisacárido natural extraído a partir de algas pardas. Tiene la capacidad de polimerizarse en presencia de cationes divalentes. Las cápsulas de gel de alginato de calcio son usadas a menudo como matriz (OUWERX *et al.*, 1997).

En la bioencapsulación realizada, la técnica utilizada para la inmovilización del compuesto de interés biológico, es la gelatinización iónica de sales monovalentes de alginato, inducidas por iones de calcio, descrita por OUWERX *et al.* (1997). En este trabajo se demostró que los iones de calcio los proporcionó el gluconato de calcio, sustancia en que se sumergieron las gotas líquidas de homogeneizado. Al entrar en contacto el alginato presente en el homogeneizado con el gluconato de calcio, se produjo la coagulación de las gotas, las que se convirtieron en las cápsulas frescas. Esta técnica puede ser muy útil para la encapsulación de muchas drogas o células, porque requiere de solventes no orgánicos o agentes de ligamiento de cruce (cross-linking) y se realiza a temperatura ambiente (OUWERX *et al.*, 1997).

La quitina, otro componente de las biocápsulas, es un polímero de N-acetilglucosamida, y está principalmente presente en conchas de crustáceos, insectos y estructura el micelio de hongos. Es el segundo material más abundante en la naturaleza, después de la celulosa (ADAMIEC y MODRZEJEWSKA, 2003). El rol de esta sustancia en la presente tesis es incentivar la secreción inhibidores del crecimiento del hongo, por parte de la cepa S111. El mecanismo involucrado en la acción antagonista se basa en que la cepa S111 de *S. liquefaciens*, en presencia de quitina, secreta quitinasas, enzimas que degradan la quitina. Esta sustancia constituye las paredes celulares del micelio de *R. solani*, y como consecuencia, el crecimiento del hongo es inhibido. De este modo la actividad antagónica de la bacteria frente al hongo se ve favorecida por la temprana presencia del precursor al interior de la cápsula.

Al igual que *S. liquefaciens*, *S. marcescens* secreta enzimas quitinolíticas, según el estudio de SOMEYA *et al.* (2000), quienes investigaron la actividad inhibitoria

de esta especie hacia *R. solani*. La bacteria suprimió la enfermedad fúngica, especialmente el dumping-off (caída de almácigos) causado por *R. solani* en invernaderos. En los filtrados, además, estuvieron presentes componentes antifúngicos de bajo peso molecular, que junto a las enzimas suprimieron la germinación de *R. solani in vitro*.

La cepa S111 fue seleccionada de entre otras del género, por su mayor capacidad de inhibir a *R. solani*, lo que evidencia una mayor producción de quitinasa. Sin embargo queda abierta la posibilidad de ampliar el estudio a un mayor número de cepas de *Serratia* y comparar sus niveles de producción de esta enzima, para así seleccionar la más eficiente.

Las quitinasas no son los únicos inhibidores secretados por los agentes que contrarrestan el ataque de *R. solani*. VELAZHAHAN *et al.* (1999) estudiaron a *P. fluorescens*, especie que liberó quitinasa y beta-1,3-glucanasa, cuando creció en un medio que contenía quitina y laminarina, respectivamente. Hubo una relación significativa entre la actividad antagónica de *P. fluorescens* y su nivel de producción de quitinasa. El "viscosinamide" es un nuevo metabolito lipopéptido purificado desde la bacteria antagonista *P. fluorescens* (THRANE *et al.*, 1998; NIELSEN *et al.*, 1999). Un antibiótico antifúngico identificado como N-butylbenzenesulphonamide, resultó ser el agente inhibidor secretado por *Pseudomonas* sp. contra *R. solani*. (KIM *et al.*, 2000)

NIELSEN y SORENSEN (1999), también estudiaron a *P. fluorescens*, aislada a partir de la rizósfera de cebada y remolacha con acción antagonista hacia *R. solani*. Esta mostró actividad quitinolítica en cultivos donde creció en un medio sin quitina exógena. Pruebas de enzimas en cultivos demostraron una completa colección de enzimas quitinolíticas.

Amplia es la gama de sustancias antagónicas secretadas para inhibir a *R. solani*, dependiendo del antagonista. *Bacillus subtilis* exhibió un amplio espectro supresivo contra varios patógenos de plantas, principalmente produciendo un antibiótico lipopéptido, el Iturin A. Este mostró ser efectivo es la supresión del damping-off de tomate causado por *R. solani*. (SHODA, 1999). También se han realizado

investigaciones en otros géneros como *Bacillus*. Algunos ejemplos son *B. subtilis* (MEW *et al.*, 1999; CHOI *et al.*, 1999; CHOI *et al.*, 1997; MARTEN *et al.*, 1999; SCHMIEDEKNECHT *et al.*, 1998; STEINER *et al.*, 1999, SARIAH *et al.*, 1999; SARMAH, 1999), *Bacillus circulans* Jordan 1890 (CZACZYK *et al.*, 2000), *Bacillus megaterium* de Bary 1884 (CHUNG y WU, 2000).

Alcaligenes faecalis Castellani and Chalmers 1919 produce hidroxilamina que causa supresión del dumping-off producido por *R. solani* (HONDA *et al.*, 1999). Pigmentos fluorescentes y antibióticos antifúngicos fueron responsables el biocontrol de *R. solani* por *Burkholderia glumae* (Kurita and Tabei 1967) Urakami *et al.* 1994 (Syn. *Pseudomonas glumae*) en un estudio de PAL *et al.* (2000). Cinco cepas bacterianas con altos niveles de actividad de quitinasas fueron aisladas utilizando una solución enriquecida en células de la pared de *R. solani* (ZHENG *et al.*, 2001).

Muchas son las investigaciones llevadas a cabo con la finalidad de evaluar diferentes agentes que controlen a *R. solani* alrededor del mundo, tanto en el cultivo de la papa, como en otros. La antagonista ya señalada *P. fluorescens* (NIELSEN *et al.*, 1998; KAMALA *et al.*, 1998; LAHA y VERMA, 1998; VIDHYASEKARAN y MUTHAMILAN, 1999; KIM *et al.*, 1998; ARNDT *et al.*, 1998; DEMIR *et al.*, 1999), *Pseudomonas Aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 (SIDDIQUI *et al.*, 1999; SIDDIQUI, 2000; SIDDIQUI *et al.*, 2001; LOU *et al.*, 2001), *P. putida* (KRISHNAMURTHY y GNANAMANICKAM, 1998; DEMIR *et al.*, 1999), *Pseudomonas cepacia* (Burkholder) Palleroni y Holmes (HEYDARI y MISAGHI, 1998) y *Pseudomonas ambifaria* Coenye *et al.* 2001 (LI *et al.*, 2002), han sido estudiadas por un gran número de científicos.

Trichoderma es uno de los géneros de hongos de mayor importancia en el biocontrol de hongos, tanto a nivel mundial, como en Chile. Se han realizado investigaciones con *T. harzianum* (WICKREMASINGHE *et al.*, 1999), *Trichoderma viride* Pers. ex Gray (CHEN *et al.*, 1999; SARIAH y CHAN, 1999), *Trichoderma koningii* Oudemans (RODRÍGUEZ y COTES, 1999; PASTUCHA, 1999), y otros.

Numerosos trabajos señalan a distintas especies de *Trichoderma* como importantes agentes de biocontrol de las enfermedades producidas por un amplio rango de patógenos, entre los cuales está *R. solani* (CHET, 1987).

También destaca la investigación con los géneros *Bradyrhizobium sp.* y *Rhizobium* para el control de *R. solani*, ya que en nuestro país han destacado por su importancia en la inoculación en leguminosas. *Bradyrhizobium sp.* ha sido estudiado por SIDDIQUI *et al.* (2000); SIDDIQUI *et al.* (1998); OMAR y ABD-ALLA (1998). *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926 por SIDDIQUI *et al.* (1998), *Rhizobium* por OMAR y ABD-ALLA (1998) y *Rhizobium meliloti* Gili *et al.* por SIDDIQUI *et al.* (2000).

Otros ejemplos de especies biocontroladoras de *R. solani* son *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen 1931) Waksman y Henrici 1948 (CHAMBERLAIN y CRAWFORD, 1999), *Streptomyces violaceusniger* (Waksman and Curtis 1916) Pridham *et al.* 1958 (TREJO *et al.*, 1998), *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni y Bradbury 1993 (GIESLER y YUEN, 1998), *Gliocladium virens* (SARMAH, 1999), *Aspergillus fumigatus* Fresenius (WICKREMASINGHE *et al.*, 1999), *Rhizoctonia* no patógena (SNEH, B. 1999). El control del hongo se expresa en diversos grados, y los ejemplos presentados son solo una parte del amplio universo estudiado en este campo.

A pesar de muchos resultados promisorios obtenidos usando agentes de control biológico, su utilidad está aún limitada, reemplazando sólo una pequeña parte del mercado de productos químicos. Esto se debe a muchas razones, tales como dificultades para encontrar agentes nuevos y apropiados; limitaciones tecnológicas en la aplicación, almacenaje y formulación de organismos; restricciones medioambientales de aplicación y finalmente costos de registro, producción y distribución de biopesticidas. Según lo planteado por VURRO *et al.* (2001), la mayor razón es que muy pocos agentes han tenido la eficacia de los químicos tradicionales, aún no costando, en la mayoría de los casos, más que los pesticidas.

KOCH (2001), destaca algunos factores que han hecho lenta la transformación práctica de las investigaciones en controles biológicos. Ellos son especificidad del

producto, precio y obligación de registro. En adición, el descuido de la investigación en la fermentación y formulación de microorganismos y la corta duración de los proyectos de investigación son las mayores razones para la lenta transformación. Otras son los bajos niveles de control observados con los productos biológicos, problemas de almacenaje y de aplicabilidad, como también la falta de acercamientos para la integración de estos productos en sistemas de producción agrícolas y hortícolas.

Cada cepa, formulación y uso de microorganismos como agentes de control biológico necesitan ser registrados. COOK (1996), sugiere que los costos de registro y los de obtención de permisos, pueden ser raramente justificados. Esto porque la naturaleza específica de los agentes de biocontrol microbial limita su uso a pequeños nichos de mercado. Normalmente es necesario un agente de biocontrol para cada peste o enfermedad, o diferentes agentes son necesarios en diferentes medioambientes para controlar la misma peste o enfermedad.

Sin embargo, en el ámbito técnico, una de las mediciones básicas más relevantes para determinar el éxito de una formulación biológica sobre la base de matrices de alginato, es el cálculo la actividad de agua (a_w). Esta debe ser de tal cuantía en la cápsula que permita la supervivencia de la bacteria antagonista y que impida la invasión de microorganismos y su posterior desarrollo.

La a_w es la proporción de agua disponible para reacciones biológicas, químicas y bioquímicas, es decir, el agua disponible para el crecimiento microbial BEAUCHAT (2003); Scott, 1950, citado por AQUALAB (2003). Es una medida del estatus energético del agua en un sistema, indica si el agua está libre o comprometida en una muestra. Libre, referido a las moléculas de agua que en un producto no están física o químicamente adheridas. Productos sin agua libre tendrán una actividad de agua de 0.000, lo que equivale a una humedad relativa del 0%, mientras un producto como agua pura tendrá una actividad de agua de 1.000, lo que equivale a una humedad relativa del 100% (AQUALAB, 2003; KESSLER, 1981).

La a_w , en el rango de 0.61 a 0.999, afecta el comportamiento de los microorganismos: crecimiento, esporulación, producción de toxinas, estabilidad,

supervivencia durante el proceso y almacenaje, recuperación en un medio de agar (BEUCHAT, 2003). Si el agua dentro de un producto es sostenida con suficiente fuerza, los microorganismos no serán capaces de ejercer la energía requerida para obtener el agua necesaria para su subsistencia.

La importancia de la aw radica en el hecho de que este parámetro influye más que ninguno en la viabilidad de los microorganismos (BEUCHAT, 2003; FONTANA, 2003). Mientras temperatura, pH y varios otros factores pueden influenciar si un organismo crecerá en un producto y la tasa de crecimiento, la aw es a menudo el factor más importante (AQUALAB, 2003).

Del análisis de regresión simple realizado en la presente tesis, se desprende que la aw influye o explica en un 94,43% la capacidad de inhibición del hongo por parte de la cepa S111 de *S. liquefaciens*.

Este resultado coincide plenamente con lo expuesto por BEUCHAT (2003) y FONTANA (2003), pues señalan que el factor de mayor importancia es la aw, e influye decisivamente en la supervivencia y multiplicación de las bacterias, y por ende, en la efectividad de su capacidad inhibitoria frente al patógeno (AQUALAB, 2003).

La menor aw a la cual la vasta mayoría de las bacterias degradantes pueden crecer es de alrededor de 0.9. La aw límite para el crecimiento para mohos y levaduras es de alrededor de 0.61 (AQUALAB, 2003)

Los límites de crecimiento de los microorganismos están dados por los rangos mínimos de actividad de agua para su desarrollo. Así *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Proteus*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Clostridium perfringens* y algunas levaduras se desarrollan entre 1 y 0.95 aw. *Serratia*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *V. parahaemolyticus*, *C. Botulinum*, *Pediococcus*, algunos mohos, levaduras (*Rhodotorula*, *Pichia*) entre 0.95 y 0.91 aw. Muchas levaduras (*Candida*, *Torulopsis*, *Hansenula*, *Micrococcus*) entre 0.91 y 0.87 aw. La mayoría de los mohos (*micotoxigenic penicillia*), *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884, la mayoría de *Saccharomyces*, *Debaryomyces* entre 0.87 y 0.80. La mayoría de las bacterias halofílicas, *micotoxigenic aspergilli* entre 0.80 y

0.75 aw. Mohos xerofílicos (*Aspergillus chevalieri* Thom y Church, *Aspergillus candidus* Link : Fries, *Wallemia sebi* (Fr.) von Arx), *Saccharomyces bisporus* (Naganishi) Lodder y Kreger-van Rij entre 0.75 y 0.65 aw. Levaduras osmofílicas (*Zygosaccharomyces rouxii* (Boutroux) Yarrow 1977), unos pocos mohos (*Aspergillus echinulatus* Thom y Church, *Monascus bisporus* (Fraser) Arx) entre 0.65 y 0.61 aw. No hay proliferación microbial bajo 0.60 (BEUCHAT, 2003; FONTANA, 2003).

Según lo expuesto, *Serratia liquefaciens* estaría no apta en cápsulas con una aw entre 0.95 y 0.91. Sin embargo, esta aw debe ser menor para que la cápsula no sea colonizada por microorganismos invasores.

Valores de aw obtenidos por algunos investigadores indican que el rango óptimo en los procesos de encapsulación y posterior secado deben ser cercanos al tramo 0.5 a 0.6 aw⁷, y el valor más cercano a esta cifra en la presente tesis, se obtuvo al deshidratar las cápsulas durante 24 h (0.627). Sin embargo, se deduce que el tiempo de secado es un valor intermedio entre 24 h y 36 h, por lo que se desprende la necesidad de realizar otra medición más detallada de la aw entre las estos tiempos de secado, para determinar con mayor exactitud el tiempo de deshidratación más adecuado.

A través de los procesos de formación, deshidratación y almacenamiento de las cápsulas, se aprecia una clara disminución en las unidades formadoras de colonia (ufc) (Cuadro 6). Esto implica que la población, el número de células de *S. liquefaciens*, disminuye. Sin embargo, el menor recuento bacteriano observado (1.2×10^8 ufc/g a los 60 días de almacenaje) aún es bueno, comparado con resultados obtenidos por otros investigadores. LISERRE *et al.* (2003), expone que la concentración de bacterias probióticas en una formulación, sea de 10^6 ufc/g de producto, para poder proveer beneficios a la salud. Al respecto, la Federación Láctea Internacional ha recomendado que la bacteria esté presente al menos en 10^7 ufc/g, para una mínima durabilidad (Ouwehand y Salminen, 1998, citados por CHANDRAMOULI *et al.* 2003). Finalmente Lourens-Hattingh *et al.*, 2001, citado por AINSLEY *et al.*, 2003, propone una

⁷ CIAMPI, L. (2004). Ing. Agr. Ph. D. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Comunicación personal.

concentración de 10^8 a 10^9 ufc/g en las formulaciones biológicas. Esto demuestra que el sistema de bioatrapamiento empleado en el presente trabajo permite la supervivencia de *S. liquefaciens* y presenta a las biocápsulas de alginato como un probable medio de transporte adecuado de la cepa a condiciones de campo.

En las fases líquidas, homogeneizado y el cultivo líquido, se presentan los recuentos bacterianos más altos de este estudio (Cuadro 6). La importancia de estos valores es descriptiva, dentro del bioatrapamiento, ya que la utilidad práctica la prestarían las cápsulas secas (a partir de las 24 h de deshidratación).

El alto recuento bacteriano del homogeneizado coincide con el valor que presentó en las pruebas de inhibición, pues este tratamiento arrojó la menor área de crecimiento de *R. solani*, es decir, la mayor efectividad en el control biológico *in vitro*, seguido en efectividad por el cultivo líquido. La superioridad de la capacidad inhibitoria de los tratamientos en estado líquido (homogeneizado y cultivo líquido) versus la de las cápsulas formadas, se puede deber a tres factores. El primero dice relación con el mayor recuento bacteriano de los cultivos líquidos, pues a mayor número de bacterias vivas hay una mayor probabilidad de producción de sustancias inhibitoras.

El segundo motivo dice relación con el estado físico del medio que contiene a la bacteria. Una bacteria en una cápsula primero debe rehidratarse, hasta llegar a una *aw* de 0.91 a 0.95, según lo expuesto por BEUCHAT (2003) y FONTANA (2003), como el rango óptimo para *Serratia*. Mientras más seca esté la cápsula mayor tiempo le tomará la rehidratación y posterior reactivación. Por lo tanto si la bacteria ya está en un medio líquido y tiene alimento, sólo tiene que multiplicarse y producir las sustancias inhibitoras, lo que la beneficia con relación a las bacterias bioencapsuladas. Esta diferencia aumenta a medida que la cápsula es sometida a un mayor tiempo de deshidratación: decrece su recuento bacteriano, su *aw* y por lo tanto su dificultad para reactivarse, lo que trae como consecuencia una disminución de su capacidad inhibitoria, coyuntura que aprovecha el hongo para crecer con menor dificultad.

Y el tercer motivo es que el homogeneizado contiene elementos que protegen a la bacteria de cambios osmóticos y le otorgan las condiciones óptimas para que libere

quitinazas. Estos elementos no están presentes en el cultivo líquido, lo que le daría superioridad inhibitoria sobre éste, pero si están en las cápsulas, donde la superioridad del homogeneizado frente a éstas está dado por el estado físico, el recuento bacteriano y la dificultad de reactivación.

Esto no quiere decir que las biocápsulas sean menos efectivas que una solución líquida, pues la *aw* presente, los nutrientes, los osmoprotectores y precursores son herramientas tales que permitirían reactivar a la bacteria encapsulada, en cuanto se den las condiciones de humedad necesarias.

La menor eficiencia inhibitoria de las cápsulas frescas y de 6 h de deshidratación frente a los medios en estado acuoso, se explica por la mayor dificultad de rehidratación y menor recuento bacteriano frente a los últimos. Por las mismas razones se evidencia un mejor control en el tratamiento de 24 h de deshidratación que en el de 36 h.

Se produjo una mayor dispersión de la varianza al comparar todos los resultados de los tratamientos de las pruebas de inhibición, lo que ocasiona una distorsión de la realidad. Esto se debe al amplio rango de variación que se produce en la inhibición provocada por las bacterias en medios líquidos, en las cápsulas deshidratadas y el testigo. Los tratamientos que objetivamente interesa evaluar desde el punto de vista práctico (cápsulas secas que pueden ser llevadas a condiciones de campo), se muestran similares.

La finalidad de la formulación es poder trasladar los biocontroladores desde condiciones de laboratorio a condiciones de campo de una forma simple, que facilite su utilización sin incurrir en gastos excesivos, y manteniendo la efectividad mostrada *in vitro*. Sin duda los mejores resultados en cuanto a capacidad inhibitoria de la cepa S111 se presentaron en los tratamientos en estado líquido. Sin embargo, utilizar esta biotecnología dirigiendo los esfuerzos a una formulación líquida resulta menos práctica que las biocápsulas que físicamente se asemejan al salitre. Ellas facilitan el traslado de los organismos benéficos al campo y hacen posible pensar en una implementación del

control biológico como método normal dentro de los programas fitosanitarios de las distintas especies cultivables.

Es así como al realizar una ANDEVA específica para las cápsulas secas, es decir, de 24 h, 36 h y 48 h de deshidratación más el testigo, el escenario se visualiza diferente. Se aprecia una clara disminución de la efectividad del control inhibitorio a medida que la cápsula va perdiendo humedad.

Dado este escenario, es importante determinar qué tiempo de secado produce cápsulas con una mayor efectividad inhibitoria y cercano al rango óptimo de a_w requerido (0.5 – 0.6).

Al comparar los tratamientos de 24 h, 36 h y 48 h de deshidratación se aprecia una mayor eficiencia inhibitoria de las cápsulas con 24 h de deshidratación frente a las que se secaron durante más horas. Esto confirma el hecho de que a mayor tiempo de deshidratación hay una mayor dificultad para la reactivación de las bacterias, dada por la disminución del recuento bacteriano y de la a_w . Por lo tanto el óptimo tiempo de secado es el mínimo para que la cápsula alcance la a_w adecuada. Este le permitiría sobrevivir en buenas condiciones, evitar la invasión de otros microorganismos, no retrasar más de lo necesario la reactivación, ni disminuir en exceso el recuento bacteriano.

Así como disminuye el recuento bacteriano a medida que es mayor el tiempo de deshidratación, también disminuye a mayor tiempo de almacenamiento de las biocápsulas. La efectividad inhibitoria disminuye junto con el recuento bacteriano. A los 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente (entre 18 y 25°C, temperatura de almacenamiento de las biocápsulas de la presente investigación), el recuento bacteriano aún es un valor aceptable para una formulación. Sin embargo esto podría mejorar sustancialmente si se disminuye la temperatura de almacenaje a 5°C y 4°C, según lo planteado por HAGGAG y NOFAL (2000) y RUSSO *et al.* (2001) respectivamente.

Formulaciones (gránulos de almidón, polvo de talco y cápsulas de alginato con *Streptomyces* sp.) almacenadas a 4°C, tuvieron una vida útil mayor que las almacenadas a 24°C, basadas en mediciones de viabilidad a intervalos de 2 semanas sobre un período de almacenamiento de 6 meses. La biomasa pulverizada tuvo un recuento inicial de 2×10^7 ufc/g y retuvieron un 100% de viabilidad por dos semanas cuando se almacenaron a 4°C. Sin embargo, al final de las 24 semanas, el número de propágulos viables en las formulaciones granulares y en polvo, decrecieron a 1.2×10^5 y 7×10^3 ufc/g, respectivamente. Cápsulas de alginato fueron las menos estables en almacenamiento. A 4°C, 6.9×10^4 y 7.3×10^2 propágulos viables/g de formulación fueron detectados al final de 12 y 24 semanas respectivamente (SABARATNAM y TRAQUAIR, 2002).

Las consideraciones realizadas en los párrafos anteriores evidencian la importancia de saber cómo influye el tiempo de almacenamiento a una determinada temperatura en el recuento bacteriano.

Por lo tanto habría que optimizar el tiempo de deshidratación según la a_w y el tiempo de almacenamiento a una cierta temperatura según los valores de recuento bacteriano.

Al observarse que la bacteria encapsulada requería tiempo para rehidratarse y reactivarse sobre el agar papa, surgió la idea de complementar las pruebas de inhibición con la adición del factor “ventaja”. Es decir, si el sembrar la bacteria con uno a tres días de anticipación con respecto a la siembra del hongo en la placa, favorecía su temprana reactivación y provocaba alguna diferencia en la efectividad inhibitoria.

En los tiempos de deshidratación de 24 h, 36 h y 48 h estudiados en la presente investigación (ANDEVAS de doble entrada, segundo diseño estadístico) se presenta una interacción entre los factores “ventaja” y “almacenamiento” de las cápsulas (Figuras 6, 7 y 8). El factor “ventaja” tendrá una mayor importancia a medida que el tiempo de almacenaje es menor, al aumentar la ventaja es mayor el efecto inhibitorio de la bacteria sobre el hongo. Al aumentar el tiempo de almacenamiento, la “ventaja” que se le otorga a la bacteria muestra una menor influencia en la eficiencia inhibitoria.

Es así como hasta un tiempo de almacenamiento de 30 días, las bacterias aún responden a una cooperación en su competencia frente al hongo, la que es otorgada por la “ventaja” de dos o tres días de siembra. Además, las cápsulas con menor tiempo de deshidratación, por ejemplo 24 h, responden mejor al factor “ventaja”. Al mismo tiempo una cápsula de menor tiempo de deshidratación responde de mejor manera al factor “ventaja” a medida que sea almacenada por menor tiempo.

Al observarse diferencias significativas entre los tratamientos con “ventajas” de 2 días en adelante, se demuestra la importancia de este factor en los ensayos. Esto quiere decir que si a una cápsula deshidratada se le da tiempo (de dos hasta tres días de “ventaja” de siembra frente al hongo) y condiciones adecuadas para su rehidratación, su capacidad inhibitoria será de una mayor efectividad que si esta cápsula se siembra al mismo tiempo o con un día de diferencia con respecto al hongo. Este último siempre está en óptimas condiciones para continuar creciendo una vez sembrado, ya que el micelio empleado en las pruebas de inhibición se obtiene de hifas de 24 h de desarrollo.

Puede que exista un punto crítico de deshidratación, a partir del cual se produce una latencia de las bacterias más profunda, en que la reactivación se torna más lenta, y las ventajas probadas en este ensayo no son suficientes para una reactivación satisfactoria. Queda abierta la posibilidad de probar mayores tiempos de “ventaja” en ensayos posteriores, asegurando una adecuada rehidratación de la cápsula con una humedad suficiente, pues de nada serviría la “ventaja” si no hay agua disponible. Estos resultados no hacen más que reafirmar la importancia de la reactivación de las bacterias para obtener resultados promisorios.

El factor “ventaja” es de gran importancia, pues manifiesta la relevancia del carácter preventivo de este control biológico. Si se le otorga a la bacteria tiempo para reactivarse, las condiciones de humedad y la temperatura adecuadas, ésta se reproducirá y secretará sus sustancias de inhibición antes de que el hongo comience a crecer, según se observó en condiciones *in vitro*. Los otros componentes de la cápsula en este caso, posicionan a la bacteria en una mejor condición para que cumpla con su rol antagónico.

En una situación de campo, las biocápsulas con *S. liquefaciens* pueden ir junto a la semilla de papa, por lo tanto es elemental que se le otorgue a la bacteria condiciones adecuadas de humedad en el suelo. Así, cuando se inicie la brotación, la cepa S111 ya estará presente en las inmediaciones y presta a iniciar su actividad inhibitoria que protegerá el cultivo.

El carácter preventivo del control biológico presentado en esta investigación puede verse reforzado en condiciones de campo si cada año se adiciona inóculo de la bacteria antagonista en la formulación estudiada de matrices de alginato. Se presume que llegaría un momento en el cual el suelo pasaría a ser “supresivo” hacia *R. solani*, en este caso específico, ya que esta condición está íntimamente ligada a la presencia de bioantagonistas. Esto lo demuestra una investigación realizada por MAZZOLA (1999), en el cual evaluó los cambios en la composición de las comunidades microbiales del suelo y la relativa habilidad supresora de enfermedades de la microflora residente. Cambios en la habilidad de la microflora residente del suelo para suprimir a *R. solani* AG-5, estuvo asociada con reducciones en las poblaciones relativas de *Burkholderia cepacia* (Palleroni y Holmes 1981) Yabuuchi *et al.* 1993 y *Pseudomonas putida* en la rizósfera de manzanos.

Ya que la formulación estudiada preserva la viabilidad de las bacterias antagonistas, el próximo paso es realizar un ensayo de campo, adicionando biocápsulas por más de una temporada a determinados suelos, e incluso extrapolar la experiencia a otros bioantagonistas.

Lo más probable es los resultados obtenidos de las pruebas de laboratorio *in vitro* deban ser evaluados en condiciones de campo, y para este fin estos datos muestran una tendencia, la que proporciona una orientación para encausar las investigaciones futuras.

6 CONCLUSIONES

- Las biocápsulas construidas permitieron mantener las características de cepa S111 de *Serratia liquefaciens*. La cepa es fácil de trabajar, responde adecuadamente a la formulación, sobrevive y no pierde su capacidad de reproducirse e inhibir “*in vitro*” al patógeno a través del bioatrapamiento, deshidratación y almacenaje de las cápsulas.
- Se realizó una descripción cuantitativa de los procesos de bioatrapamiento, deshidratación y almacenaje, destacando la importancia del manejo de la actividad de agua (aw). Este parámetro explica en un 94,4% la capacidad de inhibición del hongo por parte de la cepa S111 bioencapsulada, siendo más importante que el recuento bacteriano (24,7%) y además determinó que el tiempo óptimo de deshidratación de las biocápsulas es un período intermedio entre 24 h y 36 h de deshidratación.
- A través de la bioencapsulación, deshidratación y almacenamiento, disminuye la capacidad inhibitoria de *S. liquefaciens* y su recuento bacteriano. Los valores más altos los presentaron el homogeneizado, el cultivo líquido y las cápsulas deshidratadas 24 h. La cepa del hongo utilizado pertenece a *R. solani* AG-3, por lo tanto, sirvió al propósito esencial de evaluar la capacidad inhibitoria de la cepa S111 bioatrapada.
- A mayor período de deshidratación, disminuye la capacidad inhibitoria. Sin embargo esto mejora si se le otorga “ventaja” en tiempo de rehidratación a la bacteria frente al hongo. Finalmente, a mayor período de almacenamiento, la diferencia en días de la “ventaja” otorgada a la bacteria, mostró una menor incidencia en la eficiencia inhibitoria.

7 RESUMEN

El creciente interés mundial por el consumo de productos sanos y la conservación del medio ambiente, han impulsado el desarrollo de sistemas ecológicos de producción agrícola limpia. Dentro de este contexto, se han llevado a cabo estudios tendientes a controlar patógenos de enfermedades de las plantas a través de diversos métodos alternativos a los productos químicos.

Rhizoctonia solani Kühn, agente causal de la sarna negra de la papa, es un patógeno que afecta considerablemente al cultivo de la papa en Chile y en el mundo. Investigaciones realizadas en la Universidad Austral de Chile han determinado que la bacteria *Serratia liquefaciens*, nativa de los suelos del sur del país, ha demostrado una evidente capacidad inhibitoria frente a *R. solani*.

La presente tesis presenta una evaluación *in vitro* de un sistema de control biológico que utiliza como agente antagónico a la cepa S111 de *S. liquefaciens*, bioencapsulada en matrices de alginato de sodio, frente al patógeno *R. solani*.

A través de los procesos de formación, deshidratación y almacenamiento de las cápsulas se aprecia una disminución del recuento bacteriano y de la capacidad inhibitoria de *S. liquefaciens*. Esto coincide con un descenso de los valores de la actividad de agua (*aw*), factor más influyente en la viabilidad de los microorganismos en una formulación.

Las cápsulas evaluadas otorgan a las bacterias las condiciones adecuadas para mantener su viabilidad y su capacidad inhibitoria frente al patógeno. Esto queda demostrado al otorgarle “ventaja” en tiempo de rehidratación a la bacteria frente al hongo, que manifiesta el carácter preventivo del control biológico presentado en la presente tesis. No obstante, a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, la

“ventaja” que se le otorga a la bacteria muestra una menor influencia en la eficiencia inhibitoria.

Los tratamientos homogeneizado y cultivo líquido, presentan los mayores recuentos bacterianos y las mayores capacidades inhibitorias. Sin embargo, de los tratamientos de las cápsulas secas, que son las de mayor utilidad práctica, la deshidratada durante 24 h mostró el recuento bacteriano más alto y la capacidad inhibitoria más eficiente.

Según los datos de actividad de agua obtenidos, se estima que el tiempo óptimo de deshidratación de las biocápsulas es un período intermedio entre 24 h y 36 h de deshidratación, por lo tanto habría que realizar otra investigación que determine este tiempo de forma precisa.

SUMMARY

The growing world interest for the consumption of healthy products and the environment conservation, have prompted the development of ecological systems of clean agricultural production. Among this context studies have been carried out toward controlling pathogens causing plant diseases through several alternative methods to chemical products.

Rhizoctonia solani Kühn, agent of the black scurf of the potato, is a pathogen that affects considerably the potato culture in Chile and also in the world. Research developed at the Universidad Austral de Chile have determined that the bacteria *Serratia liquefaciens*, native of soil of Chile, shows an evident inhibitory capacity against *R. solani*.

The present study offers an *in vitro* evaluation of a biological control system that uses the antagonistic agent strain S111 of *S. liquefaciens*, biocapsulated in a water matrix of sodium alginate, against the pathogen *R. solani*.

Through the formation, dehydration and storage processes of the capsules a decrease of the bacterial count, there is an inhibitory capacity of *S. liquefaciens*. The results agree with a decrease in the water activity (a_w), which is the most relevant factor in the viability of the antagonistic in the formulation used.

Nevertheless, the evaluated capsules offer the bacteria the adequate conditions to maintain their viability and their inhibitory capacity against the pathogen. This appears demonstrated by giving advantage to the bacteria over the fungus in time of dehydration, which demonstrated the preventive character of the biological control presented in this study. However, as the storage time increases, the advantage offered to the bacteria shows a smaller influence in the inhibitory efficiency.

The homogenization and liquid cultivation processes show higher bacteria numbers and also greater inhibitory capacities. However, of the processing of the dry capsules, which are those of greater practical use, the one dehydrated after 24 h showed the highest bacterial number and the most efficient inhibitory capacity.

According to the values obtained with the water activity data, it is estimated that the optimum time of dehydration of the beads is some hours greater than 24 hours. Therefore another investigation should be carried out to determine this time in an accurate way.

8 BIBLIOGRAFIA

- ABADA, K. y ABDEL, A. 2002. Biological and chemical control of stem-canker and black-scurf on potato in Egypt. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Cairo University, Cairo, Egypt. Bulletin of Faculty of Agriculture, Cairo University. 53: 1, 115-128.
- ADAMIEC, J. y MODRZEJEWSKA, Z. 2003. Spray-dried chitosan microgranules. *In* Proceedings IXth International workshop on bioencapsulation. May 25-27, 2003. Strasbourg, France. Sp.
- AGRIOS, G. 1996. Fitopatología. México. Limusa. 838p.
- AINSLEY, A., BRITTEN, M., ARCAND, Y., FANRWORTH, J., VUILLEMARD, J. y CHAMPAGNE, C. 2003. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in whey proteins and survival in a dynamic gastro-intestinal model. *In* Proceedings IXth International workshop on bioencapsulation. May 25-27, 2003. Strasbourg, France. Sp.
- ALONSO, F. 1996. El cultivo de la patata. Madrid, España. Mundi-Prensa. 272 p.
- AQUALAB, 2005. Water activity for product quality. Decagon Devices, INC. Pullman, Washington, U.S.A. <http://www.aqualab.com/aw_info.html> (25 sep. 2005).
- ARNDT, W., KOLLE, C. y BUCHENAUER, H. 1998. Effectiveness of *Fluorescent pseudomonas* on cucumber and tomato plants under practical conditions and preliminary studies on the mode of action of the antagonists. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Alemania. 105: 2, 198-215.

- BEUCHAT, L. 2003. Water activity and microbial stability. Center for food safety and Department of food science and technology. University of Georgia. <<http://www.wateractivity.org/BeuchatIFT2002.pdf>> (24 oct. 2003)
- BREGNI, C., DEGROSSI, J., GARCIA, R., LAMAS, M., FIRENSTEIN, R., D'AQUINO, M. 2000. Alginate microspheres of *Bacillus subtilis*. *Ars Pharmaceutica*,41:3, 245-248.
- CALDERON, A. 1978. Enfermedades de la papa y su control. Buenos Aires, Argentina. Hemisferio Sur. 143 p.
- CIAMPI, L. 2005. Estado del Arte. El control biológico y su aplicación a situaciones productivas. La bioencapsulación. <http://www.bioinsumos.cl/p_arte1112.htm. (30 oct. 2005).
- CIAMPI, L. 2002. Introducción a la patología vegetal. Ed. Nuova Firenze. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 231p.
- CHAMBERLAIN, K. y CRAWFORD, D., 1999. *In vitro* and *in vivo* antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 23: 1, 641-646.
- CHANDRAMOULI, V., KAILASAPATHY, P., PEIRIS, P. y CHIN, J. 2003. Studies on co-encapsulation of probiotic bacteria. *In Proceedings IXth International workshop on bioencapsulation*. May 25-27, 2003. Strasbourg, France. Sp.
- CHEN, J., GAO, H., LIN, R., JI, M., GAO, Z., CHEN, J., GAO, H., LIN, R., JI, M. y GAO, Z. 1999. Infection mechanism and biocontrol of major corn fungal diseases in Northern China. *Research progress in plant protection and plant nutrition*. China Agriculture Press; Beijing; China. pp:78-84.

- CHET, I. 1987. *Trichoderma* application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In Innovative approaches to plant disease control (I. Chet, Ed.). Wiley, New York. pp. 137-159
- CHOI, K., YOUN, C., AN, S. y YOOK, W. 1999. Effects of antagonistic bacteria and soil-borne pathogenic fungi on growth of pasture plants seedlings. Korean-Journal of Dairy-Science. 21: 1, 41-48.
- CHOI, K., YOON, C., KIM, J., KIM, K., MOON, S., LEE, Y., SONG, C y CHUN, W. 1997. Effects of antagonistic microorganisms, *Bacillus* spp., on growth of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Korean Journal of Dairy Science. 19: 1, 1-8.
- CHUNG, I. y WU, W. 2000. Effects of *Bacillus megaterium* on controlling lily root rot caused by *Rhizoctonia solani*. Plant Pathology Bulletin. 9: 2, 59-68. Chine.
- CONTRERAS, A. 1991. El cultivo de la papa. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 33 p.
- CONTRERAS, A. 2002. Cultivo de papas en Chile y sus riesgos. In Curso para Ingenieros Agrónomos Inspectores de Terreno. 19 de noviembre 2002. CRI Quilamapu. Chillán. 32 p.
- COOK, R. y BAKER, K. 1983. The nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. U.S.A. 539 p.
- COOK, R. 1996. Assuring the safe use of microbial biocontrol agents: a need for policy based on real rather than perceived risks. USDA Agricultural Research Service, Pullman, WA 99164, USA. Symposium on potential and problems of commercialization and registration of biological agents, Annual meeting of the Canadian Phytopathological Society, Toronto, Ontario, 25-28 Jun. 1995. Canadian Journal of Plant Pathology. 18: 4, 439-445.

- CÚNDOM, M. y MAZZA, S. 2001. Cátedra de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. www.unne.edu.ar/cyt/2001/5-agrarias/A-051pdf. (25 nov. 2003).
- CZACZYK, K., STACHOWIAK, B., TROJANOWSKA, K y GULEWICZ, K. 2000. Antifungal activity of *Bacillus* sp. isolated from compost. *Folia Microbiológica*. 45: 6, 552-554.
- DEMIR, G., KARCILIOGLU, A. y ONAN, E. 1999. Protection of cotton plants against damping-off disease with rhizobacteria. *Journal of Turkish Phytopathology*. 28: 3, 111-118.
- DREPPER, W., GHORBANI; A. y ARASI, H. 1996. Biological control of *Rhizoctonia solani* in potatoes by *Verticillium biguttatum* in the republic of Yemen an alternative to fungicides. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten un Pflanzenschutz*. Alemania. 103 (3): 324.
- DUFFY, B. 2000. Combination of pencycuron and *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79 for integrated control of *Rhizoctonia* root rot and take-all of spring wheat. *Crop Protection*. 19: 1, 21-25.
- ESCOBAR, P., MONTEALEGRE, J. y HERRERA, R. 2000. Selección *in vitro* de cepas de *Trichoderma harzianum* y respuesta a temperatura, Fe⁺³, salinidad y pH con el fin de ser utilizadas en el control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en tomate. X Congreso Chileno de Fitopatología, Valdivia-Chile 18 al 20 de Octubre 2000. p. 25.
- EMMERT, E. y HANDELSMAN, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706, USA. *FEMS-Microbiology-Letters*. 171: 1, 1-9.
- FAIGUENBAUM, H. 1987. Producción de cultivos en Chile: cereales, leguminosas e industriales. Santiago, Chile. Publicitaria Torrelodones. 332 p.

- FONTANA, A. 2003. Water activity's role in food safety and quality. Decagon Devices, Inc. Washington. U.S.A.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 1995. La Papa en la Década de 1990: Situación y Perspectivas de la Economía de la Papa a Nivel Mundial. Estudio Conjunto del Servicio de Productos Alimenticios Básicos. Dirección de Productos Básicos de la FAO y Manejo Post-cosecha y Comercialización del CIP. Roma, Italia. 39 p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, DEPARTAMENTO DE DESARROLLO SOSTENIBLE (FAO). 2005. Depósito de documentos de la FAO. Agricultura orgánica y biodiversidad. <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/005/Y4137S/y4137s06.htm> (25 sep. 2005).
- GERDING, M. 2005. Control biológico en Chile, una herramienta en la agricultura nacional. Centro de Desarrollo Medioambiental, Universidad Central <<http://www.sustentable.cl/portada/Reportajes/4516.asp>> (24 oct. 2005).
- GIESLER, L. y YUEN, G. 1998. Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 for biocontrol of brown patch disease. Crop-Protection. 17: 6, 509-513.
- HAGGAG, W. y NOFAL, M. 2000. Application of formulated biocontrol fungi against *Rhizoctonia* black scurf disease of potato. Plant Pathology Department, National Research Centre, Dokki, Egypt. Arab Universities Journal of Agricultural Sciences. 8: 1, 319-334.
- HEYDARI, A y MISAGHI, I. 1998. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. Plant and Soil. 202: 1, 109-116.
- HODA, A., EL, M., ALLAM, A. y FAHYMY, F. 2000. Biological control of root-rots and wilt diseases of cotton. Assiut Journal of Agricultural Sciences. 31: 2, 269-285.

- HOITINK, H. y BOEHM, M. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*. U.S.A. 37: 427-446.
- HONDA, N., HIRAI, M., ANO, T. y SHODA, M. 1999. Control of tomato damping-off caused by *Rhizoctonia solani* by the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis* and its product, hydroxylamine. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 65: 2, 153-162; 41.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (CMSF). 1988. *Microorganisms in foods 1. Their significance and methods*. 2^a ed. Toronto, Canadá. University of Toronto Press. 436 p.
- KALBE, C., MARTEN, P. y BERG, G. 1996. Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. University of Rostock, Department of Biology, Microbiology, Justus-von-Liebig-Weg 8, D-18051 Rostock, Germany. *Microbiological Research*. 151: 4, 433-439.
- KAMALA, N., VIDHYASEKARAN, P. y NAYAR, K. 1998. Evaluation of a new biopesticide formulation for the management of some foliar diseases of rice. *Proceedings of International Conference on Ecological Agriculture: Towards Sustainable Development*, Chandigarh, India. pp:382-388.
- KEEL, C. 1992. Bacterial antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: mechanisms and prospects. Department of Plant Sciences/Phytomedicine, Swiss Federal Institute of Technology, 8092 Zurich, Switzerland. *Bulletin-OILB-SROP*. 15: 1, 93-99.
- KESSLER, H. 1981. *Food Engineering and Dairy Technology*. Munich. Alemania. Verlag A. Kessler. 619 p.

- KIM, J., PARK, B., HWANG, I., PARK, C., KIM, J., PARK, B., HWANG, I. y PARK, C. 1998. Antifungal activity of root colonizing *Pseudomonas fluorescens* MC07 is responsible for its disease suppression ability. Korean-Journal-of-Plant-Pathology. 14: 6, 606-611.
- KIM, K., KANG, J., MOON, S., KANG, K., KIM, K. y KANG, T. 2000. Isolation and identification of antifungal N-butylbenzenesulphonamide produced by *Pseudomonas* sp. AB2. Journal of Antibiotics. 53: 2, 131-136.
- KOCH, E . 2001. Microbial antagonists of plant diseases: status, problems and future development -- results of a workshop. Biologische Bundesanstalt fur Land- und Forstwirtschaft, Institut fur biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstrasse 243, D-64287 Darmstadt, Germany. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes. 52: 9, 209-213.
- KRISHNAMURTHY, K. y GNANAMANICKAM, S. 1998. Biocontrol of rice sheath blight with formulated *Pseudomonas putida*. Indian-Phytopathology. 51: 3, 233-236.
- KUJAWA, P. 1997. Encapsulation of living cells in alginate and alginate/PVAL hydrogels. In International workshop on bioencapsulation VI. Barcelona. España. Sp.
- KURZAWINSKA, H. y GAJDA, I. 2001. The application of microorganisms (*Trichoderma viride*, *Bacillus polymyxa*) in protection of potato against *Rhizoctonia solani* (Kuhn). Agricultural University of Cracow, 29 Listopada 54, 31-425 Krakow, Poland. Biological and agrotechnical aspects of vegetable crops management. Proceedings of a conference, Skierniewice, Poland. Vegetable Crops Research Bulletin. 54: 1, 143-146.
- LAHA, G. y VERMA, J. 1998. Role of *fluorescent pseudomonads* in the suppression of root rot and damping-off of cotton. Indian-Phytopathology, 51: 3, 275-278.

- LEWIS, J. y PAPAIVIZAS, G. 1991. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. Biocontrol of Plant Diseases Laboratory, Plant Sciences Institute, ARS, USDA, Beltsville, MD 20705, USA. *Crop-Protection*. 10: 2, 95-105.
- , LUMSDEN, R. y LOCKE, J. 1996. Biocontrol of damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* with alginate prills of *Gliocladium virens*, *Trichoderma hamatum* and various food bases. Biocontrol of Plant Diseases Laboratory, USDA, ARS, Beltsville, USA. *Biocontrol Science and Technology*. 6: 2, 163-173.
- LI, W., ROBERTS, D., DERY, P., MEYER, S., LOHRKE, S., LUMSDEN, R. y HEBBAR, K. 2002. Broad spectrum anti-biotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. College of Life Science, Hubei University, Wuhan, China. *Crop-Protection*. 21: 2, 129-135.
- LIGON, J., LAM, S., GAFFNEY, T., HILL, D., HAMMER, P., TORKEWITZ, N., YOUNG, T., HOFMANN, D. y KEMPF, H. 2000.. Technologies for strain improvement for biological control of plant pathogens. Emerging technologies for integrated pest management: concepts, research, and implementation. Kennedy-gg (ed.); Sutton-tb Proceedings of a Conference, Raleigh, North Carolina, USA. American Phytopathological Society. pp: 257-268.
- LISERRE, A., FRANCO, B. y RE, M. 2003. Survival and release of *Bifidobacterium lactis* from alginat and alginate-chitosan-polyvinylacetatephtalate microparticles. *In* Proceedings IXth International workshop on bioencapsulation. May 25-27, 2003. Strasbourg, France. Sp.
- LOU, B., ZHANG, B., RYDER, M., LOU, B. y ZHANG, B. 2001. Colonization of *Pseudomonas aeruginosa* CR56 in the rhizosphere of cucumber and tomato. *Journal of Zhejiang. University Agriculture and Life Sciences*. China. 27: 2, 183-186.

- MARTEN, P., BRUCKNER, S. y LUTH, P. 1999. Plant growth promotion of different cultivated plants and biological control of soil-borne phytopathogenic fungi by *Bacillus subtilis* strain B2g. Zeitschrift-fur-Pflanzenkrankheiten-und-Pflanzenschutz. Alemania. 106: 1, 74-81.
- MAZZOLA, M. 1999. Transformation of soil microbial community structure and *Rhizoctonia*-suppressive potential in response to apple roots. Phytopathology. U.S.A. 89: 10, 920-927.
- MEW, T., CHEN, Z., LU, F., YIN, S., SHI, A., CHEN, Z., LU, F., YIN, S., y SHI, A. 1999. Field experiments on biocontrol using beneficial bacteria in rice. Integrating science and people in rice pest management: proceedings of the rice integrated pest management (IPM) conference. Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI); Kuala Lumpur; Malaysia. pp: 99-101.
- MUÑOZ, C., VIRGEN, G., HERRERA, A. y OLALDE, V. 2001. Introduction of biological control agents of *Rhizoctonia solani* to solarized or limed soil under greenhouse conditions. Manejo Integrado de Plagas. 1, No. 59, 10-14.
- NAKASAKI, K., HIRAOKA, S. y NAGATA, H. 1998. A new operation for producing disease-suppressive compost from grass clippings. Applied and Environmental Microbiology. 64: 10, 4015-4020.
- NIELSEN, T., CHRISTOPHERSEN, C., ANTHONI, U. y SORENSEN, J. 1998. A promising new metabolite from *Pseudomonas fluorescens* for biocontrol of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani*. Bulletin-OILB-SROP 21: 9, 51-55.
- NIELSEN, T., CHRISTOPHERSEN, C., ANTHONI, U. y SORENSEN, J. 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. Journal of Applied Microbiology. 87: 1, 80-90.

- NIELSEN, M. y SORENSEN, J. 1999. Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. 30: 3, 217-227.
- CHILE, MINISTERIO DE AGRICULTURA, OFICINA DE ESTUDIOS Y POLITICAS AGRARIAS (ODEPA). 2005. Mercados y rubros. El mercado de las papas. TAPIA, B. <<http://www.odepa.gob.cl/>> (22 dic. 2005).
- OGOSHI, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Khün. *Annual Review of Phytopathology*. U.S.A. 25:125-143.
- OMAR, S. y ABD-ALLA, M. 1998. Biocontrol of fungal root rot diseases of crop plants by the use of rhizobia and bradyrhizobia. *Folia Microbiológica*. 43: 4, 431-437.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. FAO. 1995. La papa en la década de 1990: Situación y perspectivas de la economía de la papa a nivel mundial. Roma, Italia. 50 p.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. FAO .1999. La agricultura orgánica. 250 p.
- OUWERX, C., DEGHRAN, B., MESTDAGH, M. y AXELOS, M. 1997. Characterization of alginate gels: relation between structure and retention/release of solutes. *In* International workshop on bioencapsulation VI. Barcelona. España. Sp.
- PAAU, A., GRAHAM, L. y BENNETT, M. 1991. Progress in formulation research for PGPR and biocontrol inoculants. Agracetus, 8520 University Green, Middleton, WI 53562, U.S.A. *Bulletin SROP*. 14: 8, 399-403.

- PAL, K., TILAK, K., SAXENA, A., RINKU, D., SINGH, C. y DEY, R. 2000. Monitoring a biocontrol rhizobacterium *Pseudomonas glumae* using Tn5::lacZ marker. *Indian Journal of Microbiology*. 40: 1, 21-24.
- PASTUCHA, A. 1999. Protective effect of antagonistic microorganisms in limiting soyabean (*Glycine max* (L.) Merrill) root diseases. *Annales Universitatis Mariae Curie Sklodowska. Sectio EEE, Horticultura*. 7: 119-135.
- PATEL, A., BUBLITZ, M y VORLOP, K. 2003. Encapsulation and drying of *Pseudomonas fluorescens* for biological pest control. *In Proceedings IXth International workshop on bioencapsulation*. May 25-27, 2003. Strasbourg, France. Sp.
- PFÜTZE, S. 2003. Encapsulation and granulation. *In Proceedings IXth International workshop on bioencapsulation*. May 25-27, 2003. Strasbourg, France. Sp.
- PETKOWSKI, J. y BOER, R. 2001. *Rhizoctonia solani* anastomosis group AG 3 and AG 2-1 as pathogens of potato and other crops in potato production systems. *Proceedings of the Second Australasian Soilborne Diseases Symposium*. Lorne. Ed. Porter *et al.*
- RODHAM, D., WANG Y., CANTWELL, J., WINN, P., FOUNDLING, J., y WANG, Y. 1999. Formulating microbial biocontrol agents. *Formulation and Analytical Sciences*, Zeneca Agrochemicals, Jealott's Hill Research Station, Bracknell, Berkshire, RG42 6ET, UK. 9th International Congress of Pesticide Chemistry, London, UK, 2-7 August 1998. *Pesticide-Science*. 55: 3, 340-342.
- RODRÍGUEZ, F. y COTES, A. 1999. Biological control of the bean root rot (*Rhizoctonia solani* Kühn) using pregermination control in the presence of *Trichoderma koningii* Oudemans. *ASCOLFI Informa*. 25: 1, 3-4.
- ROJAS S. y RIPA R. 1987. Pasado, presente y futuro de la Subestación Experimental de Control Biológico La Cruz. *IPA La Platina*. Chile. 44: 3-7.

- RUSSO, A., BASAGLIA, M., TOLA, E. y CASELLA, S. 2001. Survival, root colonisation and biocontrol capacities of *Pseudomonas fluorescens* F113 LacZY in dry alginate microbeads. Dipartimento di Chimica e Biotecnologie Agrarie, Via del Borghetto, 80, 56124 Pisa, Italy. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 27: 6, 337-342.
- SABARATNAM, S. y TRAQUAIR, J. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. Department of Plant Sciences, The University of Western Ontario, London, Ontario N6A 5B7, Canada. *Biological-Control*. 23: 3, 245-253.
- SAINZ, D., LEKKA, M., KULIK, A. y WANDREY, C. 2003. Influence of formulation and preparation on gel and surface characteristics of alginate based microspheres. *In Proceedings IXth International workshop on bioencapsulation*. May 25-27, 2003. Strasbourg, France. Sp.
- SARIAH, M. y CHAN, L. 1999. Biological seed treatment for the control of *Rhizoctonia* damping-off of choy sam. *Proceedings of the Symposium on Biological Control in the Tropics held at MARDI Training Centre, Serdang, Malaysia*. 138-140.
- SARMAH, D. 1999. Combined effect of *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis* on sheath blight of rice. *Journal of the Agricultural Science Society of North East India*. 12: 2, 271-273.
- SCHMIEDEKNECHT, G., BOCHOW, H. y JUNGE, H. 1998. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent II. Biological control of potato diseases. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. Alemania. 105: 4, 376-386.
- SCHNETTLER, E. 1993. Efecto de bacterias antagonistas en la incidencia de *Rhizoctonia solani* Kühn AG3 agente causal de la sarna negra en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Chile. 152 p.

- SHODA, M. 1999. Production of microbial pesticide in submerged and in solid state fermentations. Thirteenth forum for applied biotechnology, Proceedings Part I. Gent, Bélgica. 64: 275-280.
- SIDDIQUI, I., EHTESHAMUL, H. y GHAFAR, A. 1998. Effect of rhizobia and fungal antagonists in the control of root infecting fungi on sunflower and chickpea. Pakistan Journal of Botany. Pakistán. 30: 2, 279-286.
- , 1999a. Root dip treatment with *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma* spp., in the control of root rot-root knot disease complex in chilli (*Capsicum annuum* L.). Pakistan Journal of Nematology. Pakistán. 17: 1, 67-75.
- , 1999b. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* and chemical fertilizers on root-rot and root-knot diseases of mungbean. Pakistan Journal of Nematology. Pakistán. 17: 1, 77-86.
- , 2000. Effects of cell suspension and cell-free culture filtrate of *Pseudomonas aeruginosa* in the control of root rot-root knot disease complex of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Acta Agrobotanica. Pakistán. 53: 2, 47-55.
- ZAKI, M. y GHAFAR, A. 2000. Greenhouse evaluation of rhizobia as biocontrol agent of root-infecting fungi in okra. Acta Agrobotánica. 53: 1, 13-22.
- y ABDUL, G. 2000. Co-inoculation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bradyrhizobium* sp., in the control of root infecting fungi and root knot nematode on uridbean *Vigna mungo* (L.) Hepper. Pakistan Journal of Phytopathology. Pakistán. 12: 1, 35-41.

- y SHAUKAT, S. 2001. Use of rhizobacteria in the control of root rot-root knot disease complex of mungbean. *Journal of Phytopathology*. 149: 6, 337-346.
- SILVA, L. 1999. Control biológico de *Rhizoctonia solani* Kühn AG3 en papa *Solanum tuberosum* L. mediante *Serratia liquefaciens* cepa S111 bioencapsulada, bajo condiciones controladas y de campo. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Chile. 107 p.
- SIVAKUMAR, G., SHARMA, R. y RAI, S. 2000. Biocontrol of banded leaf and sheath blight of maize by peat based *Pseudomonas fluorescens* formulation. *Indian Phytopathology*. India. 53: 2, 190-192.
- SMIDSRØD, O., y SKJAK-BRÆK, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Tibtech* 8:71-77.
- SNEH, B., BURPEE, L., y OGOSHI, A. 1994. Identification of *Rhizoctonia* Species. Minnesota. U.S.A. APS press. 135 p.
- SNEH, B. 1999. Biological control of *Rhizoctonia* diseases. 2. Use of non-pathogenic isolates of *Rhizoctonia* in biological control. *Summa Phytopathologica*. 25: 2, 102-106.
- SOMEYA, N., KATAOKA, N., KOMAGATA, T., HIRAYAE, K., HIBI, T. y AKUTSU, K. 2000. Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant-Disease*. 84: 3, 334-340.
- STEINER, U., KILIAN, M. y JUNGE, H. 1999. A plant strengthener based on *Bacillus subtilis* as dressing for potato cultivation. *Kartoffelbau*. Alemania. 50: 1-2, 32-34.
- STEWART, D. 1962. A selective-diagnostic medium for the isolation of pectinolytic organisms in the enterobacteriaceae. *Nature* 195: 1023.

- SULTANA, V., EHTESHAMUL, H., ARA, J., QASIM, R. y GHAFAR, A. 2000. Effect of crustacean chitin on the efficacy of plant growth promoting bacteria in the control of root infecting fungi of sunflower and chickpea. *Acta Agrobotánica*. 53: 1, 5-12.
- THRANE, C., NIELSEN, T., SORESEN, J., y OLSSON, S. 1998. DUFFY-B (ED.); ROSENBERGER-U (ED.); DEFAGO-G. Detection of fungal stress responses by vital fluorescent staining. *Molecular approaches in biological control*. Delemont, Switzerland. *Bulletin OILB-SROP*. 21: 9, 65-68.
- TREJO, S., SEPÚLVEDA, I. y CRAWFORD, D. 1998. In vitro and in vivo antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 6, 865-872; 13.
- TSROR, L., BARAK, R. y SNEH, B. 2001. Biological control of black scurf on potato under organic management. *Crop Protection* 20 (2): 145-150.
- TUITERT, G., SZCZECH, M. y BOLLEN, G. 1998. Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with compost made from organic household waste. *Phytopathology*. U.S.A. 88: 8, 764-773.
- URIBE, D., ORTIZ, E., PORTILLO, M., BAUTISTA, G. y CERÓN, J. 1999. Diversidad de *Pseudomonas fluorescens* en cultivos de papa de la región cundiboyacense y su actividad antagonista in vitro sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2 (1). <www.ibun.unal.edu.co/revista1.html> (25 nov. 2003).
- VELAZHAHAN, R., SAMIYAPPAN, R. y VIDHYASEKARAN, P. 1999. Relationship between antagonistic activities of *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Rhizoctonia solani* and their production of lytic enzymes. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 106: 3, 244-250.
- VIDHYASEKARAN, P. y MUTHAMILAN, M. 1999. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight. *Biocontrol*

Science and Technology. Department of Plant Pathology, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. India. 9: 1, 67-74.

VURRO, M., GRESSEL, J., BUTT, T., HARMAN, G., PILGERAM, A., St. LEGER, R. y NUSS, D. 2001. Enhancing biocontrol agents and Handling Risks. NATO Sciens Series: Life and behavioural sciences. Nueva Zelandia. Vol 339, 296p.

WICKREMASINGHE, R., ABEYWICKRAMA, K. y ABEYTUNGA, D. 1999. Isolation and identification of fungi from mushroom composts and evaluation of their biological activity. Journal of the National Science Foundation of Sri-Lanka. Sri-Lanka. 27: 1, 29-40.

WILSON, F. y HUFFAKER, C. 1976. The philosophy, scope and importance of biological control. In: Theory and practice of biological control. Huffaker, C. y Messeger, P. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp 3-14.

ZHENG, A., LI, P., CHEN, H., WANG, L., MA, B., WANG, X., ZHENG, A., LI, P., CHEN, H., WANG, L., MA, B. y WANG, X. 2001. Isolation of bacteria producing chitinase and inhibiting growth of *Rhizoctonia solani*. Chinese Rice Research Newsletter. China. 9: 1.

ZÚÑIGA, E. 1985. Ochenta años de control biológico en Chile. Revisión histórica y evaluación de los proyectos desarrollados (1903-1983). Agricultura Técnica (Chile). 45 (3): 175-183.

ANEXOS

ANEXO 1 Detalle de otros materiales utilizados en la tesis.

Material de vidrio

- Placas Petri
- Pipetas
- Buretas
- Tubos
- Matraces

Químicos y elementos utilizados en la confección de medios.

- Agar Mc Conkey
- Cloruro de calcio
- Agua destilada
- Polipeptato de Sodio
- Etanol
- Acido tetracético etilendiamina (EDTA)
- Dextrosa
- Acido láctico
- Melaza
- Extracto de carne
- Peptona de soya
- Sacarosa
- Acido succínico
- Sulfato de amonio
- Agar papa

Equipo de Laboratorio

- Agitador orbital
- Olla a presión
- Cámara de flujo laminar
- Centrífugas
- Estufas de incubación

(Continúa)

(Continuación Anexo 1)

- Medidor de actividad de agua. Este instrumento se empleó para medir la actividad de agua presente en las cápsulas. Las mediciones se realizaron en dependencias de laboratorio Quimatic S.A., Santiago de Chile.
- Equipo de atrapamiento: bomba peristáltica, mangueras.

ANEXO 2 Determinación de la capacidad inhibitoria del cultivo líquido, homogeneizado, cápsulas frescas, deshidratadas y almacenadas.

Comprobación de supuestos de homogeneidad de la varianza.

Test de Cochran:	0.293601	P:	0.314952 NS
Test de Bartlett:	1.283020	P:	0.399197
Test de Hartley:	7.18974		

NS indica que existe homogeneidad de varianza, con lo cual se cumple el supuesto para realizar un análisis de varianza.

Análisis de Varianza por área - Tipo III Suma de Cuadrados

Fuente	SC	Gl	CM	F-cal	P-valor
Inhibición	6802.31	8	850.289	382.81	0.0000 **
Error	79.9618	36	2.22116		
Total	6882.27	44			

Todos los F-calculados están basados en el error residual del cuadrado medio.

** Indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos (p -valor < 0.01)

ANEXO 3 Determinación de la capacidad inhibitoria de las cápsulas secas.

Comprobación de supuestos. Tratamientos 24 h, 36 h y 48 h sin “ventaja”, sin almacenamiento, más testigo.

Test de Cochran:	0.562055	P:	0.358463 NS
Test de Bartlett:	1.11905	P:	0.544779
Test de Hartley:	2.98096		
Test de Levene:	2.28035	P:	0.11843

Análisis de Varianza por área - Tipo III Suma de Cuadrados

Fuente	SC	Gl	CM	F-cal	P-valor
Tratamientos	744.85	3	248.283	190.97	0.0000
Error	20.8022	16	1.30014		
Total	765.652	19			

Todos los F-calculados están basados en el error residual del cuadrado medio.

ANEXO 4 Determinación de la capacidad inhibitoria de cápsulas con 24 h de deshidratación, frente a los factores almacenaje y ventaja.

ANDEVA para el factor área de crecimiento de *R. solani* frente a cápsulas con 24 h de deshidratación, considerando los factores “ventaja” y almacenamiento.

Análisis de Varianza por área - Tipo III Suma de Cuadrados

Fuente	SC	Gl	CM	F cal	P-valor
A: Ventaja	398.43	3	132.81	53.64	0.0000
B: Almacena.	3360.87	3	1120.29	452.43	0.0000
Interacción A:B	419.902	9	46.6557	18.84	0.0000
Error	158.474	64	2.47616		
Total	4337.67	79			

Todos los F-calculados están basados en el error residual del cuadrado medio.

ANEXO 5 Determinación de la capacidad inhibitoria de cápsulas con 36 h de deshidratación, frente a los factores almacenaje y ventaja.

ANDEVA para el factor área de crecimiento de *R. solani* frente a cápsulas con 36 h de deshidratación, considerando los factores “ventaja” y almacenamiento.

Análisis de Varianza por área - Tipo III Suma de Cuadrados

Fuente	SC	GI	CM	F cal	P-valor
A: Ventaja	1262.99	3	420.996	192.02	0.0000
B: Almacena.	2349.09	3	783.029	357.14	0.0000
Interacción A:B	667.045	9	74.1161	33.80	0.0000
Error	140.32	64	2.1925		
Total	4419.44	79			

Todos los F-calculados están basados en el error residual del cuadrado medio.

ANEXO 6 Determinación de la capacidad inhibitoria de cápsulas con 48 h de deshidratación, frente a los factores almacenaje y ventaja.

Análisis de Varianza por área - Tipo III Suma de Cuadrados

Fuente	SC	GI	CM	F cal	P-valor
A: Ventaja	1338.93	3	446.311	272.23	0.0000
B: Almacena.	2807.21	3	935.737	570.77	0.0000
Interacción A:B	310.094	9	34.4549	21.02	0.0000
Error	104.924	64	1.63944		
Total	4561.16	79			

Todos los F-calculados están basados en el error residual del cuadrado medio.

ANEXO 7 Análisis de regresión simple.

Se presenta un análisis de regresión simple para las variables inhibición, recuento y actividad de agua. La variable dependiente es la inhibición.

Datos utilizados en el análisis de regresión simple.

Etapa de confección y almacenaje de cápsulas	Recuento bacteriano (ufc/ml)	Area de avance de <i>R. solani</i> (cm ²)	Actividad de Agua (aw)
Cultivo líquido	6,8 x 10 ¹⁰	33,04	-
Homogeneizado	4,5 x 10 ¹¹	29,75	-
Cápsulas frescas	1,2 x 10 ¹⁰	38,48	0,998
Cápsulas 6 h de secado	1,1 x 10 ¹⁰	39,99	0,995
Cápsulas 12 h de secado	1,4 x 10 ¹⁰	42,29	0,993
Cápsulas 24 h de secado	3,4 x 10 ⁹	52,70	0,627
Cápsulas 36 h de secado	2,7 x 10 ⁹	56,03	0,432
Cápsulas 48 h de secado	1,1 x 10 ⁹	58,27	0,252
Cápsulas 24 h, 15 días almac.	7,5 x 10 ⁸	63,45	-
Cápsulas 24 h, 30 días almac.	6,6 x 10 ⁸	67,67	-

En los valores de inhibición se utilizó el promedio lineal de 5 placas y el crecimiento o área de avance de *R. solani* al sexto día.

Análisis de regresión simple

Parámetro	Estimado	Error Standard	T Estadística	Valor P
Constante	66.5511	2.17571	30.5882	0.0000
aw	-25.9591	2.80286	-9.26165	0.0008

Análisis de la Varianza

Fuente	SC	Gl	CM	F-cal	P-valor
Modelo	362.524	1	362.524	85.78	0.0008
Error	16.9052	4	4.22629		
Total	379.429	5			

Aw: R² : 95.54%
 R² : (ajustado para Gl) : **94.43%**
 Error estándar: 2.06

Recuento: R² : 33.10%
 R² : (ajustado para Gl) : **24.70%**
 Error estándar: 11.43

ANEXO 8 Pruebas de inhibición.

Este factor se expresa en el área de crecimiento diario o área de avance de *R. solani* dentro de placas Petri, frente a la bacteria antagonista *S. liquefaciens*.

A continuación se presentan los crecimientos diarios (cm²) del hongo frente a la acción de la bacteria, a través de las etapas de confección, deshidratación y almacenamiento de las cápsulas.

Testigo. Crecimiento diario de *R. solani* sin la presencia de bacterias.

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	9.2	9.0	8.7	9.3	8.9
	medición 2	9.1	9.0	8.6	9.2	8.7
	medición 3	9.2	9.0	8.6	9.3	8.9
	promedio	9.2	9.0	8.6	9.3	8.8
2 ^o día	medición 1	47.0	45.0	45.3	46.8	45.5
	medición 2	47.0	45.2	45.5	46.8	45.5
	medición 3	46.8	45.2	45.3	46.9	45.4
	promedio	46.9	45.1	45.4	46.8	45.5
3 ^{er} día	medición 1	63.0	63.3	62.5	62.7	64.0
	medición 2	63.1	63.5	62.5	62.6	64.0
	medición 3	63.0	63.5	62.4	62.7	63.8
	promedio	63.0	63.4	62.5	62.7	63.9
4 ^o día	medición 1	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 2	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 3	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	promedio	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en medio líquido

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	6.7	7.4	6.5	6.5	6.0
	medición 2	6.7	7.5	6.6	6.6	6.0
	medición 3	6.8	7.5	6.7	6.5	6.2
	promedio	6.7	7.5	6.6	6.5	6.1
2 ^o día	medición 1	30.0	28.5	28.5	27.4	28.5
	medición 2	29.9	28.4	28.5	27.5	28.5
	medición 3	30.0	28.3	28.6	27.3	28.6
	promedio	30.0	28.4	28.5	27.4	28.5
3 ^{er} día	medición 1	37.8	33.6	32.5	33.9	31.8
	medición 2	37.7	33.7	32.5	34.1	31.7
	medición 3	37.6	33.6	32.3	34.0	31.9
	promedio	37.8	33.6	32.4	34.0	31.8

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en el homogeneizado

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	9.3	10.1	12.1	11.6	10.0
	medición 2	9.3	9.9	12.0	11.4	9.9
	medición 3	9.3	9.9	11.9	11.7	10.2
	promedio	9.3	10.0	12.0	11.6	10.0
2 ^o día	medición 1	14.0	26.7	30.5	27.1	26.1
	medición 2	14.2	26.6	30.3	27.1	26.2
	medición 3	14.1	26.6	30.2	27.3	26.1
	promedio	14.1	26.6	30.3	27.2	26.1
3 ^{er} día	medición 1	15.0	29.2	33.5	30.9	27.5
	medición 2	15.0	29.3	33.3	31.0	27.6
	medición 3	14.9	29.2	33.2	30.9	27.6
	promedio	15.0	29.2	33.3	30.9	27.6

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en las cápsulas frescas

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	8.8	10.4	8.0	11.2	11.9
	medición 2	8.8	10.3	8.3	11.3	12.1
	medición 3	8.7	10.5	8.2	11.2	12.2
	promedio	8.8	10.4	8.2	11.2	12.1
2 ^o día	medición 1	30.0	32.7	30.6	32.0	32.9
	medición 2	30.1	32.7	30.8	32.1	32.8
	medición 3	30.0	32.8	30.9	31.9	33.0
	promedio	30.0	32.7	30.8	32.0	32.9
3 ^{er} día	medición 1	34.8	39.8	37.2	38.6	38.1
	medición 2	34.8	39.8	37.2	38.7	38.2
	medición 3	34.5	40.0	37.3	38.5	38.1
	promedio	34.7	39.9	37.2	38.6	38.1

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 6 h de deshidratación

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	8.4	7.5	8.3	8.1	7.7
	medición 2	8.4	7.4	8.4	8.3	7.8
	medición 3	8.4	7.6	8.3	8.3	7.6
	promedio	8.4	7.5	8.4	8.2	7.7
2 ^o día	medición 1	31.3	28.7	31.9	32.0	30.0
	medición 2	31.4	28.7	31.8	32.0	30.0
	medición 3	31.3	28.6	32.1	31.9	30.0
	promedio	31.3	28.7	31.9	32.0	30.0
3 ^{er} día	medición 1	38.3	37.4	38.4	40.6	40.8
	medición 2	38.2	37.5	38.5	40.5	40.7
	medición 3	38.0	37.3	38.4	40.7	40.8
	promedio	38.2	37.4	38.4	40.6	40.8
4 ^o día	medición 1	39.4	37.7	38.4	41.6	42.3
	medición 2	39.2	37.6	38.5	41.6	42.0
	medición 3	39.2	37.8	38.4	41.7	42.3
	promedio	39.3	37.7	38.4	41.6	42.2

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 12 h de deshidratación

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	13.9	12.7	13.2	12.0	10.5
	medición 2	14.0	12.5	13.2	12.0	10.4
	medición 3	14.0	12.8	12.9	12.2	10.5
	promedio	14.0	12.7	13.1	12.1	10.5
2 ^o día	medición 1	35.7	34.3	35.8	34.1	33.2
	medición 2	35.7	34.3	35.9	34.2	33.1
	medición 3	35.8	34.2	36.0	34.1	33.2
	promedio	35.7	34.3	35.9	34.1	33.2
3 ^{er} día	medición 1	40.7	39.9	42.9	39.3	44.2
	medición 2	40.6	40.0	42.7	39.3	44.1
	medición 3	40.8	39.7	42.8	39.2	44.3
	promedio	40.7	39.9	42.8	39.3	44.2
4 ^o día	medición 1	40.7	41.6	43.5	39.8	44.9
	medición 2	40.6	41.6	43.5	39.7	44.9
	medición 3	40.8	41.4	43.5	39.8	45.0
	promedio	40.7	41.5	43.5	39.8	44.9

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	7.5	8.9	8.9	9.5	9.1
	medición 2	7.5	9.0	9.1	9.5	9.2
	medición 3	7.6	9.0	9.2	9.6	9.1
	promedio	7.5	9.0	9.1	9.5	9.1
2 ^o día	medición 1	37.0	38.0	38.7	37.8	33.5
	medición 2	37.2	38.0	38.8	37.8	33.5
	medición 3	37.3	38.0	38.7	37.9	33.6
	promedio	37.2	38.0	38.7	37.8	33.5
3 ^{er} día	medición 1	46.7	52.1	52.9	55.3	50.3
	medición 2	46.7	52.1	52.9	55.3	50.3
	medición 3	46.7	52.0	52.9	55.4	50.4
	promedio	46.7	52.1	52.9	55.3	50.3
4 ^o día	medición 1	49.3	53.8	52.9	56.1	52.4
	medición 2	49.2	53.7	52.9	55.9	52.3
	medición 3	49.4	53.8	52.9	56.0	52.3
	promedio	49.3	53.7	52.9	56.0	52.3
5 ^o día	medición 1	50.1	54.5	52.9	56.1	53.2
	medición 2	50.1	54.5	52.9	55.9	53.3
	medición 3	50.1	54.6	52.9	56.0	53.4
	promedio	50.1	54.5	52.9	56.0	53.3

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación y 1 día de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	9.7	10.2	9.6	10.0	8.4
	medición 2	9.7	10.3	9.6	10.0	8.4
	medición 3	9.8	10.4	9.7	10.0	8.3
	promedio	9.7	10.3	9.6	10.0	8.4
2 ^o día	medición 1	39.1	37.5	40.3	39.6	38.0
	medición 2	39.2	37.5	40.2	39.7	38.1
	medición 3	39.1	37.6	40.2	39.7	38.1
	promedio	39.1	37.5	40.2	39.7	38.1
3 ^{er} día	medición 1	49.3	46.3	49.0	47.7	48.0
	medición 2	49.3	46.3	49.1	47.7	48.0
	medición 3	49.1	46.2	49.2	47.5	48.0
	promedio	49.2	46.3	49.1	47.6	48.0
4 ^o día	medición 1	50.0	48.1	51.0	48.8	50.8
	medición 2	50.1	48.2	51.0	48.8	50.9
	medición 3	50.1	48.3	51.1	48.6	50.9
	promedio	50.1	48.2	51.0	48.7	50.9
5 ^o día	medición 1	50.9	48.6	51.1	49.0	52.2
	medición 2	51.1	48.7	51.2	49.0	52.1
	medición 3	50.9	48.8	51.2	48.8	52.2
	promedio	50.9	48.8	51.2	48.9	52.2

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación y 2 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	14.2	9.7	12.3	11.6	10.1
	medición 2	14.3	9.6	12.3	11.6	10.1
	medición 3	14.3	9.8	12.4	11.5	9.9
	promedio	14.3	9.7	12.3	11.6	10.1
2 ^o día	medición 1	37.3	23.8	34.2	33.1	42.6
	medición 2	37.3	23.7	34.3	33.2	42.5
	medición 3	37.1	23.8	34.2	33.3	42.7
	promedio	37.2	23.8	34.2	33.2	42.6
3 ^{er} día	medición 1	47.5	40.6	45.7	43.7	51.0
	medición 2	47.6	40.5	45.7	43.7	51.1
	medición 3	47.8	40.6	45.8	43.8	51.1
	promedio	47.6	40.6	45.7	43.7	51.1
4 ^o día	medición 1	51.1	49.0	50.0	47.7	54.8
	medición 2	51.2	49.2	50.0	47.7	54.7
	medición 3	51.2	49.3	50.2	47.7	54.8
	promedio	51.2	49.2	50.1	47.7	54.8
5 ^o día	medición 1	51.1	52.3	50.0	47.7	56.1
	medición 2	51.2	52.3	50.0	47.7	56.2
	medición 3	51.2	52.2	50.2	47.7	56.1
	promedio	51.2	52.2	50.1	47.7	56.1

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación y 3 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	13.4	13.1	12.3	13.4	12.5
	medición 2	13.5	13.1	12.3	13.5	12.6
	medición 3	13.4	12.9	12.4	13.6	12.7
	promedio	13.4	13.0	12.3	13.5	12.6
2 ^o día	medición 1	34.1	28.6	35.1	34.9	29.5
	medición 2	34.1	28.7	35.2	34.9	29.6
	medición 3	34.4	28.8	35.2	34.9	29.6
	promedio	34.2	28.7	35.2	34.9	29.6
3 ^{er} día	medición 1	46.6	36.9	48.8	45.6	37.1
	medición 2	46.6	37.0	48.9	45.6	37.0
	medición 3	46.5	37.1	48.9	45.5	37.2
	promedio	46.6	37.0	48.9	45.6	37.1
4 ^o día	medición 1	53.4	38.5	53.9	49.6	38.0
	medición 2	53.4	38.5	53.9	49.6	38.0
	medición 3	53.4	38.6	53.9	49.3	37.9
	promedio	53.4	38.5	53.9	49.5	38.0
5 ^o día	medición 1	54.6	38.7	55.2	49.6	38.0
	medición 2	54.6	38.6	55.1	49.6	38.0
	medición 3	54.6	38.4	55.2	49.3	37.9
	promedio	54.6	38.6	55.2	49.5	38.0

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación y 15 días de almacenamiento

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	10.7	10.4	9.4	11.0	10.8
	medición 2	10.7	10.3	9.4	11.0	10.8
	medición 3	10.8	10.4	9.5	11.0	10.8
	promedio	10.7	10.4	9.4	11.0	10.8
2 ^o día	medición 1	37.4	40.1	42.2	40.2	38.2
	medición 2	37.4	40.2	42.2	40.3	38.2
	medición 3	37.4	40.1	42.3	40.3	38.2
	promedio	37.4	40.1	42.2	40.3	38.2
3 ^{er} día	medición 1	56.9	60.4	55.6	58.8	57.2
	medición 2	56.9	60.5	55.7	58.9	57.2
	medición 3	56.8	60.4	55.6	58.7	57.2
	promedio	56.9	60.4	55.6	58.8	57.2
4 ^o día	medición 1	65.1	69.5	61.3	69.8	66.0
	medición 2	65.1	69.5	61.1	69.8	66.0
	medición 3	65.2	69.6	61.2	69.7	65.9
	promedio	65.1	69.5	61.2	69.8	65.9
5 ^o día	medición 1	66.1	69.5	61.3	69.8	66.0
	medición 2	66.2	69.5	61.1	69.8	66.0
	medición 3	66.1	69.6	61.2	69.7	65.9
	promedio	66.1	69.5	61.2	69.8	65.9

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación, 15 días de almacenamiento y 1 día de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	11.2	9.8	10.5	11.2	11.7
	medición 2	11.2	9.9	10.5	11.1	11.7
	medición 3	11.3	9.8	10.5	11.1	11.9
	promedio	11.2	9.8	10.5	11.1	11.8
2 ^o día	medición 1	43.3	35.2	41.8	40.4	42.9
	medición 2	43.5	35.3	41.8	40.4	42.9
	medición 3	43.5	35.3	41.9	40.5	43.0
	promedio	43.4	35.3	41.8	40.4	42.9
3 ^{er} día	medición 1	60.5	53.2	55.6	57.9	59.1
	medición 2	60.5	53.2	55.7	57.8	59.3
	medición 3	60.5	53.3	55.6	57.9	59.2
	promedio	60.5	53.2	55.6	57.8	59.2
4 ^o día	medición 1	65.9	69.3	61.3	61.2	64.2
	medición 2	65.8	69.3	61.2	61.2	64.3
	medición 3	66.0	69.4	61.1	61.5	64.3
	promedio	65.9	69.3	61.2	61.3	64.3

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación, 15 días de almacenamiento y 2 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	11.2	10.1	8.3	8.6	9.9
	medición 2	11.2	10.2	8.4	8.6	9.9
	medición 3	11.3	10.2	8.3	8.7	9.9
	promedio	11.2	10.2	8.3	8.6	9.9
2 ^o día	medición 1	32.5	36.0	34.2	31.0	36.4
	medición 2	32.5	35.9	34.2	31.1	36.4
	medición 3	32.6	35.9	34.3	31.0	36.3
	promedio	32.5	35.9	34.2	31.0	36.4
3 ^{er} día	medición 1	41.1	52.1	51.9	50.0	51.7
	medición 2	41.4	52.0	51.9	50.0	51.7
	medición 3	41.4	52.0	51.6	50.0	51.7
	promedio	41.3	52.0	51.8	50.0	51.7
4 ^o día	medición 1	42.7	57.3	58.1	56.0	58.0
	medición 2	42.7	57.3	58.2	56.1	57.9
	medición 3	42.6	57.3	58.3	56.2	57.9
	promedio	42.7	57.3	58.2	56.1	57.9
5 ^o día	medición 1	42.7	57.3	59.4	56.0	58.0
	medición 2	42.7	57.3	59.4	56.1	57.9
	medición 3	42.6	57.3	59.4	56.2	57.9
	promedio	42.7	57.3	59.4	56.1	57.9

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación, 15 días de almacenamiento y 3 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	9.7	6.7	8.8	9.7	8.5
	medición 2	9.7	6.7	8.8	9.7	8.5
	medición 3	9.8	6.7	8.9	9.8	8.5
	promedio	9.7	6.7	8.8	9.7	8.5
2 ^o día	medición 1	33.0	30.7	33.9	36.6	36.4
	medición 2	33.0	30.7	34.0	36.6	36.4
	medición 3	33.3	30.7	34.0	36.9	36.3
	promedio	33.1	30.7	34.0	36.7	36.4
3 ^{er} día	medición 1	41.7	40.8	48.6	44.7	51.7
	medición 2	41.8	40.8	48.5	44.8	51.7
	medición 3	41.9	41.0	48.7	44.6	51.7
	promedio	41.8	40.9	48.6	44.7	51.7
4 ^o día	medición 1	50.1	42.4	58.5	47.1	58.0
	medición 2	50.1	42.4	58.3	47.2	57.9
	medición 3	50.1	42.5	58.3	47.2	57.9
	promedio	50.1	42.4	58.5	47.2	57.9

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación y 30 días de almacenamiento

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	13.8	14.4	13.0	13.7	12.8
	medición 2	13.8	14.4	13.0	13.6	12.7
	medición 3	13.9	14.4	13.0	13.8	12.7
	promedio	13.8	14.4	13.0	13.7	12.7
2 ^o día	medición 1	37.1	31.7	36.4	38.5	33.6
	medición 2	37.0	31.8	36.4	38.5	33.5
	medición 3	37.0	31.7	36.5	38.6	33.6
	promedio	37.0	31.7	36.4	38.5	33.6
3 ^{er} día	medición 1	60.2	51.7	54.1	57.0	52.5
	medición 2	60.2	51.7	54.1	57.3	52.5
	medición 3	60.3	51.8	54.2	57.3	52.6
	promedio	60.3	51.7	54.1	57.2	52.5
4 ^o día	medición 1	73.0	67.5	73.0	66.0	66.8
	medición 2	73.0	67.5	73.0	66.1	66.8
	medición 3	73.0	67.7	73.0	65.9	66.8
	promedio	73.0	67.6	73.0	66.0	66.8

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación, 30 días de almacenamiento y 1 día de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	6.9	6.9	8.0	8.1	8.7
	medición 2	6.9	6.9	8.1	8.3	8.7
	medición 3	7.0	6.8	8.2	8.0	8.8
	promedio	6.9	6.9	8.1	8.1	8.7
2 ^o día	medición 1	29.5	27.7	30.4	27.2	32.0
	medición 2	29.5	27.7	30.4	27.2	31.9
	medición 3	29.5	27.8	30.1	27.3	32.0
	promedio	29.5	27.7	30.3	27.2	32.0
3 ^{er} día	medición 1	55.2	53.9	51.4	50.9	54.7
	medición 2	55.2	53.9	51.5	50.8	54.8
	medición 3	55.3	53.8	51.4	51.0	54.7
	promedio	55.2	53.9	51.4	50.9	54.7
4 ^o día	medición 1	64.5	64.5	64.1	62.8	67.2
	medición 2	64.4	64.6	64.3	62.9	67.2
	medición 3	64.3	64.8	64.2	63.0	67.3
	promedio	64.4	64.6	64.2	62.9	67.2
5 ^o día	medición 1	65.5	65.8	64.1	62.8	67.2
	medición 2	65.6	65.8	64.3	62.9	67.2
	medición 3	65.8	66.0	64.2	63.0	67.3
	promedio	65.6	65.9	64.2	62.9	67.2

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación, 30 días de almacenamiento y 2 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	7.4	11.2	9.1	9.1	9.4
	medición 2	7.4	11.3	9.1	9.2	9.4
	medición 3	7.5	11.3	9.2	9.2	9.4
	promedio	7.4	11.3	9.1	9.2	9.4
2 ^o día	medición 1	30.0	39.8	39.0	39.0	35.6
	medición 2	30.0	39.8	39.0	39.0	35.6
	medición 3	30.0	39.8	39.2	39.2	35.7
	promedio	30.0	39.8	39.1	39.1	35.6
3 ^{er} día	medición 1	46.6	58.2	51.0	51.0	50.2
	medición 2	46.8	58.2	51.0	51.0	50.2
	medición 3	46.8	58.3	51.1	51.1	50.2
	promedio	46.7	58.2	51.0	51.0	50.2
4 ^o día	medición 1	60.5	68.1	54.7	62.5	64.3
	medición 2	60.5	68.2	54.7	62.5	64.3
	medición 3	60.5	68.3	54.8	62.4	64.3
	promedio	60.5	68.2	54.7	62.5	64.3

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación, 30 días de almacenamiento y 3 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	13.9	10.6	11.2	12.0	10.4
	medición 2	13.9	10.6	11.2	12.0	10.3
	medición 3	14.0	10.6	11.2	12.0	40.3
	promedio	13.9	10.6	11.2	12.0	10.3
2 ^o día	medición 1	38.1	32.1	33.2	33.8	36.4
	medición 2	38.2	32.1	33.2	33.7	36.5
	medición 3	38.1	32.3	33.2	33.8	36.3
	promedio	38.1	32.2	33.2	33.8	36.4
3 ^{er} día	medición 1	57.6	55.3	48.5	47.4	65.6
	medición 2	57.6	55.2	48.6	47.4	65.6
	medición 3	57.6	55.3	48.7	47.5	65.7
	promedio	57.6	55.3	48.6	47.4	65.6
4 ^o día	medición 1	59.1	55.3	52.3	47.4	65.6
	medición 2	59.3	55.2	52.3	47.4	65.6
	medición 3	59.2	55.3	52.4	47.5	65.7
	promedio	59.2	55.3	52.3	47.4	65.6

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación y 60 días de almacenamiento

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	4.3	4.7	4.1	4.5	4.4
	medición 2	4.4	4.9	4.3	4.6	4.3
	medición 3	4.4	4.8	4.2	4.6	4.3
	promedio	4.4	4.8	4.2	4.6	4.3
2 ^o día	medición 1	12.8	14.5	15.7	18.1	16.2
	medición 2	12.8	14.6	15.6	17.9	16.3
	medición 3	12.8	14.5	15.6	18.0	16.2
	promedio	12.8	14.5	15.6	18.0	16.2
3 ^{er} día	medición 1	36.8	42.5	40.2	42.9	41.2
	medición 2	36.6	42.5	40.1	43.0	41.3
	medición 3	36.7	42.5	40.1	43.0	41.3
	promedio	36.7	42.5	40.1	43.0	41.3
4 ^o día	medición 1	55.0	58.7	58.3	62.6	63.6
	medición 2	55.1	58.7	58.1	62.6	63.5
	medición 3	55.0	58.7	58.2	62.6	63.6
	promedio	55.0	58.7	58.2	62.6	63.6
5 ^o día	medición 1	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 2	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 3	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	promedio	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación, 60 días de almacenamiento y 1 día de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	8.6	7.7	6.9	7.4	8.2
	medición 2	8.7	7.6	6.9	7.3	8.5
	medición 3	8.8	7.7	6.9	7.5	8.4
	promedio	8.7	7.7	6.9	7.4	8.4
2 ^o día	medición 1	27.5	26.7	21.8	23.2	27.0
	medición 2	27.4	26.8	21.9	23.4	26.9
	medición 3	27.5	26.7	21.8	23.2	26.8
	promedio	27.5	26.7	21.8	23.3	26.9
3 ^{er} día	medición 1	46.4	49.2	41.7	43.2	45.7
	medición 2	46.6	49.2	41.9	43.2	45.7
	medición 3	46.5	49.2	41.9	43.4	45.8
	promedio	46.5	49.2	41.8	43.3	45.7
4 ^o día	medición 1	62.9	63.2	59.6	60.4	61.1
	medición 2	63.0	63.2	59.4	60.5	61.2
	medición 3	63.0	63.5	59.4	60.6	61.1
	promedio	63.0	63.3	59.5	60.5	61.1
5 ^o día	medición 1	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 2	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 3	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	promedio	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación, 60 días de almacenamiento y 2 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	7.4	8.2	9.2	8.4	8.7
	medición 2	7.5	8.2	9.3	8.4	8.5
	medición 3	7.6	8.2	9.4	8.4	8.6
	promedio	7.5	8.2	9.3	8.4	8.6
2 ^o día	medición 1	29.2	26.2	28.7	27.1	26.9
	medición 2	29.1	26.1	28.8	27.1	27.0
	medición 3	29.1	26.1	28.7	27.1	26.7
	promedio	29.1	26.1	28.7	27.1	26.7
3 ^{er} día	medición 1	50.6	47.3	44.7	47.1	49.2
	medición 2	50.8	47.2	44.7	47.1	49.2
	medición 3	50.7	47.2	44.7	47.1	49.3
	promedio	50.7	47.2	44.7	47.1	49.2
4 ^o día	medición 1	65.0	64.7	63.2	60.3	61.7
	medición 2	65.1	64.8	63.0	60.3	61.5
	medición 3	65.0	64.6	63.1	60.3	61.6
	promedio	65.0	64.7	63.1	60.3	61.6
5 ^o día	medición 1	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 2	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 3	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	promedio	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 24 h de deshidratación, 60 días de almacenamiento y 3 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	8.2	9.8	9.2	9.1	10.7
	medición 2	8.3	9.8	9.3	9.2	10.7
	medición 3	8.2	9.9	9.2	9.1	10.7
	promedio	8.2	9.8	9.2	9.1	10.7
2 ^o día	medición 1	32.1	32.6	48.1	32.0	30.5
	medición 2	32.0	32.7	48.2	32.1	30.5
	medición 3	32.0	32.7	48.1	32.2	30.5
	promedio	32.0	32.7	48.1	32.1	30.5
3 ^{er} día	medición 1	49.2	49.6	48.1	48.7	47.8
	medición 2	49.2	49.5	48.2	48.8	47.7
	medición 3	49.1	49.5	48.1	48.9	47.7
	promedio	49.2	49.5	48.1	48.8	47.7
4 ^o día	medición 1	62.5	63.0	63.4	64.3	62.9
	medición 2	62.5	63.1	63.2	64.4	62.7
	medición 3	62.7	63.0	63.3	64.3	62.8
	promedio	62.6	63.0	63.3	64.3	62.8
5 ^o día	medición 1	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 2	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 3	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	promedio	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	10.0	8.9	9.0	7.8	8.5
	medición 2	10.0	8.9	9.2	7.7	8.5
	medición 3	9.7	9.0	9.2	7.8	8.6
	promedio	9.9	8.9	9.1	7.8	8.5
2 ^o día	medición 1	34.7	36.6	34.4	24.4	34.4
	medición 2	34.7	36.6	34.5	24.5	34.2
	medición 3	34.8	36.5	34.3	24.5	34.2
	promedio	34.7	36.6	34.4	24.5	34.3
3 ^{er} día	medición 1	50.3	51.5	48.9	46.3	51.7
	medición 2	50.3	51.6	48.9	46.3	57.7
	medición 3	50.4	51.5	48.9	46.2	51.8
	promedio	50.3	51.5	48.9	46.3	51.7
4 ^o día	medición 1	58.0	56.7	54.9	53.8	59.7
	medición 2	58.1	56.5	54.9	53.6	59.5
	medición 3	58.1	56.7	55.1	53.6	59.5
	promedio	58.1	56.6	55.0	53.7	59.6
5 ^o día	medición 1	58.0	56.7	54.9	59.7	60.9
	medición 2	58.1	56.5	54.9	59.8	60.8
	medición 3	58.1	56.7	55.1	59.6	60.9
	promedio	58.1	56.6	55.0	59.7	60.9

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 1 día de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	7.3	9.4	8.8	8.3	8.5
	medición 2	7.3	9.4	8.9	8.3	8.5
	medición 3	7.4	9.1	9.0	8.3	8.4
	promedio	7.3	9.3	8.9	8.3	8.5
2 ^o día	medición 1	26.8	37.1	36.7	29.9	28.5
	medición 2	26.8	37.1	36.8	30.2	28.3
	medición 3	26.5	37.0	36.7	30.0	28.5
	promedio	26.7	37.1	36.7	30.0	28.4
3 ^{er} día	medición 1	45.0	50.3	46.7	44.4	40.1
	medición 2	45.0	50.3	46.5	44.4	40.2
	medición 3	45.1	50.3	46.8	44.4	39.9
	promedio	45.0	50.3	46.7	44.4	40.1
4 ^o día	medición 1	53.8	57.4	51.1	53.0	49.7
	medición 2	53.7	57.3	51.0	53.2	49.8
	medición 3	53.8	57.3	51.3	53.3	49.9
	promedio	53.8	57.3	51.1	53.2	49.8
5 ^o día	medición 1	57.7	58.9	51.8	57.5	55.0
	medición 2	57.7	58.9	51.8	57.3	55.1
	medición 3	57.7	59.0	51.7	57.3	55.0
	promedio	57.7	58.9	51.8	57.4	55.0
6 ^o día	medición 1	59.7	58.9	51.8	59.1	59.8
	medición 2	59.7	58.9	51.8	59.1	59.9
	medición 3	60.0	59.0	51.7	59.1	60.1
	promedio	59.8	58.9	51.8	59.1	59.9

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 2 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	10.5	13.0	13.0	12.5	14.2
	medición 2	10.6	13.0	13.0	12.5	14.2
	medición 3	10.7	13.0	13.2	12.6	14.2
	promedio	10.6	13.0	13.1	12.5	14.2
2 ^o día	medición 1	27.8	32.4	33.0	33.5	34.0
	medición 2	27.8	32.4	33.1	33.7	34.1
	medición 3	27.6	32.5	33.0	33.8	34.0
	promedio	27.8	32.4	33.0	33.7	34.0
3 ^{er} día	medición 1	39.1	42.7	44.5	44.0	43.9
	medición 2	39.1	42.8	44.3	44.0	43.8
	medición 3	39.1	42.7	44.2	43.9	43.6
	promedio	39.1	42.7	44.3	44.0	43.8
4 ^o día	medición 1	46.7	46.4	49.7	51.2	48.6
	medición 2	46.7	46.5	49.7	51.3	48.6
	medición 3	46.4	46.3	49.8	51.2	48.7
	promedio	46.6	46.4	49.7	51.2	48.6
5 ^o día	medición 1	51.5	47.7	52.3	52.8	50.9
	medición 2	51.5	47.7	52.2	52.8	50.8
	medición 3	51.6	47.8	52.4	52.9	50.9
	promedio	51.5	47.7	52.3	52.8	50.9
6 ^o día	medición 1	52.9	48.4	54.1	53.0	51.6
	medición 2	52.9	48.4	54.2	53.0	51.5
	medición 3	53.0	48.4	54.4	53.1	51.7
	promedio	52.9	48.4	54.2	53.0	51.6

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 3 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	8.0	8.0	7.6	11.4	10.1
	medición 2	7.9	8.2	7.7	11.5	10.3
	medición 3	8.0	8.3	7.8	11.5	10.4
	promedio	8.0	8.2	7.7	11.5	10.3
2 ^o día	medición 1	20.7	20.3	19.0	26.5	26.6
	medición 2	20.8	20.5	19.0	26.5	26.9
	medición 3	20.6	20.6	19.0	26.8	26.6
	promedio	20.7	20.5	19.0	26.6	26.7
3 ^{er} día	medición 1	36.6	37.7	35.6	37.0	39.4
	medición 2	36.4	37.7	35.6	37.0	39.3
	medición 3	36.4	37.7	35.6	37.1	39.4
	promedio	36.5	37.7	35.6	37.0	39.4
4 ^o día	medición 1	44.4	45.8	44.4	40.2	44.6
	medición 2	44.4	45.6	44.6	40.2	44.7
	medición 3	44.4	45.6	44.7	40.3	44.8
	promedio	44.4	45.7	44.6	40.2	44.7
5 ^o día	medición 1	49.1	50.9	48.7	40.2	45.5
	medición 2	49.1	50.9	48.8	40.2	45.5
	medición 3	49.1	51.0	48.9	40.3	45.6
	promedio	49.1	50.9	48.8	40.2	45.5

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 15 días de almacenamiento

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	10.5	10.6	9.6	10.0	8.7
	medición 2	10.7	10.6	9.6	10.1	8.8
	medición 3	10.8	10.7	9.7	10.2	9.0
	promedio	10.7	10.6	9.6	10.1	8.8
2 ^o día	medición 1	42.6	40.4	39.3	40.4	33.7
	medición 2	42.6	40.4	39.3	40.4	33.8
	medición 3	42.7	40.1	39.5	40.4	33.9
	promedio	42.6	40.3	39.4	40.4	33.8
3 ^{er} día	medición 1	63.3	57.7	60.1	60.4	52.5
	medición 2	63.3	57.8	60.1	60.5	52.5
	medición 3	63.4	58.0	60.2	60.6	52.5
	promedio	63.3	57.8	60.1	60.5	52.5
4 ^o día	medición 1	71.6	64.5	68.2	66.2	62.2
	medición 2	71.6	64.6	68.2	66.4	62.2
	medición 3	71.6	64.7	68.3	66.3	62.3
	promedio	71.6	64.6	68.2	66.3	62.2

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación, 15 días de almacenamiento y 1 día de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	11.9	10.5	10.7	8.9	8.0
	medición 2	11.9	10.6	10.8	8.9	8.1
	medición 3	12.1	10.7	10.8	9.0	8.2
	promedio	12.0	10.6	10.8	8.9	8.1
2 ^o día	medición 1	41.3	42.3	42.8	39.6	35.3
	medición 2	41.5	42.4	42.9	39.4	35.3
	medición 3	41.4	42.4	43.1	39.7	35.4
	promedio	41.4	42.4	42.9	39.6	35.3
3 ^{er} día	medición 1	57.7	59.2	59.7	54.0	49.1
	medición 2	57.7	59.2	59.7	53.9	49.2
	medición 3	57.7	59.2	59.8	54.1	49.3
	promedio	57.7	59.2	59.7	54.0	49.2
4 ^o día	medición 1	65.1	64.4	64.6	55.4	61.3
	medición 2	65.1	64.4	64.7	55.4	61.4
	medición 3	65.2	64.5	64.8	55.4	61.5
	promedio	65.1	64.4	64.8	55.4	61.4

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación, 15 días de almacenamiento y 2 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	8.9	9.2	10.4	9.6	8.8
	medición 2	8.9	9.2	10.4	9.6	8.9
	medición 3	9.0	9.3	10.5	9.9	8.8
	promedio	8.9	9.2	10.4	9.7	8.8
2 ^o día	medición 1	30.2	33.4	37.2	32.5	33.2
	medición 2	30.2	33.4	37.2	32.6	33.2
	medición 3	30.2	33.5	37.3	32.6	33.3
	promedio	30.2	33.4	37.2	32.6	33.2
3 ^{er} día	medición 1	46.1	45.4	51.4	52.6	45.5
	medición 2	46.1	45.4	51.4	52.6	45.6
	medición 3	46.2	45.3	51.5	52.4	45.7
	promedio	46.1	45.4	51.4	52.5	45.6
4 ^o día	medición 1	49.2	46.1	55.8	57.3	50.1
	medición 2	49.2	46.2	55.7	57.4	50.2
	medición 3	49.2	46.2	55.7	57.5	50.1
	promedio	49.2	46.2	55.7	57.4	50.1

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación, 15 días de almacenamiento y 3 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	9.7	11.3	10.7	6.8	6.9
	medición 2	9.8	11.4	10.7	6.8	7.0
	medición 3	9.7	11.3	10.8	6.9	7.1
	promedio	9.7	11.3	10.7	6.8	7.0
2 ^o día	medición 1	39.1	34.6	33.3	31.0	33.0
	medición 2	39.1	34.6	33.3	31.0	33.3
	medición 3	39.3	34.6	33.3	31.1	33.2
	promedio	39.2	34.6	33.3	31.0	33.2
3 ^{er} día	medición 1	51.3	51.7	42.9	42.9	43.4
	medición 2	51.4	51.7	43.0	42.9	43.6
	medición 3	51.3	51.7	43.1	42.9	43.7
	promedio	51.3	51.7	43.0	42.9	43.6
4 ^o día	medición 1	58.4	54.4	46.5	43.5	47.7
	medición 2	58.4	54.5	46.6	43.5	47.8
	medición 3	58.3	54.6	46.7	43.6	48.0
	promedio	58.4	54.5	46.6	43.5	47.8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 30 días de almacenamiento

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	14.9	10.8	12.5	12.3	14.7
	medición 2	15.0	10.8	12.6	12.3	14.7
	medición 3	15.1	10.9	12.7	12.4	14.7
	promedio	15.0	10.8	12.6	12.3	14.7
2 ^o día	medición 1	34.5	28.5	33.9	32.8	33.6
	medición 2	34.5	28.4	44.0	32.8	33.7
	medición 3	34.5	28.3	44.0	32.8	33.6
	promedio	34.5	28.4	44.0	32.8	33.6
3 ^{er} día	medición 1	54.5	47.4	50.9	51.0	51.5
	medición 2	54.5	47.5	51.0	51.0	51.4
	medición 3	54.6	47.4	51.0	51.1	51.3
	promedio	54.5	47.4	51.0	51.0	51.4
4 ^o día	medición 1	68.7	64.6	65.1	66.0	64.1
	medición 2	68.7	64.5	65.2	66.0	64.2
	medición 3	68.8	64.4	65.2	66.0	64.3
	promedio	68.7	64.5	65.2	66.0	64.2

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 30 días de almacenamiento y 1 día de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	6.1	8.4	7.1	6.7	8.1
	medición 2	6.1	8.6	7.1	6.8	8.2
	medición 3	6.2	8.6	7.2	6.9	8.3
	promedio	6.1	8.5	7.1	6.8	8.2
2 ^o día	medición 1	25.4	27.0	26.2	28.8	28.9
	medición 2	25.5	27.1	26.2	28.8	29.0
	medición 3	25.6	27.1	26.2	28.8	29.1
	promedio	25.5	27.1	26.2	28.8	29.0
3 ^{er} día	medición 1	47.0	52.7	52.4	53.1	52.2
	medición 2	47.0	52.8	52.4	53.2	52.4
	medición 3	47.5	53.0	52.6	53.3	52.4
	promedio	47.2	52.8	52.5	53.2	52.3
4 ^o día	medición 1	58.7	64.3	64.9	64.1	62.4
	medición 2	58.6	64.3	65.0	64.1	62.6
	medición 3	58.5	64.4	65.0	64.2	62.6
	promedio	58.6	64.3	65.0	64.1	62.5
5 ^o día	medición 1	64.3	66.3	64.9	65.1	66.6
	medición 2	64.3	66.3	65.0	65.1	66.7
	medición 3	64.3	66.3	65.0	65.1	66.8
	promedio	64.3	66.3	65.0	65.1	66.7

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 30 días de almacenamiento y 2 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	12.4	8.3	6.9	7.9	9.4
	medición 2	12.4	8.3	6.9	7.9	9.4
	medición 3	12.1	8.4	7.0	8.0	9.5
	promedio	12.3	8.3	6.9	7.9	9.4
2 ^o día	medición 1	41.8	35.1	31.5	31.8	41.3
	medición 2	41.9	35.1	31.4	31.8	41.4
	medición 3	42.0	35.0	31.3	31.8	41.3
	promedio	41.9	35.1	31.4	31.8	41.3
3 ^{er} día	medición 1	53.9	48.3	49.0	50.0	55.6
	medición 2	53.8	48.4	49.0	50.0	55.6
	medición 3	53.7	48.5	49.2	50.0	55.6
	promedio	53.8	48.4	49.1	50.0	55.6
4 ^o día	medición 1	57.7	49.9	67.3	65.5	63.4
	medición 2	57.8	49.9	67.4	65.6	63.5
	medición 3	57.7	49.6	67.6	65.5	63.7
	promedio	57.7	49.8	67.4	65.5	63.5

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 30 días de almacenamiento y 3 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	11.9	10.1	12.0	12.4	12.1
	medición 2	11.9	10.1	12.0	12.4	12.1
	medición 3	12.2	10.2	12.1	12.4	12.1
	promedio	12.0	10.1	12.0	12.4	12.1
2 ^o día	medición 1	34.6	31.7	35.3	36.1	34.6
	medición 2	34.7	31.7	35.3	36.0	34.6
	medición 3	34.8	31.8	35.3	36.1	34.7
	promedio	34.7	31.7	35.3	36.1	34.6
3 ^{er} día	medición 1	57.7	52.5	51.6	50.5	48.9
	medición 2	57.8	52.6	51.7	50.6	48.9
	medición 3	57.9	52.7	51.8	50.5	48.9
	promedio	57.8	52.6	51.7	50.5	48.9
4 ^o día	medición 1	69.0	56.7	59.3	57.7	51.6
	medición 2	69.0	56.8	59.4	57.8	51.6
	medición 3	69.0	56.9	59.5	57.7	51.7
	promedio	69.0	56.8	59.4	57.7	51.6
5 ^o día	medición 1	69.0	57.3	61.8	57.7	51.6
	medición 2	69.0	57.3	61.8	57.8	51.6
	medición 3	69.0	57.6	61.8	57.7	51.7
	promedio	69.0	57.4	61.8	57.7	51.6

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 60 días de almacenamiento

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	5.3	5.2	5.5	5.0	5.0
	medición 2	5.2	5.2	5.5	5.1	5.0
	medición 3	5.3	5.3	5.6	5.2	5.0
	promedio	5.3	5.2	5.5	5.1	5.0
2 ^o día	medición 1	19.8	23.6	18.5	18.0	13.9
	medición 2	20.0	23.6	18.6	18.1	14.0
	medición 3	19.9	23.7	18.7	18.2	14.0
	promedio	19.9	23.6	18.6	18.1	14.0
3 ^{er} día	medición 1	44.4	50.6	42.6	44.8	42.9
	medición 2	44.5	50.6	42.5	44.9	42.9
	medición 3	44.3	50.6	42.8	45.0	43.0
	promedio	44.4	50.6	42.6	44.9	42.9
4 ^o día	medición 1	63.0	67.1	61.8	64.9	63.2
	medición 2	63.0	67.2	61.9	65.0	63.4
	medición 3	63.1	67.3	62.0	65.1	63.5
	promedio	63.0	67.2	61.9	65.0	63.4
5 ^o día	medición 1	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 2	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	medición 3	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0
	promedio	69.0	69.0	69.0	69.0	69.0

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 60 días de almacenamiento y 1 día de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	6.8	6.0	6.7	6.7	6.3
	medición 2	7.1	6.1	6.7	6.7	6.4
	medición 3	7.1	6.2	6.8	6.5	6.5
	promedio	6.9	6.1	6.7	6.6	6.4
2 ^o día	medición 1	24.7	28.6	23.3	24.8	21.4
	medición 2	24.7	28.6	23.4	24.8	21.4
	medición 3	24.7	28.6	23.3	24.8	21.4
	promedio	24.7	28.6	23.3	24.8	21.4
3 ^{er} día	medición 1	47.3	47.9	43.3	47.1	43.5
	medición 2	47.4	47.9	43.0	47.1	43.5
	medición 3	47.4	47.9	43.2	47.2	43.5
	promedio	47.4	47.9	43.2	47.1	43.5
4 ^o día	medición 1	64.8	62.8	61.4	64.8	62.4
	medición 2	64.8	62.8	61.3	64.9	62.4
	medición 3	64.8	63.0	61.4	64.7	62.5
	promedio	64.8	62.9	61.4	64.8	62.4
5 ^o día	medición 1	69.9	69.9	69.9	69.9	69.9
	medición 2	69.9	69.9	69.9	69.9	69.9
	medición 3	69.9	69.9	69.9	69.9	69.9
	promedio	69.9	69.9	69.9	69.9	69.9

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 60 días de almacenamiento y 2 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	9.7	9.2	9.5	9.5	10.7
	medición 2	9.7	9.1	9.6	9.5	10.5
	medición 3	9.6	9.2	9.6	9.5	10.6
	promedio	9.7	9.2	9.6	9.5	10.6
2 ^o día	medición 1	32.1	31.9	30.5	29.2	32.6
	medición 2	32.1	32.0	30.7	29.1	32.5
	medición 3	32.3	31.9	30.5	29.2	32.6
	promedio	32.2	31.9	30.6	29.2	32.6
3 ^{er} día	medición 1	51.7	50.7	51.3	49.5	52.0
	medición 2	51.8	50.6	51.2	49.6	52.3
	medición 3	51.7	50.8	51.1	49.3	52.2
	promedio	51.7	50.7	51.2	49.5	52.2
4 ^o día	medición 1	60.2	59.5	64.6	64.9	64.4
	medición 2	60.3	59.6	64.5	65.0	64.3
	medición 3	60.2	59.5	64.5	65.0	64.4
	promedio	60.2	59.5	64.5	65.0	64.4
5 ^o día	medición 1	62.2	63.3	69.9	69.9	69.9
	medición 2	62.2	63.2	69.9	69.9	69.9
	medición 3	62.2	63.3	69.9	69.9	69.9
	promedio	62.2	63.3	69.9	69.9	69.9
6 ^o día	medición 1	62.6	64.4	69.9	69.9	69.9
	medición 2	62.6	64.5	69.9	69.9	69.9
	medición 3	62.7	64.4	69.9	69.9	69.9
	promedio	62.6	64.4	69.9	69.9	69.9

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 36 h de deshidratación y 60 días de almacenamiento y 3 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	10.1	11.2	11.4	9.5	10.7
	medición 2	9.9	11.1	11.5	9.2	10.7
	medición 3	10.1	11.2	11.5	9.2	10.6
	promedio	10	11.2	11.5	9.3	10.7
2 ^o día	medición 1	36	37.4	38.1	35.3	37.0
	medición 2	36	37.5	38.2	35.3	37.1
	medición 3	36.1	37.6	38.2	35.3	37.0
	promedio	36	37.5	38.2	35.3	37.0
3 ^{er} día	medición 1	59.2	61.1	61.6	58.0	60.4
	medición 2	59.3	61.0	61.6	58.0	60.3
	medición 3	59.3	61.1	61.6	58.1	60.4
	promedio	59.3	61.1	61.6	58.0	60.4
4 ^o día	medición 1	65.8	67.3	65.9	64.2	66.7
	medición 2	65.7	67.3	66.0	64.2	66.8
	medición 3	65.8	67.3	66.1	64.1	66.6
	promedio	65.8	67.3	66.0	64.2	66.7
5 ^o día	medición 1	66.5	68.3	67.6	65.8	66.8
	medición 2	66.4	68.3	67.5	65.8	66.7
	medición 3	66.5	68.4	67.7	65.7	66.8
	promedio	66.5	68.3	67.6	65.8	66.8
6 ^o día	medición 1	66.5	68.3	67.6	65.8	66.8
	medición 2	66.4	68.3	67.5	65.8	66.7
	medición 3	66.5	68.4	67.7	65.7	66.8
	promedio	66.5	68.3	67.6	65.8	66.8

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 48 h de deshidratación

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	9.1	6.7	8.4	8.0	7.9
	medición 2	9.1	6.7	8.5	8.1	7.9
	medición 3	9.2	6.7	8.4	7.9	8.1
	promedio	9.1	6.7	8.4	8.0	8.0
2 ^o día	medición 1	41.9	34.7	43.8	34.8	35.6
	medición 2	41.7	34.5	43.7	35.0	35.6
	medición 3	41.8	34.8	43.5	35.1	35.3
	promedio	41.8	34.7	43.7	35.0	35.5
3 ^{er} día	medición 1	50.6	47.5	55.2	48.0	48.3
	medición 2	50.7	47.5	55.1	48.1	48.5
	medición 3	50.6	47.2	55.1	48.1	48.3
	promedio	50.6	47.4	55.1	48.1	48.4
4 ^o día	medición 1	53.2	52.8	58.6	54.7	55.4
	medición 2	53.2	52.9	58.6	54.7	55.5
	medición 3	53.2	52.6	58.6	54.7	55.4
	promedio	53.2	52.8	58.6	54.7	55.4
5 ^o día	medición 1	53.9	57.7	59.3	56.5	59.1
	medición 2	53.8	57.7	59.6	56.7	59.1
	medición 3	54.0	57.8	59.6	56.5	59.1
	promedio	53.9	57.7	59.5	56.6	59.1
6 ^o día	medición 1	54.4	58.6	59.3	56.9	59.1
	medición 2	54.4	58.8	59.6	57.0	59.1
	medición 3	54.4	58.8	59.6	57.0	59.1
	promedio	54.4	58.7	59.5	57.0	59.1

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 48 h de deshidratación y 1 día de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	11.0	9.6	7.8	7.7	10.4
	medición 2	11.0	9.6	7.8	7.6	10.4
	medición 3	11.1	9.6	7.6	7.8	10.5
	promedio	11.0	9.6	7.7	7.7	10.4
2 ^o día	medición 1	29.1	29.5	21.6	23.4	29.1
	medición 2	29.1	29.5	21.6	23.4	29.1
	medición 3	29.3	29.5	21.7	23.5	29.2
	promedio	29.2	29.5	21.6	23.4	29.1
3 ^{er} día	medición 1	41.2	41.3	36.2	36.8	44.6
	medición 2	41.2	41.3	36.2	36.8	44.6
	medición 3	41.3	41.4	35.9	36.8	44.6
	promedio	41.2	41.3	36.1	36.8	44.6
4 ^o día	medición 1	48.5	48.4	45.6	46.4	52.0
	medición 2	48.6	48.5	45.6	46.4	52.1
	medición 3	48.6	48.4	45.6	46.4	52.0
	promedio	48.6	48.4	45.6	46.4	52.0
5 ^o día	medición 1	53.6	52.6	52.4	51.9	57.4
	medición 2	53.6	52.6	52.4	51.9	57.5
	medición 3	53.9	52.6	52.5	52.0	57.3
	promedio	53.7	52.6	52.4	51.9	57.4
6 ^o día	medición 1	53.8	54.0	55.3	54.4	58.8
	medición 2	53.8	54.2	55.2	54.4	58.8
	medición 3	53.8	54.3	55.5	54.5	58.8
	promedio	53.8	54.2	55.3	54.4	58.8

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 48 h de deshidratación y 2 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	13.5	13.7	11.0	7.4	7.1
	medición 2	13.5	13.8	11.0	7.4	7.1
	medición 3	13.8	13.9	11.3	7.5	7.2
	promedio	13.6	13.8	11.1	7.4	7.1
2 ^o día	medición 1	33.0	35.0	30.1	21.0	22.4
	medición 2	33.2	35.1	30.3	21.0	22.4
	medición 3	33.3	35.2	30.3	21.2	22.5
	promedio	33.2	35.1	30.2	21.1	22.4
3 ^{er} día	medición 1	44.1	48.1	44.0	34.2	35.0
	medición 2	44.1	48.2	44.2	34.2	35.1
	medición 3	44.2	48.3	44.3	34.2	35.3
	promedio	44.1	48.2	44.2	34.2	35.1
4 ^o día	medición 1	48.0	56.3	50.2	44.2	43.8
	medición 2	48.1	56.3	50.2	44.2	43.9
	medición 3	48.3	56.3	50.2	44.3	44.0
	promedio	48.1	56.3	50.2	44.2	43.9
5 ^o día	medición 1	49.8	58.9	52.1	50.9	51.1
	medición 2	49.9	58.9	52.0	51.0	51.2
	medición 3	50.0	58.9	52.1	51.2	51.3
	promedio	49.9	58.9	52.1	51.0	51.2
6 ^o día	medición 1	50.8	58.9	52.1	52.3	52.2
	medición 2	50.9	58.9	52.0	52.3	52.2
	medición 3	50.9	58.9	52.1	52.3	52.3
	promedio	50.9	58.9	52.1	52.3	52.2

(Continúa)

Continuación Anexo 8

Avance diario de *R. solani* frente a las bacterias en cápsulas de 48 h de deshidratación y 3 días de “ventaja”

Días	Mediciones	Repeticiones				
		A	B	C	D	E
1 ^{er} día	medición 1	7.5	14.1	9.3	9.0	7.2
	medición 2	7.5	14.0	9.3	9.0	7.2
	medición 3	7.5	13.8	9.4	9.1	7.2
	promedio	7.5	14.0	9.3	9.0	7.2
2 ^o día	medición 1	22.7	32.5	28.4	26.3	21.5
	medición 2	22.8	32.5	28.4	26.3	21.5
	medición 3	22.5	32.6	28.1	26.4	21.5
	promedio	22.7	32.5	28.3	26.3	21.5
3 ^{er} día	medición 1	33.2	41.9	37.9	35.4	31.5
	medición 2	33.3	41.9	38.0	35.7	31.8
	medición 3	33.4	41.9	37.9	35.7	31.5
	promedio	33.3	41.9	37.9	35.6	31.6
4 ^o día	medición 1	38.8	46.2	43.9	41.5	40.3
	medición 2	38.9	46.2	44.0	41.5	40.3
	medición 3	39.0	46.3	44.1	41.6	40.4
	promedio	38.9	46.2	44.0	41.5	40.3
5 ^o día	medición 1	39.8	48.3	45.0	43.1	44.8
	medición 2	39.9	48.3	45.0	43.2	44.9
	medición 3	40.0	48.3	45.0	43.2	45.0
	promedio	39.9	48.3	45.0	43.2	44.9