

Aporte de Microorganismos Benéficos por la Incorporación al Suelo de Residuos Deshidratados de Col (*Brassica oleracea* var *capitata*) y su Efecto en el pH

Contribution of Beneficial Microorganisms While Added to the Dried Cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata*) Residues and its Effect on pH Soil

Karla Alejandra Rodríguez Millán, Clara Teresa Monreal Vargas, Jesús Huerta Díaz, José Carmen Soria Colunga y Ramón Jarquín Gálvez, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, km 14.5 Carr. San Luis-Matehuala, Apdo. Postal 32., Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, CP 78321, México. Correspondencia: clara.monreal@uaslp.mx

(Recibido: Marzo 05, 2013 Aceptado: Mayo 23, 2013)

Rodríguez Millán KA, Monreal Vargas CT, Huerta Díaz J, Soria Colunga JC y Jarquín Gálvez R. 2013. Aporte de microorganismos benéficos por la incorporación al suelo de residuos deshidratados de col (*Brassica oleracea* var *capitata*) y su efecto en el pH. Revista Mexicana de Fitopatología 31:29-44.

Resumen. Se plantea que los residuos deshidratados de col aportan microorganismos antagonistas hacia fitopatógenos y modifican el PH del suelo. Se utilizaron residuos de col deshidratados al sol, envasados y preservados en un ambiente seco, por dos y cinco años. Éstos se analizaron microbiológicamente, se evaluó su efecto sobre el pH de un suelo estéril durante 30 d, y se estableció el tipo y número de microorganismos que pueden incorporar. También se determinó su efecto sobre el pH, características físicas, químicas y biológicas, en cinco suelos sin esterilizar, durante 51 d. En los residuos predominaron *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp. y *Penicillium* sp. *In vitro*, *Bacillus* y *Pseudomonas* mostraron antibiosis contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersi*. *Trichoderma* y *Bacillus* fueron micoparásitos de estos hongos respectivamente. En el suelo estéril, los residuos incrementaron el pH de 7.57 a 8.79; y favorecieron el desarrollo de bacterias (160×10^7 ufc g⁻¹ de suelo), principalmente de *Bacillus* y *Pseudomonas*. En cuatro de los suelos no estériles, el pH siempre fue significativamente ($P \leq 0.05$) menor al testigo y varió dinámicamente entre 7.33 y 8.24; se incrementó el contenido de nitrógeno asimilable, potasio, bacterias g⁻¹ de suelo; se incorporaron *Bacillus* y *Pseudomonas*; y se promovió el desarrollo de *Penicillium*.

Palabras clave adicionales: Modificadores orgánicos de suelos, microorganismos antagonistas, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*.

Abstract. It is suggested that cabbage dry residues provide antagonist microorganisms to plant pathogens and they modify the pH of the soil. We used cabbage sun-dried residues, packaged and preserved in a dry environment for two and five years. They were analyzed microbiologically, and their effect on the pH of a sterile soil for 30 d, and the type and number of microorganisms they can incorporate were studied. We also determined its effect on pH, the physical, chemical and biological characteristics in five unsterilized soils for 51 d. In the residues, the *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp. and *Penicillium* sp. predominated. *In vitro*, *Bacillus* and *Pseudomonas* showed antibiosis against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersi*. *Trichoderma* and *Bacillus* were mycoparasites of these fungi respectively. In sterile soil, residues increased the pH from 7.57 to 8.79, and favored the development of bacteria (160×10^7 ufc g⁻¹ soil), mainly from *Bacillus* and *Pseudomonas*. In four of the non-sterile soils, the pH was always significantly ($P \leq 0.05$) lower than the control and ranged dynamically between 7.33 and 8.24; the content of assimilable nitrogen, potassium, and the bacteria g⁻¹ in soil were increased; *Bacillus* and *Pseudomonas* were incorporated; and the development of *Penicillium* was promoted.

Additional keywords: organic soil amendments, antagonistic microorganisms, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*.

The soilborne plant pathogens (SPP) cause diseases in economically important crops that originate production losses. Various strategies have been developed for management these microorganisms, such as biological control and production of soils with biological, chemical and physical characteristics against pathogens through incorporation of organic residues (Cook and Baker, 1983).

Los fitopatógenos habitantes del suelo (FHS) ocasionan enfermedades en cultivos de importancia económica que originan pérdidas en la producción. Se han desarrollado diversas estrategias para el manejo de estos microorganismos, como el control biológico y la generación de suelos con características biológicas, químicas y físicas adversas a los patógenos, a través de la incorporación de residuos orgánicos (Cook y Baker, 1983). Los residuos orgánicos más utilizados por sus propiedades biodesinfectantes (antao biofumigantes) son los de crucíferas, lo cual se debe a que los tejidos de estas plantas contienen una elevada cantidad de compuestos azufrados denominados glucosinolatos (Kriegaard y Sarwar, 1998). La enzima glucosinolasa tioglucósido (mirosinasa) hidroliza a estos compuestos y los transforma en los compuestos volátiles tóxicos isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos, tio-oxazolidinas y eptionitrilos; dependiendo de la especie de crucífera (Brown y Morra, 2005). En los tejidos intactos la enzima se encuentra asociada a la membrana de la célula y separada de los glucosinolatos; y sólo actúa cuando los tejidos vegetales sufren una autólisis o cuando se fermentan. Los residuos se pueden incorporar frescos o secos, siempre que se evite el daño e hidrólisis endógena por la mirosinasa, antes de ser aplicados. Los residuos de col son una buena opción para el manejo de FHS debido a que su acción biocida o biostática no se debe únicamente a los glucosinolatos, sino también a otros compuestos tóxicos como amoníaco, nitratos, ácido nítrico, ácido sulfhídrico, ácidos orgánicos, enzimas proteolíticas y quitinolíticas; que los microorganismos generan durante la descomposición de la materia orgánica que los constituye, además de aumentar la población de microorganismos con características antagonistas a los FHS (Lazarovits *et al.*, 2005). En diversos estudios se ha comprobado que los residuos deshidratados de la col (RDC) preservan sus propiedades biodesinfectantes y pueden suprimir hongos patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Aphanomyces eutiches*, *Thielaviopsis basicola*, *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, entre otros (Hoitink y Boehm, 1999; Lazzeri *et al.*, 2004). Las investigaciones sobre diversas especies de crucíferas se han centrado en determinar el tipo y concentración de glucosinolatos que poseen (Mayton *et al.*, 1996; Smolinska *et al.*, 1997; Kirkegaard y Sarwar, 1998; Matthiessen y Shackleton, 2005), en el efecto variable que tienen los compuestos volátiles tiocianatos e isotiocianatos sobre los FHS, que va desde disminuir el número de propágulos y la severidad de diversas enfermedades, hasta un efecto nulo (Muehlchen *et al.*, 1990; Mojtahedi *et al.*, 1991; Zasada *et al.*, 2003; Snapp *et al.*, 2007; Njoroge *et al.*, 2008); en evaluar el efecto de los residuos frescos y deshidratados, solos y en combinación con solarización (Ramírez-Villapudua y Munnecke, 1987; Ramírez-Villapudua y Munnecke, 1988; Gamliel y Stapleton, 1993; Coelho *et al.*, 1999); y en establecer los factores que favorecen la biodesinfección y la vida media de los tiocianatos e isotiocianatos en el suelo, la cual no es mayor a 12 días (Brown *et al.*, 1991; Brown y Morra, 1997; Gardiner *et al.*, 1999; Morra y Kirkegaard, 2002; Gimsing y Kirkegaard,

Most used organic residues - because of their biodesinfectant properties (formerly biofumigants) are those from cruciferous, because the tissues of these plants contain a high amount of sulfur compounds known as glucosinolates (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Thioglucoside glucosinolase enzyme (myrosinase) hydrolyzes these compounds and transform them into toxic volatile compounds such as isothiocyanates, nitriles, thiocyanates, oxazolidinethione and eptionitriles, depending on the cruciferous species (Brown and Morra, 2005). In intact tissue the enzyme is associated with the cell membrane and separated from the glucosinolates; and it only acts when the plant tissues undergo autolysis or when fermented. Residues can be incorporated fresh or dried, as long as damage and hydrolysis by endogenous myrosinase are avoided before application. Cabbage residues are a good option for SPP control because their biocide or biostatic activity is not only due to the glucosinolates, but also to other toxic compounds such as ammonia, nitrates, nitric acid, sulfhydryl acid, organic acids and proteolytic and chitinolytic enzymes that microorganisms produce during decomposition of its own organic matter; besides increasing the population of microorganisms with antagonistic characteristics to the SPP (Lazarovits *et al.*, 2005). Several studies have shown that the dried cabbage residues (DCR) keep their biodesinfectant properties and they can suppress pathogenic fungi such as *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Aphanomyces eutiches*, *Thielaviopsis basicola*, *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*, among others (Hoitink and Boehm, 1999; Lazzeri *et al.*, 2004). Research on various cruciferous species has been focused mainly on determining the type and concentration of glucosinolates present (Mayton *et al.* 1996; Smolinska *et al.* 1997; Kirkegaard and Sarwar, 1998; Matthiessen and Shackleton, 2005); on the variable effect of thiocyanate and isothiocyanates volatiles on SPP, ranging from reducing the number of propagules and severity of various diseases up to a null effect (Muehlchen *et al.*, 1990; Mojtahedi *et al.*, 1991; Zasada *et al.*, 2003; Snapp *et al.*, 2007; Njoroge *et al.*, 2008); on evaluation of the effect of fresh and dried residues, alone and in combination with solarization (Ramírez-Villapudua and Munnecke, 1987; Ramírez-Villapudua and Munnecke, 1988; Gamliel and Stapleton, 1993, Coelho *et al.*, 1999); and in establishing the factors that favor the biodesinfection and the average life of thiocyanates and isothiocyanates on the soil, which is not more than 12 d (Brown *et al.*, 1991; Brown and Morra, 1997; Gardiner *et al.*, 1999; Morra and Kirkegaard, 2002; Gimsing and Kirkegaard, 2006). It was noted that the biocidal activity of thiocyanates and isothiocyanates is only short-term, and that the suppressive effect of cruciferous residues in the long term is due to other mechanisms, among them, it has been proposed the increase of antagonist populations such as *Streptomyces* and *Pseudomonas fluorescens* (Cohen *et al.*, 2005). Motisi *et al.* (2009) suggested the late induction of microbial populations that can generate other biocidal compounds. On the other hand, the pH is one of the environmental factors influencing microbial growth, each microbial population has a pH range where growth is

2006). Se ha señalado que la actividad biocida de los tiocianatos e isotiocianatos tiene un corto plazo, y que el efecto supresivo de los residuos de crucíferas a largo plazo se debe a otros mecanismos, entre ellos se ha propuesto el incremento de poblaciones antagonistas como *Streptomyces* y *Pseudomonas fluorescens* (Cohen *et al.*, 2005). Motisi *et al.* (2009) sugieren la inducción tardía de poblaciones microbianas que pueden generar otros compuestos biocidas. Por otro lado, el pH es uno de los factores ambientales que influye en el crecimiento microbiano, cada población microbiana tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo bien definido, con variaciones en un margen de 2 a 3 unidades; sin embargo, algunos microorganismos son muy sensibles y no toleran ningún cambio. Además el pH del suelo afecta significativamente la actividad enzimática microbiana y es por ello que una de las estrategias que se puede utilizar en conjunto con otras, para el manejo de los FHS, es la regulación del pH a niveles no tolerados por éstos. El pH del suelo puede tener un doble efecto, impedir el crecimiento microbiano, y en el caso de los residuos biodesinfectantes, propiciar la formación de compuestos tóxicos. Por ejemplo, la descomposición microbiológica de residuos con un alto contenido de nitrógeno provoca una acumulación de amonio y un incremento del pH del suelo. Cuando el pH es mayor de 8.5 parte del amonio se convierte en amoniaco. El amonio no es tóxico, incluso a altas concentraciones, mientras que el amoniaco es muy tóxico (Tenuta y Lazarovits, 2002a). El amonio en los suelos con alto contenido en carbono orgánico no se acumula, convirtiéndose rápidamente por los procesos de nitrificación en nitrito (NO_2^-) y posteriormente en nitrato (NO_3^-) (Tenuta y Lazarovits, 2002b). De manera colateral el pH influye en la eficacia del control de las enfermedades cuando se utilizan residuos orgánicos debido a que se ha encontrado que sólo existen productos tóxicos que sean letales para los patógenos cuando el pH del suelo está por debajo de 6 o sobre 8; por ello, los cambios en el pH pueden influir en el grado de control (Tenuta y Lazarovits, 2004). En esta investigación se plantea que además de los biocidas volátiles, los mecanismos supresivos de los RDC se deben a que poseen una microflora antagonista a los FHS, modifican el pH e incrementan las poblaciones microbianas benéficas en el suelo, lo que genera condiciones adversas a los FHS. El objetivo fue determinar si los residuos deshidratados de col aportan microorganismos benéficos que sean antagonistas a los fitopatógenos y su período de viabilidad en ellos, así como su efecto sobre el pH del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Residuos deshidratados de col. Los residuos deshidratados de col (*Brassica oleraceae* var *capitata*) se obtuvieron picando el follaje finamente, se secaron por exposición a la radiación solar durante ocho días, posteriormente se molieron para obtener residuos con una textura más fina pero sin llegar a polvo, se envasaron en frascos de plástico y se almacenaron en un ambiente seco. Se dispuso de tres tipos de residuos: uno de preparación reciente (RDC1) y dos almacenados durante dos y cinco años (RDC2 y RDC5, respectivamente).

possible and usually has a well-defined optimum pH with variations in a range of 2 to 3 units; however, some microorganisms are very sensitive and they cannot tolerate any change. Besides, soil pH significantly affects microbial enzyme activity and that is why one of the strategies that can be used in conjunction with others to management SPP, is the regulation of pH to levels not tolerated by them. Soil pH can have a double effect, prevent microbial growth, and in the case of biodesinfectants residues, to promote the formation of toxic compounds. For example, microbiological decomposition of residues with a high nitrogen content causes ammonium accumulation and an increase in the soil pH. When pH is higher than 8.5 part of ammonium is converted into ammonia. Ammonium is not toxic, even at high concentrations, while ammonia is very toxic (Tenuta and Lazarovits, 2002a). Ammonium in soils with high organic carbon content does not accumulate, rather, it rapidly converts due to nitrification processes to nitrite (NO_2^-) and then to nitrate (NO_3^-) (Tenuta and Lazarovits, 2002b). In a similar way, the pH influences the efficiency of disease control only when organic residues are used because it has been found that there are toxic products that are lethal to the pathogens only when the soil pH is below 6 or above 8; therefore, changes in pH can affect the degree of control (Tenuta and Lazarovits, 2004). In the present study it is suggested that in addition to the volatile biocides, the DCR suppressive mechanisms are due to the SPP antagonistic microflora that modify the pH and increase the beneficial microbial population in the soil, which leads to adverse conditions for SPP. The aim was to determine if the dried cabbage residues can provide beneficial microorganisms that are antagonistic to plant pathogens and their period of viability on them, as well as their effect on soil pH.

MATERIALS AND METHODS

Dried cabbage residues. Cabbage (*Brassica oleraceae* var *capitata*) dehydrated residues were obtained by finely chopping the foliage, drying by exposure to sunlight during eight days, and then grounded until obtaining residues with a finer texture but without becoming powder, they were packaged in plastic bottles and stored in a dry environment. There were three types of residues obtained: one fresh preparation (DCR1) and two stored during two and five years (DCR2 and DCR5, respectively).

Microflora associated to DCR, viable units and identification of most abundant microorganisms. Cultivable microflora associated to DCR1 and to the cultivable viable units in DCR2 and DCR5 were determined with the classic microbiological growth technique and plate count (Barre and Harwood, 1999; Oliver, 2005), based on the dilution method and spread over the entire surface of potato dextrose agar (PDA) culture media, peptone yeast extract glucose agar (YPGA) and Czapeck (Cz). Decimal dilutions were made from one gram of DCR, 0.1 mL of 10^1 to 10^4 were inoculated and incubated at 28 °C in a growth chamber. For each dilution and each medium there were three replicates. Colony forming units (cfu) per gram of DCR were determined by the number of fungal and bacterial

Microflora asociada a los RDC, unidades viables e identificación de los microorganismos más abundantes.

La microflora cultivable asociada a RDC1 y las unidades viables cultivables en RDC2 y RDC5 se determinaron con la técnica microbiológica clásica de crecimiento y conteo en placa (Barer y Harwood, 1999; Oliver, 2005), basada en el método de dilución y siembra por extensión en los medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA), extracto de levadura peptona glucosa agar (YPGA) y Czapeck (Cz). Las diluciones decimales se efectuaron a partir de un gramo de RDC, se sembraron 0.1 ml de 10^1 a 10^7 , y se incubaron a 28 °C en una cámara de crecimiento. Para cada dilución y cada medio se realizaron tres repeticiones. Las unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de RDC, se determinaron por el número de colonias fúngicas y bacterianas desarrolladas desde las 24 h y hasta los seis días. De las poblaciones predominantes se obtuvieron las cepas puras. Los hongos se identificaron por medio de sus estructuras microscópicas observadas con un microscopio óptico Karl Zeiss, y con base en las referencias de Barnett y Hunter (1972), así como Alexopoulos *et al.* (1996). En el caso de las bacterias, se caracterizó la morfología macroscópica, y la microscópica a través de la tinción de Gram. La identificación a nivel de género se llevó a cabo con las pruebas básicas de Cowan y Steel (Cowan *et al.*, 1993), además de la prueba de KOH, expresión de fluorescencia en el medio B de King y crecimiento en el medio selectivo agar cetrimida. Con los microorganismos predominantes identificados, se efectuaron pruebas de confrontación en PDA y YPGA, contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) y *Rhizoctonia solani*, para detectar si alguno de ellos es antagónico hacia estos hongos fitopatógenos. Los patógenos se sembraron en forma masiva, y en el centro los posibles antagonistas; incubándose las cajas a 28 °C por 24 a 72 h, en una cámara de crecimiento. El antagonismo se evaluó por halos de inhibición del crecimiento, lisis del micelio y tasa de crecimiento colonial radial.

Incorporación de poblaciones microbianas por adición de RDC a un suelo estéril y su efecto sobre el pH. El suelo utilizado se colectó en el municipio de Moctezuma, SLP. Éste se esterilizó en autoclave a 121 °C h⁻¹, tres veces, cada tercer día. Antes de iniciar el ensayo, se midió el pH con el potenciómetro, en una dilución 1:10 obtenida a partir de muestras de un gramo de suelo. Se confirmó la esterilidad por el conteo en placa de unidades viables en las diluciones 10^1 a 10^7 , y por siembra de 10 gránulos de suelo (0.5 cm de diámetro) por caja, en 10 cajas de PDA, YPGA y Cz. Éstas se incubaron a 28 °C por ocho días, en una cámara de crecimiento. Cinco gramos de residuos RDC2 o RDC5 se incorporaron en 500 g de suelo estéril contenido en recipientes de unicel, se humedecieron con agua destilada estéril a capacidad de campo, se sellaron perfectamente con papel aluminio y parafilm, y se incubaron a 28 °C en una cámara de crecimiento. Por cada tipo de residuo se efectuaron tres repeticiones y los testigos respectivos fueron preparados de la misma forma pero sin RDC. Después de 24 h y hasta los seis días se cuantificaron las poblaciones microbianas mediante la técnica de conteo en placa, a partir de diluciones y siembra por extensión en PDA, YPGA y Cz.

colonies developed from 24 h up to six days. Pure strains were obtained from predominant populations. Fungi were identified by their microscopic structures observed with a Karl Zeiss optical microscope, and based on the references of Barnett and Hunter (1972) and Alexopoulos *et al.* (1996). In the case of bacteria, macroscopic morphology was characterized and the microscopic morphology with the Gram stain. The identification at the genus level was carried out with Cowan and Steel (Cowan *et al.*, 1993) basic tests, besides KOH test, fluorescence expression in the King B medium and growth in the cetrimide agar selective medium. With the predominant microorganisms identified, confrontation tests were done in PDA and YPGA against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) and *Rhizoctonia solani* to detect if any of them was antagonistic to wards any of these fungal pathogens. Pathogens were spread in massive form, and at the center the potential antagonists; plates were incubated at 28 °C for 24 to 72 h in a growth chamber. Antagonism was assessed by growth inhibition halos, lysis of the mycelium and radial colony growth rate.

Incorporation of microbial populations by addition of DCR to a sterile soil and its effect on pH. The soil used was collected in the Moctezuma municipality, SLP. It was autoclaved at 121 °C hr⁻¹, three times every other day. Before starting the test, the pH was measured with the potentiometer at a 1:10 dilution of a sample obtained from a gram of soil. Sterility was confirmed by plate count of viable units of the 10^1 to 10^7 dilutions, and by inoculation 10 pellets of soil (0.5 cm diameter) per plate, in 10 plates of PDA, YPGA and Cz. These plates were incubated at 28 °C for eight days in a growth chamber. Five grams of DCR2 or DCR5 residues were incorporated into 500 g of sterile soil kept in styrofoam containers, they were moistened with sterile distilled water at field capacity and perfectly sealed with aluminum foil and parafilm, and incubated at 28 °C in a chamber growth. For each type of residue three repetitions were made and the respective controls were prepared in the same way but without DCR. After 24 h and up to six days, the microbial populations were quantified by plate count technique from dilutions and spread over the entire surface of PDA, YPGA and Cz. The dilutions inoculated were 10^3 to 10^7 , with three replicates per dilution and culture medium. In order to know the effect of pH on the DCR, it was measured at 1, 5, 9, 12, 15, 20, 23, 26 and 30 d, as described above. The obtained data were statistically analyzed with Student's t-test.

Effect of DRC on pH and microflora of different types of non-sterile soil. Five soils samples from San Luis Potosi (Villa de Arista, two samples), Veracruz (one sample) and Zacatecas (two samples) were used. These were analyzed to determine their physical (data not shown) and chemical characteristics with the classical techniques described by Reeuwijk (2002) - pH in distilled water as well as in 1M KCl at a 1:2.5 ratio, electrical conductivity, bulk density, texture, assimilable nitrogen with NaOH, assimilable potassium with ammonium acetate and organic matter percentage. Each soil microflora was determined in cfu g⁻¹ soil with the plate count technique described above. Decimal dilutions were made from 10^1 to 10^6 and 0.1 mL of

Las diluciones sembradas fueron 10^3 a 10^7 , con tres repeticiones por dilución y medio de cultivo. Para conocer el efecto de los RDC sobre el pH, éste se midió a los: 1, 5, 9, 12, 15, 20, 23, 26 y 30 d, de la forma antes descrita. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con una prueba t de Student.

Efecto de los RDC sobre el pH y la microflora de diferentes tipos de suelo no estériles. Se utilizaron cinco suelos provenientes de San Luis Potosí (Villa de Arista, dos muestras), Veracruz (una muestra) y Zacatecas (dos muestras). Éstos se analizaron para determinar sus características físicas (datos no presentados) y químicas con las técnicas clásicas descritas por Reeuwijk (2002) para pH en agua destilada así como en KCl 1M en una relación 1:2.5, conductividad eléctrica, densidad aparente, textura, nitrógeno asimilable con NaOH, potasio asimilable con acetato de amonio y por ciento de materia orgánica. La microflora de cada suelo se determinó en ufc g^{-1} de suelo, con la técnica de conteo en placa antes descrita. Se efectuaron diluciones decimales de 10^1 a 10^6 y se sembraron 0.1 mL de las diluciones 10^4 , 10^5 , y 10^6 en los medios PDA, PDA acidulado y YPGA; posteriormente se incubaron a 28 °C en una cámara de crecimiento. El conteo de colonias se realizó después de 24 h y hasta los seis días. Se realizaron tres repeticiones por cada dilución y por cada medio de cultivo. El tratamiento consistió en incorporar cinco gramos de DCR2 en 500 g de suelo contenido en recipientes de unicel y se humedecieron con agua destilada estéril a capacidad de campo. Se sellaron perfectamente con papel aluminio y parafilm, y se incubaron a 28 °C en una cámara de crecimiento. Por cada tipo de suelo se realizaron tres repeticiones y el testigo correspondiente. Durante todo el ensayo, el suelo se mantuvo húmedo a capacidad de campo. El pH se registró durante 51 d. En los primeros cinco días las evaluaciones fueron diarias, posteriormente cada tercer día y en las últimas dos semanas cada dos días. Los valores de pH promedio de las tres repeticiones se analizaron estadísticamente con la prueba t para medias de dos muestras emparejadas. Al final del ensayo se determinaron las características físicas (datos no presentados), químicas y microbiológicas de los suelos con las técnicas ya mencionadas; y los valores obtenidos se analizaron estadísticamente con la prueba t de Student para dos muestras emparejadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microflora asociada a los RDC, unidades viables e identificación de los microorganismos más abundantes. La microflora cultivable asociada a los RDC1 estuvo constituida por hongos y bacterias que crecieron en los medios de PDA y YPGA pero no en Czapeck. Se determinó una población bacteriana de 20×10^6 ufc y fúngica de 15×10^5 ufc g^{-1} de RDC. Las poblaciones bacterianas predominantes fueron *Pseudomonas* y *Bacillus*, identificadas con base en las características morfológicas microscópicas y pruebas bioquímicas básicas (Cuadro 1). *Pseudomonas* creció preferentemente en PDA (Figura 1A), y produjo un pigmento fluorescente tanto en agar cetrimida como en el medio B de King, lo que indica que es una pseudomonas del

the 10^4 , 10^5 , and 10^6 dilutions were inoculated in PDA, acidified PDA and YPGA media; then they were incubated at 28 °C in a growth chamber. The colony count was performed after 24 h and up to six days. Three replicates for each dilution and for each medium were carried out. The treatment consisted on incorporating five grams of DCR2 in 500 g of soil contained in styrofoam containers and moistened with sterile distilled water to field capacity. They were perfectly sealed with aluminum foil and parafilm, and they were incubated at 28 °C in a growth chamber. For each soil type there were three replicates and the corresponding control. Throughout the test, the soil was kept moist at field capacity. The pH was recorded during 51 d. In the first five days the evaluations were daily, then every other day and in the last two weeks every two days. The average pH values of the three replicates were statistically analyzed with the t-test for paired means of two samples. At end of the study, the physical (data not shown), chemical and microbiological characteristics of the soils were determined with the techniques mentioned above; the obtained values were statistically analyzed with Student's t-test for two paired samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Microflora associated to DCR, viable units and identification of most abundant microorganisms. The cultivable microflora associated to DCR1 consisted of fungi and bacteria grown on PDA and YPGA but not Czapeck media. Bacterial population was 20×10^6 cfu and fungal population 15×10^5 cfu g^{-1} of DCR. The predominant bacterial populations were *Pseudomonas* and *Bacillus*, as they were identified based on microscopic morphological characteristics and basic biochemical tests (Table 1). *Pseudomonas* grew preferably on PDA (Figure 1A), and it produced a fluorescent pigment in both cetrimide agar and King B media, which indicates that the group is a fluorescent pseudomonas. *Bacillus* grew on YPGA but not on PDA (Figure 1B). The fungi were identified by their microscopic structures and the main fungal populations corresponded to *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Rhizopus*; and predominant gender was *Trichoderma*. For DCR2 and DCR5 the same amount of viable culturable bacteria units (6×10^4 cfu g^{-1} DCR) and fungi (1×10^4 cfu g^{-1} DCR) was obtained, which indicates the existence of bacterial and fungal species preserved dehydrated during five years. The only viable bacteria were fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* sp.; as for fungi only *Penicillium* and *Alternaria*, being *Penicillium* the predominant fungal population. The fungi and bacteria genera identified in the recent and preserved DCR, are among the most common found in most organic residues, the prevalence or absence of some of them depends on the type of residue, for example, *Aspergillus* is one of the predominant fungi in alfalfa residues, *Trichoderma* and *Penicillium* in fish flour, and *Aspergillus* and *Trichoderma* in mushroom compost (Nico *et al.*, 2005). In vermicompost obtained from horse manure and plant matter with California earthworms and in sandy loam soil, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* were found (Guedez *et al.*, 2009). Residues from banana, cattle

Cuadro 1. Características morfológicas y bioquímicas que identifican a *Bacillus* y *Pseudomonas* como parte de las poblaciones microbianas asociadas a los RDC.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics that identify *Bacillus* and *Pseudomonas* as part of the microbial populations associated to the DCR.

Características morfológicas y prueba bioquímica	Bacteria 1 <i>Pseudomonas</i>	Bacteria 2 <i>Bacillus</i>
Morfología y tinción de Gram	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (+)
Prueba de KOH	+	-
Ácido-alcohol resistente	-	-
Presencia de endospora (central/terminal)	-	+ central
Catalasa	+	+
Oxidasa	+	-
Metabolismo O/F	Oxidativo	F/-
Crecimiento aerobio/anaerobio	Aerobio	Aerobio
Producción de ácido a partir de la glucosa	-	+
Movilidad	+	-

O: Metabolismo oxidativo

F: Metabolismo fermentativo (algunas cepas fueron fermentativas y otras negativas)

grupo fluorescente. *Bacillus* creció en YPGA pero no en PDA (Figura 1B). Los hongos se identificaron por sus estructuras microscópicas y las principales poblaciones fúngicas correspondieron a *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Rhizopus*; y el género predominante fue *Trichoderma*. Para RDC2 y RDC5, se obtuvo la misma cantidad de unidades viables cultivables de bacterias (6×10^4 ufc g⁻¹ de RDC) y de hongos (1×10^4 ufc g⁻¹ de RDC), lo cual indica la existencia de especies bacterianas y fúngicas que se conservan en deshidratación por cinco años. Las bacterias viables fueron únicamente *Pseudomonas* del grupo fluorescente y *Bacillus* sp.; y los hongos *Penicillium* y *Alternaria*, siendo *Penicillium* la población fúngica predominante. Los géneros de hongos y bacterias identificados en los RDC recientes y conservados, están dentro de los más comunes que se han encontrado en la mayoría de las enmiendas orgánicas, el predominio o ausencia de algunos de ellos depende del tipo de enmienda, por ejemplo *Aspergillus* es uno de los hongos predominantes en enmiendas de alfalfa, *Trichoderma* y *Penicillium* en harina de pescado, y *Aspergillus* y *Trichoderma* en composta de champiñón (Nico *et al.*, 2005). En lombricomposta obtenida con lombriz californiana en suelo franco-arenoso a partir de excremento de caballo y materia vegetal, se encontró a *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Guédez *et al.*, 2009). Las enmiendas de residuos de plátano, estiércol bovino, pulpa de café y gallinaza se caracterizan por poblaciones bacterianas constituidas principalmente por diversas especies de *Bacillus* y *Pseudomonas*, además de *Aspergillus* y *Penicillium* (Escobar *et al.*, 2012). Atlas y Bartha (2005) refieren que los géneros de bacterias y hongos identificados en los RDC y en las diversas enmiendas orgánicas son los más abundantes debido a su versatilidad metabólica para degradar monosacáridos, disacáridos, almidón, celulosa y hemicelulosa; así como los compuestos nitrogenados orgánicos.

En las pruebas de confrontación *in vitro*,

manure, poultry manure and coffee pulp are characterized by bacterial populations consisting mainly of various species of *Bacillus* and *Pseudomonas*, as well as *Aspergillus* and *Penicillium* (Escobar *et al.*, 2012). Atlas and Bartha (2005) reported that the bacteria and fungi genera identified in the DCR and in various organic residues are the most abundant due to their metabolic versatility to degrade monosaccharides, disaccharides, starch, cellulose and hemicellulose, as well as organic nitrogen compounds.

In vitro's confrontation tests, *Pseudomonas* showed antibiosis only against *R. solani* strain with a inhibition zone of 4.5 cm (Figure 2A). *Bacillus* showed a slight inhibition and induction of resistance structures development (sclerotia) in the *R. solani* strain (Figure 2B) and invaded and caused mycelium lysis of the Fol strain (Figure 2C). *Trichoderma* carried out its competence and mycoparasite activity on *R. solani* strains (Figure 2D) and Fol. *Alternaria* and *Penicillium* grew faster than Fol and *R. solani*. *Alternaria* showed a 1cm per day radial growth and it invaded all the culture medium, suggesting competitive antagonism to wards these SPP (Figure 2E).

These results suggest that the most abundant microbial populations associated to the DCR, are genera that include species that act as SPP biological control agents (Baker and Cook, 1974). Although in this work *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Trichoderma* species were not determined, it was shown that these isolates are Fol and *R. solani* antagonists and that these are important and diversified plant pathogens in soils of San Luis Potosi (Monreal, 2008). Good *in vitro* antagonistic behavior does not ensure biocontrol under natural conditions but it predicts that this may happen (Alonso *et al.*, 2002).

Trichoderma was not detected in the DCR stored during two and five years; according to Wakelin *et al.* (1999), this fungus is susceptible to desiccation periods longer than one year. In contrast, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium* and *Alternaria*, seem to have an excellent ability

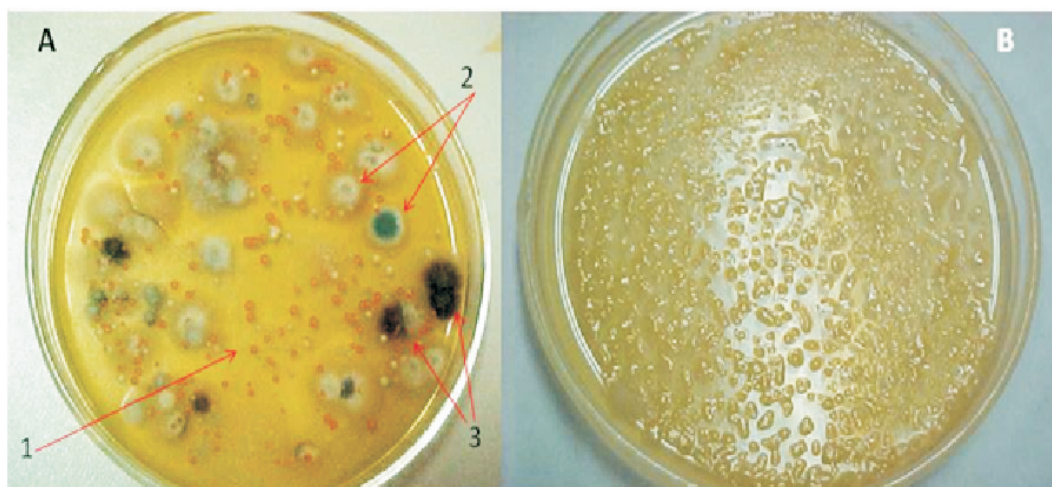


Figura 1. Microflora viable aislada en PDA y YPGA a partir residuos deshidratados de col almacenados durante cinco años. A) Crecimiento en PDA: 1) Colonias amarillo intenso que corresponden a *Pseudomonas*; 2) Colonias con el centro verde-azul y periferia blanca de *Penicillium* y 3) Colonias negras de *Alternaria*. B) Colonias desarrolladas en YPGA, de aspecto mucoso brillantes que corresponden a *Bacillus*.

Figure 1. Isolated viable microflora in PDA and YPGA from dehydrated cabbage residues stored during five years. A) Growth on PDA: 1) Deep yellow colonies corresponding to *Pseudomonas*; 2) Colonies with blue-green center and white borders of *Penicillium* and 3) Black colonies of *Alternaria*. B) Colonies developed in YPGA, bright mucosal aspect corresponding to *Bacillus*.

Pseudomonas mostró antibiosis únicamente contra la cepa de *R. solani*, con un halo de inhibición de 4.5 cm (Figura 2A). *Bacillus* mostró una leve inhibición e inducción del desarrollo de estructuras de resistencia (esclerocios) en la cepa de *R. solani* (Figura 2B) e invadió y causó lisis del micelio de la cepa de Fol (Figura 2C). *Trichoderma* ejerció su actividad de competencia y micoparásito sobre las cepas de *R. solani* (Figura 2D) y Fol. *Alternaria* y *Penicillium* crecieron más rápidamente que Fol y *R. solani*. *Alternaria* tuvo un crecimiento radial de un centímetro por día e invadió todo el medio de cultivo, lo cual sugiere antagonismo por competencia hacia estos FHS (Figura 2E).

Los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones microbianas más abundantes asociadas a los RDC, son géneros que incluyen especies que actúan como agentes de control biológico de FHS (Baker y Cook, 1974). Aunque en este trabajo no se determinó la especie de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Trichoderma*, si se evidenció que estos aislamientos son antagonistas de Fol y *R. solani*, que son fitopatógenos importantes y diversificados en los suelos de San Luis Potosí (Monreal, 2008). Un buen comportamiento antagonístico *in vitro* no asegura un control biológico en condiciones naturales pero predice que éste puede acontecer (Alonso *et al.*, 2002).

En los RDC conservados por dos y cinco años no se detectó a *Trichoderma*, según Wakelin *et al.* (1999), este hongo es susceptible a periodos de desecación mayor a un año. En contraste *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium* y *Alternaria*, parecen tener una excelente capacidad para mantenerse viables por largo tiempo en condiciones de desecación. La microflora benéfica asociada a los RDC le da un valor adicional a su efecto biodesinfectante.

to remain viable for a long period of time under desiccation conditions. The beneficial microflora associated to DCR gives an additional value to its biodesinfectant effect.

Incorporation of microbial populations by adding cabbage residuo to a sterile soil and their pH effect. After 24 h of incorporating DCR2 to soil, only bacteria developed in all culture media used were detected, unlike bacterial populations associated to DCR2 that did not grow in Czapeck. Their cfu on average were $116 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ soil, higher than the cfu determined for DCR2 ($6 \times 10^4 \text{ cfu g}^{-1}$ DCR), predominating *Bacillus* and *Pseudomonas*, which indicates these were the proper conditions for reproduction. Isolated bacteria from this soil, grew in culture media with acidic pH (5.5 in PDA) to slightly alkaline (7.5 in Czapeck), which shows a superior diversity of bacteria in soil with DCR2 in fermentation. The abundance of bacterial populations on the soil with DCR2, agrees with the results obtained by Calbrix *et al.* (2007) who estimated that the initial decomposition of organic matter, is due to the 80-90 % of the metabolic activity of the bacteria.

In the control soil, the pH variations were minimal, while on the soil with DCR2, the change was noticeable and significantly higher than in the control ($P \leq 0.05$), increasing its initial value of 7.57 to 8.79 at 12 d, and then it decreased but still being alkaline (Figure 3). The alkaline pH is consistent with the dominance of bacterial populations and fungi absence, in particular *Bacillus* and *Pseudomonas*, which have been described as putrefactive species that are alkalophilic and that have a tendency to alkalinize their culture media (Insam *et al.*, 2010). It is assumed that pH changes in sterile soil are primarily due to the transformation of the DCR nitrogen compounds by putrefactive bacteria

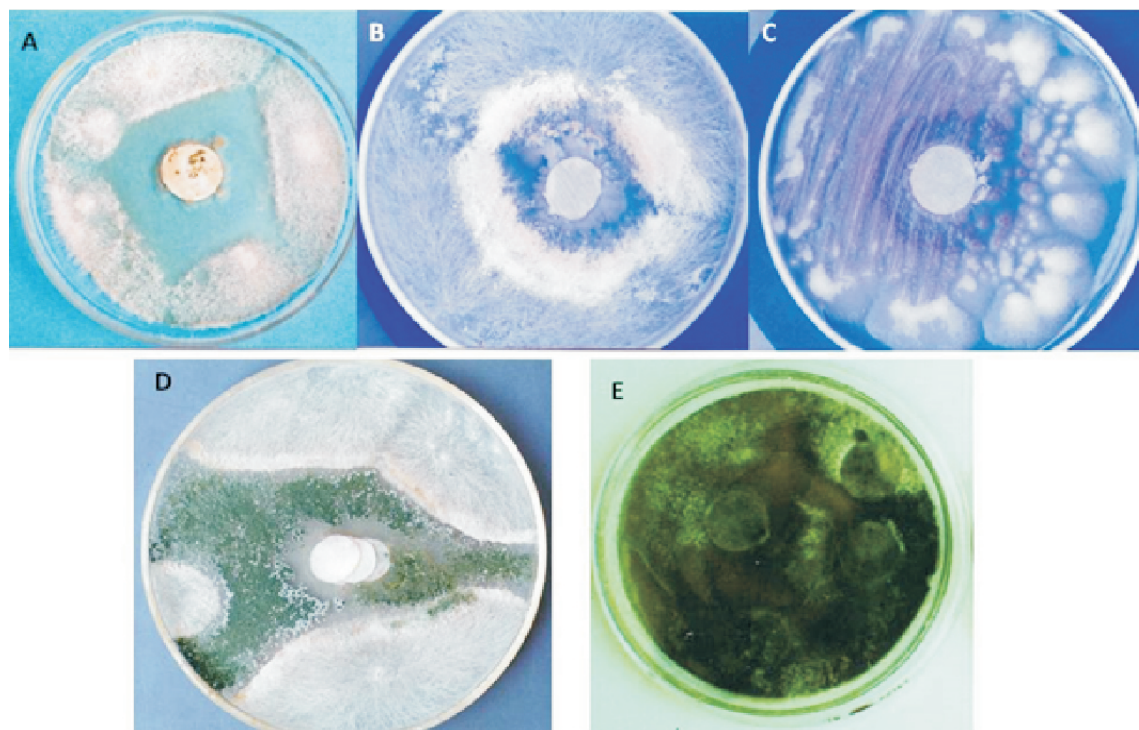


Figura 2. Detección de antagonistas en las poblaciones microbianas predominantes de los residuos deshidratados de col, por pruebas de confrontación *in vitro* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). A) Antibiosis de *Pseudomonas* contra *R. solani*; B) *Bacillus* mostró antibiosis e indujo el desarrollo de esclerocios en *R. solani*; C) *Bacillus* causó lisis del micelio de Fol; D) *Trichoderma* inhibió el crecimiento de *R. solani* por competencia y micoparasitismo; E) *Penicillium* y *Aspergillus* eliminaron a Fol y *R. solani* por competencia (crecimiento rápido).

Figure 2. Detection of antagonists in predominant microbial populations of the dried cabbage residues by confrontation tests *in vitro* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). A) *Pseudomonas* antibiosis against *R. solani*; B) *Bacillus* showed antibiosis and induced sclerotia development in *R. solani*; C) *Bacillus* caused lysis of the mycelium of Fol; D) *Trichoderma* inhibited *R. solani* growth by competition and mycoparasitism; E) *Penicillium* and *Aspergillus* eliminated Fol and *R. solani* by competition (fast growth).

Incorporación de poblaciones microbianas por adición de residuos de col a un suelo estéril y su efecto sobre el pH. A las 24 h posteriores a la incorporación de RDC2 al suelo, se detectaron exclusivamente bacterias que se desarrollaron en todos los medios de cultivo utilizados, a diferencia de las poblaciones bacterianas asociadas a los RDC2 que no crecieron en Czapeck. Sus ufc fueron en promedio de $116 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ de suelo, mayores a las ufc determinadas para los RDC2 ($6 \times 10^4 \text{ ufc g}^{-1}$ de RDC), y volvieron a predominar *Bacillus* y *Pseudomonas*; lo cual indica que tuvieron condiciones apropiadas para reproducirse. Las bacterias aisladas de este suelo, crecieron en medios de cultivo con pH ácido (5.5 en PDA) a ligeramente alcalino (7.5 en Czapeck), lo que muestra una mayor diversidad de bacterias en el suelo con RDC2 en fermentación. La abundancia de poblaciones bacterianas en el suelo con RDC2, concuerda con los resultados obtenidos por Calbrix *et al.* (2007), que estimaron, que la descomposición inicial de la materia orgánica, se debe al 80-90 % de la actividad metabólica de las bacterias.

En el suelo testigo las variaciones de los valores de pH fueron mínimas, en tanto que en el suelo con RDC2, el

asociado a them, and that in this process there are ammonium or organic bases released, that increase the pH value. Tsao and Oster (1981) and Bello *et al.* (2000) reported that any organic amendment with low C/N ratio (8-20) produce in a short-term (24-72 h) a sharp rise in the pH because of ammonium release. DCR belong to this group, which explains the pH behavior on sterile soil. The alkaline pH itself is adverse for some pathogens, and it may also favor them to be parasitized by certain biocontrol agents as shown by Elad *et al.* (1980) in the interaction *Trichoderma harzianum* with *R. solani* and *S. rolfii*. Similarly, if ammonia builds up and there are no conditions for its nitrification, then it is transformed into ammonia and nitrous acid, both toxic to SPP but not for some biocontrol agents (Tenuta and Lazarovits, 2002a, 2002b, 2004).

Effect of cabbage residues on pH and microflora in different non-sterile soil types. pH values for the five types of non-sterile soil and with DCR2, showed alternated increase and decrease during the 51 evaluation days. In general, the pH change was similar for all soils, the values fluctuated between 7.33 and 8.24, and they were always significantly ($P \leq 0.05$) lower than the control, except for

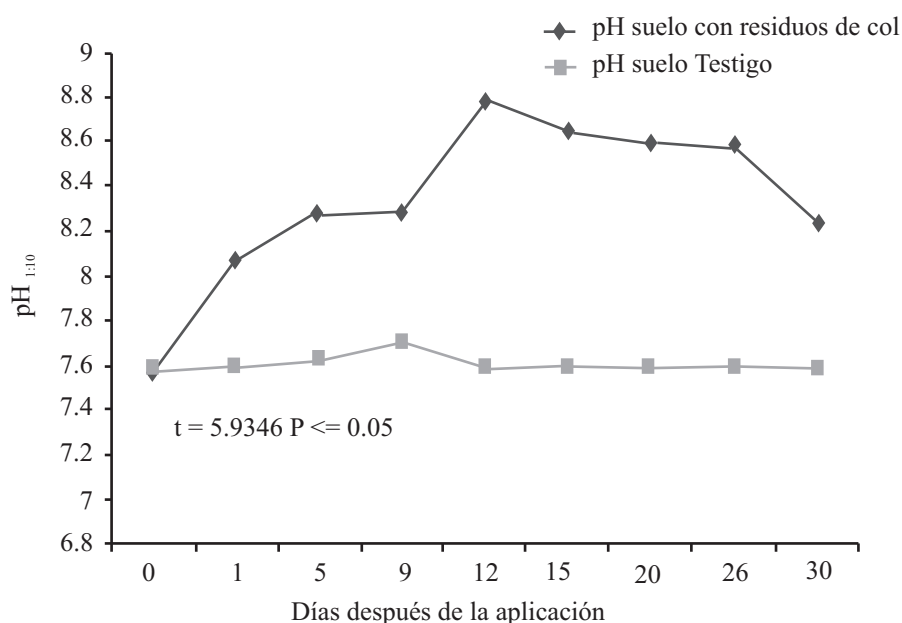


Figura 3. Efecto de los residuos deshidratados de col (RDC) sobre el pH de un suelo estéril. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones.

Figure 3. Effect of dried cabbage residues (DCR) on the pH of a sterile soil. Each dot represents the average of three replications.

cambió fue perceptible y significativamente superior al testigo ($P \leq 0.05$), incrementando su valor inicial de 7.57 al máximo de 8.79 a los 12 d, y después disminuyó pero sin dejar de ser alcalino (Figura 3). El pH alcalino concuerda con el predominio de poblaciones bacterianas y la ausencia de hongos, en particular de *Bacillus* y *Pseudomonas*, en los que se han descrito especies putrefactivas que son alcalófilas y a su vez tienden a alcalinizar sus medios de cultivo (Insam *et al.*, 2010). Se asume que los cambios de pH en el suelo estéril se deben principalmente a la transformación de los compuestos nitrogenados de los RDC por las bacterias putrefactivas asociadas a éstos, y que en este proceso se liberan bases orgánicas o amoníaco que incrementan el valor del pH. Tsao y Oster (1981), y Bello *et al.* (2000) refieren que cualquier enmienda orgánica con baja proporción C/N (entre 8-20) provocan en un corto plazo (24 a 72 h) un ascenso brusco en el pH, por liberación de amonio. Los RDC pertenecen a este grupo, lo cual explica el comportamiento del pH en el suelo estéril. El pH alcalino en sí, es adverso para algunos fitopatógenos, y además puede favorecer que éstos sean parasitados por ciertos agentes de biocontrol como lo demostraron Elad *et al.* (1980) en la interacción *Trichoderma harzianum* con *R. solani* y *S. rolfsii*. Así mismo si el amonio se acumula y si no existen las condiciones para su nitrificación, éste se transforma en amoníaco y ácido nítrico, ambos son tóxicos para los FHS pero no para algunos agentes de biocontrol (Tenuta y Lazarovits, 2002a, 2002b, 2004).

Efecto de los residuos de col sobre el pH y la microflora en diferentes tipos de suelo sin esterilizar. Los valores de pH para los cinco tipos de suelo sin esterilizar y con RDC2 mostraron incrementos alternados con

Zacatecas 1 (Figure 4). Variation of pH in the five control soils indicates that several chemical and biological reactions occur mainly due to microbial activity, which depends on the microbial species present and it is affected by moisture, temperature, pH, aeration, type and amount of organic matter (Insam *et al.*, 2010). The null pH variation observed in the sterile soil without DCR may be due to the absence of microorganisms (Figure 3). The results shown in Table 2, suggest that the incorporation of DCR2 was one of the factors that indirectly influence the pH variation, and it is very likely that the dynamics of pH variation was mainly due to stimulated microbial activity provided by the cabbage residues and soil characteristics. It is possible that in the soils under study existed different microbial species, however, it can be inferred that the microorganisms of the soil treated with DCR produced some substances that buffered the pH increase and, therefore, this was always lower in comparison to the control, for example, mineralization processes of organic matter by the microbial biomass involves a decrease of the pH of the soil solution due to an increased CO_2 release. Additionally, it is important to consider the influence of organic acids in the soil produced by high populations of *Bacillus* and *Pseudomonas* (Paredes-Mendoza and Espinosa-Victoria, 2010). Only in the Zacatecas 1 soil added with DCR, at the beginning and up to day 12, the pH was higher than the control, however, then it decreased (Figure 4D); nevertheless, the differences were not significant and this could be attributed to microbial species present in this soil that did not release metabolites that affect the pH. The effect of organic amendments on pH is very heterogeneous, for example, Contreras *et al.* (2005) evaluated the addition of chicken manure and cattle vermicompost to two soils with

disminución durante los 51 d de evaluación. En general, la modificación del pH fue similar para todos los suelos, los valores fluctuaron entre 7.33 y 8.24; y siempre fueron significativamente ($P \leq 0.05$) menores al testigo, a excepción de Zacatecas 1 (Figura 4). La variación del pH en los cinco suelos testigo indica que ocurren muchas reacciones químicas y biológicas debidas principalmente a la actividad microbiana, la cual depende de las especies microbianas presentes y es afectada por la humedad,

contrasting pH, soil (a) pH 6.2 and soil (b) pH 3.4. The manure increased pH from 6.2 to 7.2, and from 3.4 to 4.1, but with vermicompost the soil pH (a) increased from 6.2 to 6.9, and in the soil (b) it decreased from 3.4 to 3.3. Nico *et al.* (2003) reported that the addition of baled alfalfa and fish flour to a soil of pH 6.0, increased the pH values to 7.6 and 8.2, respectively; whereas with mushroom compost the pH was maintained at 6.0. In the research studies mentioned above, the pH was recorded at the beginning and at the end

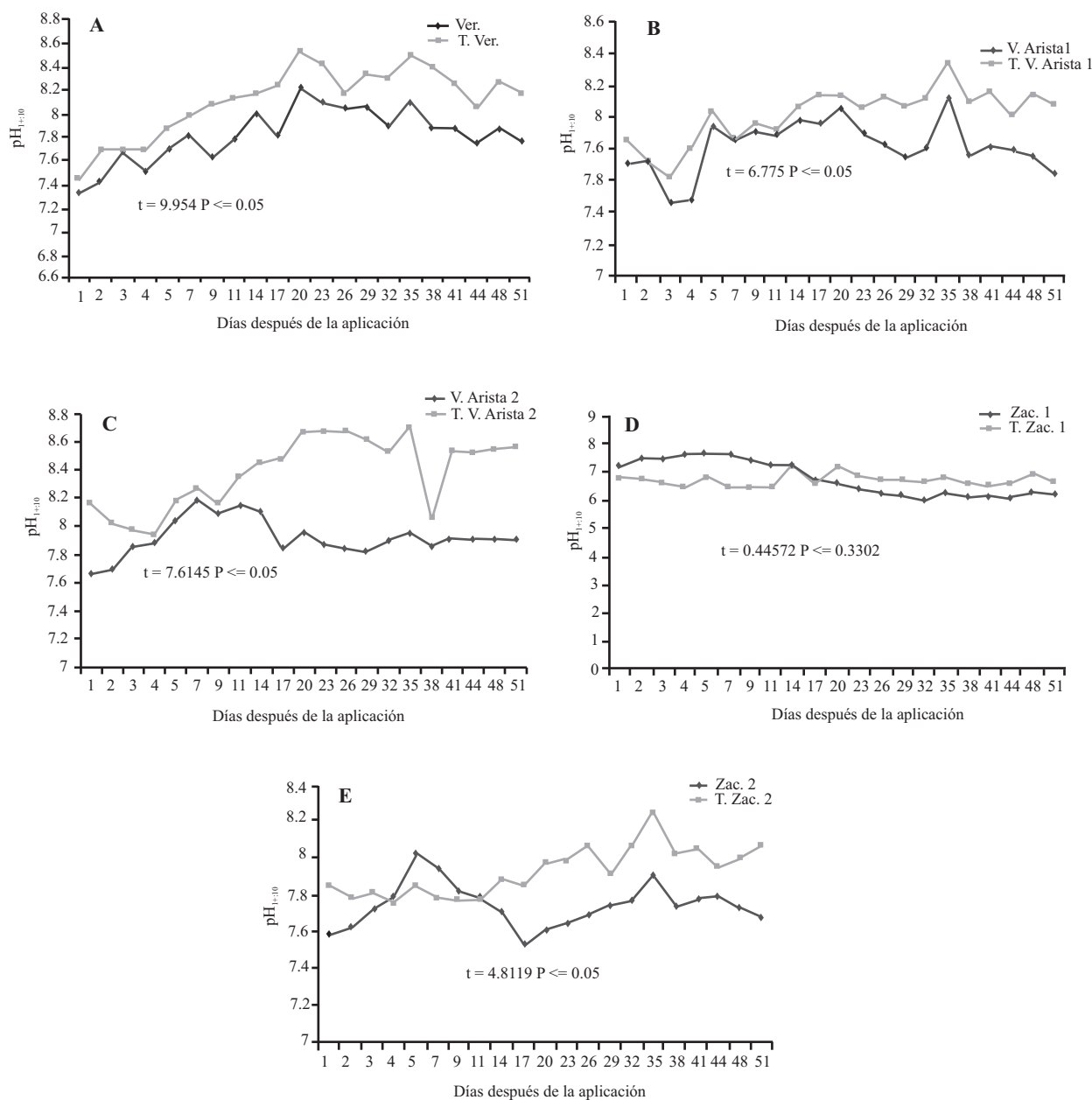


Figura 4. Dinámica del pH por incorporación de residuos deshidratados de col (RDC) en cinco suelos sin esterilizar, procedentes de tres estados de México, durante un periodo de 51 d. A) Veracruz, B) Villa de Arista 1-San Luis Potosí, C) Villa de Arista 2-San Luis Potosí, D) Zacatecas 1, E) Zacatecas 2.

Figure 4. pH dynamics by incorporation of dried cabbage residues (DCR) in five non-sterile soils from three states of Mexico, during a period of 51 d. A) Veracruz, B) Villa de Arista 1-San Luis Potosí, C) Villa de Arista 2-San Luis Potosí, D) Zacatecas 1, E) Zacatecas 2.

temperatura, pH, aireación, tipo y cantidad de materia orgánica (Insam *et al.*, 2010). La nula variación de pH observada en el suelo estéril sin RDC se puede deber a la ausencia de microorganismos (Figura 3). Los resultados mostrados en el Cuadro 2, sugieren que la incorporación de RDC2 fue uno de los factores que más influyó indirectamente en la variación del pH, y es muy factible que la dinámica de variación del pH se debió principalmente a la actividad microbiana estimulada y aportada por los residuos de col y por las características del suelo. Es posible que en

of the treatment, where as in the present work the pH was measured at different times and it was found that changes were not constant. The heterogeneous effect of organic amendments on soil pH was confirmed by Tenuta and Lazarovits (2002b), who found inconsistencies in the results obtained after the application of nitrogen-rich organic amendments in different soils, concluding that factors influencing pH are organic components of the amendment and the soil characteristics such as cation exchange capacity, the content of organic matter, moisture and bulk density. In

Cuadro 2. Efecto de los residuos deshidratados de col sobre características químicas de cinco suelos procedentes de tres estados de México.

Table 2. Effect of dried cabbage residues on chemical characteristics of five soils from three states of Mexico.

Localidad	pH en H ₂ O		pH en KCl		pH dil 1:10		C. E. dil 1:10		N asim ppm		P asim ppm		K asim ppm		% MO	
	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR	SR	CR
Veracruz	7.84	7.76	7.02	7.02	8.24	7.89	0.25	0.45	41.46	40.24	53.86	52.69	627.2	940.8	1.87	3.73
V. Arista 1	7.86	7.64	7.11	7.05	8.18	7.87	0.32	0.35	65.85	68.29	18.9	57.3	1344	1545	1.09	2.9
V. Arista 2	8.15	7.91	7.43	7.38	8.49	7.97	0.15	0.58	39.02	93.9	17.72	20.76	1187.2	1433.6	2.82	1.8
Zacatecas 1	6.79	6.2	5.69	5.62	7.27	6.77	0.15	0.73	39.024	136.58	16.06	19.23	560	940.8	2.96	2.96
Zacatecas 2	7.85	7.67	7.25	7.24	7.9	7.01	0.12	0.62	34.14	119.51	28.58	26.72	672	1008	2.185	4.32
Promedio	7.698	7.436	6.900	6.862	8.016	7.502	0.198	0.546	43.899	91.704	27.024	35.340	878.080	1173.640	-1.57	3.142
t calculado	3.029		2.728		5.015		-3.42		-2.311		-1.095		-9.213		2.365	
T crítico	2.776		2.776		2.776		2.78		2.776		2.776		2.776		0.161	
P(T≤t)	0.039		0.053		0.007		0.026		0.082		0.335		0.0007			

Las diferencias estadísticas se establecieron con la prueba t de Student.

t: estadístico t de Student calculado

T: estadístico t de Student crítico

P: probabilidad de la prueba de t de Student

Cada cifra representa el promedio de tres repeticiones.

SR: suelo sin residuos deshidratados de col

CR: suelo con residuos deshidratados de col

V. Arista 1 y V. Arista 2 son suelos de San Luis Potosí

los suelos en estudio existan especies microbianas diferentes, sin embargo, se puede inferir que en general los microorganismos de los suelos tratados con RDC produjeron algunas sustancias que amortiguaron el incremento de pH y por ello, este siempre fue más bajo con relación al testigo, por ejemplo, los procesos de mineralización de la materia orgánica por la mayor biomasa microbiana implica una disminución del pH de la solución del suelo por una mayor liberación de CO₂. A esto habrá que sumar también la influencia de ácidos orgánicos en el suelo producidos por las altas poblaciones de *Bacillus* y *Pseudomonas* (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010). Solamente en el suelo Zacatecas 1 adicionado con RDC, al inicio y hasta el día 12, el pH fue mayor al del

soils with DCR also increased the available nitrogen content (P = 0.082) and available potassium (P = 0.0007). The first increased markedly in the soils: Villa de Arista 2 (140.64 %) and Zacatecas 1 and 2 (250 %), and consequently there was a significant increase (P = 0.026) in the electric conductivity (Table 2). Potassium significantly increased in most soils, especially in Zacatecas 1 (68 %) and 2 (50 %). Phosphorus increased in lower ratio in three of the soils under study without observing significant differences (P = 0.335) between controls and the ones with DCR application. In general, DCR provided nitrogen and potassium (Table 2); Morra and Johnson-Maynard (2003) cited by Brown and Morra (2005) indicated that the cruciferous tissues are a source of available nitrogen. On the other hand, Escandon

testigo, no obstante, después disminuyó (Figura 4D); sin embargo, las diferencias no fueron significativas y esto se podría atribuir a que las especies microbianas de este suelo no liberan metabolitos que incidan sobre el pH. El efecto de las enmiendas orgánicas sobre el pH es muy heterogéneo, por ejemplo Contreras *et al.* (2005), evaluaron la adición de gallinaza y vermicomposta de ganado bovino a dos suelos con pH contrastantes, suelo (a) pH 6.2 y suelo (b) pH 3.4. La gallinaza aumentó el pH de 6.2 a 7.2, y de 3.4 a 4.1, pero con vermicomposta el pH del suelo (a) se incrementó de 6.2 a 6.9, y en el suelo (b) disminuyó de 3.4 a 3.3. Nico *et al.* (2003) determinaron que la incorporación de alfalfa enfiada y harina de pescado a un suelo con pH de 6.0, incrementó los valores a pH 7.6 y 8.2 respectivamente; en cambio con composta de champiñón se mantuvo el pH en 6.0. En las investigaciones citadas, el pH se registró al inicio y al final del tratamiento, mientras que en el presente trabajo el pH se midió a diferentes tiempos y se encontró que los cambios no son constantes. El efecto heterogéneo de las enmiendas orgánicas sobre el pH del suelo fue corroborado por Tenuta y Lazarovits (2002b), que observaron inconsistencias en los resultados obtenidos tras la aplicación de enmiendas orgánicas ricas en nitrógeno en diferentes suelos, llegando a la conclusión de que los factores que influyen en el pH son los componentes orgánicos de la enmienda y las características del suelo como la capacidad de intercambio catiónico, el contenido de materia orgánica, la humedad y la densidad aparente. En los suelos con RDC también se incrementó el contenido de nitrógeno asimilable ($P = 0.082$) y potasio asimilable ($P = 0.0007$). El primero aumentó notablemente en los suelos de Villa de Arista 2 (140.64 %) y Zacatecas 1 y 2 (250 %), y en consecuencia hubo un incremento significativo ($P = 0.026$) en la conductividad eléctrica (Cuadro 2). El potasio aumentó considerablemente en la mayoría de los suelos, especialmente en Zacatecas 1 (68 %) y 2 (50 %). El fósforo se incrementó en menor proporción en tres de los suelos estudiados, no observándose diferencia significativa ($P = 0.335$) entre testigos y la aplicación de RDC. En general, los RDC aportaron nitrógeno y potasio (Cuadro 2), Morra y Johnson-Maynard (2003) citados por Brown y Morra (2005) indican que los tejidos de crucíferas son fuente de nitrógeno asimilable. Por su parte Escandón (2007), obtuvo plantas de *Kalanchoe blossfeldiana* con excelente porte, cantidad de follaje y color, cuando fueron cultivadas en sustrato adicionado con RDC.

El análisis microbiológico de los cinco suelos con RDC2 reveló que no hubo crecimiento de microorganismos en las placas de PDA acidulado, ni antes ni después de la adición de los RDC, esto sugiere que la microflora de dichos suelos no es tolerante al pH ácido de 3.5. En el Cuadro 3 se presentan las poblaciones microbianas cultivables en PDA no acidulado (pH 5.5) y en YPGA (pH 7.1). Se aprecia que la microflora natural en todos los suelos está constituida principalmente por bacterias, solamente en el suelo Veracruz se aislaron hongos en YPGA y en el de Villa de Arista 2 en PDA, pero con poblaciones menores a la de las bacterias. En todos los suelos tratados con RDC, las ufc de hongos y bacterias g^{-1} de suelo fueron mayores con respecto

(2007), obtained *Kalanchoe blossfeldiana* plants with excellent size, amount of foliage and color, when they were grown in substrate supplemented with DCR.

Microbiological analysis of the five soils with DCR2 showed no microorganisms growth in acidulated PDA plates, before or after addition of the DCRs, suggesting that microflora in such soils is not tolerant to acidic pH (3.5). Table 3 shows the cultivable microbial populations in non-acidified PDA (pH 5.5) and in YPGA (pH 7.1). It can be observed that the natural microflora in all soils is mainly composed by bacteria, except in the Veracruz soil where fungi were isolated in YPGA and in Villa de Arista 2 in PDA, but with smaller populations than bacteria. In all soils treated with DCR, the cfu of fungus and bacteria g^{-1} soil were higher than the control; and the increase of bacterial populations was significantly high for both acidophilic ($P < 0.01$) and for neutrophils ($P < 0.01$) (Table 3). This coincides with Castro *et al.* (1999) report, that after 25 d of adding 1 % DCR to a soil, they registered bacteria increase from 13.8×10^6 to 41×10^6 cfu, and for fungi from 7.5×10^4 to 16.8×10^4 cfu. Ramírez-Villapudua and Munnecke (1987, 1988) reported that the bacterial population increased 16 times in soils treated with 1 % DCR, and Cohen *et al.* (2005) found increments of two logarithmic units in bacterial populations in two weeks after the addition of residues of *Brassica napus*, with predominance of *Streptomyces* sp. The DCR incorporated, also contributed with fungi to those soils where they were not detected at the beginning of the experiment, and in those that were present, the populations increased, particularly *Penicillium*. Again *Bacillus* and *Pseudomonas* predominated, which were not observed in the controls. On the other hand, fungi isolated in three of the soils lacking of them before treatment with DCR, corresponded to *Penicillium* and *Aspergillus*, these same genders have been isolated by Castro *et al.* (1999) in soils treated with DCR. The prevalence of bacterial species in soils with and without DCR is related to the dynamics of pH in both soils, as it favored bacterial populations and a few fungi populations. Also in soils with added organic amendments, organic matter content is higher and it induces an increase in microbial activity, which results in higher biomass, but depending on the amendment it may increase or decrease the species diversity, so that some amendments can define preferential development of species more adapted to the nutritional source consumption (Kwasna *et al.*, 2000). Therefore, based on this discussion, it can be deduced that with cabbage residues not only microflora increases in soils, but also new bacterial and fungal populations are incorporated or induced which can be antagonists, and hyperparasitism is favored (Villar *et al.*, 1990); hence, in an indirect way, organic amendments have also been used for biological control of SPP (Bello *et al.*, 2000; Osorio *et al.*, 2005). In a first stage, when applying DCR to the soil, different isothiocyanates are provided mainly for a natural chemical treatment of the pathogens, and these can also be affected by changes in pH, then antagonistic microbiota reduces reinfections (Castro *et al.*, 1999), and lastly N and K are provided for an improved plant growth. Díez-Rojo *et al.* (2010) reported that the DCR and

Cuadro 3. Efecto de los residuos deshidratados de col sobre la población de bacterias y hongos cultivables, en cinco suelos procedentes de tres estados de México.

Table 3. Effect of dried cabbage residues on the populations of cultivable bacteria and fungi in five soils from three states of Mexico.

Suelo	Microflora inicial PDA - ufc g ⁻¹	Microflora final PDA - ufc g ⁻¹	Microflora inicial YPGA - ufc g ⁻¹	Microflora final YPGA - ufc g ⁻¹
Veracruz	B: 150 x 10 ⁶	B: 30 x 10 ⁸	B: 76 x 10 ⁶ H: 1 x 10 ⁴	B: 36 x 10 ⁸ H: 1 x 10 ⁶
V. Arista 1	B: 6 x 10 ⁶	B: 25 x 10 ⁸ H: 3 x 10 ⁴	B: 30x 10 ⁵	B: 30 x 10 ⁸ H: 1 x 10 ⁴
V. Arista 2	B: 6 x 10 ⁶ H: 7 x 10 ⁵	B: 36 x 10 ⁸ H: 10 x 10 ⁶	B: 20 x 10 ⁶	B: 30 x 10 ⁸ H: 2 x 10 ⁴
Zacatecas 1	B: 100 x 10 ⁶	B: 35 x 10 ⁸ H: 23 x 10 ⁶	B: 100 x 10 ⁶	B: 30 x 10 ⁸
Zacatecas 2	B: 150 x 10 ⁶	B: 32 x 10 ⁸ H: 7 x 10 ⁴	B: 12 x 10 ⁶	B: 28 x 10 ⁸ H: 6 x 10 ⁴
Promedio t calculado T crítico	B: 8.24 x 10 ⁷ -157488123 2.77644511	B: 3.16 x 10 ⁹	B: 4.22 x 10 ⁷ -23.9120956 2.77644511	B: 3.08 x 10 ⁹
P (T ≤ t)	9.4968 x 10 ⁻⁵		1.814 x 10 ⁻⁵	

Las diferencias estadísticas para las poblaciones bacterianas se establecieron con la prueba t de Student.

t: estadístico t de Student calculado

T: estadístico t de Student crítico

P: probabilidad de la prueba t de Student

Cada cifra representa el promedio de tres repeticiones.

B: Bacterias

H: Hongos

V. Arista 1 y V. Arista 2 son suelos de San Luis Potosí

al testigo; y el incremento de las poblaciones bacterianas fue altamente significativo tanto para las acidófilas ($P < 0.01$) como para las neutrófilas ($P < 0.01$) (Cuadro 3). Esto coincide con los resultados de Castro *et al.* (1999), que después de 25 d de haber adicionado RDC al 1% a un suelo, determinaron incrementos de 13.8×10^6 a 41×10^6 ufc de bacterias, y de 7.5×10^4 a 16.8×10^4 ufc de hongos. Ramírez-Villapudua y Munnecke (1987, 1988) reportan que la población bacteriana se incrementó 16 veces en suelos tratados con RDC al 1%, y Cohen *et al.* (2005) encontraron incrementos de dos unidades logarítmicas en las poblaciones de bacterias en dos semanas posteriores a la adición de residuos de *Brassica napus*, con predominio de *Streptomyces* sp. Los RDC incorporados, además aportaron hongos en aquellos suelos donde éstos no fueron detectados al inicio del experimento, y en los que estuvieron presentes, se incrementaron las poblaciones, en particular de *Penicillium*. Nuevamente predominaron los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, los cuales no se registraron en los testigos. Por otro lado, los hongos que se aislaron en tres de

other agro-industrial residues are an alternative to replace chemical fumigants, in particular methyl bromide that favors the destruction of the ozone layer and it is an environmental toxic pollutant. Some studies show that with the biodisinfection and biological control of the SPP with DCR and other organic amendments, the crop profitability is higher, because expenses are reduced in cost and application of synthetic fungicides, besides they do not affect health workers in the field (Castro *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2008)

CONCLUSIONS

The microflora associated to dehydrated cabbage residues consisted primarily of *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp.

Bacillus, *Pseudomonas*, *Penicillium* and *Alternaria* remained viable in dehydrated cabbage residues during five years if stored in a dry environment.

Dehydrated cabbage residues favored, and increased in soils, the microbial populations constituted mainly of

los suelos carentes de ellos antes del tratamiento con RDC, correspondieron a *Penicillium* y *Aspergillus*, estos mismos géneros fueron aislados por Castro *et al.* (1999), en suelos tratados con RDC. El predominio de especies bacterianas en los suelos con y sin RDC, tiene relación con la dinámica del pH en ambos suelos, éste favoreció a las poblaciones de bacterias y a unas cuantas de hongos. Asimismo en los suelos adicionados con enmiendas orgánicas, el contenido de materia orgánica es mayor y ésta induce un incremento en la actividad microbiana, la cual se traduce en una mayor biomasa, pero dependiendo de la enmienda se puede aumentar o disminuir la diversidad de especies, de tal forma que algunas enmiendas pueden definir el desarrollo preferencial de aquellas especies más adaptadas al consumo de la fuente nutricional (Kwasna *et al.*, 2000). Por lo anterior se deduce que con los residuos de col no solo se incrementa la microflora en los suelos, sino que también se incorporan o se inducen nuevas poblaciones fúngicas y bacterianas que pueden ser antagonistas, y se favorece el hiperparasitismo (Villar *et al.*, 1990); por ello de manera indirecta las enmiendas orgánicas también se han utilizado para el control biológico de FHS (Bello *et al.*, 2000; Osorio *et al.*, 2005). Al aplicar RDC al suelo, en una primera fase se aportan principalmente diversos isotiocianatos para un tratamiento químico natural de los fitopatógenos, además éstos también pueden ser afectados por las variaciones de pH que se producen, posteriormente la microbiota antagonista reduce las reinfecciones (Castro *et al.*, 1999), y finalmente se proporciona N y K para un mejor crecimiento de las plantas. Díez-Rojo *et al.* (2010), señalan que los RDC y otros residuos agroindustriales son una alternativa para sustituir a los fumigantes químicos, en particular al bromuro de metilo que favorece la destrucción de la capa de ozono y es un contaminante tóxico ambiental. Algunos estudios muestran que con la biodesinfección y control biológico de los FHS con RDC y otras enmiendas orgánicas, la rentabilidad de los cultivos es mayor, debido a que se reducen gastos en el costo y aplicación de los fungicidas sintéticos, y además no se afecta la salud de los trabajadores del campo (Castro *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

La microflora asociada a los residuos deshidratados de col estuvo constituida principalmente por *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. y *Rhizopus* sp.

Bacillus, *Pseudomonas*, *Penicillium* y *Alternaria* permanecieron viables en los residuos deshidratados de col por cinco años, conservados en un ambiente seco.

Los residuos deshidratados de col favorecieron e incrementaron en los suelos, poblaciones microbianas constituida principalmente por *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.

Los residuos deshidratados de col adicionados a un suelo estéril aumentaron significativamente el pH de 7.57 a 8.79; sin embargo en cuatro de cinco suelos sin esterilizar, con su microflora nativa, promovieron la variación dinámica del pH, con valores significativamente menores a los de los testigos y fluctuaron entre 7.33 y 8.24; además

Bacillus sp., *Pseudomonas* sp., *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp.

Dehydrated cabbage residues added to a sterile soil significantly increased pH from 7.57 to 8.79; however, in four out of five non-sterile soils with their native microflora, promoted dynamic variation of pH, with values significantly lower than the controls and they oscillated between 7.33 and 8.24; additionally, they increased nitrogen and potassium content.

Acknowledgements. This article is published thanks to the financial resources of the PIFI 2012 program of the UASLP.

LITERATURACITADA.

- Alexopoulos C, Mims C and Blackwell M. 1996. Introductory Micology. Fourth Edition. John Wiley and Sons. New York, U.S. 869p.
- Alonso RR, Barranco MB, Gracia RG y Jiménez MG. 2002. Actividad in vivo de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 66:45-48.
- Atlas R y Barttha L. 2005. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. 677p.
- Baker KF and Cook RJ. 1974. Biological Control of Pathogens. W.H. Freeman Company. San Francisco, U.S. 433p.
- Barnett H and Hunter B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company. Minnesota, U.S. 241p.
- Barer MR and Harwood CR. 1999. Bacterial viability and culturability. Advances in Microbial Physiology 41:93-137.
- Bello A, López-Pérez JA, Díez-Rojo MA, López-Cepero J, García-Álvarez A. 2008. Principios ecológicos en la gestión de los agrosistemas. Arbor, Ciencia, Pensamiento y Cultura 729:19-29.
- Bello A, López-Pérez JA, Sanz R, Escuer M and Herrero J. 2000. Biofumigation and organic amendments. Pp 113-141. In: United Nations Environment Programme (eds). Methyl Bromide Alternatives for North Africa and Southern European Countries. UNEP, French. 244p.
- Brown J and Morra MJ. 2005. Glucosinolate-Containing Seed Meal as a Soil Amendment to Control Plant Pest. National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy. 99p.
- Brown PD and Morra MJ. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. Advances in Agronomy 61:167-231.
- Brown PD, Morra MJ, McCaffrey JP, Auld DL and Williams L III. 1991. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. Journal of Chemical Ecology 17:2021-2034.
- Calbrix R, Barray S, Chabrierie O, Fourrie L and Laval K. 2007. Impact of organic amendments on the dynamics of soil microbial biomass and bacterial communities in cultivated land. Applied Soil Ecology 35:511-522.
- Castro RR, Herrera IL, Suárez CN, Perera AT y Mesa JT.

incrementaron el contenido de nitrógeno y potasio.

Agradecimientos. Este artículo se publica gracias a los recursos financieros del programa PIFI 2012 de la UASLP.

1999. Efecto de los residuos de col seca (*Brassica oleracea* L.) con cobertor plástico transparente sobre la supervivencia de *Sclerotium rolfii* Sacc. en semilleros de tabaco. Centro Agrícola 3:5-11.
- Coelho L, Chellemi DO and Mitchell DJ. 1999. Efficacy of solarization and cabbage amendment for the control of *Phytophthora* spp. in North Florida. Plant Disease 83:293-299.
- Cohen MF, Yamasaki H and Mazzola M. 2005. *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. Soil Biology and Biochemistry 37:1215-1227.
- Contreras BF, Paolini J y Rivero C. 2005. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas sobre la actividad de las enzimas fosfomonoesterasa ácida y arilsulfatasa en suelos del municipio Rivas Dávila (estado Mérida). Revista Facultad de Agronomía (Maracay) 31:53-66.
- Cook R and Baker KF. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S. 539p.
- Cowan ST, Steel KJ, Barrow GI and Feltham RK. 1993. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Third Edition. Cambridge University Press. New York, U. S. 331p.
- Díez-Rojo MA, López-Pérez JA, Urbano-Terrón P y Bello A. 2010. Biodesinfección de Suelos y Manejo Agronómico. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España. 407p.
- Elad Y, Chet I and Katan J. 1980. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70:119-121.
- Escandón M A. 2007. Diagnóstico y manejo biológico de patógenos radicales asociados a la especie ornamental *Kallanchoe blossfeldiana* Poelln. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Agronomía.
- Escobar EN, Mora DJ y Romero JNJ. 2012. Identificación de poblaciones microbianas en compost de residuos orgánicos de fincas cafeteras de Cundinamarca. Boletín Científico Museos de Historia Natural 16:75-88.
- Gamliel A and Stapleton JJ. 1993. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. Phytopathology 83:899-905.
- Gardiner JB, Morra MJ, Eberlein CV, Brown PD and Borek V. 1999. Allelochemicals released in soil following incorporation of rapeseed (*Brassica napus*) green manures. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47:3837-3842.
- Gimsing AL and Kirkegaard JA. 2006. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of *Brassica* biofumigants. Soil Biology and Biochemistry 38:2255-2264.
- Guédez C, Cañizalez LM, Castillo C y Olivar R. 2009. Microflora asociada a dos sustratos orgánicos y su efecto en el control de *Rhizoctonia solani* Kühn. Agronomía Colombiana 27:395-399.
- Hoitink HAJ and Boehm MJ. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-depend phenomenon. Annual Review of Phytopathology 37:427-446.
- Insam H, Franke-Whittle I and Goberna M. 2010. Microbes at Work from Wastes to Resources. Springer. Heidelberg, Germany. 350p.
- Kirkegaard JA and Sarwar M. 1998. Biofumigation potential of *brassicas*. I. Variation in plant glucosinolate profiles of diverse field grown *brassicas*. Plant and Soil 201:71-89.
- Kwasna H, Sierota Z and Bateman GL. 2000. Fungal communities in fallow soil before and after amending with pine sawdust. Applied Soil Ecology 14:177-182.
- Lazarovits G, Conn KL, Abbasi PA and Tenuta M. 2005. Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens. Acta Horticulturae 689:215-224.
- Lazzeri L, Leoni O and Manici LM. 2004. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. Industrial Crops and Products 20:59-65.
- Matthiessen JN and Shackleton MA. 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. Pest Management Science 61:1043-1051.
- Mayton HS, Oliver C, Vaughn SF and Loria R. 1996. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. Phytopathology 86:267-271.
- Mojtahedi H, Santo GS, Hang AN and Wilson JH. 1991. Suppression of root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure. Journal of Nematology 23:170-174.
- Monreal V CT. 2008. Diagnóstico de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en jitomate y chile mediante técnicas moleculares. Claridades Agropecuarias 173:26-34.
- Morra MJ and Kirkegaard JA. 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. Soil Biology and Biochemistry 34:1683-1690.
- Motisi N, Montfort F, Doré T, Romillac N and Lucas P. 2009. Duration of control of two soilborne pathogens following incorporation of above- and below-ground residues of *Brassica juncea* into soil. Plant Pathology 58:470-478.
- Muehlchen AM, Rand RE and Parke JL. 1990. Evaluation of crucifer green manures for controlling *Aphanomyces* root-rot of peas. Plant Disease 74:651-654.
- Nico AI, Mónaco CI, Dal Bello G y Alippi H. 2005. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: II. Microflora asociada y antagonismo in vitro de los

- aislados más frecuentes. Revista de Investigaciones Agropecuarias 34:29-44.
- Nico AI, Mónaco CI, Dal Bello G y Alippi H. 2003. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: test de patogenicidad y actividad biológica de metabolitos volátiles y difusibles. Revista de Investigaciones Agropecuarias 32:173-192.
- Njoroge SMC, Riley MB and Keinath AP. 2008. Effect of incorporation of *Brassica* spp. residues on population densities of soilborne microorganisms and on damping-off and *Fusarium* wilt of watermelon. Plant Disease 92:287-294.
- Oliver JD. 2005. The viable but non culturable state in bacteria. Journal of Microbiology 43:93-100.
- Osorio-Nila MA, Vázquez-García LM, Salgado-Siclán ML y González-Esquivel CE. 2005. Efecto de dos enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. para controlar *Sclerotinia* spp. en lechuga. Revista Chapingo Serie Horticultura 11:203-208.
- Paredes-Mendoza M y Espinosa-Victoria D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos: una revisión crítica. Terra Latinoamericana 28:61-70.
- Ramírez-Villapadua J and Munnecke DE. 1988. Effect of solar heating and soil amendment of cruciferous residues on *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and other organisms. Phytopathology 78:289-295.
- Ramírez-Villapadua J and Munnecke DE. 1987. Control of cabbage yellow (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) by solar heating of field soil amended with dry cabbage residues. Plant Disease 71:217-221.
- Reeuwijk LP van. 2002. Procedure for Soil Analysis. 6th Edition. International Soil Reference and Information Centre/FAO. Wageningen, The Netherlands 40p.
- Smolinska U, Morra MJ, Knudsen GR and Brown PD. 1997. Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassica napus* seed meal to wards *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi*. Phytopathology 87:77-82.
- Snapp SS, Date KU, Kirk W, O'Neil K, Kremen A and Bird G. 2007. Root, shoot tissues of *Brassica juncea* and Cereal secale promote potato health. Plant and Soil 294:55-72.
- Tenuta M and Lazarovits G. 2004. Soil properties associated with the variable effectiveness of meat and bone meal to kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Applied Soil Ecology 25:219-236.
- Tenuta M and Lazarovits G. 2002a. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 92:255-264.
- Tenuta M and Lazarovits G. 2002b. Identification of specific soil properties that affect the accumulation and toxicity of ammonia to *Verticillium dahliae*. Canadian Journal of Plant Pathology 24:219-229.
- Tsao PH and Oster JJ. 1981. Relation of ammonia and nitrous acid to suppression of *Phytophthora* in soil amended with nitrogenous organic substances. Phytopathology 71:53-59.
- Villar LRC, Zavaleta-Mejía F y García ER. 1990. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas (*Brassicaceae*) sobre fitopatógenos del suelo, II. Efecto de la incorporación de col y brocoli sobre la pudrición blanda (*Sclerotium cepivorum* Berk) de la cebolla, bajo condiciones de invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 8:160-169.
- Wakelin SA, Sivasithamparam K, Cole ALJ and Skipp RA. 1999. Saprophytic growth in soil of a strain of *Trichoderma koningii*. New Zealand Journal of Agricultural Research 42:37-45.
- Zasada IA, Ferris H, Elmore CL, Roncoroni JA, MacDonald JD, Bolkan LR and Yakabe LE. 2003. Field application of brassicaceous amendments for control of soilborne pests and pathogens. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2003-1120-01-RS.