

Efecto de diferentes medios de cultivo en el crecimiento y la actividad antifúngica de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5

Mileidy Cruz-Martín^{1*}, <https://orcid.org/0000-0003-3825-499X>

Ernesto Rocha-Rodríguez², <https://orcid.org/0000-0003-0729-7516>

Mayra Acosta-Suárez¹, <https://orcid.org/0000-0002-1256-5688>

Eloísa Rodríguez¹, <https://orcid.org/0000-0003-1831-9012>

Tatiana Pichardo¹, <https://orcid.org/0000-0001-9416-2649>

Berkis Roque¹, <https://orcid.org/0000-0003-4969-2047>

Yelenys Alvarado-Capó¹, <http://orcid.org/0000-0003-1721-717X>

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

*Autora para correspondencia e-mail: mileidy@ibp.co.cu

RESUMEN

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) son cultivos que requieren abundante fertilización y son afectados por numerosas plagas y enfermedades, entre ellas la Sigatoka negra. En estudios previos se demostró el potencial de la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 para el control *in vitro* y en casa de cultivo de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet y estimular el crecimiento de plantas de *Musa* spp. Aún se requiere de varios estudios para desarrollar un bioproducto a base de esta cepa. Por ello, en esta investigación se propone como objetivo determinar el efecto de diferentes medios de cultivo en el crecimiento y la actividad antifúngica de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5. Se emplearon dos medios de cultivo elaborados con subproductos industriales, en los cuales se evaluó la cinética de crecimiento de la cepa y el efecto de filtrados de cultivo (FC) en la inhibición del crecimiento de *Pseudocercospora fijiensis*. La cepa bacteriana fue capaz de crecer en ambos medios de cultivo y se observó inhibición del crecimiento fúngico por todos los FC. Los FC obtenidos en Caldo Soya-Quitina produjeron mayor inhibición del crecimiento respecto a los FC obtenidos en Caldo Soya-Melaza. Se concluye que el medio de cultivo Caldo Soya-Quitina pudiera ser el más indicado para la elaboración de un bioproducto a partir de *B. pumilus* CCIBP-C5.

Palabras clave: bioproducto, control biológico, fermentación, *Pseudocercospora fijiensis*

Effect of different culture media on the growth and antifungal activity of *Bacillus pumilus* CCIBP-C5

ABSTRACT

Plantains and bananas (*Musa* spp.) are crops that require abundant fertilization and are affected by numerous pests and diseases, including Black Sigatoka. Previous studies demonstrated the potential of the *Bacillus pumilus* strain CCIBP-C5 for the *in vitro* and greenhouse control of *Pseudocercospora fijiensis* Morelet and to stimulate the growth of *Musa* spp. Several studies are still required to develop a bioproduct based on this strain. For this reason, this research aims to determine the effect of different culture media on the growth and antifungal activity of *Bacillus pumilus* CCIBP-C5. Two culture media made with industrial by-products, in which the growth kinetics of the strain and the effect of culture filtrates (FC) on the growth inhibition of *Pseudocercospora fijiensis* were evaluated. The bacterial strain was able to grow in both culture media and inhibition of fungal growth was observed in all FCs. The FC obtained in Soy-Chitin Broth produced greater growth inhibition compared to the FC obtained in Soy-

Molasses Broth. It is concluded that the Soy Broth-Chitin culture medium could be the most indicated for the elaboration of a bioproduct from *B. pumilus* CCIBP-C5.

Keywords: bioproduct, biological control, fermentation, *Pseudocercospora fijiensis*

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) son cultivos de gran importancia para la alimentación a nivel mundial y la economía de países subdesarrollados exportadores de estos productos. En Cuba, poseen gran significación y representan un alto por ciento de las producciones de viandas (Minag, 2018). Sin embargo, estos cultivos tienen exigencias en cuanto a fertilización (Robinson, 1996) y son afectados por plagas y enfermedades que limitan las producciones (Alarcón-Restrepo y Jiménez-Neira, 2012). Entre estas enfermedades, una de las más destructivas es la Sigatoka negra, causada por *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton.

El uso de bioproductos de origen microbiano constituye una de las alternativas más alentadoras para el desarrollo de una agricultura sostenible. Un grupo de microorganismos ampliamente empleados para este propósito son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Sharma *et al.*, 2020). En especial, las bacterias del género *Bacillus* son reconocidas por su versatilidad para estimular el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos y por su capacidad para formar estructuras de resistencia (Shafi *et al.*, 2017; Fira *et al.*, 2018). Estos atributos resultan deseables para desarrollar bioproductos más eficientes y duraderos.

En varios estudios realizados en el Instituto de Biotecnología de las Plantas, se aislaron y caracterizaron *Bacillus* de la filosfera de *Musa* spp. (Cruz-Martín *et al.*, 2016). En particular destaca la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP-C5, la cual constituye un agente eficaz para el control *in vitro* y en casa de cultivo de *P. fijiensis* y estimula el crecimiento en *Musa* spp. en casa de cultivo (Cruz-Martín *et al.*, 2015).

A partir de esta cepa bacteriana se pudieran desarrollar bioproductos para la protección y el crecimiento de *Musa* spp. Para comenzar, se requiere establecer la tecnología de fermentación de la cepa. Se conoce que los procesos de fermentación a gran escala son muy costosos, por tal razón, el desarrollo del

proceso de producción de un bioproducto se inicia, a nivel laboratorio, con la optimización de un medio de cultivo y el estudio de otras variables (Serrano-Carreón y Galindo-Fentanes, 2007). La meta es lograr la máxima producción posible con el menor costo, lo cual se puede lograr en gran medida usando productos de bajo costo como sustratos (Montesinos, 2003). Otro aspecto a optimizar es la eficacia del biocontrol (Slininger *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta la necesidad de optimizar el proceso de fermentación a partir de la cepa *B. pumilus* CCIBP-C5, la presente investigación estuvo encaminada a contribuir a este propósito mediante el aporte de medios de cultivo elaborados a base de subproductos industriales. Por ello, se propuso como objetivo determinar el efecto de diferentes medios de cultivo en el crecimiento y la actividad antifúngica de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de microorganismos

Bacillus pumilus CCIBP-C5, aislada de la filosfera del cultivar FHIA-18 (*Musa* AAAB).

En todos los experimentos de actividad antifúngica se emplearon suspensiones miceliales de *Pseudocercospora fijiensis* CCIBP-Pf-83. La suspensión micelial se obtuvo a partir de un cultivo de *P. fijiensis* en Caldo Papa Dextrosa (PDB) (Fluka) incubado durante 15 días en agitación a 120 rpm y 28 °C (Zaranda termostataada, Fly-1111B). Se decantó el medio de cultivo, se homogeneizó el micelio con medio de cultivo PDB durante un minuto y se ajustó a una concentración de 10⁵ fragmentos de micelio ml⁻¹.

Medios de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo líquidos, los cuales fueron elaborados a partir de subproductos industriales y se denominaron Caldo Soya-Melaza (SM) y Caldo Soya-Quitina (SQ) teniendo en cuenta sus componentes principales. En el primero se utilizó harina de soya como fuente de nitrógeno y melaza de

caña como fuente de carbono, mientras que en el segundo se utilizó harina soya como fuente de nitrógeno y quitina coloidal como fuente de carbono y para promover la producción de quitinasas. La quitina coloidal fue preparada según Hsu y Lockwood (1975) a partir de quitina procedente del molinado del exoesqueleto de crustáceos. Se empleó harina de soya 2% (m/v), melaza y quitina a 0.1% (m/v). Los medios de cultivo comerciales se prepararon según las instrucciones de los proveedores. Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1.2 atm durante 20 min.

Cinética de crecimiento

Para determinar el efecto de los medios de cultivos en el crecimiento de la cepa se evaluó la cinética de crecimiento durante 72 h de cultivo. Los datos fueron comparados con los obtenidos en Caldo Nutriente (Fluka) (CN) que se empleó como control teniendo en cuenta resultados previos (Cruz-Martín *et al.*, 2015).

Se utilizó como inóculo 100 µl de suspensión bacteriana ($DO_{600}=0.1$, 1.2×10^9 UFC ml⁻¹) preparada en agua estéril a partir de colonias crecidas en AN. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 120 rpm en zaranda (Fly-1111B) durante 72 h. Para evaluar la cinética de crecimiento de la cepa en cada uno de ellos, se realizó el conteo de células viables (unidades formadoras de colonias, UFC). Se emplearon frascos de cultivo de 100 ml de capacidad con 50 ml de medio de cultivo y se incluyeron tres réplicas por tratamiento.

Las tomas de muestras se realizaron bajo condiciones de esterilidad a las 0, 8, 24, 32, 48, 56 y 72 h de iniciado el cultivo. A partir de las muestras se hicieron diluciones decimales en agua destilada estéril y se inocularon 100 µl en placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo AN. Las placas fueron incubadas a 30 °C y oscuridad durante 24 h y se procedió al conteo de colonias. Se utilizaron tres réplicas por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. Los valores de UFC obtenidos en cada medio de cultivo fueron graficados como log (UFC) en función del tiempo. Además, se determinaron los parámetros cinéticos en la fase de crecimiento exponencial según el modelo de regresión lineal: velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación.

Actividad antifúngica de los filtrados de cultivo

Para determinar la actividad antifúngica de la cepa bacteriana en los medios de cultivo propuestos se emplearon cultivos microbianos de 48 y 72 h incubación a 30 °C y oscuridad en SM, y SQ y se compararon con CN. Para obtener los filtrados de cultivo (FC), las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm (Eppendorf 5810R) durante 5 min a 4 °C y luego el sobrenadante fue esterilizado por filtración al vacío donde se emplearon membranas de filtro (0.22 µm, Whatman).

La evaluación de la actividad antifúngica de los FC se realizó por dilución en agar en placa de 24 pocillos. Para esto se preparó medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (DIFCO) fundido (~ 40 °C) al que se le añadió una suspensión micelial de *P. fijiensis* (para una concentración final de 5.0×10^5 fragmentos de micelio ml⁻¹). Se homogenizó la mezcla y se vertió en cada pocillo 900 µl de esta con 100 µl de FC, para una dilución de 1:10 del FC. Los controles para los FC consistieron en el correspondiente medio de cultivo (SQ, SM y CN). Se utilizaron dos réplicas para cada uno de los tratamientos y el experimento se repitió dos veces. Las placas fueron incubadas en oscuridad, a 28 °C durante 120 h. La evaluación se realizó diariamente y consistió en la observación del crecimiento micelial y la comparación visual de este con respecto al FC en CN.

Además, se realizaron las observaciones del micelio de los diferentes tratamientos al microscopio óptico de campo claro (Olympus, 400x). Se describieron los cambios ocurridos en el micelio en presencia de los FC y se compararon con los respectivos controles.

Procesamiento estadístico de los datos

Los datos de la cinética de crecimiento fueron procesados mediante Microsoft Excel para Windows. Los datos se graficaron y se obtuvo la curva de regresión en la fase de crecimiento exponencial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de crecimiento

La cepa *B. pumilus* CCIBP-C5 creció en los medios de cultivo Caldo Soya-Melaza (SM) y Caldo Soya-Quitina (SQ) durante 72 h de incubación. Se

observó turbidez en los medios de cultivo desde las 8 h de incubación y su incremento con el paso del tiempo. El cultivo de microorganismos utilizando fuentes de nutrientes como melaza y soya ha sido demostrado en disímiles estudios (Singh y Satynarayana, 2006; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Al-Bahry *et al.*, 2013). Esto puede deberse al alto contenido nutricional de estos productos y aún más si se trata del cultivo de microorganismos poco exigentes como *Bacillus* spp.

En la curva de crecimiento para cada cultivo se observaron las diferentes etapas del crecimiento de la cepa, siendo similar en los tres (Figura 1). Se pudo apreciar que después de aproximadamente 30 h, la cepa se encontraba en la fase estacionaria en los tres medios de cultivo. Además, se observó que entre las 48 y 56 h se obtuvieron los valores más altos de células viables para cada medio de cultivo y los valores más bajos se observaron en el medio de cultivo SM.

En varios estudios sobre el crecimiento de *Bacillus* spp. para la producción de biomasa o metabolitos se ha empleado la melaza como fuente nutritiva (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). Así mismo, Nápoles *et al.* (2006) demostraron que dos medios de cultivo a base de melaza y soya fueron superiores al medio YEM (*Yeast-Extract-Medium*) en cuanto al crecimiento de una cepa de *Bradyrhizobium* sp. Sin embargo el medio de cultivo con menor cantidad de melaza presentó el máximo

rendimiento, pues refieren que el exceso de sustrato y la presencia de fenoles, pueden inhibir el crecimiento microbiano.

En la tabla 1 se muestran los parámetros de la cinética de crecimiento en la fase de crecimiento exponencial calculados según el modelo de regresión lineal. Se comprobó que la velocidad específica de crecimiento en estos medios de cultivo fue de aproximadamente de 0.1 h^{-1} y el tiempo de generación de 2h. Estos parámetros resultaron mayores en el medio de cultivo SQ y menores SM. El valor de R^2 mayor de 0.95 en los tres medios de cultivo indicó que los datos se ajustan bien el modelo.

Los componentes utilizados en los medios de cultivo se han referido previamente por otros autores. En un estudio realizado por Osorio *et al.* (2008) para la producción de biomasa y renina a partir de *Mucor miehi*, se demostró que en medios de cultivo con melaza y fuentes de N (suero de leche y papa), se produjo mayor cantidad de biomasa respecto el que solo contenía melaza. A pesar de esto, dichos autores no encontraron actividad enzimática en ninguno de los medios con melaza, y atribuyen este resultado a que la gran cantidad de iones en la melaza pueden inhibir la producción de enzimas.

De igual forma, Gomaa (2014) demostró que ciertas sales de amonio y nitratos son mejores fuentes de N para el crecimiento de una cepa de *B. subtilis*.

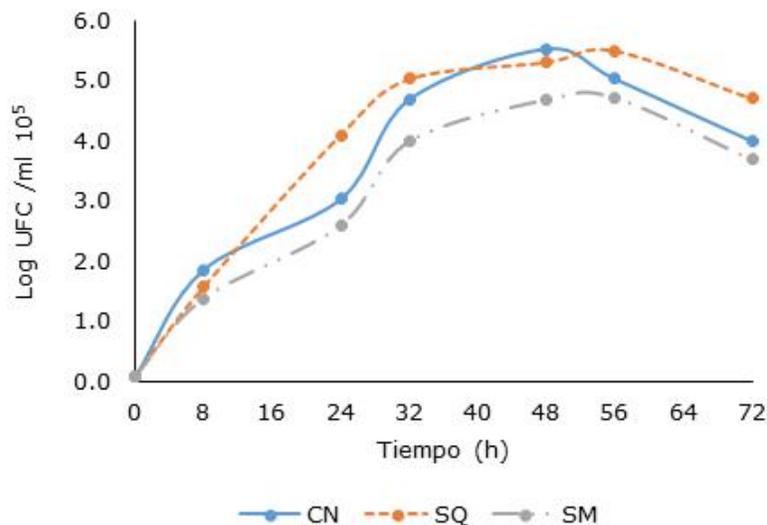


Figura 1. Curva de crecimiento de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 en Caldo Soya-Melaza (SM), Caldo Soya-Quitina (SQ) Caldo Nutriente (CN) durante 72 h de incubación a 30 °C y 120 rpm.

Tabla 1. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 en la fase de crecimiento exponencial en diferentes medios de cultivo, y calculados según el modelo de regresión lineal.

Medio de cultivo	Velocidad específica (h ⁻¹)	Tiempo de generación (h)	R ²
CN	0.1303	2.3256	0.9548
SQ	0.1557	1.9462	0.9950
SM	0.1132	2.6769	0.9735

Caldo Soya-Melaza (SM), Caldo Soya-Quitina (SQ) Caldo Nutriente (CN)

Sin embargo, Chen *et al.* (2010) demostraron que fuentes de N orgánico como el maíz y la soya son mejores para la producción de esporas de *B. subtilis* WHK-Z12 que fuentes de N inorgánico. Si se trata de disminuir los costos en medio de cultivo, las fuentes orgánicas de N son la mejor elección pues son más baratas y se obtienen buenos rendimientos aunque no siempre sean los más altos.

El crecimiento de la cepa CCIBP-C5 en SQ sugiere que la quitina está siendo utilizada como fuente de carbono. Producto de la actividad enzimática se liberan moléculas de N-acetilglucosamina, que pueden ser asimiladas por las células bacterianas para su crecimiento. La presencia de un grupo amino en la molécula de N-acetilglucosamina, convierte a este compuesto en una fuente de alternativa de N, e incrementa así el valor nutritivo de este medio de cultivo en cuanto a la presencia de dicho elemento.

En este sentido, Kishore *et al.* (2005) aplicaron quitina coloidal en conjunto con dos cepas bacterianas quitinolíticas (*Bacillus circulans* y *Serratia marcescens*) para el control biológico de *Paeoisariopsis personata* (Berk. & Curtis) en plantas de maní (*Arachis hypogaea* L.). Estos autores observaron que aumentaba el tiempo de supervivencia de las cepas en la filósfera de dicha planta, lo cual sugiere que la quitina fue utilizada como fuente de carbono.

El crecimiento de la cepa CCIBP-C5 observado en los medios de cultivo SQ, SM indicó que pueden emplearse para la producción de biomasa como alternativa al medio de cultivo CN.

Actividad antifúngica

Con el método empleado se pudo observar la actividad antifúngica de los FC frente *P. fijiensis*. Esta dependió del FC y del tiempo de incubación (Figura 2). Además, se constató que la inhibición del crecimiento no estuvo asociada a los medios de cultivo en sí (controles) y sino a los compuestos producidos en los mismos. El crecimiento del hongo en los dos medios de cultivo fue similar al crecimiento en el CN, por lo que se puede descartar la influencia de estos componentes del medio de cultivo en la actividad antifúngica.

Todos los FC inhibieron el crecimiento de *P. fijiensis*. (Figura 2). Sin embargo, se observaron diferencias en la intensidad de la inhibición. Se constató que la actividad antifúngica de los FC SM fue menor que en los FC CN y que en los FC SQ.

Varios autores (Wang *et al.*, 2002; Kishore, *et al.*, 2005; Ghasemi *et al.*, 2010) observaron que la presencia de quitina en el medio de cultivo incrementó significativamente la actividad antifúngica de cepas de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos. Dichos autores atribuyeron ese resultado a la producción de quitinasas y a su efecto sobre la pared celular de los hongos. Se conoce que las quitinasas al degradar la pared celular de los hongos producen inhibición del crecimiento de las hifas y además estas pueden quedar expuestas a lisis por perturbación osmótica (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). Incluso, además de afectar hifas maduras, son capaces de dañar estructuras resistentes como conidios, clamidosporas y esclerocios (Lorito *et al.*, 1998).

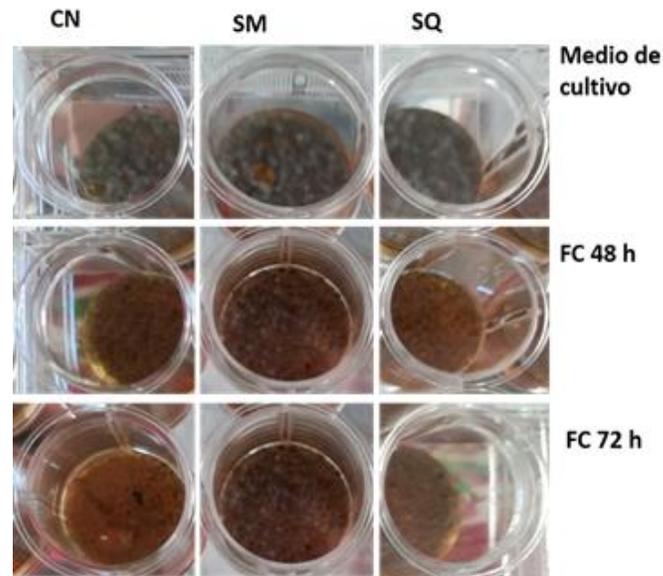


Figura 2. Crecimiento de *Pseudocercospora fijiensis* CCIBP-Pf-83 a los 5 días de incubación en oscuridad a 28°C en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa en presencia de filtrados de cultivo (FC) de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 obtenidos a las 48 y 72 h de incubación en Caldo Nutriente (CN), Caldo Soya-melaza (SM) y Caldo Soya-Quitina (SQ).

Los FC obtenidos a las 72 h de incubación de los medios de cultivo CN y SQ produjeron mayor inhibición del crecimiento fúngico que los respectivos FC obtenidos a las 48 h. No se observaron diferencias entre los dos FC obtenidos en SM. La menor actividad antifúngica en Caldo SM puede deberse a que en este medio de cultivo no existe estímulo para el incremento de la producción de quitinasa y/o a que la alta cantidad de iones de la melaza puede haber inhibido la producción enzimática, tal como se refirió anteriormente. Saima y Roohi (2013) demostraron que ciertos iones, Ca^{++} y Mg^{++} , en el caso de *Aeromonas hydrophila* e Fe^{++} , Mg^{++} y Hg^{++} , en el caso de *Aeromonas punctata*, inhiben la producción de quitinasas.

Además, la presencia de azúcares en la melaza también puede haber inhibido la producción enzimática, pues se conoce que la glucosa actúa como represor de la síntesis de las quitinasas (Monreal y Reese, 1969). Estos autores demostraron que la glucosa inhibía la producción de quitinasas en el cultivo de *Serratia marcescens*. Además, encontraron actividad quitinasa en medios de cultivo con otros componentes como fuente de carbono, sin embargo los resultados eran despreciables en comparación con el incremento de la actividad enzimática ocasionada por la quitina. Resultados

similares fueron obtenidos por Gohel *et al.* (2006) en el cultivo de *Pantoea dispersa*.

En los medios de cultivo SQ y CN se presentó la mayor actividad antifúngica a las 72 h, es decir al finalizar el cultivo. Esto puede deberse a una mayor producción de metabolitos secundarios como los lipopéptidos, en relación con la esporulación al agotarse los nutrientes y acumularse desechos metabólicos. Por ejemplo, Hmidet *et al.* (2017) encontraron mayor producción de lipopéptido de *Bacillus mojavensis* después de las 72 h de incubación. La producción enzimática es mayor durante la fase exponencial, sin embargo, Rahmawati *et al.* (2016) encontraron mayor actividad enzimática en la fase estacionaria. Esto indica que tal vez la actividad enzimática se mantenga en el tiempo contribuya junto a los lipopéptidos a la mayor actividad antifúngica al final del cultivo.

Mediante el análisis microscópico se pudo comprobar que los FC produjeron daños en el micelio de *P. fijiensis*. Ambos FC ocasionaron deformaciones en las hifas, al contrario de los medios de cultivo empleados como control (Figura 3). Se observaron deformaciones como vacuolización e hinchamientos, principalmente en los extremos apicales de las hifas. Además, se pudo observar el vaciado del contenido celular hacia el medio extracelular.

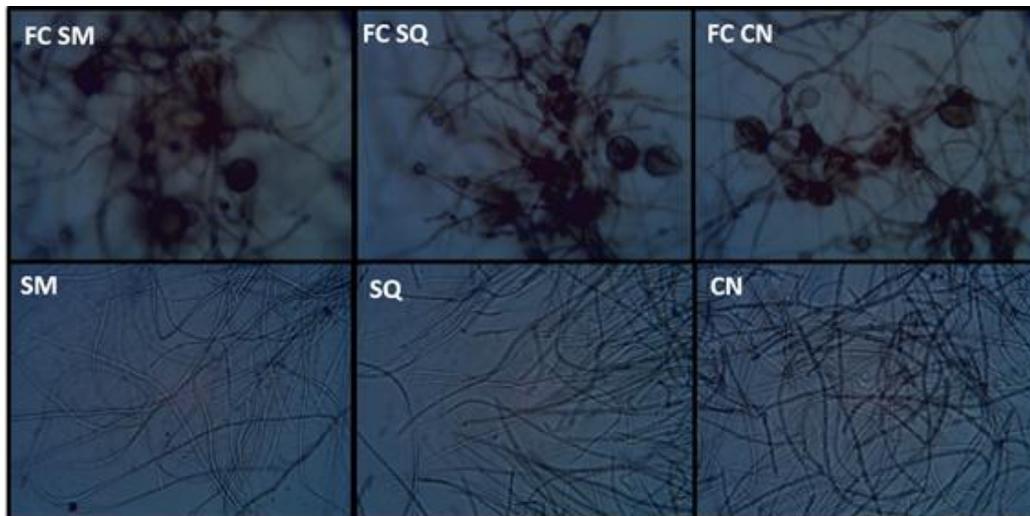


Figura 3. Micelio de *Pseudocercospora fijiensis* CCIBP-Pf-83 en presencia de filtrados de cultivo de la cepa *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 cultivada en Caldo Soya-Melaza (FC SM), Caldo Soya-Quitina (FC SQ) y Caldo Nutriente (FC CN) Controles: Medio de cultivo Caldo Soya-Melaza (SM), Caldo Soya-Quitina (SQ) y Caldo Nutriente (CN). Aumento 400x.

Autores como Ordentlich *et al.* (1988) y Alvarez *et al.* (2011) observaron daños similares en el micelio de hongos fitopatógenos al aplicar FC bacterianos. Estos autores atribuyeron estos resultados a compuestos antifúngicos tipo quitinasa y lipopéptidos, respectivamente.

CONCLUSIONES

Los medios de cultivo Caldo Soya-Melaza y Caldo Soya-Quitina pueden ser utilizados para el crecimiento de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 y la producción de compuestos antifúngicos frente a *P. fijiensis*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue en parte financiado a través del proyecto: Alternativas para la nutrición y protección fitosanitaria de cultivos agrícolas mediante el uso de bioproductos de origen microbiano (código P131LH001316) financiado por el Programa Nacional de Alimento Humano del CITMA. Los financistas no tuvieron participación en el diseño del estudio, la colecta y análisis de los datos. La decisión de publicar o la preparación del manuscrito fue de las instituciones participantes y el colectivo de autores del proyecto.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen intereses personales o financieros que atenten contra los resultados de este trabajo.

Contribución de los autores

Conceptualización MCM, YAC, ERR, Análisis formal MCM, ERR, Investigación ERR, MCM, Metodología ERR, MCM, MAS, TPM, ER, BR, Supervisión MCM, YAC Escritura-Primera redacción MCM, ERR, Escritura-Revisión y Edición MCM, YAC.

REFERENCIAS

Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM, Hassouna Na-H (2008) Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 150(2): 305-325

Al-Bahry SN, Al-Wahaibi YM, ElShaue AE, Al-Bemani AS, Joshi SJ, Al-Makhmari HS, Al-Sulaimani HS (2013) Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation* 81: 141-146

Alarcón-Restrepo JJ, Jiménez-Neira Y (2012) Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (*Musa spp.*), Medidas para la temporada invernal. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá

Alvarez F, Castro M, Príncipe A, Borioli G, Fischer S, Mori G, Jofré E (2011) The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the

- cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology* 112: 159-174
- Cruz-Martín M, Acosta-Suárez M, Roque B, Pichardo T, Castro R, Alvarado-Capó Y (2016) Diversidad de cepas bacterianas de la filósfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología Vegetal* 16(1): 53-61
- Cruz-Martín M, Mena E, Sánchez-García C, Roque B, Acosta-Suárez M, Pichardo T, Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y (2015) The effects of plant growth promoting *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 on 'Grande naine' (*Musa* AAA) plants in acclimatization stage. *Biotecnología Vegetal* 15(3): 151-156
- Chen Z-M, Li Q, Liu H-M, Yu N, Xie T-J, Yang M-Y, Shen P, Chen X-D (2010) Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(5): 1353-1360
- Fira D, Dimkic I, Beric T, Lozo J, Stankovic S (2018) Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology* 285: 44-55
- Ghasemi S, Ahmadian G, Jelodar NB, Rahimian H, Ghandili S, Dehestani A, Shariati P (2010) Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary repor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(8): 1437-1443
- Gohel V, Chaudhary T, Vyas P, Chhatpar HS (2006) Statistical screenings of medium components for the production of chitinase by the marine isolate *Pantoea dispersa*. *Biochemical Engineering Journal* 28: 50-56
- Gomaa EZ (2014) Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) By *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol Brazilian Archives of Biology and Technology 57(1): 145-154
- Hmidet N, Ayed HB, Jacques P, Nasri M (2017) Enhancement of Surfactin and Fengycin Production by *Bacillus mojavensis* A21: Application for Diesel Biodegradation. *BioMed Research International* 2017: 1-8
- Hsu SC, Lockwood JL (1975) Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. *Applied Microbiology* 29(3): 422-426
- Kishore GK, Pande S, Podile AR (2005) Biological Control of Late Leaf Spot of Peanut (*Arachis hypogaea*) with Chitinolytic Bacteria. *Phytopathology* 95(10): 1157-1165
- Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence C, Zoina A, Tuzun S, Scala F (1998) Genes from Mycoparasitic Fungi as a Source for Improving Plant Resistance to Fungal Pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(14): 7860-7865
- Minag (2018) Informe Estadístico, Dirección de la Agricultura, Acumulado hasta diciembre 2018, Consolidado Nacional. MINAG, La Habana
- Monreal J, Reese ET (1969) The chitinase of *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology* 15: 689-696
- Montesinos E (2003) Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology* 6(4): 245-252
- Nápoles MC, Martínez J, Costales D, Gómez G, Somers E (2006) Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii*. *Cultivos Tropicales* 27(1): 35-38
- Ordentlich A, Elad Y, Chet I (1988) The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotinium rolfsii*. *Phytopathology* 78: 84-88
- Osorio A, Gómez N, Sánchez C (2008) Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei*. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia* 45: 17-26
- Rahmawati H, Purnomo AJ, Umniyat S, Pramadi D, Sari N (2016) Identification and characterization of chitinase enzyme producing bacteria from Bat Guano and its potential to inhibit the growth of fungus

- Colletotrichum* sp. cause Anthracnose on the Chili by *in vitro*. Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engg., 3(2): 249-254. <http://dx.doi.org/10.15242/IJAAEE.U0516208>
- Robinson JC (1996) Bananas and Plantains. CAB International, Oxon
- Saima MK, Roohi IZA (2013) Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 11: 39-46
- Serrano-Carreón L, Galindo-Fentanes E (2007) Control Biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. Ciencia 58(1): 77-88
- Shafi J, Tian H, Ji M (2017) *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology & Biotechnological Equipment 31(3): 446-459
- Sharma V, Kaur J, Sharma S (2020) Plant growth promoting rhizobacteria: potential for sustainable agriculture. Biotecnología Vegetal 20(3): 157-166
- Singh B, Satyanarayana T (2006) A marked enhancement in phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* using statistical designs in a cost-effective cane molasses medium. Journal of Applied Microbiology 101: 344-352
- Slininger P, Behle R, Jackson M, Schisler D (2003) Discovery and developmental of biological agents to control crop pests. Neotropical Entomology 32(2): 183-195
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, De Los Santos-Villalobos S (2018) The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 95-130
- Wang S-L, Shih I-L, Liang T-W, Wang C-H (2002) Purification and Characterization of Two Antifungal Chitinases Extracellularly Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(8): 2241-2248

Recibido: 20-12-2020

Aceptado: 19-02-2021

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.