

Evaluación de fuentes de carbono para la producción de metabolitos antifúngicos a partir de *Bacillus sp* cepa VC3

Nayra Ochoa-Viñals^{1*}, Jessica Mendoza-Rodríguez², Evelyn Faife-Pérez¹, Isis Amores-Sánchez¹, Orquídea Coto-Pérez² y Antonio Bell-García¹

1. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba.

*nayra.ochoa@icidca.azcuba.cu

2. Departamento de Biotecnología de los Metales, Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

Calle 25 No. 455, Vedado, La Habana, Cuba.

RESUMEN

En este trabajo se realiza la evaluación del crecimiento de la cepa *Bacillus sp* cepa VC3, la actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Fusarium sporotrichum* F-13, *Fusarium oxysporum* F-44, *Fusarium moniliforme* F-22 y *Fusarium solani* F-29 y la actividad proteolítica, se emplean como fuentes de carbono: glucosa, glicerol, miel final de caña de azúcar y sacarosa. Las evaluaciones arrojaron que los valores superiores en cuanto al crecimiento de la bacteria, la actividad proteolítica y el porcentaje de inhibición, se obtuvieron con el empleo de miel, a pesar de solo alcanzar un valor 1.5 veces menor que alcanzado con el SLC del medio comercial de este último. Puede afirmarse que existe una relación sinérgica entre metabolitos como antibióticos, lipopéptidos y enzimas proteolíticas que, asociados a otros compuestos, causan la inhibición en hongos fitopatógenos. El empleo de la miel de caña de azúcar resulta el sustrato más adecuado para una producción industrial, considerando las ventajas económicas y nutricionales frente a otros medios de cultivos comerciales.

Palabras clave: *Bacillus*, actividad antifúngica, actividad proteolítica.

ABSTRACT

In this work was realized the evaluation of the growth of the strain *Bacillus sp* VC3, the antifungal activity against the phytopathogenic fungi: *Alternaria alternata*, *Fusarium sporotrichum* F-13, *Fusarium oxysporum* F-44, *Fusarium moniliforme* F-22 and *Fusarium solani* F-29 and the proteolytic activity, using as sources of carbon: glucose, glycerol, final sugarcane molassa and sucrose. As a result of the evaluations it was obtained that the higher values regarding the growth of the bacteria, the proteolytic activity and the percentage of inhibition were obtained using molasses, despite only reaching a value 1.5 times lower than reached with the SLC of the commercial medium. It can be said that there is a synergistic relationship between metabolites such as antibiotics, lipopeptides and proteolytic enzymes that, associated with other compounds, cause inhibition in phytopathogenic fungi. We suggest the use of molasses as the most suitable substrate for industrial production considering the economic and nutritional advantages over other commercial cultures media.

Key words: *Bacillus*, antifungal activity, proteolytic activity.

INTRODUCCIÓN

Cada año se pierde una parte de los alimentos por la incidencia de las plagas que atacan los cultivos de interés agroalimentario. El 50 % de las pérdidas son provocadas por organismos cau-

santes de enfermedades o daños en las plantas. El impacto negativo de tales enfermedades en los cultivos incrementa los costos de producción agrícola, por la necesidad de implementar estrategias adicionales para el control de microorganismos patógenos y la disminución de sus efectos sobre las cosechas (1).

Uno de los métodos que más se utilizan para contrarrestar estos males es el uso de agroquímicos. Estos desempeñan un papel decisivo en la reducción de los daños económicos en los cultivos, pero la toxicidad elevada de algunos de ellos, ha generado consecuencias negativas como: la erosión de los suelos, la contaminación de los alimentos, la aparición de cepas resistentes. Su persistencia en el medio y su mal uso han llevado a un replanteamiento de las tácticas de control de plagas (2).

El desarrollo de una agricultura sostenible y más eficiente, así como el conocimiento sobre los peligros asociados al uso de agroquímicos, han conducido al resurgimiento y empleo de microorganismos o sus metabolitos, como agentes de control biológico para uso en la agricultura (3).

Los ecosistemas de serpentina imponen a su microbiota condiciones de vida diferentes a las clasificadas como “normales” por el hombre, en cuanto a las concentraciones de metales pesados y cantidades de nutrientes esenciales que, en ellos, se depositan. Los microorganismos que habitan estos ecosistemas presentan excepcionales adaptaciones en sus sistemas enzimáticos y membranas, que les permiten tolerar el tipo y la composición del suelo, las características de las sustancias orgánicas e inorgánicas, su poder quelante, los márgenes de pH y su estado redox (4).

Las características distintivas de los suelos ultramáficos posibilitan que la microbiota existente en estos suelos pueda ser utilizada para obtener nuevos bioproductos, con alto valor agregado (5, 6). Los estudios con bacterias para el control biológico de enfermedades se han enfocado en especies rizosféricas, principalmente del género *Bacillus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Para el desarrollo de esta investigación se seleccionó la cepa VC3, perteneciente a la colección de microorganismos del Laboratorio de Biotecnología de los Metales, de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Esta cepa fue aislada de la rizosfera de una planta hiperacumuladora de Ni: *Mosiera bullata*, del depósito ultramáfico del Cuabal Cubanacán, Villa Clara, Cuba (7). La conservación de la cepa se realizó en tubos de cultivo con medio Luria- Bertani (LB) con 2 % de agar en plano inclinado, a temperatura de 4 °C, durante 6 meses y por crioconservación con el uso de glicerol al 20 %, a una temperatura de -20 °C. En el desarrollo del trabajo también se utilizaron cinco hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Fusarium sporotrichum* F-13, *Fusarium oxysporum* F-44, *Fusarium moniliforme* F-22 y *Fusarium solani* F-29, pertenecientes a la colección de microorganismos del Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). La conservación de los tres hongos filamentosos se realizó en los medios agar extracto de malta (AEM).

Composición de medios de cultivos

Se formularon cuatro medios de cultivo y se evaluaron cuatro fuentes de carbono, se mantuvieron constantes la composición de sales y la fuente de nitrógeno (8). Se utilizó como medio control Luria-Bertani (LB), compuesto por Triptona 10 g.L⁻¹; extracto de levadura 5 g.L⁻¹ y NaCl 10 g.L⁻¹. Durante la preparación de cada medio, se realizó un ajuste de pH a 7.0 ± 0.2 con HCl o NaOH 1M. Los medios fueron esterilizados por calor húmedo, en autoclave, aplicando 1 atm y 121 °C, durante 20 min.

Tabla 1. Composición de medios de cultivos diseñados

Medios de cultivos	Fuente de carbono (g.L ⁻¹)	Fuente nitrógeno (g.L ⁻¹)	Sales (g.L ⁻¹)
Medio A	Glucosa (15)	Extracto levadura 1.0	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.2 K ₂ HPO ₄ 3.0 KH ₂ PO ₄ 1.5 MgSO ₄ * 7H ₂ O 0.2 CaCl ₂ * 2H ₂ O 0.05 MnSO ₄ * 2H ₂ O 0.009 ZnSO ₄ * 7H ₂ O 0.001 Citrato trisódico 1.0
Medio B	Glicerol (15)		
Medio C	Miel final de caña de azúcar (15) (ART)*		
Medio D	Sacarosa (15)		

(ART)*: Azúcares reductores totales.

Condiciones de cultivo

La fermentación se realizó en Erlenmeyer de 1 L de capacidad con un volumen de trabajo de 200 mL. Los medios fueron inoculados con un preinoculo de 18 horas crecido en medio LB líquido para una relación de inóculo medio 1:10 (v/v). Posteriormente, los cultivos se incubaron a una velocidad de agitación de 150 r.min⁻¹ y 30 °C de temperatura, durante 24 horas. Los medios se centrifugaron a 10000 r.min⁻¹, durante 10 min. Los sobrenadantes se filtraron al vacío en condiciones de asepsia, se utilizó membrana de nitrato de celulosa con poros de 0.2 µm. Los sobrenadantes libres de células (SLC) se conservaron a 4 °C, hasta su utilización.

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células.

Con el objetivo de definir el tiempo de incubación de los ensayos de actividad antagonista se determinó, previamente, la cinética del crecimiento de los hongos fitopatógenos. El crecimiento se determinó mediante la medida del diámetro de la colonia en milímetro sobre medio agar extracto de malta. Las placas se incubaron a 30 °C durante, 96 horas (n=3). Los sobrenadantes libres de células (SLC), se adicionaron al medio de cultivo agar extracto de malta, a una concentración del 20 % v/v (9). Previamente, se ajustó el pH a un valor de 6.0, para evitar la inhibición del crecimiento fúngico por pH alcalino. Cada una de las placas se inoculó en el centro, con un ponchete de 5 mm del hongo fitopatógeno a evaluar. Se utilizaron tres placas por tratamiento. En cada bioensayo se utilizó un testigo que consistió en la inoculación del ponchete del hongo correspondiente en placas con medio agar extracto de malta (AEM) sin la adición de SLC. Todos los cultivos se incubaron a 30 °C, durante el tiempo de incubación determinado para el crecimiento de cada hongo fitopatógeno. El crecimiento del hongo se comparó con el testigo y se determinó el porcentaje de inhibición mediante la fórmula (10):

$$\% I = \left[\frac{(T - F)}{T} \right] \times 100 \quad (\text{Ec.1})$$

Donde:

T = Promedio de las mediciones del diámetro de la colonia fúngica del testigo (agar extracto de malta en ausencia de SLC)

F = Promedio de las mediciones del diámetro de la colonia fúngica en agar extracto de malta con adición de SLC, al 20 %

I = Inhibición del crecimiento micelial del hongo

Determinación de la actividad proteolítica de los sobrenadantes libres de células

La actividad proteolítica de los SLC de la cepa VC3 se midió mediante el método de Anson (11), con el empleo de caseína al 1 % como sustrato.

Se preparó una mezcla de 300 μL de caseína, 600 μL del Tampón Tris-HCl 50 mM a pH = 8 y 100 μL de SLC y se incubó a 55 °C, durante 30 minutos. La reacción se detuvo por adición de 100 μL de ácido tricloroacético (TCA), a una concentración final de 100 %, se incubó durante 10 minutos a 4 °C. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 r.min⁻¹ y se midió la absorbancia a 280 nm, en un espectrofotómetro de luz ultravioleta Genesys-6. Se realizó de forma simultánea una curva de tirosina, a concentraciones conocidas (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.0313 mM). La actividad enzimática se definió como la cantidad de μmoles de L-tirosina liberados en 1 min, mediante la comparación de los resultados con la curva patrón de tirosina.

Determinación del crecimiento microbiano

Para determinar la concentración celular en los cultivos se tomaron muestras de la suspensión celular de los Erlenmeyer. Se empleó el método turbidimétrico con un espectrofotómetro de luz ultravioleta Genesys-6, para realizar las lecturas de densidad óptica a 600 nm y correlacionar esta con la concentración celular.

Procesamiento y análisis estadístico de los datos

Para el procesamiento y análisis estadístico de los datos se utilizó el editor de gráficos GraphPad Prism, versión 5.0. En la determinación de la homogeneidad de la varianza y la normalidad de los datos se empleó las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Para la determinación del efecto de los medios A, B, C y D en la actividad proteolítica, se realizó el análisis de los datos por prueba de Tukey. En los ensayos que los datos no mostraron homogeneidad de varianza y/o una distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples se realizaron por la prueba de Dunn.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación e influencia de los componentes del medio de cultivo sobre la síntesis de metabolitos antifúngicos

Un primer paso en la búsqueda de los requerimientos nutricionales adecuados es identificar aquellas variables que tengan una mayor influencia en la respuesta. De aquí que con el objetivo de examinar el efecto de diferentes componentes del medio de cultivo en la síntesis de metabolitos antifúngicos, se seleccionaron como la fuente de carbono la glucosa, sacarosa, glicerol y miel de caña de azúcar.

Evaluación de la actividad antifúngica

Los resultados sobre el estudio *in vitro* de la evaluación de la actividad antifúngica de los metabolitos secretados por *Bacillus* sp. cepa VC₃ con diferentes fuentes de carbono adicionadas a los medios de cultivo se presentan en la figura 1. El ensayo se realizó con los sobrenadantes libres de células (SLC) contra cinco hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme* F-29, *Fusarium sporotrichum* F-13, *Fusarium solani* F-22, y *Fusarium oxysporum* F-44. Se determinó el porcentaje de inhibición, que demostró la influencia de la fuente de carbono sobre la síntesis o expresión de los metabolitos antifúngicos.

Los mayores valores se alcanzaron con los SLC(s) de los medios con miel (49.0 \pm 0.8 %) y sacarosa (36.7 \pm 0.29 %) para cuatro de los hongos evaluados, excepto para *F. moniliforme* (figura 1), la glucosa también estimuló este efecto. El SLC obtenido en los medios con adición de glucosa mostró mayor inhibición contra *F. moniliforme* que el SLC de sacarosa. No hubo diferencias significativas entre estos SLC(s) en los porcentajes de inhibición en *A. alternata* y *F. oxysporum*.

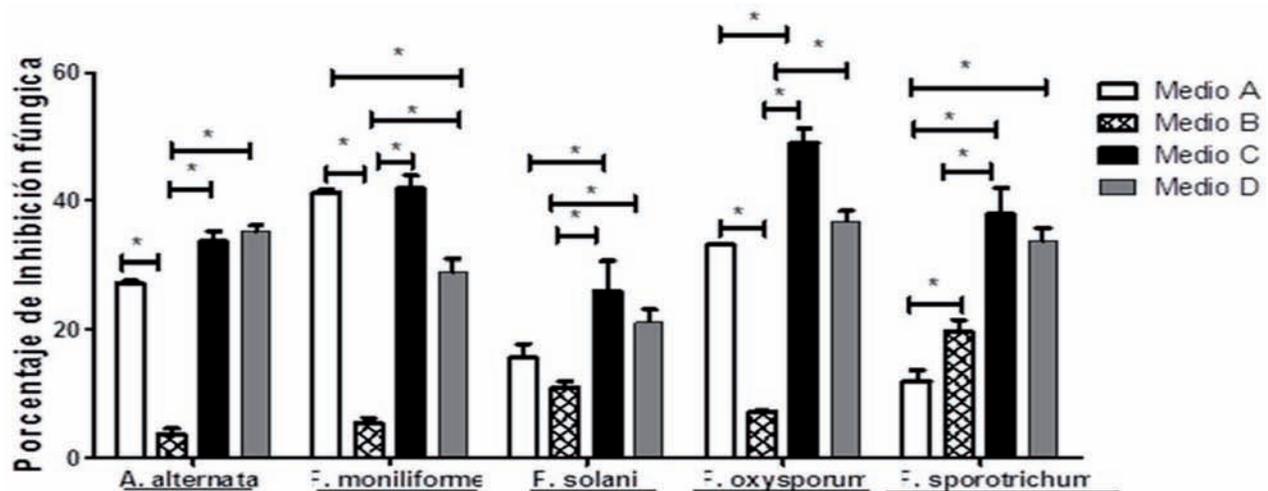


Figura 1. Porcentaje de inhibición de los SLC de los medios con glucosa (Medio A), glicerol (Medio B), miel final de caña de azúcar (Medio C) y sacarosa (Medio D). Se evaluó *A. alternata*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. sporotrichum*, sembrados en AEM al 20 % envenenado. Incubado durante 96 horas, a 30 °C. Prueba de Dunn.

Los SLC(s) de los medios con miel y sacarosa inhibieron más de un 30 %, lo cual se informa en la literatura como criterio de selección de cepas promisorias para el control biológico (12).

La utilización de miel, sacarosa y glucosa potenciaron la síntesis de metabolitos antifúngicos, este efecto ha sido ampliamente estudiado en el género *Bacillus* sp. (13,14;15).

Al comparar los porcentajes de inhibición obtenidos con los porcentajes de inhibición del SLC, del medio LB (50 % - 70 %), se encontró que aunque la miel mostró los mejores resultados fue 1,5 veces menor que en el SLC del medio comercial. Por lo planteado anteriormente se hace necesario formular un medio para potenciar la actividad antifúngica, que alcance valores similares al medio LB.

La actividad antifúngica en el género *Bacillus* está determinada por factores como: la producción de lipopéptidos y la producción de enzimas extracelulares, que fueron identificados en *Bacillus mojavensis* y *Bacillus subtilis*, respectivamente (16).

Evaluación de proteasas

Al relacionar el perfil de crecimiento de la bacteria en diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, glicerol y miel final de caña de azúcar) con la actividad enzimática (figura 2), se aprecia que la síntesis de enzimas proteasas comenzó simultáneamente, con el crecimiento de la bacteria en el caso de las fuentes glucosa (figura 2A) y glicerol (figura 2B), sus mayores actividades se expresaron en la fase de desaceleración del crecimiento, mientras que en los medios con miel final de caña de azúcar (figura 2C) y sacarosa (figura 2D), los mayores valores de la actividad proteasa se alcanzó en la fase estacionaria del crecimiento. La máxima actividad de la proteasa se alcanzaron antes del comienzo de la fase estacionaria y, luego, declinó a un nivel bajo, y se mantuvo casi constante.

La miel final de caña de azúcar y la sacarosa resultaron ser superiores al resto de las fuentes carbonadas, al incrementar 5 veces la actividad proteasa, comparadas con la glucosa y el glicerol. La velocidad específica de crecimiento de la cepa VC3 en el medio con sacarosa fue 1.7 veces mayor que las velocidades específicas de crecimiento del glicerol y la miel. Entre el medio con glucosa y sacarosa no se observaron diferencias en cuanto al crecimiento. Bajo estas condiciones el microorganismo regula su metabolismo, dirigido al incremento de la maquinaria enzimática, capaz de degradar los compuestos complejos y transformarlos en sustratos asimilables, según el principio de economía celular.

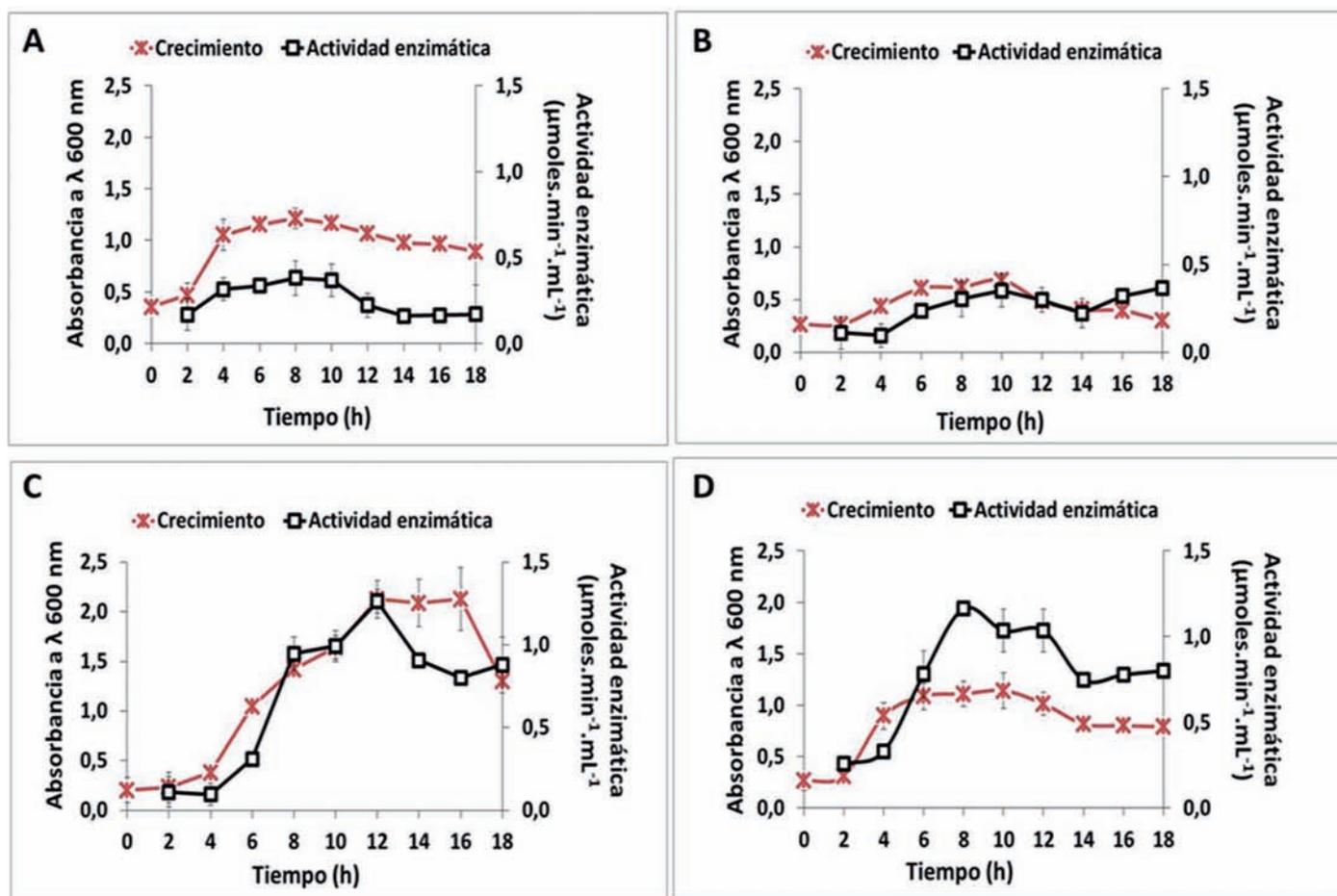


Figura 2. Cinética de crecimiento y actividad enzimática de proteasas en *Bacillus* sp. cepa VC₃, en diferentes medios de cultivo: A: glucosa; B: glicerol; C: miel final caña de azúcar; D: sacarosa, durante 18 horas. La fermentación se realizó en cultivo discontinuo a 30 °C, a 150 r.min⁻¹. La actividad enzimática se realizó por el método de Ansón modificado, con la caseína al 1 % como sustrato.

Estos resultados pudieran estar relacionados con el fenómeno de represión catabólica o “efecto glucosa” en fuentes de carbono fácilmente metabolizables (17). La represión catabólica se ha definido como la represión de la síntesis de enzimas, relacionada con el metabolismo de una fuente de carbono que es rápidamente catabolizada. La expresión de operones catabólicos inducibles se reprime en respuesta a la presencia de un carbohidrato eficiente como la glucosa (18). Por tanto, el crecimiento a expensas de glucosa, disminuye los niveles intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), reduciendo la expresión de los operones catabólicos inducibles. En su medio natural las bacterias están rodeadas de una variedad de fuentes de carbono adecuadas para el crecimiento, y pudiera ser perjudicial para el organismo el sintetizar las enzimas inducidas del catabolismo para todos los azúcares disponibles. La represión catabólica ofrece al organismo un medio de coordinar su metabolismo energético y de carbono.

Krishnaveni (19) observó que la mejor actividad enzimática en *Bacillus subtilis* se obtenía cuando utilizaba cebada de trigo como fuente de carbono, MgSO₄, y extracto de carne como fuente de nitrógeno. La producción de enzimas en el género *Bacillus* ha favorecido la biotecnología agrícola, debido a las potencialidades antifúngicas que estas presentan; sin embargo, se ha comprobado la existencia de otros metabolitos antifúngicos como: las iturinas, fengicinas, y surfactinas (19, 20).

Se planteó anteriormente que, en los medios con miel y sacarosa, el SLC de la cepa VC3 fue capaz de ocasionar mayores efectos antifúngicos medidos por la inhibición de crecimiento del hongo

(figura 1), coincidiendo con los mayores valores de actividad proteasa (figura 2). Por tanto, existe una relación sinérgica entre metabolitos como antibióticos, lipopéptidos y enzimas proteolíticas, que asociados a otros compuestos, causan la inhibición en hongos fitopatógenos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el medio con miel sustentan su utilización como sustrato idóneo para la producción de enzimas y metabolitos. Las mieles aportan azúcares fermentables, como la glucosa, rafinosa y sacarosa y es esta última la que se encuentra en mayor concentración. Además, contienen vitaminas del grupo B, aminoácidos esenciales y minerales como el calcio, sodio, cloro, magnesio, potasio, hierro y cobre. Por tanto, las mieles de caña de azúcar son ampliamente utilizadas en la producción de biomasa, metabolitos extracelulares y suplemento en los medios de cultivos. Este compuesto presenta ventajas económicas y nutricionales frente a otros medios de cultivos comerciales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez, F., Castro, M., Principe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofre, E., (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 112 (1), 159–174.
2. Arrebola, E., Jacobs, R. and Korsten, L. (2010) Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J Appl Microbiol* 108, 386–395.
3. Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., Ongena, M., (2014). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microb. Biotechnol.* 8, 281–295.
4. Chandler, S., Van Hese, N., Coutte, F., Jacques, P., Höfte, M., De Vleeschauwer, D., (2015). Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 91, 20–30.
5. Govin, A., Coto, O., Marrero, J, (2015). Caracterización fenotípica de una colección bacteriana aislada del yacimiento laterítico Yagrumaje Norte, Moa, Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 4(1) 18-24.
6. Amores, I. (2013). Caracterización de dos rizobacterias aisladas de plantas acumuladoras de níquel. Tesis presentada para optar por el título de Máster en Microbiología. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
7. Villa, P.; R. Batista; R. Fernández; I. Amores y C. O. (2009). Rizobacterias de plantas hiperacumuladoras de níquel: fuente potencial de metabolitos de interés agrícola. XXIV Reunión Latinoamericana de Rizobiología y I Conferencia Iberoamericana de interacciones beneficiosas microorganismo-planta-ambiente. *Memorias*.
8. Zhang SM, Wang YX, Meng LQ, Li J, Zhao XY, Cao X, et al. (2012). Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *Afr J Microbiol Res*; 6(8):1747-55.
9. Prapagdee B., Kuekuluong C., Mongkolsuk S. (2008). Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. *Short Research Communication. Int J. Biol Sci*, 4: 330-337.

10. Villa P., Frías A. (2005): Evaluación de cepas de *Pseudomona* ssp. para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar, 39 (3): 41- 45.
11. Anson M L. (1938): The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 2279-84.
12. Mounia Y, Noredine K, chaouche, laid dehimat, Insafbataiche, Mounira K, Hélène C, y Philippe (2014): Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavensis* y *Bacillus subtilis*. African Journal of Microbiology Research Vol. 8(6), pp. 476-484.
13. Sip V., Chrpova J., Leisova L., Sykorovvesna S., Lucera L., Ovesna J. (2007): Implications for *Fusarium* head blight control from study of factor determining pathogen and content in grain of wheat cultivars. Stressed Environments, 281-287.
14. Bing L, Huang L., Buchenauer H, Kang Z. (2010): Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4. Pesticide Biochemistry and Physiology, 98 305-311.
15. On-Uma R, Chang C, Amadou L.S, and Liang W.J, (2012): Identification of antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* LB5 with ability to control anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* African Journal of Microbiology Research Vol. 6 (16), pp. 3732-3738.
16. Ben S. Khedher, et al., "Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato," C. R. Biologies (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2015.09.005>.
17. Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Khalil, Q., Hoondal, G.S., (2001): Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. World J. Microbiol. Biotechnol. 17, 125-129.
18. Botsford J, Harman J. (1992): Cyclic AMP in procaryotes. Microbiol. Rev. 56:100-122.
19. Krishnaveni M S. (2010): Studies on Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) in Rhizosphere and Non-Rhizosphere Soils in Different Varieties of Foxtail Millet (*Setaria italica*). International Journal of Agriculture and Food Science Technology, 1: 23-39.
20. Zouari, I., Jlaiel, J., Tounsi, S., Trigui, M., 2016. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. Biol. Control 100, 54–62.