

Producción y efectividad de un biopreparado a partir de *Bacillus subtilis* con actividad antagonista y estimuladora del crecimiento vegetal.

Grisel Tejeda¹, Janet Rodríguez¹, Rafael Martínez Viera¹, Rosa García¹, Juan J. Castellanos¹, Lissett Gutiérrez¹, Wilder Rodríguez¹, Liuba Plana¹, José País Chanfrau², Yoania Ríos¹, María E. Simanca¹, Maricel Ortega¹, Elena González¹ y Grisel Croche¹.

¹Instituto de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT). Cuba. ☎ (53-7) 57 9010 Fax (53-7) 57 90 14

Email: rmartinez@inifat.esihabana.cu

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Cuba

RESUMEN

Las bacterias del género *Bacillus* están consideradas como efectivas en el control de microorganismos fitopatógenos. El presente trabajo expone el desarrollo de una tecnología fermentativa para la obtención de un biopreparado a partir de la cepa INIFAT-101 de *Bacillus subtilis*, con actividad antagonista frente a hongos y bacterias fitopatógenas, además se evalúa la efectividad de este bioproducto como controlador biológico de enfermedades y estimulador del crecimiento vegetal. Entre los resultados más importantes se destacan el diseño del medio de cultivo, la definición de los parámetros cinéticos de la fermentación a escala de zaranda y banco. El bioproducto obtenido, a través de la fermentación sumergida a 37° C, 200 rpm, 1 VVM y medio de cultivo optimizado mostró actividad antagonista “*in vitro*” frente a *Alternaria solani*, *Alternaria porri* y *Xanthomonas vesicatoria*, además al ser aplicado en condiciones controladas y no controladas para los cultivos de tomate y trigo, se evidenció su actividad estimuladora del crecimiento vegetal.

INTRODUCCIÓN

Especies del género *Bacillus* han sido frecuentemente utilizadas por su capacidad de producir antibióticos con acción antifúngica o antibacteriana (Abraham y col., 1993). *Bacillus subtilis* es una de las bacterias más estudiadas como antagonista de diferentes hongos y bacterias fitopatógenas (Arbige, 1993; Zuber, 1993). Su empleo como potencial de uso agrobiológico representa en la actualidad la posibilidad de disminuir la utilización de plaguicidas químicos, que afectan indiscriminadamente nuestro ecosistema natural (Powell,

1993; Castellanos y col., 1995; Mizubuti, 1995 ; Badel y Kelemu, 1996; Korsten y col. , 1997).

En la obtención de la tecnología de fabricación de un biopreparado como control biológico, las condiciones ambientales tienen un efecto importante sobre el crecimiento del microorganismo y/o la formación de productos. Entre las más importantes se encuentran el medio de cultivo, la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la viscosidad, etc. Aunque se conocen los rangos adecuados para cada variable, cada cepa en cuestión presenta condiciones óptimas para lograr rendimientos máximos en cuanto a crecimiento y producción de metabolitos (Quintero, 1993; Nielsen, 1994; Acevedo, 1996).

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como principal objetivo exponer una tecnología fermentativa para la obtención de un biopreparado a partir de la cepa INIFAT-101 de *Bacillus subtilis*, con actividad antagonista frente a hongos y bacterias fitopatógenas. Además, evaluar la efectividad de este bioproducto como control biológico de enfermedades y estimulador del crecimiento vegetal, al ser aplicado en condiciones controladas y no controladas en tomate y trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio del proceso fermentativo

Se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* INIFAT-101. Para estudiar el efecto de los medios de cultivo y evaluar las variables temperatura, agitación y pH (ajustado antes de la esterilización), se utilizó una zaranda rotatoria con erlenmeyers de 500mL, 50 mL de volumen efectivo y 10 % de razón de inoculación. Se evaluaron diferentes fuentes de Carbono, Nitrógeno y sales minerales en varios diseños experimentales (completamente aleatorizado, 2x3 y Plan Compuesto Central); después de la comparación de 11 medios de cultivo, se optimizó la mejor variante nutricional para garantizar un bioproducto con actividad antagonista frente a hongos y bacterias fitopatógenas, capaz de estimular el crecimiento vegetal.

El proceso de escalado se llevó a cabo en un fermentador Biolafitte de 6 Litros a 37 °C, con agitación de 300rpm y 1 VVM de aireación, el proceso se desarrolló sin control de pH. La actividad estimuladora fue validada en condiciones controladas y no controladas para los cultivos de tomate y trigo, sembrados sobre suelo Ferralítico Rojo (Instituto de

Suelos,2000). Las variables evaluadas fueron para el cultivo de tomate: largo del tallo, altura de la planta, área foliar y diámetro del tallo; para el cultivo de trigo: altura de la planta, # de espigas/planta, largo de espigas /planta y número de gramos/espiga.

Las técnicas empleadas en los ensayos fueron:

a) Evaluación del crecimiento microbiano: Se midió DO a 670 nm, UFC/mL por conteo en placas y conteo celular usando cámara de Neubauer.

b) Consumo de sustrato limitante: Los Azúcares Reductores Totales (ART) se determinaron utilizando la técnica de *Eynon-Lane* modificada (Biar, 1975).

b) Evaluación de la actividad antifúngica: Se utilizaron como hongos fitopatógenos *Alternaria porri* y *Alternaria solani*, los cuales fueron crecidos en medio Czapeck a pH 6.5 y transferido al mismo medio con la adición de los inóculos de *Bacillus subtilis* estudiados. Se determinó el % de control, teniendo en cuenta el crecimiento micelial (mm) del hongo en cada caso.

c) Evaluación de la actividad antibacteriana: Se seleccionó como bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*. Se midió el halo de inhibición provocado por el efecto antibiótico de los metabolitos obtenidos durante la fermentación, utilizando el método de difusión en placas (Kavanagh, 1974).

Las muestras resultantes de la fermentación, para la evaluar las actividades bactericida y fungicida, fueron centrifugadas y esterilizadas por autoclave durante 5 minutos a 1.2 atm., obteniéndose sobrenadantes libres de células.

Aislamiento y purificación de metabolitos extracelulares del biopreparado.

Se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) tomando 1,5 mL de sobrenadante para aplicar a un gel de 15 % de poliacrilamida. Se determinó la concentración de proteínas totales mediante la técnica de COMASSIE. Luego se precipitó con Ácido Trifluoracético (TFA) y se lavó con acetona a -20°C , aplicándose en los pocillos 15 y 20 μg respectivamente. Se utilizaron 5 patrones de peso molecular (A: Albúmina bovina 66 kDa, B: Albúmina de huevo 45 kDa, C: Tripsinógeno 24 kDa, D: μ - Lactoglobulina 18.4 kDa, E: Lisosima 4.3 kDa). En la etapa de purificación la muestra se, equilibró con metanol, agitándose durante 30 min. en la cámara a 4°C . Se centrifugó a 10, 000 r.p.m. durante 30 min. y se aplicó a una columna XK16, con un volumen de gel empacado de 20 mL a un flujo de 9-10 mL/min., previamente equilibrada a pH 5.0 y con un valor de conductividad de 0.62 mS/cm. El

absorbente utilizado fue la resina de hidrofobicidad, LiChroprep RP -18, con tamaño de partícula de 5-20 μm . Se eluyó con 20 mL de metanol 100 % y los picos de la elución fueron cuantificados mediante RP-HPLC utilizando una columna analítica C18 208TP54 VYDAC con dimensiones de $\text{Ø}4 \times 250 \text{ mm}$.

El sistema tampón utilizado en RP- HPLC, consistió en 1 % (v/v) TFA para solución A y $\text{CH}_3\text{CN} + 0.5 \%$ de TFA, para solución B. Se corrió un gradiente lineal desde 10 hasta 60 % de B, durante 30 min. y se regeneró con 100 % de B durante 10 min., posteriormente se equilibró con 10 % B, a un flujo constante de 0.22 mL/min. La temperatura se fijó a 45 °C y la detención UV se realizó a 226 nm. Las señales UV se registraron mediante el *software* BioCROM, versión 2.3, 1994 (CIGB, Habana, Cuba).

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio del proceso fermentativo.

La selección de medios de cultivo, dio continuidad a los estudios anteriores realizado por Tejeda, 1997. Los medios M1 y M2 mostraron superioridad, con diferencias significativas del resto de los evaluados, en cuanto al crecimiento de la bacteria y la actividad antagonista de los metabolitos extracelulares obtenidos en el proceso fermentativo (tabla 1). Este resultado confirma las cualidades nutricionales de la miel final de caña, como fuente de azúcar, rica en aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y minerales (Manual de Derivados de la Caña de Azúcar, 1988), necesarios para garantizar el crecimiento bacteriano y la producción de metabolitos, responsables de la actividad antimicrobiana del biopreparado.

Tabla 1: Efecto de los medios de cultivo sobre la actividad antifúngica del biopreparado contra *Alternaria porri* (AAp).

Medios de cultivo	AAp*(% Control)
M1	59.17 a
M2	50.00 a
M3	36.46 c
M4	43.70 b
M5	41.90 b

Se evaluó la influencia cualitativa de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno orgánico, que fueron utilizadas en los medios de cultivo estudiados (Tabla 2). El análisis estadístico demostró que la fuente de carbono es un elemento importante en la

composición del medio de cultivo, con efecto significativo sobre la actividad bactericida frente a *Xanthomonas vesicatoria*. La utilización de glucosa afectó negativamente esta actividad, lo cual coincide con lo planteado por Kuits y col (1974), quienes encontraron que la presencia de carbohidratos que se metabolizan rápidamente, puede reprimir la esporulación.

Tabla 2. Influencia de la fuente de Carbono y N.Orgánico sobre la actividad antimicrobiana

Variantes	Fuente de Carbono	Fuente de N. Orgánico	AXh (mm)
V-1	Miel (+1)	HLT (-1)	11.8
V-2	Glucosa (-1)	HLT (-1)	0.0
V-3	Sacarosa (0)	HLT (-1)	14.0
V-4	Miel (+1)	EL (+1)	10.8
V-5	Glucosa (-1)	EL (+1)	1.0
V-6	Sacarosa (0)	EL (+1)	14.8

HLT: Hidrolizado de Lev. Torula; EL: Ext. de Levadura; AXh: Actividad bactericida frente a *X. vesicatoria*.

La optimización del medio de cultivo M2 tuvo como primer objetivo evaluar la influencia de las concentraciones de las principales fuentes de nutrientes que componen el mismo. Al aplicar el diseño factorial Plan Compuesto Central (Tabla 3) se demostró un efecto significativo de la concentración del fosfato de amonio (NI) sobre la actividad antifúngica del cultivo contra *Alternaria solani*.

El modelo matemático resultante de la regresión múltiple de la matriz fue:

$$\begin{aligned}
 AAs = & 43.33 - 11.68 (NI) - 7.53 (ART)^2 - 6.77 (ART \cdot NO) + 6.63 (ART) + 4.47 (NO)^2 \\
 & + 4.08 (NI)^2 - 2.06 (NO \cdot NI) + 1.58 (NO) - 0.67 (ART \cdot NI) \quad R^2 = 0.70
 \end{aligned}$$

Tabla 3: Valores codificados y resultados del Plan Compuesto Central.

Variante	ART	NO	NI	AXh (mm inhibición)	AAs (% control)	CCEL _(fi)
1	- 1	- 1	1	1.6	16.1	9.74
2	1	- 1	1	3.0	39.8	11.67
3	- 1	1	1	0.0	35.2	8.24
4	1	1	1	3.8	9.8	12.25
5	- 1	- 1	- 1	0.0	52.5	6.23
6	1	- 1	- 1	1.7	57.1	5.90
7	- 1	1	- 1	1.0	60.2	5.35
8	1	1	- 1	1.2	59.5	4.74
9	- α	0	0	2.3	0.0	6.25
10	α	0	0	2.3	52.7	7.86
11	0	- α	0	4.2	53.6	7.15
12	0	α	0	2.8	67.0	8.67
13	0	0	- α	3.2	68.4	3.22
14	0	0	α	2.3	50.0	8.39
15	0	0	0	2.3	33.9	10.73
16	0	0	0	2.0	39.8	11.47

AAs: Actividad frente a *Alternaria solani* ; CCEL_(fi): Relación entre conteo de células finales e iniciales

El coeficiente significativo asociado a la variable NI nos indica que la concentración de fosfato de amonio tuvo un efecto negativo sobre la actividad antifúngica del cultivo; este resultado coincide con lo planteado por Schaeffer (1969), en relación con *Bacillus subtilis*: Una buena esporulación es obtenida en un medio donde el nitrógeno sea deficitario, pero exista fuente de carbono en exceso; si ocurriera lo contrario, entonces se favorece la lisis celular; llegando a la conclusión que la esporulación puede ser reprimida por la glucosa sólo en presencia de una fuente utilizable de nitrógeno.

Al analizar la relación CCEL_(fi), sólo resultaron significativas la concentración de fosfato de amonio (NI) y los efectos cuadráticos de las variables ART y NI, lo que demostró la existencia de valores óptimos en sus concentraciones y los resultados obtenidos fueron: Concentración óptima de Azúcares Reductores Totales: ART= 15 g/L.

Concentración óptima de fosfato de amonio: NI= 2.006 g/L

Al evaluar la influencia del pH y la temperatura sobre el crecimiento de la bacteria se demostró que el proceso a 37°C favorece tanto la máxima velocidad de crecimiento como la concentración de biomasa final, este comportamiento se ha manifestado en algunos procesos fermentativos asociados al género *Bacillus* (Bajpai y col. , 1987). El pH con que

fue ajustado el medio de cultivo antes de la esterilización no influyó significativamente en el crecimiento bacteriano.

La actividad antifúngica del biocontrol (tabla 4), mostró un incremento de la actividad cuando el proceso fermentativo se desarrolló a 37 °C, incluso a la hora 48 de la fermentación (2do día), sin embargo ocurrió un retardamiento del proceso a 30 °C y disminuyó la efectividad del biopreparado frente a *A. solani* al trabajar a pH = 9.

Tabla 4: Matriz del Diseño 2². Actividad antifúngica contra *Alternaria solani*.

Variantes	Temperatura	pH	AAs (% de control)		
			2° día	4° día	7° día
1	-1(30°C)	-1(8.0)	-5.2 b	30.2 c	44.3 b
2	+1(37°C)	-1(8.0)	25.9 d	43.8 a	46.9 a
3	-1(30°C)	+1(9.0)	-14.5 a	22.3 d	40.1 c
4	+1(37°C)	+1(9.0)	20.7 c	41.8 b	42.9 b

La figura 1 muestra la influencia negativa sobre la actividad antifúngica y bactericida del biocontrol cuando se ajustó el medio a pH 9, no encontrándose diferencias significativas en el resto de los pH estudiados.

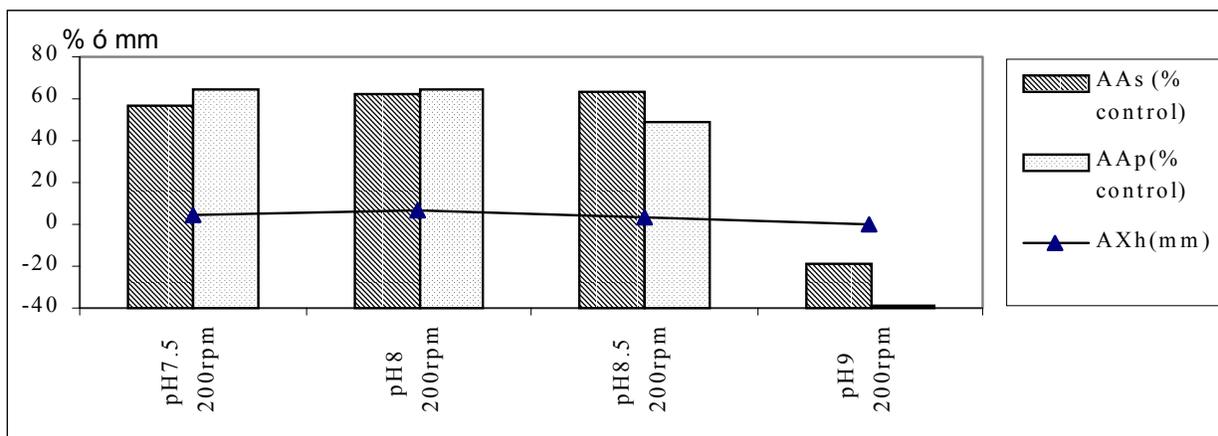


Figura 1: Influencia del pH y la agitación sobre la actividad antagonista del biopreparado.

Los resultados obtenidos en el plan experimental para evaluar los niveles de agitación en tres fases del proceso fermentativo (figura 2), demuestran que la mejor variante fue V-3 al tercer día de fermentación, en este caso la bacteria fue capaz de producir metabolitos antimicrobianos que arrojaron controles frente a los tres patógenos, esto confirma que

aunque la formación de esporas es un proceso aeróbico, está además condicionado a diferentes stress del cultivo y se vincula con la formación de antibióticos (Phae y col., 1990; Arbige, 1993).

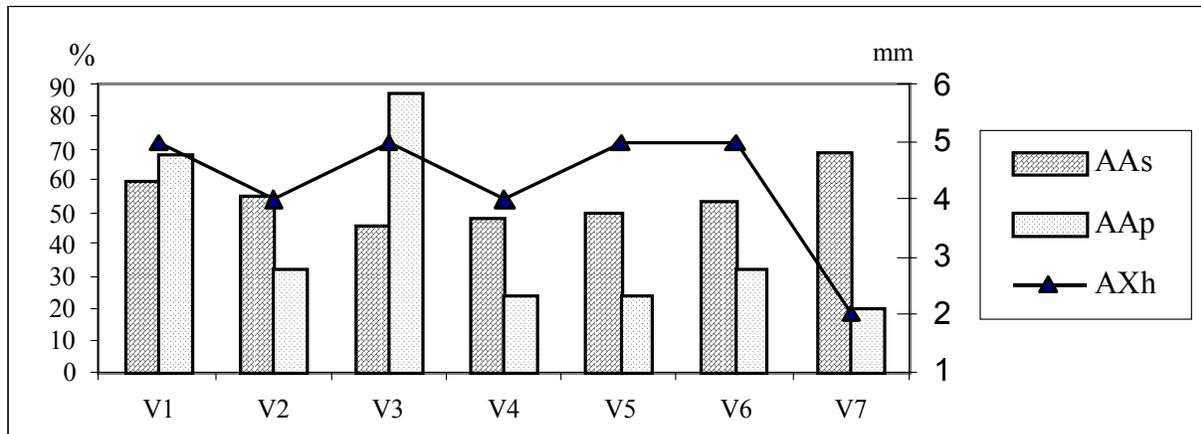


Figura 2: Influencia de la agitación sobre la actividad antagonista del biopreparado

En los experimentos realizados a escala de banco se evaluaron las diferentes actividades del cultivo como control biológico, con el objetivo de determinar con mayor precisión los parámetros asociados al proceso fermentativo, teniendo en cuenta que éste puede incluir la formación de uno o más antibióticos con actividad bactericida y/o antifúngica (Zuber y col., 1993), lo cual se evidencia en los diferentes resultados obtenidos.

El crecimiento de la bacteria se evaluó mediante el conteo de células totales (figura 3) donde se observa una pequeña fase de adaptación y una velocidad máxima de crecimiento promedio de 0.48 h^{-1} ; la fase estacionaria se alcanzó alrededor de la hora 8 de la fermentación. El consumo de los ART durante la fase de crecimiento de la bacteria fue de 10.6 g/L , con un incremento de biomasa de 1.6 g/L , para un $Y_{X/S}$ promedio de 16% ; este comportamiento del rendimiento no corresponde con lo reportado por la literatura (Nagai, 1979; Babel y Muller, 1985) para bacterias, aunque es importante destacar que, aunque la cantidad de sustrato destinada a la formación de metabolitos secundarios debe ser siempre inferior a la destinada a la formación de biomasa, el rendimiento se verá afectado, en este caso, por la formación de productos parcialmente asociados al crecimiento, con actividad antimicrobiana.

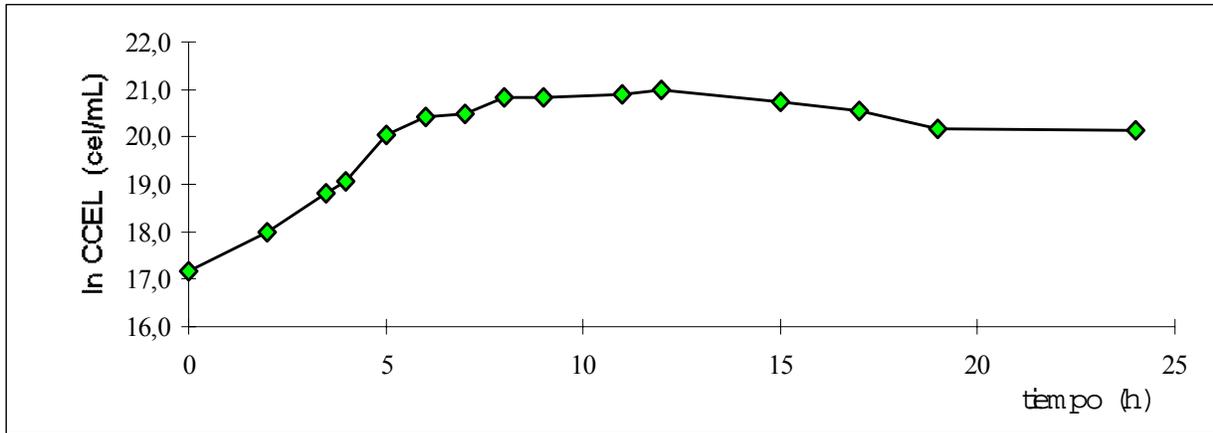


Figura 3: Crecimiento de la bacteria a escala de banco.

La actividad antifúngica contra *Alternaria solani* (figura 3) apareció durante la fase logarítmica de crecimiento, alcanzando su máximo valor durante la fase estacionaria, alrededor de las horas 24 y 30 de la fermentación. La actividad bactericida apareció desde la hora 5 de la fermentación (fase exponencial del crecimiento), alcanzando su valor máximo durante la fase estacionaria del crecimiento. Se ha reportado la producción de antibióticos no asociada al crecimiento de la bacteria, aunque algunos autores como Phae (1990) y Arbige (1993) han detectado actividad antibiótica en etapas cercanas al desarrollo de las esporas, al final de la fase de crecimiento exponencial.

El sistema de fermentación por Lote deberá garantizar un biocontrol con actividad bactericida y antifúngica, por lo que el tiempo del proceso fermentativo a escala de 6 Litros será de 24 horas para las condiciones estudiadas de pH, Temperatura y transferencia de oxígeno.

Al expresar la productividad en función de la actividad antifúngica en el Cultivo Batch se obtiene que: $P = 2.4 \%$ de control/h.

Aislamiento y purificación de metabolitos extracelulares.

Como resultado de la electroforesis SDS- PAGE se evidenció la presencia proteica alrededor de los 19 y 30 kDa. A partir de la muestra de elusión del proceso de purificación se obtuvo el cromatograma BSEME01 que se observa en la figura 4, en el que aparecen 5 picos, de ellos el más representativo, es el número 4, con un área de 212.80.

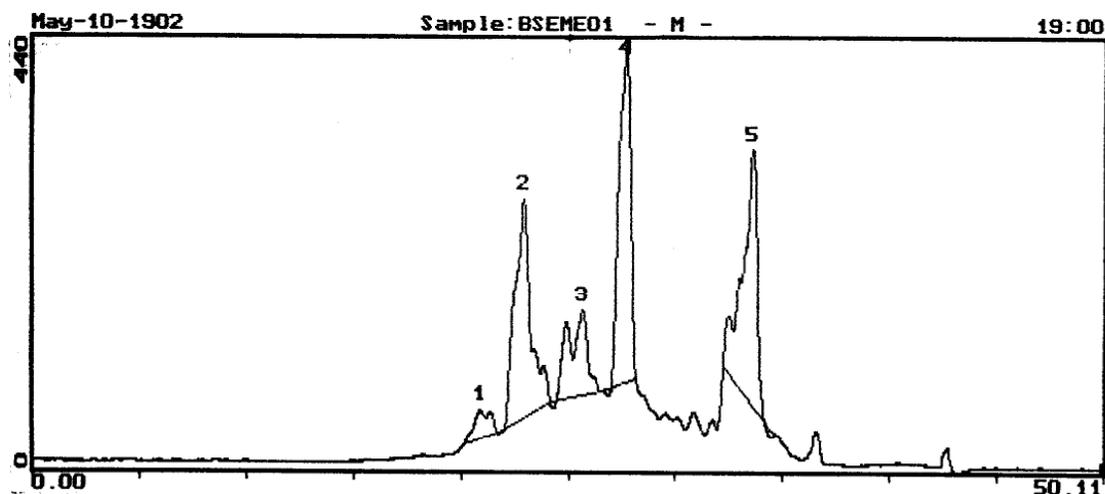


Figura 4. Cromatograma BSEME01, correspondiente a la muestra de la elusión.

El test de actividad biológica realizada al metabolito aislado proveniente del pico 4 eluído, mostró actividad bactericida frente a *X. vesicatoria*, inhibiendo su crecimiento con un halo de 17.67 mm; el %de control para *A. solani* y *A. porri* fue de 84.9 % y 76.3 % respectivamente.

Los resultados demuestran que la cepa evaluada *Bacillus subtilis* INIFAT-101 bajo las condiciones de fermentación estudiadas es capaz de producir al menos un metabolito extracelular con actividad biológica frente a tres patógenos que afectan cultivos de importancia económica, estos resultados corroboran la potencialidad de esta bacteria en la producción de antibióticos (Bernal y col. 2002 ; Kilian y col. 2002)

Actividad estimuladora del biocontrol

La actividad estimuladora del biopreparado en los diferentes cultivos se muestra en las Tablas 5 y 6.

Tabla. 5: Evaluación de la aplicación del biopreparado sobre el cultivo de trigo.

Tratamientos	Altura de planta (cm)	# de espigas/planta	Largo de espigas/planta (cm)	Número granos/espiga
Bs	72.08 a	7.45 a	7.78 a	25.8605 a
Testigo	70.41 b	4.93 b	7.23 b	23.8093 b
Sx	0.6	0.38	0.42	3.5

Como se observa en la tabla, existen diferencias significativas en todos los parámetros evaluados, lográndose un incremento de 8.62 % en el número de granos/espiga, de 51 % en el número de espigas/planta, lo cual influye en el rendimiento total/planta.

Tabla 6: Efecto estimulador del biopreparado frente al cultivo de tomate.

Tratamientos	Largo del tallo (cm)	Altura de la planta (cm)	Área Foliar (cm ²)	Diámetro del tallo (mm)
Bs	10.58 a	16.24 a	29.76 a	0.20 a
Testigo	8.05 b	11.92 b	21.63 b	0.17 b
Sx	0.48	0.81	3.42	0.01

En la tabla se observa el más rápido y vigoroso desarrollo de las plántulas, con diferencias significativas en todos los parámetros evaluados. Hay que señalar sobre todo la diferencia en el área foliar con 37,6 % de incremento por la acción del biopreparado, el cual se comporta como el parámetro fundamental por su incidencia sobre la velocidad del crecimiento y el desarrollo total de la planta, a consecuencia de una mayor actividad fotosintética.

CONCLUSIONES

1. El medio M2 logró una mayor actividad antimicrobiana frente a *Xanthomonas campestris*, *Alternaria porri* y *Alternaria solani*.
2. La optimización de M2 demostró que:
 - a) La concentración de fosfato de amonio tuvo efecto significativo sobre la actividad antifúngica del biocontrol contra *Alternaria solani*.
 - b) La concentración bacteriana tuvo un máximo con valores óptimos en 15 g/L de ART y 2 g/L de fosfato de amonio.

3. El proceso fermentativo regulado a 37°C favoreció la actividad antagonista “*in vitro*” del biopreparado frente a *Alternaria solani* .
4. El medio de cultivo antes de su esterilización debe ser ajustado a pH 8.0 para lograr una máxima actividad antagonista del biopreparado..
5. A escala de zaranda la mejor condición de transferencia de oxígeno fue una agitación de 100 rpm hasta la hora 12 de la fermentación seguida de un proceso estático hasta la hora 96.
6. El tiempo de fermentación para el Cultivo Batch a escala de banco fue de 24 horas.
7. La productividad en el Cultivo Batch basada en la actividad antifúngica del biocontrol fue de 2.4 % de control/h.
8. El rendimiento Biomasa-Sustrato en el Cultivo Batch fue de 16 %.
9. El cultivo de trigo en parcelas experimentales se vió favorecido con al aplicación del bioproducto de *Bacillus subtilis*, al incrementar en 51 % el número de espigas / planta y en 8 % el número de granos/ planta.
10. La aplicación del biopreparado en el cultivo de tomate incrementó en 37.6 % el área foliar, 31.4 % el largo del tallo, 36.2 % la altura de la planta y 17.6 % el diámetro del tallo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abraham L. Sonenshein, James Hoch, Richard Losick. 1993: “*Bacillus subtilis* and other Gram- Positive Bacteria, Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics”
2. Acevedo, F. 1996. “Balances de materia aplicados a procesos de fermentación” En: *V Curso Latinoamericano de Biotecnología. Escuela de Ingeniería Bioquímica. Univ. Católica de Valparaíso, Chile.*
3. Arbige, M. 1993. “Fermentation of *Bacillus*”. En: *Bacillus subtilis and other Gram-Positive Bacteria, Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*”. Abraham L. Sonenshein, James Hoch and Richard Losick (Ed.).American Society for Microbiology. Washington.
4. Babel, W. and Müller, R. H. 1985. “Correlation between cell composition and carbon conversion efficiency in microbial growth: a theoretical study”. *Appl. Microbiol Biotechnol* 22: 201-207.

5. Badel J, and Kelemu, S. 1996. "Inhibition in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz y otros hongos fitopatógenos por filtrados de cultivos de *Bacillus subtilis*". *Fitopatología Colombiana*. 18(1): 30-35.
6. Bajpai, P. and Bajpai, P. K. 1987."High- Temperature Alkaline α -amylasa from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13". *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 33:72-78
7. Bernal, G., Illanes, A., Ciampi, L. 2002. "Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents". *Electronic Journal of Biotechnology* 5(1): 1-9.
8. Biart, S. R. 1975. "Determinación de azúcares reductores. Método Eynon-Lane modificado". *Manual de técnicas analíticas*. ICIDCA. Habana. Cuba.
9. Castellanos, J. J., Oliva, P. H.; Izquierdo, G. E. Y Morales, N. 1995. "Sustitución de un fungicida sistémico por *Bacillus subtilis* en el control de la *Alternaria porri* (Ell.) Cif en cebolla". X Forum de Ciencia y Técnica. INIFAT. MINAGRI.
10. Instituto de suelos. 2000. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Ed. Agroinfor, La Habana, 64 pp.
11. Kavanagh, F. W. 1974. "Métodos para evitar errores en el ensayo microbiológico de antibióticos". *J. Pharm. Sci.* 63 (9): 1459.
12. Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Hain, R. 2002: "FZB24 *Bacillus subtilis*- mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality". *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 1/00,1, 72-93.
13. Korsten L., E.E. De Villiers, R.C. Wehner and J.M. Kotzet. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvet fruit disease of avocado in South Africa. *Plant Disease* 81, pag 455-459, 1997.
14. Kuits, F.; Porcel, M. and Lopesant, K. 1974. "Piciotropic mutation effecting sporulation conditions and the synthesis of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168". *Biochemic* 56: 1481.
15. Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar.1988. Serie: Diversificación, GEPLACEA-PNUD-ICIDCA. México.pp 252.
16. Mizubuti, E.S.G.; Mafia, L.A.; Muchovej, J.J.; Romeiro, R.S. y Batista, U.G. 1995 "Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust". *Fitopatology bras.* 20: 540-544.

17. Nagai, S. 1979. "Mass and Energy Balances for Microbial Growth Kinetics". En: *Advances in Biochemical Engineering vol II. (Ed.) T. K. Ghose, A. Fiechter, and N. Blakebrough.* Springer-Verlag, New York.
18. Nielsen, J. and Villadsen, J. 1994. "Bioreaction Engineering Principles". Plenum Press. New York and London.
19. Phae, C.G.; Shoda, M. and Kubota, H. 1990. "Suppressive Effect of *Bacillus subtilis* and Its Products on Phytopathogenic Microorganisms". *Journal of Fermentation and Bioengineering* 69 (1): 1-7.
20. Powell, K.A. 1993. "The commercial exploitation of microorganisms in agriculture". In *Exploitation of microorganisms*, D.G. Jones, Chapman y Hall, Londres. (Ed.).
21. Pusey, P. L.; Hotchkiss, M. W.; Dulmage, H. T.; Baumgardner, R. A.; Reilly, E. J.; Reilly, C. C.; Wilson, C.L. 1988: "Pilot tests for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for post harvest control of peach brown rot". *Plant disease* 72 (7): 622-626.
22. Quintero, R. 1993. *Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones. (Ed.) Alhambra Mexicana, México D. F.*
23. Schaeffer, D. 1969. "Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes and exotoxins". *Bact. Rev* 33: 48-71.
24. Tejeda, G. 1997: "Obtención de un biopreparado a partir de *Bacillus subtilis* para el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas". Tesis para optar por el Grado Científico de Master en Ciencias.
25. Zuber, P.; Nakano, M. M. and Marahiel, M. A. 1993. Peptide antibiotics "*Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria, Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics" (Ed.) Abraham L. Sonenshein, James Hoch and Richard Losick. American Society for Microbiology. Washington.