

ARTÍCULO CORTO

Aislamiento de bacterias antagónicas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y promotores de crecimiento en banano (*Musa AAA*)

Luis Ángel Cruz-Ortiz*, Mariana Flores-Méndez, Kimberly Rosa Escobar-Ventura, Benjamín Moreno-Castillo

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

Mycosphaerella fijiensis Morelet (agente causal de la Sigatoka Negra, SN) es un patógeno altamente virulento en las plantaciones de banano triploides (*Musa AAA*). La enfermedad se maneja mediante aspersiones aéreas semanales de fungicidas químicos principalmente, lo cual provoca contaminación del ambiente y daños potenciales a la salud humana. Se ha reportado que los microorganismos asociados a las plantas (hojas, frutos, tallos y raíces), podrían ser candidatos para el biocontrol de patógenos y como biofertilizantes. En este trabajo se aislaron en medio selectivo (M9 + quitina coloidal) bacterias asociadas a la rizósfera y filósfera de plantas de banano (AAA, clon enano gigante) en producción comercial. Posteriormente se determinó cuáles de las cepas capaces de producir ácido indol- acético (AIA). Finalmente, el sobrenadante de cultivo en M9 + quitina coloidal de cada cepa aislada se inoculó sobre ascosporas vivas de *M. fijiensis* para evaluar su capacidad de inhibición. Se aislaron tres cepas con propiedades quitinolíticas, dos de rizósfera (Res R-01 y Res R-02) y una de filósfera (Res F), las cuales inhibieron 76.8%, 61.5% y 75.7% la elongación del tubo germinativo, respectivamente. La cepa Res F fue la única que produjo AIA a partir de L-triptófano. Las tres cepas quitinolíticas aisladas tienen potencial como agentes de biocontrol de *M. fijiensis*, dada su capacidad de inhibición *in vitro*, mientras que la cepa Res F podría ser, además, un candidato agente promotor de crecimiento en banano.

Palabras clave:

Ácido indol-acético
Ascosporas
Biocontrol
Biofertilizante
Quitinasas

Keywords:

Indol-acetic acid
Ascospores
Biocontrol
Biofertilizer
Chitinases

Isolation of antagonistic bacteria of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and growth promoters in banana (*Musa AAA*)

Abstract

The Black Sigatoka Disease (BSD) is caused by the ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, a highly virulent pathogen in triploid banana plantations (*Musa AAA*). Management of the BSD is mainly achieved by weekly-aerial sprays of chemical fungicides that provoke environmental pollution and potential hazardous effects on human health. There are reports about the potential of plant-associated microorganisms (leaf, fruit, stem and root-associated) as candidate biocontrol agents of phytopathogens and as biofertilizers. In this work we isolate banana phyllosphere and rhizosphere-associated bacterial strains in salt broth M9 + colloidal chitin, to test their ability to produce indol- acetic acid (IAA) and to evaluate the antifungal activities of the bacterial chitinolytic culture supernatants on *M. fijiensis* ascospore germination. Three chitinolytic bacterial strains were isolated, one phyllosphere-associated (Res F) and two rhizospheric (Res R-01, Res R-02) strains. The chitinolytic culture supernatants of the three isolates failed to inhibit ascospore germination but showed a germ tube inhibition of 75.7%, 76.8% and 61.5%, respectively, as compared to untreated *M. fijiensis* ascospores. Only strain Res F produced IAA from L-tryptophan. The three chitinolytic bacterial strains isolated from banana phyllosphere and rhizosphere have the potential as biocontrol agents, as function of their *in vitro* antifungal activities against *M. fijiensis*. Moreover, due to its ability to synthesize IAA, strain Res F is also a candidate as plant growth promoter in banana plants.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número colonia
Solidaridad 2000. C.P.
30798.
Tapachula Chiapas, México.
Teléfono: +52 962 1227401.
Correo-electrónico:
cruzortizluisangel@gmail.com

1. Introducción

El banano (*Musa AAA*) es una de las frutas tropicales más aceptadas por el mercado consumidor debido a sus precios bajos, sabor agradable, disponibilidad todo el año y por su aporte nutritivo en potasio, hierro y vitamina K (García et al., 2013). En 2018 se produjeron en México más de 2 millones de toneladas, de las cuales el estado de Chiapas contribuyó con 29% de total nacional (SIAP, 2018).

La Sigatoka Negra (SN) es el principal problema fitosanitario que afrontan los productores bananeros de todo el mundo, enfermedad que es causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (teleomorfo) y *Pseudocercospora fijiensis* Morelet (anamorfo), patógenos altamente virulentos que pueden ocasionar pérdidas de hasta el 100% de la cosecha si no se mantienen los niveles de infección por debajo del umbral económico (Arango et al., 2016; Churchill, 2011). Altos índices de infección de SN provocan necrosis foliar, baja tasa fotosintética, debilidad, maduración prematura, rendimientos bajos y de baja calidad, no aptos para la comercialización (Luna-Moreno et al., 2019). De manera convencional, los productores de banano aplican fungicidas químicos para el manejo de la SN, pero con la aparición de cepas resistentes de *M. fijiensis* a los fungicidas, el manejo de la SN se ha vuelto más complicado (Yáñez-López et al., 2012). Aunado a esto, el sobreuso de insumos de síntesis química ha generado problemas en la salud humana y en el ambiente (Budzinski y Courdechet, 2018).

Recientemente se ha reportado el potencial de microorganismos asociados a las plantas (principalmente a las hojas, tallos y raíces), los cuales podrían ser candidatos para el biocontrol de patógenos y como biofertilizantes, reduciendo con su implementación el impacto ambiental causado por la fertilización y el control químico (González y Fuentes, 2016). Distintos trabajos han mostrado el potencial de diversas cepas de *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y actinomicetos, como candidatos agentes de biocontrol de fitopatógenos en diferentes cultivos agrícolas (Badía et al., 2011; Ríos et al., 2016; Suárez y Rangel, 2014). Dentro de estas cepas microbianas destacan aquellas que son capaces de producir enzimas micolíticas (como las quitinasas) que degradan la quitina estructural de las paredes celulares de los hongos fitopatógenos, algunas de las cuales ya han sido reportadas contra *M. fijiensis* (Ceballos et al., 2012; Gutiérrez-Román et al., 2015; Moreno-Castillo et al., 2016). Otros mecanismos de acción de los agentes de biocontrol, aparte de la lisis, son el micoparasitismo, la competencia por nutrientes, la antibiosis, la tolerancia a factores ambientales adversos y la promoción del crecimiento vegetal, como condicionante de un estado inmunológico vegetal fuerte (Suárez y Rangel, 2014). Una de las cualidades principales de los promotores de crecimiento vegetal es la producción de fitohormonas, como el ácido indol- acético (AIA), el cual es absorbido y utilizado por la planta (Kandel et al., 2017). Esta hormona vegetal es normalmente sintetizada a partir del L-triptófano en la rizósfera o en la filósfera de las plantas y se

ha reportado como una molécula señal importante entre planta y microorganismo para la promoción del crecimiento (Hardoim et al., 2008; Spaepen et al., 2007). De esta manera, una de las formas más empleadas para determinar el potencial de microorganismos como posibles promotores de crecimiento vegetal, es determinar su capacidad de producir AIA a partir de L-triptófano (Sziderics et al., 2007).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar bacterias quitinolíticas residentes de la filósfera y rizósfera del banano, así como evaluar su actividad inhibitoria sobre ascosporas de *M. fijiensis* y determinar de manera cualitativa su capacidad para producir ácido indol- acético (AIA) a partir de L-triptófano.

2. Materiales y métodos

2.1. Aislamiento de bacterias quitinolíticas residentes de rizósfera y filósfera

Las muestras se obtuvieron de la plantación de banano (clon Enano Gigante) finca Carlota, de nueve años, en producción, suelo de tipo luvisol, textura franca, capa arable de aproximadamente 75 cm, localizado en el municipio de Tapachula Chiapas, México. Bajo condiciones de esterilidad se tomaron 5 g de suelo de rizósfera o de tejido foliar y se colocaron en 50 mL de buffer de sodio fosfato 0.1 M + Tween 80 (pH 7) 0.1% a 170 rpm por una hora (Ceballos et al., 2012). Alícuotas de 1 mL de esta suspensión se inocularon por triplicado en matraces conteniendo medio mínimo M9 + quitina coloidal 1% + 1 g L⁻¹ de extracto de levadura (5 días, 120 rpm 26 °C) (Moreno-Castillo et al., 2016). La presencia de actividad quitinasa extracelular se confirmó mediante la reacción del sobrenadante de cultivo con el sustrato cromogénico 4-PNG (Sigma) siguiendo el protocolo de Park et al. (2000). Posterior a la incubación, estas suspensiones se estiraron sobre agar nutritivo y se incubaron por 48 h a temperatura ambiente, para posteriormente seleccionar las cepas con mayor crecimiento y resembrarlas en agar nutritivo bajo las mismas condiciones hasta lograr su purificación. Las cepas puras se guardaron en glicerol (30%) a -8 °C.

2.2. Determinación de la producción de ácido indol- acético

Las cepas puras se reactivaron e inocularon por triplicado en medio de crecimiento líquido (glucosa 5 g L⁻¹ + 0.025 g L⁻¹ de extracto de levadura + 0.204 g L⁻¹ de L-triptófano) durante 3 días a 120 rpm y 26 °C. Un control negativo (sin inóculo) fue también preparado (Sziderics et al., 2007). La determinación cualitativa de la producción de ácido indol- acético (AIA) se hizo mediante una prueba colorimétrica. El sobrenadante de cultivo en medio de crecimiento (previamente centrifugado a 6708 g por 5 min) se hizo reaccionar con 2 mL de reactivo de Salkowsky (0.3 g de FeCl₃ en 8.14 mL de H₂SO₄ concentrado y 1.86 mL de agua destilada) por 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente (Glickmann y Dessaux, 1995). Una coloración rosa-púrpura indicó la presencia de AIA en el sobrenadante de cultivo. Un

control positivo con ácido 3-indol acético (Sigma) fue además preparado ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) con fines de comparación.

2.3. Efecto del sobrenadante de medio de cultivo M9 sobre ascosporas de *M. fijiensis*

El procedimiento de descarga de ascosporas se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Gutiérrez-Román et al. (2015) y Moreno-Castillo et al. (2016); lesiones en estadio 6 (escala de Fouré) presentes en hojas de banano infectadas con *M. fijiensis* se colectaron en campo y fueron colocadas en cámara húmeda por 48 h. Posteriormente se seleccionaron bajo el estereoscopio, las lesiones con abundantes pseudotecios maduros sobre el haz y próximos a esporular, las cuales se engraparon a cartulinas de 5x5 cm dejando el haz expuesto. Las lesiones se lavaron en agua corriente por 15 min, se eliminó el exceso de agua con papel toalla y se colocaron dentro de las tapas de cajas Petri de vidrio (45 mm de diámetro) cuyas bases contenían agar-agua al 1.5%. Las cajas de Petri se cerraron y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se localizaron las ascosporas sobre el agar y se marcaron con aguja estéril. El sobrenadante de las cepas bacterianas cultivadas en medio M9 + quitina coloidal (preparado fresco), fue centrifugado y filtrado en membrana de nitrocelulosa ($0.45 \mu\text{m}$). Posteriormente, $50 \mu\text{L}$ del sobrenadante se inocularon sobre las ascosporas vivas de *M. fijiensis* inmediatamente después de ser descargadas y marcadas sobre el agar-agua 1.5%. Después de 24 h de incubación a temperatura ambiente, el crecimiento de las ascosporas fue detenido con unas gotas de solución de lactofenol, para posteriormente ser fotografiadas bajo el microscopio. La longitud de 100 tubos germinativos por tratamiento fue medidos y comparados con las longitudes de los tubos germinativos del testigo (ascosporas a libre germinación y crecimiento), para calcular el porcentaje de inhibición observado en cada tratamiento.

2.4 Análisis de datos

Los datos obtenidos de todas las variables se presentan como la media y desviación estándar.

3. Resultados y Discusión

Se aislaron dos cepas bacterianas de rizósfera y una de filósfera de plantas de banano clon Enano Gigante, codificadas como Res R-01, Res R-02 y Res F, respectivamente. Se confirmó la actividad quitinolítica de las tres cepas aisladas, ya que el sobrenadante de cultivo bacteriano en M9 + quitina coloidal degradó el sustrato cromogénico 4-PNG, tornando la reacción amarilla (no mostrado). Por las condiciones de crecimiento y morfología colonial, es probable que las cepas aisladas pertenezcan al género *Bacillus*, género que parece ser común estar asociado con plantas de banano (Ceballos et al., 2012). Estos autores aislaron cepas bacterianas de la filósfera del banano y caracterizaron la actividad antifúngica de los sobrenadantes de cultivo sobre la germinación de ascosporas y crecimiento micelial de *M. fijiensis*. De 648 aislados, el sobrenadante del

44% de las cepas, mostraron valores de inhibición por arriba del 75%, las cuales eran en su mayoría *Bacillus* y en una menor proporción *Paenibacillus*. El género *Bacillus* también ha sido reportado como productor de enzimas líticas con actividad antifúngica (glucanasas y quitinasas) (Villarreal-Delgado et al., 2017). Se ha correlacionado el éxito de los agentes de biocontrol con la producción de enzimas líticas, principalmente quitinasas, mediante las cuales los microorganismos antagonistas degradan la quitina estructural contenida en la pared celular de los hongos fitopatógenos, hidrolizando el enlace glucosídico β (1,4) entre monómeros de N-acetil-glucosamina (GlcNAC) que constituyen al biopolímero para generar oligómeros y monómeros de bajo peso molecular que usan como fuente de carbono (Swiontek et al., 2014). La actividad antifúngica de las quitinasas tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos (Villarreal-Delgado et al., 2017).

Asimismo, los sobrenadantes quitinolíticos de las cepas Res R-01, Res R-02 y Res F, obtenido del cultivo en medio M9 + quitina, no inhibieron la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis* pero inhibieron en 76.8%, 61.5% y 75.7% la elongación del tubo germinativo con respecto al testigo, respectivamente (Figura 1). Ceballos et al. (2012) reportaron la inhibición del crecimiento de los tubos germinativos de *M. fijiensis* usando cepas de *Bacillus subtilis* (94% de inhibición), *Bacillus amyloliquefaciens* (93%) y *Bacillus pumilus* (92%). Moreno-Castillo et al. (2016) lograron una inhibición cercana al 100% en la germinación de ascosporas y en la elongación del tubo germinativo de *M. fijiensis* con el sobrenadante de *Streptomyces galilaeus* CFFSUR-B12, mientras que una suspensión celular de la cepa quitinolítica *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 inhibió en 100% la germinación de ascosporas de *M. fijiensis* (Gutiérrez-Román et al., 2015). Hernández et al. (2018) reportaron que cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *Stenotrophomonas rhizophila* inhibieron 81-93%, 51-69% y 90-98%, respectivamente, la germinación de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Antracnosis de la papaya y mango).

Por otro lado, la cepa Res F fue la única que produjo ácido indol- acético a partir de L-triptófano (Figura 2). Se han reportado cepas bacterianas productoras de ácido indol- acético (AIA) en diversos cultivos como el arroz, frijol y tomate (Flores-Márquez et al., 2017), las cuales tienen el potencial de ser usadas como biofertilizantes, ya que promueven procesos fisiológicos que incluyen el alargamiento y la división celular, diferenciación de tejido, fototropismo, gravitropismo, respuestas de defensa, entre otros. Dentro de estas cepas, *Bacillus* también ha sido reportado como promotor de crecimiento en una variedad de plantas (Vega-Celedon et al., 2016).

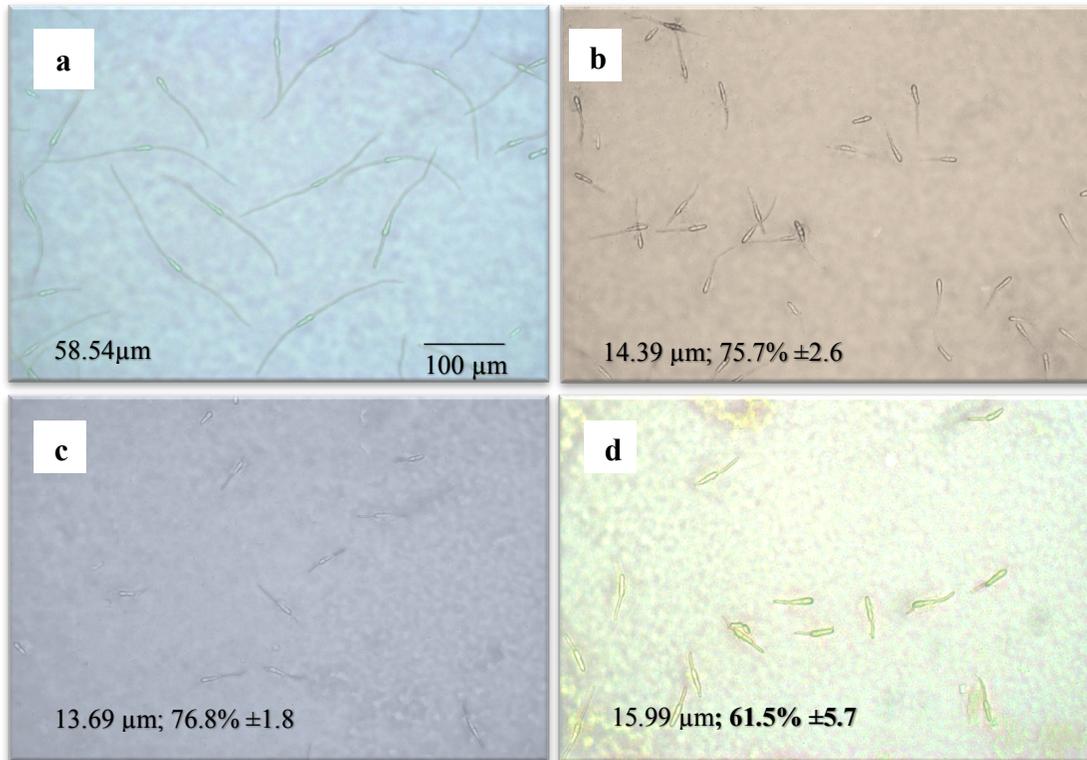


Figura 1. Porcentaje de inhibición a 24 h (promedio±desviación estándar) del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* inoculadas con el sobrenadante quitinolítico bacteriano de las cepas b) Res F (aislada de filósfera), c) Res R-01 (de rizósfera) y d) Res R-02 (de rizósfera) de banano. Se muestra el crecimiento de las ascosporas testigo a) sin tratamiento. Aumento 10X.

Los resultados de este trabajo son preliminares y se requiere de más investigación tanto *in vitro* como *in planta* para poder determinar el desempeño de las cepas como agentes de biocontrol de *M. fijiensis* y como biofertilizantes en plantas de banano.

cepas aisladas, solamente la cepa Res F fue capaz de sintetizar AIA a partir de L- triptófano, razón por la cual puede ser considerada como un potencial promotor de crecimiento en plantas de banano.

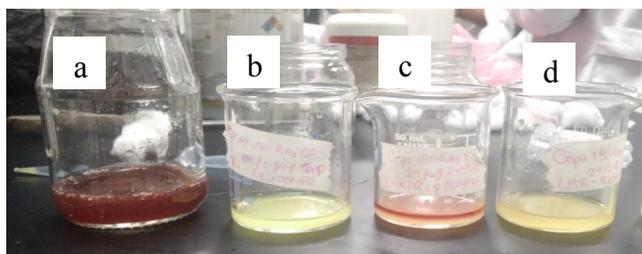


Figura 2. Detección colorimétrica de ácido indol- acético (AIA) en sobrenadante de cultivo bacteriano. a) control con AIA (sigma), b) Res R-01, c) Res F, d) Res R-02.

4. Conclusión

En el presente trabajo se aislaron tres cepas con propiedades quitinolíticas, dos asociadas a la rizósfera y una asociada a la filósfera de plantas de banano. Los sobrenadantes de cultivo de las cepas aisladas, codificadas como Res R-01, Res R-02 y Res F, no inhibieron la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis*, pero si redujeron la elongación del tubo germinativo en 76.8%, 61.5% y 75.7%, respectivamente. Las

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Arango RE, Diaz-Trujillo C, Dhillon B, Aerts A, Carlier A, Crane C, Jong T, Vries I, Dietrich R, Farmer A, Fortes C, García S, Guzman M, Hamelin R, Lindquist E, Mehrabi R, Quiros O, Schmutz J, Shapiro H, Reynolds E, Scalliet G, Souza M, Van der Lee T, De Wit P, Zapater MF, Zwiers LH, Grigorie I, Goodwin S, Kema G. 2016. Combating a global threat to a clonal crop: banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (Synonym *Mycosphaerella fijiensis*) genomes reveal clues for disease control. *Plos Genetics* 12(10): 1-36.
- Badía MR, Hernández T, Murrel AL, Mahillon J, Pérez M. 2011. Isolation and characterization of strains of the *Bacillus* associated of rice (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecología* 6(1): 90-99.
- Budzinski H, Couderchet M. 2018. Environmental and human health issues related to pesticides: from usage and

- environmental fate to impact. *Environmental Science and Pollution Research* 25(15): 14277–14279.
- Ceballos I, Mosquera S, Angulo-Bedoya M, Mira M, Argel L, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S, Villegas V. 2012. Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbial Ecology* 64: 641–653.
- Churchill CL. 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology* 12: 307–328.
- Flores-Márquez DJ, Leal-Medina GI, Ardila LD, Cárdenas DM. 2017. Isolation and characterization of rhizobacteria associated with rice crops (*Oryza sativa* L.) in Norte de Santander (Colombia). *Agrociencia* 51(4): 373-391.
- García R, González F, García C, Mora S, González A, Martínez A. 2013. Banana (*Musa paradisiaca*) market in Mexico, 1971-2017. *Agrociencia* 47(4): 399–410.
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 61: 793–796.
- González H, Fuentes N. 2016. Action mechanism of five microorganism promoters of plant growth. *Agricultural Sciences Magazine* 34(1): 17-31.
- Gutiérrez-Román MI, Holguín-Meléndez F, Dunn M, Guillén-Navarro K, Huerta-Palacios G. 2015. Antifungal activity of *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 purified chitinolytic enzymes and prodigiosin against *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka in banana (*Musa* spp.). *Biocontrol* 60: 565–572.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16(10): 463–471.
- Hernández LG, Rivas T, Romero M, Ruiz FH, Chiquito RG. 2018. Potencial antagónico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 20: 4311–4321.
- Kandel S, Joubert P, Doty S. 2017. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 5(77): 2-26.
- Luna-Moreno D, Sánchez-Álvarez A, Islas-Flores I, Canto-Canche B, Carrillo-Pech M, Villarreal-Chiu JF, Rodríguez-Delgado M. 2019. Early detection of the fungal banana black sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* by an SPR immunosensor method. *Sensors* 19(3): 1–12.
- Moreno-Castillo B, Dunn M, Guillén-Navarro K, Holguín-Meléndez F, Hernández-Ortiz M, Encarnación S, Huerta G. 2016. Antifungal performance of extracellular chitinases and culture supernatants of *Streptomyces galilaeus* CFFSUR-B12 against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 32(3): 44.
- Park SH, Lee JH, Lee HK. 2000. Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027. *The Journal of Microbiology* 38: 224–229.
- Ríos Y, Rojas M, Ortega M, Álvarez D, Rodríguez J. 2016. Isolation and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains. *Cultivos Tropicales* 37(1): 34-39.
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Resumen nacional intención de cosecha 2018. <https://www.gob.mx/siap>
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology* 31(4): 425–48.
- Suárez LY, Rangel AL. 2014. Isolation of microorganisms for biological control of *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica* 62(4): 370-378.
- Swiontek M, Urszula J, Aleksandra B, Maciej W. 2014. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current Microbiology* 68: 71–81.
- Sziderics AH, Rasche F, Trognitz F, Sessitsch A, Wilhelm E. 2007. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology* 53: 1195–1202.
- Vega-Celedon P, Canchignia H, González M, Seeger M. 2016. Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultivos Tropicales* 37: 33-39.
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, Santos-Villalobos S. 2017. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 93-130.
- Yáñez-López R, Torres-Pacheco I, Guevara-González RG, Hernández-Zul I, Quijano-Carranza JA, Rico-García E. 2012. The effect of climate change on plant diseases. *African Journal Biotechnology* 11(10): 2417–2428.