



## Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Bacillus* spp sobre hongos asociados al proceso de fermentación en cacao

### Inhibition of the *in vitro* growth of *Bacillus* spp on fungi associated with the fermentation process in cacao

Diana Carolina Cedeño Alcívar<sup>1,\*</sup>; Lenin Antonio Vera Macías<sup>1</sup>; Wilson Paúl Cedeño Guzmán<sup>1</sup>; Sergio Miguel Vélez Zambrano<sup>2</sup>

1 Carrera de Agroindustria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico, km 2.7 Vía El Limón, Calceta, Manabí, Ecuador.

2 Carrera de Ingeniería Agrícola, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, , Campus Politécnico, km 2.7 Vía El Limón, Calceta, Manabí, Ecuador.

\*Autor correspondiente: [dcedeno@espam.edu.ec](mailto:dcedeno@espam.edu.ec) (D. C. Cedeño Alcívar).

ID ORCID de los autores

D. C. Cedeño Alcívar:  <https://orcid.org/0000-0001-8420-7014>

L. A. Vera Macías:  <https://orcid.org/0009-0003-6025-7203>

W. P. Cedeño Guzmán:  <https://orcid.org/0000-0002-9506-9777>

S. M. Vélez Zambrano:  <https://orcid.org/0000-0003-3785-7457>

#### RESUMEN

Los hongos productores de Ocratoxina A (OTA) en el cacao son un problema de seguridad alimentaria que afecta la calidad organoléptica del chocolate y a la salud humana. Dado que las cepas de *Bacillus* spp resultan ser efectivos controladores biológicos, el objetivo de este trabajo fue inhibir el crecimiento de hongos productores de OTA. Para ello, se ensayó el antagonismo *in vitro* de dosis de 100 y 200 µL de *Bacillus* spp contra hongos aislados de granos de cacao en proceso de fermentación: *Aspergillus* spp y *Penicillium* sp. Los resultados de este estudio demuestran que la cepa de *B. subtilis* 31BMC y *B. licheniformis* E-44 disminuyeron significativamente el crecimiento por aislados de *Aspergillus* spp y *Penicillium* sp, inhibiendo su crecimiento en un 74,43% y 81,52%, transcurridos tres días, respectivamente. Las cepas de *Bacillus* spp demostraron ser efectivas en la inhibición *in vitro* de hongos productores de OTA en granos de cacao.

**Palabras clave:** Aislados fúngicos; antagonismo; inhibición; control biológico; bioprospección.

#### ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) producing fungi in cocoa are a food safety problem that affects the organoleptic quality of chocolate and human health. Since the *Bacillus* spp strains turn out to be effective biological controls, the objective of this work was to inhibit the growth of OTA-producing fungi. For this, the *in vitro* antagonism of doses of 100 and 200 µL of *Bacillus* spp was tested against fungi isolated from cocoa beans in the fermentation process: *Aspergillus* spp and *Penicillium* sp. The results of this study show that the strain of *B. subtilis* 31BMC and *B. licheniformis* E-44 significantly decreased the growth of *Aspergillus* spp and *Penicillium* sp isolates, inhibiting their growth by 74.43% and 81.52%, after three days, respectively. The *Bacillus* spp strains proved to be effective in the *in vitro* inhibition of OTA-producing fungi in cocoa beans.

**Keywords:** Fungal isolates; antagonism; inhibition; biologic control; bioprospecting.

Recibido: 25-07-2023.

Aceptado: 04-09-2023.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

## INTRODUCCIÓN

En Nigeria, Costa de Marfil, Guinea, Camerún, Italia, Brasil, Perú, entre otros países, se ha detectado la presencia del 93% de Ocratoxina A [OTA] en granos de cacao demostrando que, los organismos generadores de esta toxina están presentes desde la cosecha, siendo la etapa de fermentación donde proliferan en mayor cantidad hongos filamentosos, debido a la sobrefermentación (144 h) (Copetti et al., 2010; Manda et al., 2009; Ramos et al., 2016; Teixeira de Magalhães et al., 2011; Almeida et al., 2020). En Ecuador, se encontró presencia del 14% de OTA en muestras de cacao en concentraciones hasta 5,53 µg/kg (Toaza, 2012). Los granos de cacao contaminados por hongos filamentosos (es decir, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*) (Serra et al., 2019) inciden en la presencia de OTA causando efectos nefrotóxicos, inmunosupresores, carcinogénicos y teratogénicos afectando la salud del ser humano (Malir et al., 2013; Ravelo et al., 2011) e importantes pérdidas económicas (Wang et al., 2022). Los hongos productores de OTA en granos de cacao son los géneros *A. niger* y *A. carbonarius* de quienes se ha reportado la incidencia de OTA en un 96,6% en chocolates artesanales expendidos en Cuenca-Ecuador debido al deficiente manejo postcosecha (Bonilla, 2013; IARC & WHO, 1993; Wang et al., 2023). La presencia de micotoxinas en chocolates es un problema de seguridad alimentaria, que en mercados europeos es de estricto control, y afecta la exportación del cacao ecuatoriano.

Se ha demostrado que, la aplicación de microorganismos antagonistas es una opción más económica y se prevé como una alternativa sostenible (Putri et al., 2023) para el control biológico de OTA. En particular, las especies de *Bacillus* más prevalentes, incluidas *B. subtilis* y *B.*

*licheniformis*, están clasificadas por la FDA de los EE. UU. y se consideran seguras (Ghazaei, 2023). Además, han sido ampliamente estudiadas como agente de control biológico (Chowdhury et al., 2015; Fan et al., 2017), por mantener su viabilidad cuando se almacenan durante largos períodos. *B. subtilis* es capaz de reducir el 90% del contenido de OTA en granos de cacao fermentados y secos (Kadjo et al., 2023). También, ha demostrado inhibir los niveles de hongo *Trichoderma* sp en plantas de cacao (Putri et al., 2023) y reducir micotoxinas acumuladas en las semillas de maíz por *Fusarium moniliforme* (Bhushan et al., 2013; Figueiredo et al., 2010; He et al., 2019; Muzaifa et al., 2019), asimismo, se demostró que *B. licheniformis* inhibe el crecimiento de *Aspergillus* y degrada la aflatoxina B1 (AFB1) y OTA de manera eficiente (Derya et al., 2019; Sukkasem et al., 2018). Las cepas de *Bacillus* spp producen una amplia variedad de antibióticos (bacitracinas, bacilinas, bacilomicinas B y tirocidinas), sustancias y enzimas (celulasas, glucanasas, proteasas y quitinasas), que inhiben el crecimiento de fitopatógenos afectando la germinación de las esporas y degradando su pared celular (Caulier et al., 2019; Y. He et al., 2019; Li et al., 2023).

Dado el éxito antagonista de cepas bacterianas contra el crecimiento de *Aspergillus* spp, hipotéticamente planteamos que cepas de *Bacillus* spp serán efectivas contra el crecimiento de hongos productores de OTA quienes afectan al cacao. Para confirmar la hipótesis planteada, el objetivo del presente trabajo fue controlar el crecimiento de hongos productores de OTA aislados de la fermentación del cacao mediante la aplicación de *Bacillus* spp en condiciones *in vitro*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Aislamiento de microorganismos

Se aislaron seis cepas bacterianas del género *Bacillus* del suelo y materia orgánica en descomposición; las cepas fueron identificadas y conservadas en 20% glicerol y -20 °C (Florido et al., 2017). Las cepas bacterianas reconocidas fueron *B. subtilis* 50BP, 20BP, E-54, 31BMC y 21BMC y *B. licheniformis* E-44. Se utilizó Caldo Nutriente (CN) para la verificación de la pureza y refrescamiento de las cepas de *Bacillus* spp. Los medios se prepararon de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Titan Biotech, India), añadiendo agua destilada a la cantidad recomendada del medio deshidratado, y autoclavado a 15 psi durante 15 min.

Se obtuvieron aislados fúngicos de los géneros *Aspergillus* spp y *Penicillium* sp, provenientes de cuatro centros de acopio de cacao de la ciudad de Calceta (Manabí, Ecuador). El aislamiento de los aislados fúngicos se realizó de forma directa, mediante la técnica de cámara húmeda (Cajiao, 2017). Se acondicionaron recipientes plásticos con papel absorbente esterilizado humedecido con

agua destilada estéril. Para seguidamente, colocar granos de cacao con un peso promedio de 1,2 g. La cantidad de granos de cacao colocados fueron de 20 a 25 granos por cada cámara húmeda. La incubación en estas cámaras fue a 37 °C durante ocho días.

Luego, de los granos que presentaban un notable crecimiento fúngico, se tomó una pequeña porción de este tejido y se colocó en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Este procedimiento se repitió para las muestras de cuatro centros de acopio de cacao ubicados en la ciudad de Calceta.

### Identificación morfológica

La identificación macroscópica de las cepas de hongos se efectuó mediante las características de las colonias de los hongos en las cajas Petri. Las características observadas fueron: forma de la colonia, crecimiento, color y textura. La identificación microscópica se realizó preparando láminas semipermanentes, colocando una gota de azul de lactofenol (Fisher, USA) en el centro de un portaobjeto previamente esterilizado según la

metodología descrita por (NTP, 1988). Luego, empleando un asa de platino se colectó un pequeño fragmento de los tejidos miceliares de los hongos y se transfirió al portaobjeto con la gota de azul de lactofenol. Después, se colocó un cubreobjeto sobre la muestra para su observación en microscopio de luz (Olympus, Japón).

Para la identificación del género fúngico, se utilizaron claves de identificación y literatura pertinente, para cada espécimen estudiado (Seifert et al., 2011).

### Ensayo de antagonismo

Los aislados fúngicos se sembraron previamente en medio PDA y se incubaron durante ocho días a 37 °C. Por otro lado, las cepas bacterianas se sembraron en Caldo Nutriente durante 24 horas, en condiciones de agitación en incubadora a 150 rpm y temperatura de 30 °C. Posteriormente, se agregaron 100 y 200 µL del cultivo bacteriano en placas de 90 x 16 mm mediante diseminación con espátula Drigalsky y se dejó secar durante 15 min. Seguidamente, se depositó un disco de 5 mm cortado con un sorbete plástico previamente esterilizado, de cada cepa fúngica crecida, en el centro de la placa con medio de cultivo PDA. Las placas se incubaron a 30 °C y como testigo se empleó el hongo sembrado sin la cepa bacteriana. Las evaluaciones se realizaron transcurridos tres días. El experimento se realizó empleando un diseño completamente al azar [DCA] con arreglo factorial a\*b, con 12 tratamientos y 5 repeticiones. En la Tabla 1, se detallan los niveles de cada factor.

**Tabla 1**

Niveles de los factores

Factor a	Factor b
a1: <i>B. subtilis</i> 21BMC	
a2: <i>B. subtilis</i> 20BP	b1: 100 µL
a3: <i>B. subtilis</i> E-54	b2: 200 µL
a4: <i>B. subtilis</i> BP-50	
a5: <i>B. subtilis</i> 31BMC	
a6: <i>B. licheniformis</i> E-44	

El diámetro del crecimiento del hongo se midió con un calibrador Vernier donde se tomaron dos medidas de distancia de crecimiento micelial. Esta medición, se realizó de forma horizontal y vertical, tomando en cuenta que la caja Petri es redonda. Se marcaron dos puntos: uno que representó el lado horizontal y el otro el lado vertical; estos dos datos se promediaron y se obtuvo el resultado en longitud (mm) para luego representarlo en porcentaje de inhibición aplicando la ecuación aplicada por (Bharose & Gajera, 2018; Ramos et al., 2016).

$$\% \text{ inhibición} = 100 - (\text{DMCT} * 100) / \text{DMST} \quad (1)$$

Donde,

- DMCT= Distancia de crecimiento micelial con tratamiento antagonista.
- DMST= Distancia de crecimiento micelial sin tratamiento antagonista.

Se realizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis al 0,05 de significancia de las mediciones del porcentaje de inhibición. El procesamiento de datos se realizó utilizando el software estadístico *Infostat* versión 2018.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Crecimiento fúngico en cacao

De la etapa de fermentación del cacao, se aislaron 20 aislados fúngicos que correspondieron a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas más notables son resumidas en la Tabla 2, en concordancia con lo estudiado por (Samson et al., 2014; Seifert et al., 2011).

### Antagonismo *in vitro*

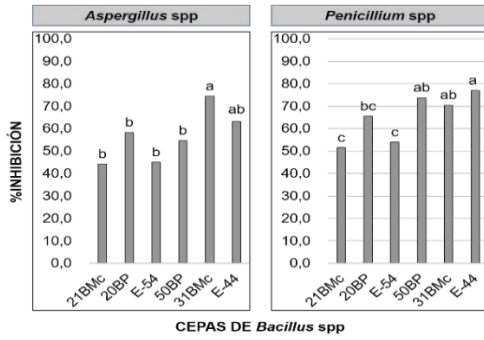
La Figura 1 describe la eficiencia de las cepas de *Bacillus* spp con respecto al porcentaje de inhibi-

ción de los aislados fúngicos. La cepa de *B. subtilis* 31BMC controló significativamente ( $\alpha = 0,0265$ ) a la cepa fúngica CF1.1(1) de *Aspergillus* spp, inhibiendo su crecimiento en un 74,43%. La bacteria *B. licheniformis* E-44 controló significativamente ( $\alpha = 0,0074$ ) a la cepa fúngica CH1.2(2) de *Penicillium* sp en un porcentaje de inhibición de 76,96%. Las dosis de 100 y 200 µL de *Bacillus* spp no mostraron diferencias significativas ( $\alpha > 0,05$ ) sobre los aislados fúngicos de *Aspergillus* spp y *Penicillium* sp.

**Tabla 2**

Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de muestras de hongos

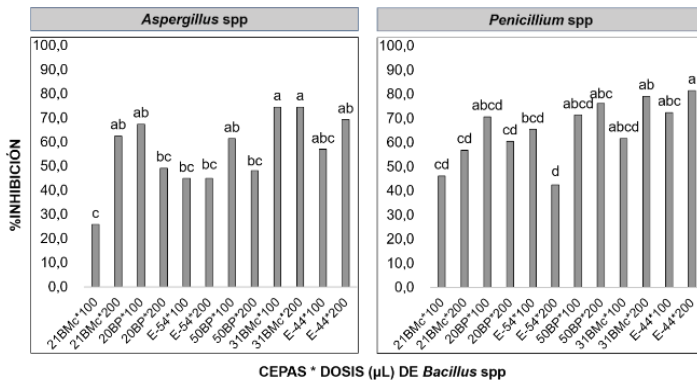
Código de muestra identificada	Características macroscópicas	Características microscópicas
CF1.1(1) CE1.1(1)	Colonias irregulares algodonosas de crecimiento rápido, de color verde con bordes blanco y textura algodonosa elevada.	Conidióforos lisos, vesículas globosas, sobre la vesícula se observaron la formación de métulas, formación de fiálides y abundantes conidios formados sobre los fiálides y presencia de conidios alrededor.
CE1.2(1)	Colonia de rápido crecimiento, color negro, con textura algodonosa.	Conidióforo liso, conidio globoso ligeramente rugoso de color negro y presencia de conidios a su alrededor.
CH1.2(2)	Colonia circular de crecimiento rápido, de color gris verde olivo con bordes blancos y textura densa cremosa.	Conidióforo liso con ramificaciones, métulas formadas sobre las ramificaciones de los conidióforos, fiálides formadas sobre las métulas y microconidios simples formados en las métulas y presencia de conidios alrededor.



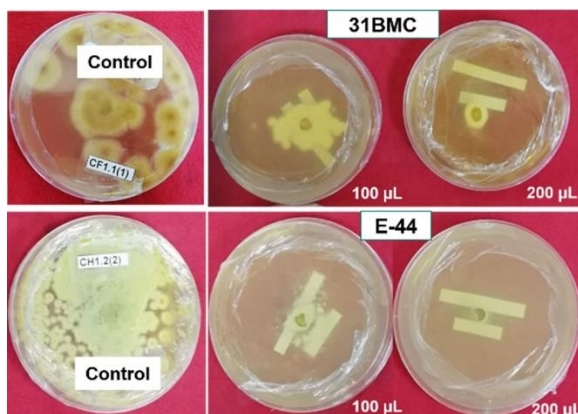
**Figura 1.** Porcentaje de inhibición de los aislados fúngicos CF1.1(1) y CE1.1(1) de *Aspergillus* spp y CH1.2(2) de *Penicillium* spp expuestas por las seis cepas de *Bacillus* spp en medio PDA ajustado a pH 7. Las letras diferentes (a y b) entre columnas indican diferencias significativas para Kruskal Wallis ( $\alpha \leq 0,05$ ).

La Figura 2 describe la interacción entre las cepas de *Bacillus* spp y las dosis de aplicación (100 y 200  $\mu$ L) sobre el porcentaje de inhibición de los aislados fúngicos de *Aspergillus* spp y *Penicillium* sp. La cepa de *B. subtilis* 31BMc con dosis de 100 y 200  $\mu$ L controló significativamente ( $\alpha=0,0093$ ) a la cepa fúngica de CF1.1(1) de *Aspergillus* spp, inhibiendo su crecimiento en un 74,43% y la cepa de *B. licheniformis* E-44 con dosis de 200  $\mu$ L controló significativamente ( $\alpha=0,0239$ ) a la cepa fúngica de CH1.2(2) de *Penicillium* sp, en un porcentaje de inhibición de 81,52%.

La interacción entre las cepas de *Bacillus* spp y dosis de 100 y 200  $\mu$ L no tuvieron diferencias



**Figura 2.** Porcentaje de inhibición de los aislados fúngicos CF1.1(1) y CE1.1(1) de *Aspergillus* spp y la cepa CH1.2(2) de *Penicillium* sp. expuestas por las seis cepas\*dosis ( $\mu$ L) de *Bacillus* spp en medio PDA ajustado a pH 7. Las letras diferentes (a y b) entre columnas del %inhibición indican diferencias significativas para Kruskal Wallis ( $\alpha \leq 0,05$ ).



**Figura 3** Actividades antifúngicas de *B. subtilis* 31BMc y *B. licheniformis* E-44 contra hongos productores de OTA CF1.1(1) y CH1.2(2). Los aislados fúngicos del lado izquierdo no estuvieron expuestas a cultivos bacterianos, mientras que, del lado derecho, mostraron una inhibición

significativas ( $\alpha > 0,05$ ) sobre el control de los aislados fúngicos de *Aspergillus* spp CE1.1(1) y CE1.2(1). Los aislados fúngicos no inhibidos poseen una estructura celular rígida compuesta por polisacáridos y proteínas; entre los polisacáridos destacan la quitina (10-20%) y glucano (65-90%). Las proteínas están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas (20-30%) (Astorga et al., 2014; Pontón, 2008).

Se ha demostrado que las cepas de *Bacillus* spp reducen entre un 22–73% el crecimiento de *Aspergillus flavus* después de siete días de incubación (Palumbo et al., 2006). Además, *B. licheniformis* disminuyó el 98% de maíz contaminado con ZEA (zearalenona), inhibió el crecimiento de *Aspergillus*, degradó la aflatoxina B1 (AFB1) y la OTA de manera eficiente (He et al., 2018b; Yi et al., 2011).

Los experimentos *in vitro* dieron como resultado una inhibición significativa del crecimiento fúngico (Figura 3). Estos resultados se deben a que las cepas de *B. subtilis* tienen la capacidad de producir enzimas hidrolíticas que ocasionan actividades de degradación en la pared de la quitina de los hongos (Sadfi et al., 2002), las enzimas que ocasionan este fenómeno son las quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasa y las proteasas (Li et al., 2016). Las cepas de *B. licheniformis* exhiben actividad antifúngica y presentan la producción de forlantibiótico y 2,3-butanediol (Sukkasem et al., 2018).

significativa del crecimiento. Los hongos estuvieron expuestos a cultivo bacteriano de *Bacillus* spp con dosis de 100 y 200 µL. Estas imágenes fueron tomadas el día 3 del experimento (después de sellar las placas).

En efecto, el compuesto antifúngico que exhibe las cepas de *Bacillus* spp pertenecen al grupo iturina de los antibióticos, que interactúan con los esteroides de la membrana citoplásmica de los

hongos (Chitarra et al., 2003) y con los compuestos lipopéptidos cíclicos de las familias surfactina y fengicina (Cawoy et al., 2015).

**Tabla 3**  
Inhibición de cepas de *Bacillus* spp. sobre hongos filamentosos

<i>Bacillus</i> spp. sobre hongos filamentosos asociados al proceso de fermentación del cacao	<i>Bacillus</i> spp. sobre hongos filamentosos en estudios previos
<i>B. subtilis</i> controló el crecimiento de <i>Aspergillus</i> spp. en un 74,43%	Cepas de <i>B. subtilis</i> AF1 suprimió el 90% de <i>A. niger</i> (Podile y Prakash, 1996). <i>B. subtilis</i> causaron inhibición del 30% al 70% en el crecimiento fúngico de <i>P. digitacum</i> (Leelasuphakul, Hemmanee y Chuenchitt, 2008). <i>Bacillus</i> sp. redujo en un rango entre 76-95% el crecimiento micelial de <i>A. westerdijkiae</i> (Einloft et al., 2017).
<i>B. licheniformis</i> inhibió en un 81,52% de <i>Penicillium</i> spp.	<i>B. subtilis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i> pudieron suprimir el crecimiento de <i>A. parasiticus</i> (hasta un 92%) y la producción de aflatoxinas (hasta un 100%) (Siahmoshteh et al., 2018). <i>B. licheniformis</i> bajo condiciones <i>in vitro</i> controló el crecimiento de <i>P. verrucosum</i> MC12 en un 53% (UI, 2019). <i>Bacillus subtilis</i> CW14 y sus componentes sobrenadantes de fermentación (Mw < 3 kDa, 3-10 kDa y > 10 kDa) tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de <i>A. ochraceus</i> y la tasa antifúngica de CW14 alcanzó el 85,7 % (Zhao et al., 2022). <i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1 tuvo mayor efecto de inhibición en el crecimiento de <i>P. crustosum</i> , en un 38,13% (Palacios, 2021).

## CONCLUSIONES

Las características morfológicas de los aislados fúngicos obtenidos de los granos de cacao indican que pertenecen a *Aspergillus* spp y *Penicillium* sp. Las cepas bacterianas más efectivas en el control *in vitro* de los hongos productores de OTA fueron, *B. subtilis* 31BMC y *B. licheniformis* E-44, las cuales tienen efecto de inhibición del 74,43 y 81,52% en

su orden, sobre los aislados CF1.1(1) y CH1.2(2) de *Aspergillus* y *Penicillium* sp. respectivamente. *Bacillus* spp demostró ser efectivo en la inhibición de hongos productores de OTA. Es por ello que, es necesario que se realicen más investigaciones sobre el uso de estas cepas bacterianas como agentes de control biológico.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los técnicos del laboratorio de biología molecular de la ESPAM MFL, Ing. Diego

Zambrano Pazmiño y M.V. José Ormaza, por su colaboración en esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, O. G. G. D., Pinto, U. M., Matos, C. B., Frazilio, D. A., Braga, V. F., von Zeska-Kress, M. R., & De Martinis, E. C. P. (2020). Does quorum sensing play a role in microbial shifts along spontaneous fermentation of cocoa beans? An *in silico* perspective. *Food Research International*, 131, 109034. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109034>
- Astorga-Quirós, K., Meneses-Montero, K., Zúñiga-Vega, C., Brenes-Madriz, J. A., & Rivera-Méndez, W. (2014). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Revista Tecnología En Marcha*, 27(2), pág. 82-91. <https://doi.org/10.18845/tm.v27i2.1929>
- Bharose, A., & Gajera, H. (2018). Antifungal Activity and Metabolites Study of *Bacillus* Strain Against Aflatoxin Producing *Aspergillus*. *Journal of Applied Microbiology and Biochemistry*, 02(02), <https://doi.org/10.21767/2576-1412.100024>
- Bhushan, G., Chhangani, S., Singh, J., & Singh, A. P. (2013). Antagonistic Effects of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* Against Seed-Borne Mycoflora of *Pennisetum americanum*. 1(3), 71-75.
- Bonilla, J. (2013). Análisis de Ocratoxina en chocolate de hoja comercializado en los mercados de la ciudad de Cuenca [Tesis de maestría, Universidad del Azuay]. Repositorio Institucional Universidad del Azuay.
- Cajiao, A. P. (2017). Aislamiento de hongos asociados al grano de café provenientes de zonas productoras en norte de Santander - Colombia. @limentech, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 14(1), 50-58. <https://doi.org/10.24054/16927125.v1.n1.2016.2125>
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology*, 10, 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/*amyloliquefaciens*: Lipopeptides as inhibitors of phytopathogens. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 281-295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
- Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., van Aelst, A. C., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 159-166. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01819.x>
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- Copetti, M. V., Pereira, J. L., Iamanaka, B. T., Pitt, J. L., & Taniwaki, M. H. (2010). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1-2), 67-70.
- Derya, I. C., Abuzer, C., & Canan, C. (2019). Relationship between soil composition, diversity and antifungal properties of *Bacillus* spp. Isolated from southeastern Anatolia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 170-177. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1559095>
- Einloft, T. C., Oliveira, P. B. D., Veras, F. F., Welke, J. E., Mallmann, C. A., Dilkin, P., & Dionello, R. G. (2017). Effect of *Bacillus* spp. on *Aspergillus westerdijkiae* growth, sporulation and ochratoxin A production in green-coffee medium. *Food Science and Technology*, 37, 24-27.

- Fan, H., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, X., Duan, Y., & Wang, Q. (2017). Biocontrol of Bacterial Fruit Blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via Surfactin-Mediated Antibacterial Activity and Colonization. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1973.
- Figueiredo, J. E. F., Teixeira, M. A., Lima, G. V. C., Bressan, W., Pinto, N. F. J. de, & Casela, C. R. (2010). Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/865392>
- Florido, G. M., Rondón, A. J., Pérez, M., Arteaga, F., Bocourt, R., Portilla, Y., Rodríguez, M., Pérez, Y., Beruvides, A., & Laurencio, M. (2017). Methodology for the isolation, identification and selection of *Bacillus* spp. Strains for the preparation of animal additives. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(2), 11.
- Ghazaei C. (2022). *Study of the Effect of Bacteriocin-producing Bacillus subtilis Strains on Beta-lactamase-producing Pathogenic Bacteria*. *J Clin Res Paramed Sci*, 11(2), e130208. <https://doi.org/10.5812/jcrps-130208>.
- He, S., Feng, K., Ding, T., Huang, K., Yan, H., Liu, X., & Zhang, Z. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* BL-010. *Microbial Pathogenesis*, 118, 199-201. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.037>
- He, Y., Zhu, M., Huang, J., Hsiang, T., & Zheng, L. (2019). Biocontrol potential of a *Bacillus subtilis* strain BJ-1 against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41(1), 47-59. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1564792>
- IARC, & WHO. (1993). *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*. Report IARC & WHO.
- Kadjo, A. C., Beugre, G. C., Sess-Tchotch, D. A., Kedjebo, K. B. D., Mounjouenpou, P., Durand, N., ... & Guehi, S. T. (2023). Screening of anti-fungal *Bacillus* strains and influence of their application on cocoa beans fermentation and final bean quality. *Journal of Advances in Microbiology*, 23(1), 8-17.
- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., & Chuenchitt, S. (2008). Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest biology and technology*, 48(1), 113-121.
- Li X, Zhang Y, Wei Z, Guan Z, Cai Y, Liao X (2016) Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. *PLoS ONE* 11(9): e0162125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162125>
- Li, Z., Fernandez, K. X., Vederas, J. C., & Gänzle, M. G. (2023). Composition and activity of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus* spp. in daqu fermentation. *Food Microbiology*, 111, 104211. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104211>
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., & Novotna, E. (2013). Ochratoxin A: developmental and reproductive toxicity-an overview. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 98(6), 493-502. <https://doi.org/10.1002/bdrb.21091>
- Manda, P., Dano, D. S., Kouadio, J. H., Diakitè, A., Sangaré-Tigori, B., Ezoulin, M. J. M., Soumahoro, A., Dembele, A., & Fourny, G. (2009). Impact of industrial treatments on ochratoxin A content in artificially contaminated cocoa beans. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26(7), 1081-1088. <https://doi.org/10.1080/02652030902894397>
- Muzaifa, M., Hasni, D., Febriani, Patria, A., & Abubakar, A. (2019). Fermentation of coffee beans with inoculation of *Bacillus subtilis* and its impact on coffee sensory quality. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 364, 012010.
- NTP. (1988). NTP 488: *Calidad de aire interior: Identificación de hongos*. Notas técnicas preventivas. Gobierno de Costa Rica.
- Palacios Gonzaga, M. F. (2021). *Determinación de la actividad antifúngica de biomasa y lipopéptidos de un aislamiento de Bacillus subtilis durante la antibiosis contra hongos filamentosos de la poscosecha de cacao*. [Tesis de grado]. Universidad de la Fuerza Armadas.
- Palumbo, J. D., Baker, J. L., & Mahoney, N. E. (2006). Isolation of Bacterial Antagonists of *Aspergillus flavus* from Almonds. *Microbial Ecology*, 52(1), 45-52. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9096-y>
- Podile AR, Prakash AP. (1996). Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1. *Can J Microbiol*. Jun;42(6):533-8. doi: 10.1139/m96-072. PMID: 8801004.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78-82. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Putri, R. E., Al-Faruq, M. M., Fahrurrozi, F., & Lisdiyanti, P. (2023, January). Exploration of antifungal activity from cacao seed coat slime-associated bacteria. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2606, No. 1). *AIP Publishing*. <https://doi.org/10.1063/5.0119481>
- Ramos, N. R., Castro, A., Juárez, J., Acha de la Cruz, O., Rodríguez, N., Blancas, J., Escudero, J., Escudero, J., & Navarro, A. (2016). Evaluación de ocratoxina A en *Theobroma cacao* L. "cacao blanco" durante el proceso de cosecha, fermentado, secado y almacenado. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(4), 431-439. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v82i4.133>
- Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A., & Hardisson de la Torre, A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: Revisión. *Nutrición hospitalaria*, 6, 1215-1226. <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.6.5381>
- Sadfi, N., Chérif, M., Hajlaoui, M. R., Boudabbous, A., & Bélanger, R. (2002). Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Ann Microbiol*, 52, 323-337.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Sziget, G., Yaguchi, T., & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141-173. <https://doi.org/10.1016/j.smyco.2014.07.004>
- Seifert, K. A., & Gams, W. (2011). The genera of Hyphomycetes - 2011 update. *Persoonia*, 27, 119-129. <https://doi.org/10.3767/003158511X617435>
- Serra, J. L., Moura, F. G., de Melo Pereira, G. V., Soccol, C. R., Rogez, H., & Darnet, S. (2019). Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. *LWT*, 106, 229-239. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.038>
- Siahmoshteh, F., Hamidi-Esfahani, Z., Spadaro, D., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 89, 300-307.
- Sukkasem, P., Kurniawan, A., Kao, T.-C., & Chuang, H. (2018). A multifaceted rhizobacterium *Bacillus licheniformis* functions as a fungal antagonist and a promoter of plant growth and abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 155, 541-551. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.005>
- Teixeira de Magalhães, J., Sodré, G. A., Viscogliosi, H., & Grenier-Loustalot, M.-F. (2011). Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans. *Food Control*, 22(5), 744-748. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.006>
- Toaza, A. (2012). *Evaluación de los niveles de Ochratoxina A en almendras de cacao, mediante el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), usando columnas de fase—Reversa (SPE) y caracterización al hongo productor de ocratoxina A*. [Tesis de grado, Escuela Politécnica del Ejército].
- Ul Hassan, Z., Al Thani, R., Alnaimi, H., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2019). Investigation and application of *Bacillus licheniformis* volatile compounds for the biological control of toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* spp. *ACS omega*, 4(17), 17186-17193.
- Wang, L., Hua, X., Shi, J., Jing, N., Ji, T., Lv, B., ... & Chen, Y. (2022). Ochratoxin A: Occurrence and recent advances in detoxification. *Toxicon*, 210, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.02.010>
- Yi, P.-J., Pai, C.-K., & Liu, J.-R. (2011). Isolation and characterization of a *Bacillus licheniformis* strain capable of degrading zearalenone. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1035-1043. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0548-7>
- Zhao, M., Liu, D., Liang, Z., Huang, K., & Wu, X. (2022). Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* CW14 and its  $\beta$ -glucanase against *Aspergillus ochraceus*. *Food Control*, 131, 108475.