

Héctor Calvo Crespo

Biocontrol de  
podredumbres en frutas  
por *Bacillus  
amyloliquefaciens* BUZ-14

Director/es

Blanco Parmo, Domingo  
Venturini Crespo, Maria Eugenia

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**BIOCONTROL DE PODREDUMBRES EN FRUTAS  
POR BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS BUZ-14**

Autor

**Héctor Calvo Crespo**

Director/es

Blanco Parmo, Domingo  
Venturini Crespo, Maria Eugenia

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

2020





**Universidad**  
Zaragoza

## Tesis Doctoral

Biocontrol de podredumbres en frutas por  
*Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14

Autor

Héctor Calvo Crespo

Director/es

María Eugenia Venturini Crespo

Domingo Blanco Parmo

Facultad de Veterinaria

2019





Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



Departamento de  
Producción Animal  
y Ciencia de los Alimentos  
Universidad Zaragoza

D. Domingo Blanco Parmo y D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Eugenia Venturini Crespo, Profesores del Area de Nutrición y Bromatología y de Tecnología de los Alimentos respectivamente del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza

**Certifican:**

Que la Tesis titulada “Biocontrol de podredumbres en frutas por *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14”, de la que es autor Héctor Calvo Crespo, ha sido realizada bajo su dirección, su contenido se corresponde con el proyecto de tesis aprobado en su momento y cumple las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

En Zaragoza, a 25 de octubre de 2019

Fdo: Dr. Domingo Blanco Parmo

Fdo: Dra. María Eugenia Venturini





## INDICE

0.	Resumen .....	1
0.	Abstract.....	5
<b>1</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
1.1	Importancia de la producción de frutas en España .....	9
1.2	Podredumbres postcosecha .....	12
1.2.1	Aspectos generales .....	12
1.2.2	<i>Botrytis cinerea</i> .....	14
1.2.3	<i>Penicillium</i> spp. ....	15
1.2.4	<i>Monilinia fructicola</i> y <i>M. laxa</i> .....	17
1.2.5	Otros hongos fitopatógenos .....	18
1.3	El control biológico o biocontrol.....	20
1.3.1	Definición, tipos y antecedentes .....	20
1.3.2	Microorganismos antagonistas .....	23
1.3.3	Desarrollo de un agente de biocontrol: criterios, etapas y factores ...	28
1.3.4	Situación actual y perspectivas de futuro .....	31
1.4	<i>Bacillus velezensis</i> como agente de biocontrol.....	34
1.4.1	Clasificación taxonómica y características microbiológicas .....	34
1.4.2	Mecanismos de acción.....	36
1.4.3	<i>Bacillus velezensis</i> BUZ-14.....	43
1.5	Producción de un agente de biocontrol.....	44
1.5.1	Medios de crecimiento .....	44
1.5.2	Etapas del proceso de producción .....	47

1.5.3	Formulación de agentes de biocontrol.....	48
1.6	Aplicación del agente de control biológico .....	55
1.6.1	Precosecha .....	55
1.6.2	Postcosecha.....	56
	Referencias .....	58
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>75</b>
<b>3</b>	<b>ESTRUCTURA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>79</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULOS</b> .....	<b>87</b>
	<b>Capítulo 1.</b> Potential of a new strain of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases.....	89
	<b>Capítulo 2.</b> The role of iturin A from <i>B. amyloliquefaciens</i> BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots .....	119
	<b>Capítulo 3.</b> Antifungal activity and identification of the volatile organic compounds (VOCs) produced by <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strains .....	147
	<b>Capítulo 4.</b> Development of bioformulates based on <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BUZ-14 through low cost ingredients and their preliminary field trials against grey mould in vineyards and postharvest brown rot in nectarines .....	175
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>205</b>
5.1	Caracterización de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BUZ-14 como agente de biocontrol .....	206
5.1.1	Aislamiento e identificación.....	206
5.1.2	Propiedades biológicas .....	207
5.1.3	Condiciones ecofisiológicas .....	209
5.1.4	Modo de acción .....	211
5.2	Producción y formulación de <i>B. amyloliquefaciens</i> BUZ-14.....	215

5.2.1	Producción microbiana en medios de bajo coste.....	215
5.2.2	Producción de endosporos .....	216
5.2.3	Influencia del medio en la producción de metabolitos antifúngicos	217
5.2.4	Bioformulación líquida y deshidratada .....	219
5.3	Aplicación en campo y en postcosecha del agente de biocontrol BUZ-14 .....	221
5.3.1	Compatibilidad con pesticidas.....	221
5.3.2	Aplicación y estrategia de control.....	222
	Referencias .....	223
6	<b>CONCLUSIONES</b> .....	229



## 0. RESUMEN

El sector hortofrutícola es uno de los más importantes en España, siendo una de las principales fuentes de ingresos para el país gracias a las exportaciones a Europa y al resto del mundo. La importancia de este sector hace que deba ser tratado con especial cuidado, evitando así que las plagas supongan un problema significativo en las pérdidas económicas y productivas de los agricultores. Las principales pérdidas suelen ir asociadas a podredumbres, ocasionadas por microorganismos fitopatógenos. El control de éstos se ha conseguido durante muchos años mediante el uso de pesticidas de síntesis química, sustancias activas con un elevado potencial antimicrobiano. Sin embargo, la aparición de resistencias ha hecho que las aplicaciones aumentaran exponencialmente y de manera descontrolada, por lo que actualmente las dosis utilizadas son mucho mayores que hace unas décadas. La contaminación ambiental y los riesgos para el ser humano hace que la presión social sea cada vez mayor, obligando a las Administraciones de cada Estado Miembro a tomar medidas alternativas. Una de ellas es el control biológico o biocontrol, estrategia que utiliza microorganismos antagonistas que inhiben el crecimiento de otros indeseables, ya sea mediante la producción de antibióticos, hiperparasitismo, competición por espacio y nutrientes o incluso induciendo resistencias sistémicas en las propias plantas.

En esta Tesis Doctoral se ha investigado el potencial de biocontrol que tiene la cepa bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14, inicialmente aislada de melocotones y cuya caracterización como agente de biocontrol ha sido llevada a cabo. Para ello se han investigado los mohos fitopatógenos frente a las que es activo, incluyendo *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp. y *Monilinia* spp., elucidando su modo de acción y finalmente siendo escalado industrialmente para poder ser aplicado tanto en pre- como en postcosecha.

En primer lugar, se llevó a cabo la identificación molecular del agente de biocontrol, seguido de una caracterización física y biológica. A continuación, se determinaron las condiciones de crecimiento, incluyendo temperatura y pH, y se evaluó la capacidad antagonista de la cepa *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente se estableció tanto la actividad antifúngica de las células como de los metabolitos presentes en el sobrenadante para poder elucidar posteriormente el modo de acción, identificar y cuantificar los lipopéptidos

presentes en el medio y estudiar los compuestos más activos. Una investigación similar se llevó a cabo con los compuestos orgánicos volátiles (COVs), determinando la actividad *in vitro* e *in vivo* del volatoloma y de los volátiles más activos individualmente.

La formulación del agente fue testada de tres maneras diferentes: líquida, desecada y liofilizada. La formulación líquida se desarrolló con ingredientes baratos que permitieran su posterior escalado industrial, a partir del cual se elaboraron los medios deshidratados. Se evaluó su estabilidad y eficacia durante un año de almacenamiento a temperatura ambiente y de refrigeración. Finalmente, el formulado líquido fue aplicado en viñedos, comprobando la compatibilidad del agente con los pesticidas usados en campo y evaluando su eficacia frente a *B. cinerea* en variedades como Garnacha y Syrah. En postcosecha el formulado fue aplicado mediante inmersión en nectarinas y se determinó su eficacia frente a *Monilinia* spp.

Los árboles filogenéticos mostraron su cercanía a la especie *B. amyloliqueafaciens* subsp. *plantarum*, conocida por su capacidad de promover el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los resultados mostraron la gran aptitud de la cepa *B. amyloliqueafaciens* BUZ-14 para poder ser desarrollado como agente comercial de biocontrol, principalmente frente a *Monilinia* spp. en frutas de hueso. La producción de endosporos favoreció las formulaciones deshidratadas, así como la viabilidad en el campo y en la superficie de las frutas durante un prolongado periodo de tiempo. BUZ-14 fue capaz de controlar de manera preventiva *P. italicum* y *P. digitatum* en cítricos y *P. expansum* en manzanas, mientras que un tratamiento curativo fue suficiente para poder evitar la infección por *Monilinia* spp. en fruta de hueso. El principal modo de acción demostrado ha sido la antibiosis, mediante la producción de compuestos como los lipopéptidos o los volátiles. La iturina A ha resultado ser el principal lipopéptido responsable de las inhibiciones frente a la mayoría de las enfermedades testadas. Además, se ha observado como BUZ-14 es capaz de producir iturina A en el propio melocotón mientras prolifera en el interior del fruto. El volatoloma de BUZ-14 también resultó ser eficaz frente a las enfermedades estudiadas, siendo el diacetilo, el benzaldehído y el alcohol isoamílico los más activos. Los tres compuestos controlaron la podredumbre gris en uva de mesa a concentraciones muy bajas (0,02, 0,05, 0,1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  respectivamente) sin causar fitotoxicidad, mientras que solo el alcohol isoamílico a concentración de 0,02  $\mu\text{L mL}^{-1}$  pudo controlar *M. laxa* en albaricoque. El formulado líquido fue desarrollado con ingredientes baratos que

permitieran su escalado industrial, a partir del cual se elaboraron los deshidratados (desecado y liofilizado). Todos mantuvieron la estabilidad y eficacia durante un año almacenados a temperatura ambiente y refrigeración, excepto el líquido a temperatura ambiente, aunque una buena gestión experimental podría evitar este problema de contaminación. En campo, el agente de biocontrol fue compatible con casi todos los pesticidas usados habitualmente en los tratamientos. Una vez aplicado el bioformulado en viñedos mediante pulverización durante una campaña, se obtuvo una reducción del 50 % en la incidencia y severidad de *B. cinerea*. Por otro lado, un resultado similar se obtuvo en las nectarinas bañadas en el bioformulado líquido, ya que se observó una reducción del 45 % en la incidencia de *Monilinia* spp.

El desarrollo comercial de un producto basado en BUZ-14 como agente activo podría ser una alternativa para combatir principalmente la podredumbre marrón en fruta de hueso; además, más estudios centrados en su modo de acción y aplicación en diferentes frutos se están llevando actualmente a cabo para aumentar el conocimiento sobre las interacciones microbianas en cultivos frutales.





## 0. ABSTRACT

The fruits and vegetables sector is one of the most important in Spain. This sector involves one of the principal entrance of money due to the exports to Europe and the world. Because of its relevance, this sector must be treated with special attention and therefore avoid that the pests are a significant issue in both productive and economical losses. Normally, the phytopathogens are the responsible for these losses causing diseases and rots. During last decades, its control has been achieved through the use of chemical pesticides, active substances with a high antimicrobial activity. However, the appearance of resistances has led to increase the number and doses of chemicals in the field. The environmental contamination and risks to human health makes that the society and therefore the Governments demand more sustainable alternatives. The biological control or biocontrol is a strategy which utilize antagonist microorganisms with antimicrobial activity based on the production of antibiotics, hyperparasitism, competition for nutrients and space or even inducing systemic resistances to the plant.

The biocontrol capacity of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 has been studied in this Doctoral Thesis. This bacterial strain has been initially isolated from peaches and its characterization as a promise biocontrol agent carried out. For that, the phytopathogen moulds against with the bacterium is active have been tested, including *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp. and *Monilinia* spp., elucidating as well its mode of action. Finally, the biocontrol agent (BCA) has been large-scale to be applied both in pre and postharvest.

Firstly, the identification of the BCA was conducted, followed by a physical and biological characterization. Later, the growth conditions (temperature and pH) and the antagonistic capacity *in vitro* and *in vivo* was also assessed. Moreover, the antifungal activity of cells as well as the metabolites present in the supernatant was also studied in order to elucidate the mechanism of action, identify and quantify the lipopeptides and determine the most active compounds. A similar research was carried out with the Volatile Organic Compounds (VOCs), since the activity of the volatilome and single volatiles separately was also evaluated both *in vitro* and *in vivo*.

The formulation of the BCA has been tested in three different forms: liquid, dried and lyophilized. The liquid bioformulation was developed with low-cost ingredients which allowed its further large-scale. The dehydrated formulates were developed from the liquid one. The stability and efficacy was assessed for one year, all of them stored at ambient and cool temperatures. Finally, the liquid bioformulate was applied in vineyards and the compatibility with chemical pesticides and the activity against *B. cinerea* in varieties such as Garnacha and Syrah were studied. Also, in postharvest the bioformulate was applied in nectarines and its efficacy against *Monilinia* spp. determined.

The phylogenetic trees showed that BUZ-14 was closely related to *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* species, known as its capacity for Plant Growth Promoting. The results showed as *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 was a promising agent to be developed as a commercial BCA, mainly against *Monilinia* spp in stone fruits. The production of endospores allowed the development of the dehydrate formulation, as well as the cell viability in the surface of the plant and fruits during the pre and postharvest applications. BUZ-14 was able to control in a preventive way the disease caused by *P. italicum* and *P. digitatum* in citrus fruit, and *P. expansum* in apples, whereas the curative treatment was enough to control brown rot caused by *Monilinia* spp in stone fruits. The main mode of action observed in BUZ-14 was antibiosis. Lipopeptides and volatile compounds were the metabolites identified as responsible for the inhibitions. Within the former group of compounds, the iturin A was the responsible involved in the control of most of the diseases. Besides, it was observed that BUZ-14 was able to produce iturin A *in planta* while growing inside the peach. The volatilome of BUZ-14 also showed high antifungal activity against the fungal diseases tested. Diacetyl, benzaldehyde and isoamyl alcohol were the most actives. The three volatiles controlled grey rot in table grapes at small concentrations (0.02, 0.05 and 0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , respectively), without causing phytotoxicity to the fruit. Moreover, isoamyl alcohol could also prevent *M. laxa* in apricots at only 0.02  $\mu\text{L mL}^{-1}$ .

All the bioformulates maintained their stability and efficacy for one year stored at ambient and cool temperatures, excepting the liquid one at ambient temperature. However, it is likely that a good experimental and logistics management might avoid

crossing contaminations. In the field, the BCA was compatible with almost all the pesticides usually applied. The treatments were conducted through fumigation and the incidence and severity of *B. cinerea* was reduced by 50 %. Similar results were obtained for the nectarines, since the immersion in the liquid bioformulate achieved 45 % of reduction in the incidence of *Monilinia* spp.

The commercial development of a BUZ-14 based-product might be an alternative to control mainly brown rot in stone fruits. In addition, more studies focus on its mode of action and the application of different fruits will be conducted in order to improve the knowledge in the plant-microbe interactions.



# 1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Importancia de la producción de frutas en España

España es un país de gran importancia para la producción primaria, tanto en ganadería como en agricultura. El sector hortofrutícola es de los más importantes de la UE28, con un valor de 12.888 millones de euros de un total de 65.459 millones de euros (media 2013-2017). Esto hace que España se ponga a la cabeza de Europa con un 20 % del total seguido de Italia y Francia con un 17 y 12 % respectivamente. La tendencia además en los últimos años ha sido ascendente, pasando de 11.538 millones de euros en el año 2010 a 14.237 millones en el año 2018 a nivel nacional. El sector de las frutas y hortalizas supone el 47 % de toda la producción vegetal y el 29 % de la reducción de la Rama Agraria, además de sumar el 25 % del total de empleo y con ello más de 100.000 empleos indirectos asociados a los centros de manipulación y acondicionamiento (MAPAMA, 2019). En la Tabla 1 se puede observar como este sector queda por encima de otros tan relevantes como el vacuno o la leche, el aceite de oliva o los cereales.

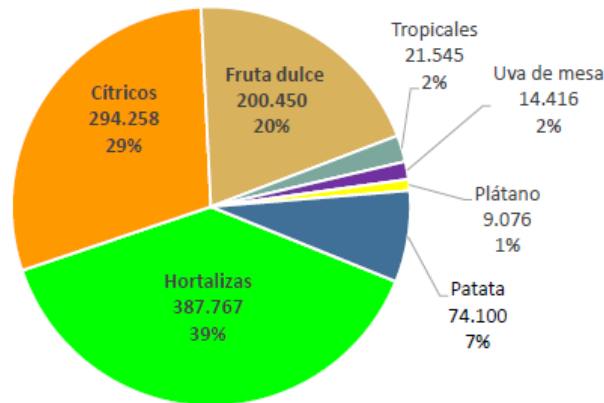
**Tabla 1.** Empleo asociado en España al sector de la producción primaria

SECTOR	EMPLEO (UTA)	%
<b>FRUTAS Y HORTALIZAS</b>	<b>202.562</b>	<b>25%</b>
Aceite de oliva	128.467	16%
Vacuno carne y leche	89.287	11%
Vino	54.699	7%
Cereales y oleaginosas	69.440	9%
Ovino y caprino	53.207	7%
Porcino	22.318	3%
Avicultura	9.108	1%
Resto	171.125	21%
<b>TOTAL</b>	<b>800.213</b>	<b>100%</b>

Fuente: Encuesta de Estructura de las explotaciones agrarias. 2016. INE.

A parte de la dimensión económica, la superficie de producción que ocupa dentro del territorio nacional es otro factor que el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA) valora y analiza para estudiar la relevancia y el impacto en Europa y en el mundo. Entre los años 2012-2016, la superficie dedicada al cultivo de frutas y hortalizas, entendiendo entre ellos hortalizas, cítricos, fruta dulce, tropicales, uva de mesa y plátano fue de 909.208 Ha frente a las 650.313 de frutos de cáscara y las 72.905

Ha de patata. En la Figura 1 se puede observar la distribución de frutas y hortalizas en España en el año 2017.

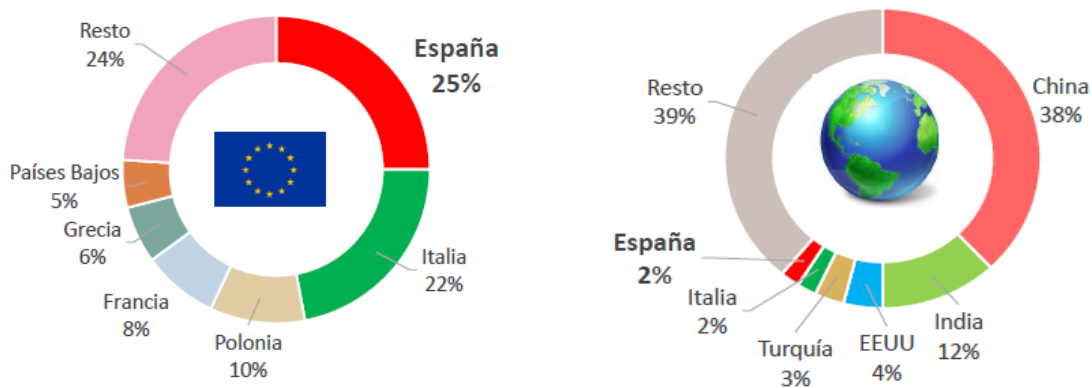


**Figura 1:** Distribución del número de hectáreas dedicadas al cultivo de frutas y hortalizas en España en el año 2017.

Fuente: Anuario de Estadística y Superficies y Producciones Anuales 2017 y Encuesta de Superficies y Rendimientos de Cultivos en España (ESYRCE). SG Análisis, Coordinación y Estadística. Subsecretaría. MAPA.

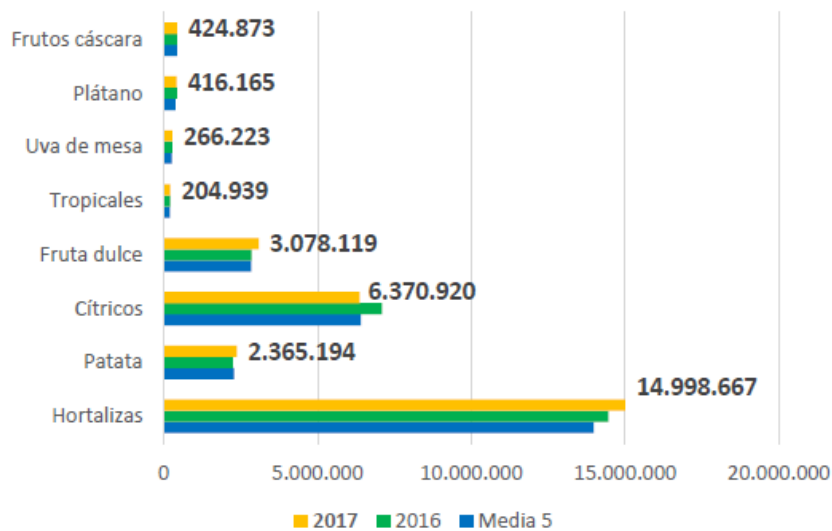
Por último, en cuanto a producción, España también es el país de Europa con mayor producción de frutas y hortalizas con 26 millones de toneladas seguido de Italia con 23 millones (MAPAMA, 2019), lo que supone un 25 y un 22 % respectivamente del total (Figura 2). En relación al mundo, la producción hortofrutícola española supone el 2 %, siendo este dato de 39 millones de toneladas respecto a un total de 1.941 millones de toneladas que se produjeron en el año 2016 en todo el mundo (MAPAMA, 2019) (Figura 2).

Dentro de la producción nacional, tal y como muestra la Figura 3, las hortalizas ocupan el primer puesto seguido de los cítricos y la fruta dulce. La producción en 2017 de frutas y hortalizas alcanzó los 26 millones de toneladas, un 5 % superior a la media entre 2012-2016, siendo las principales comunidades autónomas Andalucía, con un 29 %, seguido de la Comunidad Valenciana (15 %) y la Región de Murcia (11 %), representando Aragón un moderado 2 %.



**Figura 2.** Producción Europea (izda) y Mundial (dcha) de frutas y hortalizas en los años 2017 y 2016 respectivamente.

Fuente: FAOSTAT y EUROSTAT



**Figura 3.** Producción de frutas y hortalizas por cultivos en España

Fuente: Anuario de Estadística y Superficies y Producciones Anuales 2017. SG Análisis, Coordinación y Estadística. Subsecretaría. MAPA.

Respecto al comercio exterior, España tiene un papel muy destacado en las exportaciones de frutas y hortalizas a Europa, ya que exportó entre los años 2013-2017 hasta 12,4 millones de toneladas, y solo 1 millón de toneladas al resto del mundo. Esto ratifica la importancia de España dentro de la comunidad europea, principal objetivo de exportaciones durante la última década. La elevada producción nacional hace que las

importaciones sean bastante limitadas, recibiendo de Europa 2 millones y 1,3 millones de toneladas del resto de países (Figura 4).



**Figura 4.** Datos de Comercio Exterior referentes a España entre los años 2013-2017.

Fuente: EUROSTAT. International Trade in goods – detailed data.

## 1.2 Podredumbres postcosecha

### 1.2.1 Aspectos generales

Los productores de frutas sufren importantes pérdidas económicas porque la fruta afectada por podredumbres es inviable desde el punto de vista comercial. Además, la aparición de estas patologías lleva a la pérdida de confianza de distribuidores y clientes. Las alteraciones postcosecha patológicas, a diferencia de las alteraciones fisiológicas y otros problemas de origen abiótico, se deben fundamentalmente a mohos. Cuando se produce una infección de este tipo, la alteración fúngica o podredumbre del tejido aparece claramente diferenciada del resto del tejido no afectado en su color y/o en su textura. Esta lesión puede aparecer sólo como una alteración del tejido de la fruta, o puede estar recubierta en distinta extensión por tejidos del patógeno, como micelio vegetativo o micelio fértil fúngico, estructuras generadoras de esporas o por las propias esporas.

Muchas de las podredumbres post-cosecha son específicas para el huésped, aunque algunos patógenos, especialmente *B. cinerea*, son capaces de infectar frutas de distintos géneros. Las distintas especies dentro de un mismo género fúngico pueden infectar diferentes frutas; *Penicillium expansum* es el principal agente etiológico de las podredumbres azules en manzanas y peras, mientras que *P. italicum* y *P. digitatum* causan la podredumbre azul y verde, respectivamente, en los cítricos. Por otro lado,



las frutas de hueso también son muy sensibles a las alteraciones fúngicas, pudiéndose establecer incluso un orden de susceptibilidad decreciente: cerezas, nectarinas, melocotones, ciruelas y albaricoques (Eckert and Ogawa, 1989).

Numerosos microorganismos se encuentran de manera natural sobre la epidermis de las frutas (mohos, levaduras y bacterias) tras su recolección. De hecho, hay que asumir que en el momento en el que comienzan su vida post-cosecha, casi todas las piezas de fruta contienen algunos propágulos con capacidad de infección. Los mohos ubicuos, como *B. cinerea* y *Penicillium* spp., se multiplican en la materia vegetal en descomposición en las plantaciones y, transportados por el aire, se acumulan en forma de esporas sobre la superficie de las frutas durante su crecimiento. El propágulo fúngico que se transmite más fácilmente en las plantaciones es la espora. En la mayor parte de los casos, la espora fúngica causante de la infección de la fruta es un conidio o conidiospora, una espora asexual producida por el micelio fértil fúngico en crecimiento activo sobre tejidos vegetales vivos o muertos. Para poder germinar e iniciar la infección, normalmente las esporas necesitan oxígeno (aunque la mayor parte de los patógenos post-cosecha pueden infectar y crecer a presiones parciales de oxígeno reducidas), agua, y por último, una fuente de compuestos orgánicos metabolizables. Algunos mohos pueden infectar, durante la conservación en refrigeración, frutas que aparentemente están sanas y que no presentan ninguna herida ni lesión física, pero en la mayor parte de las podredumbres post-cosecha, las heridas y traumatismos son la principal vía de infección.

Las heridas y las lesiones físicas inactivan las barreras físicas que se oponen a la infección, como la cutícula cerosa y las capas celulares subyacentes y el tejido cortical que está a continuación, y se liberan gran cantidad de nutrientes. Aun así, hay mohos capaces de penetrar en la fruta incluso cuando no hay ninguna herida, como *B. cinerea* o *M. fructicola*, debido al complejo equipo enzimático del que disponen. Para casi todos los patógenos, el desarrollo de las podredumbres post-cosecha es directamente proporcional a la incidencia y severidad de las heridas (Eckert and Ogawa, 1988).

Hay otros orificios o aberturas naturales que pueden servir de vías de infección para los mohos patógenos. En algunos cultivares, la zona peduncular puede quedar muy carnosa y abierta, fácilmente accesible para los mohos tras la separación

de los frutos de la rama del árbol o de la mata. En estos casos, se produce después de la recolección la infección fúngica del pedúnculo. También pueden ser infectadas a través de las lenticelas de las frutas, que son los orificios a través de los cuales se realizan los intercambios gaseosos entre las células y la atmósfera circundante (Baker and Heald, 1934), pero muchas de las podredumbres tienen su origen en la infección del fruto durante su desarrollo en el árbol; esta infección permanece en estado latente hasta que la fruta, una vez recolectada, entra en las cámaras de conservación.

### 1.2.2 *Botrytis cinerea*

*B. cinerea* es un hongo patógeno necrótrofo que se alimenta de células muertas, y el principal causante de la llamada podredumbre gris (Figura 5) en uvas de mesa y vinificación (Elmer and Reglinski, 2006) produciendo pérdidas de entre un 30-40% cada año en el sector (Kasfi et al., 2018). Este moho genera abundante micelio y gran cantidad de conidios, así como unas estructuras de resistencia cuando se encuentra en condiciones adversas, denominadas esclerocios (Kasfi et al., 2018). Puede aparecer en las diferentes etapas del desarrollo del fruto: en precosecha, durante la floración de la planta, produciendo una infección latente que normalmente se puede evitar con la desinfección externa del fruto o durante la maduración al sufrir daños por aves, insectos, quemaduras solares, agrietamientos por la lluvia o por causas mecánicas. Estos daños pueden dar lugar a infecciones que se manifiestan durante el almacenamiento (Elad et al., 2004). El almacenamiento en frío también puede suponer un problema ya que *B. cinerea* es capaz de crecer a temperaturas justo por encima del punto de congelación (Parafati et al., 2015).

El primer síntoma que aparece en los frutos es el fácil desprendimiento de la piel seguido de una desintegración interna y aparición de micelio y esporulación, que puede conllevar la infección de los frutos vecinos (Elad et al., 2004). *Botrytis* es capaz de secretar enzimas como cutinasas o lipasas, y degradar la pared celular rica en pectinas de la planta. Por ello, cultivos con poco contenido en pectinas son considerados hospedadores poco específicos de este hongo. También produce metabolitos de bajo peso molecular como botrydial o ácido oxálico, que durante la penetración de la cutícula generan un estrés oxidativo en la planta y acumulación de radicales libres que producen la muerte de las células vegetales (Lynne Boddy, 2016).

Son varios los fungicidas químicos disponibles en el mercado para luchar frente

a esta enfermedad, pero debido a la elevada facilidad de *B. cinerea* para generar resistencias, o los efectos adversos para la salud humana y el medio ambiente, se están buscando nuevas alternativas más sostenibles. Los residuos de los químicos anti-*Botrytis* afectan drásticamente a la calidad de los alimentos. Tres de estos fungicidas habitualmente utilizados en el viñedo, como el pirimetanil, ciprodinil y fludioxonil han mostrado efectos tóxicos androgénicos y neuronales (Coleman et al., 2012; Orton et al., 2011). El riesgo para la salud suele estar asociado con la exposición humana y medio ambiental a estos productos, sobre todo por la presencia de residuos en el vino. Esteve-Turrillas et al. (2016) demostraron que el 44% de los vinos internacionales muestreados contenían al menos una de las cinco sustancias activas normalmente aplicadas en el campo, y los mismos residuos han sido encontrados por otros autores en otros vinos (Economou et al., 2009; Pelajić et al., 2016). Otro estudio llevado a cabo en Francia mostró como el 30% de los pesticidas analizados en la uva se transferían posteriormente al vino, y entre ellos se encontraron cuatro compuestos específicos anti-*Botrytis* (PAN Europe, 2008). Su gran variabilidad genética, corto ciclo de vida y su producción prolífica (Elad et al., 2016) hacen que el desarrollo de resistencias sea aún más favorable y reduzca así la eficacia de los fungicidas de síntesis.

### 1.2.3 *Penicillium* spp.

*Penicillium* es un género fúngico ampliamente distribuido en la naturaleza y que causa graves alteraciones en una gran variedad de alimentos al igual que *Botrytis*. Es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración, lo cual es un problema en la conservación de frutas como cítricos o frutos de pepita. Este género produce conidios de conidióforos que se ramifican cerca del ápice, formando una estructura muy característica en forma de pincel. Los conidios se caracterizan por ser de diferentes colores según la especie fúngica, aunque muchas veces son difíciles de identificar o diferenciar de otros géneros como *Aspergillus* (Bullerman, 2004).



**Figura 5.** Podredumbre gris causada por *B. cinerea* en uva de mesa (izquierda) y de vinificación (derecha).

Fuente: Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, España.

En España, las enfermedades más importantes durante la postcosecha de cítricos son las originadas por patógenos de herida estrictos como *P. digitatum* o *P. italicum*, causantes respectivamente de las podredumbres verde y azul (Tuset, 1987; Smilanick et al., 2006) (Figura 6). La infección suele aparecer por la presencia de heridas en la corteza del fruto antes, durante o tras la recolección, sobre todo en la parte final del tallo (Ladaniya, 2008). Ambas especies fúngicas tienen un crecimiento rápido y una alta esporulación, y son capaces de segregar una enzima que deshace la lignina de la corteza ablandándola. Sin embargo, *P. italicum* crece más lentamente que *P. digitatum*, aunque este último tiene unas prevalencias en cítricos más elevadas. Por otro lado, *P. italicum* tiene una propagación más fácil y agresiva sobre los frutos adyacentes ya que las hifas son capaces de atravesar la piel del fruto sano, llevando a una pudrición más húmeda que la que ocasionaría el moho verde (Ladaniya, 2008).

*P. expansum* es el hongo responsable de la podredumbre azul que se presenta en gran variedad de frutas como manzanas, peras, melocotones, nectarinas, albaricoques, ciruelas, etc. Las lesiones en un primer momento son acuosas y blandas, de un color marrón, pero con el tiempo los conidios se vuelven azules-verdosas y aparece un olor a tierra y humedad. Puede aparecer en el periodo de cosecha o en el periodo de postcosecha, durante el almacenamiento o el transporte (Errampalli, 2014). Este moho produce la patulina, una micotoxina que es citotóxica, genotóxica y tiene actividad inmunosupresora. La patulina ejerce una fuerte actividad antibacteriana, pero ha resultado ser tóxica para tejidos de animales y células. Por ello, muchas investigaciones se basan en el estudio y prevención de la producción de esta micotoxina aunque el hongo pueda desarrollarse miceliariamente (Baert et al., 2007).



**Figura 6.** Podredumbre verde y azul en naranjas causadas por *P. digitatum* y *P. italicum* respectivamente (izquierda y centro) y podredumbre azul en manzanas causada por *P. expansum* (derecha).

Fuente: Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, España.

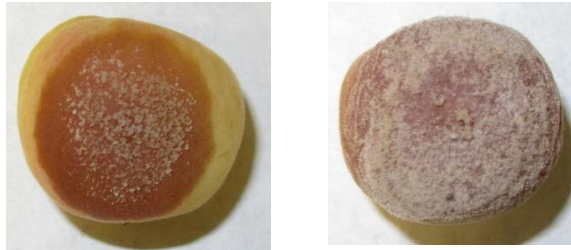
#### 1.2.4 *Monilinia fructicola* y *M. laxa*

La podredumbre parda en los frutos de hueso como melocotón, cereza, albaricoque, ciruela, etc. es causada por hongos del género *Monilinia*. Es una de las enfermedades más importantes de estos cultivos y los síntomas son la marchitez de yemas y brotes en el árbol, chancros en ramas y podredumbre en frutos (De Cal y Melgarejo, 2000). Las pérdidas más importantes se dan en los frutos, pudiendo llegar hasta un 80 % con condiciones climatológicas favorables (Larena et al., 2005). Las principales fuentes de inóculo primario en España son los frutos deshidratados que quedan pegados a las ramas tras el periodo invernal (momias) y los brotes necróticos (Casals et al., 2015), mientras que las principales fuentes de inóculo secundario son las yemas, flores y frutos podridos, aunque también los frutos aparentemente sanos que contienen infecciones latentes (Villarino et al., 2012).

Hasta hace unos años, *M. laxa* y *M. fructigena* habían sido las principales especies causantes de esta enfermedad en España. Sin embargo, desde el año 2006, una tercera especie, *M. fructicola* se ha ido introduciendo por las diferentes zonas frutícolas de Europa (Villarino et al., 2012), por lo que ya se ha retirado de la lista de enfermedades de cuarentena de la UE. *M. fructicola* causa mayores lesiones sobre la fruta de hueso y presenta un menor periodo de incubación y latencia, seguida de *M. laxa* y por último de *M. fructigena* (Villarino et al., 2016). *M. fructigena* se presenta como la especie menos agresiva sobre la fruta de hueso y prácticamente ha desaparecido como patógeno del melocotón en el Valle del Ebro desde la aparición de *M. fructicola* (Villarino et al., 2013).

*M. fructicola* degrada la cutícula y la epidermis, coloniza inter e intracelularmente las células epidérmicas y mesocárpicas del fruto con hifas finas y gruesas, provocando el

colapso y rotura de las mismas (García-Benitez et al., 2016). Es decir, *Monilinia* spp. es capaz de causar daños en los frutos de hueso mediante la acción individual de enzimas degradativas y sustancias tóxicas que destruyen las células para posteriormente ser colonizadas.



**Figura 7:** Albaricoques infectados por *M. fructicola* (izquierda) y *M. laxa* (derecha)

Fuente: Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, España.

### 1.2.5 Otros hongos fitopatógenos

El género *Rhizopus* también está siendo un hongo de gran interés en la postcosecha debido al aumento de su incidencia, sobre todo en fruta de hueso, durante la última década. Hace más de 20 años ya se identificó como un microorganismo alterante significativo en el tomate (Battilani et al., 1996) y cada vez es más incidente en otros cultivos como la fruta de hueso. Una de las especies más relevante es *R. stolonifer*, cuyas esporas se encuentran ampliamente distribuidas en la atmósfera y pueden infectar rápidamente frutos adyacentes cuando la temperatura está por encima de 0° C. La infección es muy agresiva, destruyendo por completo el fruto y la enorme producción de esporas hace que la retirada de grandes cantidades de producto durante el almacenamiento, transporte y comercialización preocupe a los comerciantes y agricultores por las pérdidas económicas que conlleva (Kong et al., 2019). *Rhizopus* spp. infecta fruta sana a través de heridas o microheridas, incluso en zonas del fruto donde se han producido golpes durante la cosecha o la manipulación. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que es capaz de penetrar en frutos con ausencia de heridas si dispone de una fuente de nutrientes (Baggio et al., 2016). Al igual que *Monilinia* spp., la podredumbre causada por *Rhizopus* spp. en fruta de hueso es marrón, causando la descomposición interna del fruto y una exudación líquida, que es la que contiene las enzimas que contribuirán a infectar los frutos sanos en contacto. Finalmente, se forma una masa filamentosa blanca coronada por los esporangios globulares de color negro, completamente visibles por el ojo humano. Los principales puntos críticos de esta

patología son los conidios que se quedan en los embalajes usados durante la cosecha y en la central, concretamente en el vaciado de la fruta en la balsa de agua. Sin embargo, la epidemiología de esta enfermedad no está del todo clara, desconociendo la capacidad de los conidios para hibernar ni en qué órganos, así como las condiciones abióticas requeridas para causar infección en los frutos sanos. Son pocos autores los que se atreven a trabajar con este microorganismo por la facilidad de contaminación y la cantidad de propágulo. Este contexto de desconocimiento de la enfermedad no permite diseñar estrategias de control efectivas, por lo que existe la necesidad de unir fuerzas para diseñar estrategias de control frente a esta patología fúngica (Casals et al., 2018)

*Alternaria alternata* es un hongo filamentoso que ha sido relacionado con la producción de micotoxinas como alternariol, altenueno, altertoxinas (Scott, 2001). Algunos de ellos son peligrosos para el ser humano pudiendo provocar cáncer. Este hongo es incidente en numerosos cultivos hortofrutícolas de todo el mundo y es el responsable de enfermedades postcosecha como la pudrición del tallo en mangos, la podredumbre negra en tomates, mandarinas o kiwis o la mancha de la fruta en manzanas, entre muchas otras. La principal forma de infección es mediante la adhesión de las esporas a la cutícula y crecimiento directo del tubo germinal en la superficie de la planta. Como la mayoría de los patógenos fúngicos, este hongo también infecta a través de daños mecánicos y heridas, producidos por quemaduras de sol, daños por frío, manejo durante la cosecha... Durante el proceso de infección, este hongo secreta enzimas, polisacáridos y toxinas que son capaces de degradar la pared vegetal del fruto y permitir así su penetración al interior (Troncoso-Rojas and Tiznado-Hernández, 2014).

*Geotrichum candidum* es otro hongo fitopatógeno que causa graves daños en cítricos en todo el mundo y que durante años han sido muy pocos los tratamientos postcosecha que han sido efectivos (Eckert and Brown, 1988). En postcosecha, la aplicación de fungicidas convencionales está prohibido por la Unión Europea (UE); solo algunos productos limitados en cítricos como el imazalil o tiabendazol están permitidos. Sin embargo, éstos no son capaces de controlar la enfermedad (Mercier and Smilanick, 2005), siendo la guazatina de los pocos compuestos eficaces, aunque está prohibido su uso en muchos países (Brown, 1988). La fruta es infectada por el hongo únicamente a través de las heridas y prolifera a temperaturas entre 25-30° C, causando la llamada podredumbre blanda. También infecta otro tipo de frutos como el tomate, pepino,

zanahoria o frutas de hueso, siendo en estas últimas cada vez más prevalente en España. La elevada resistencia de este fitopatógeno a los fungicidas ha hecho que en la última década se multipliquen las investigaciones buscando nuevas sustancias que sean efectivas (Palou et al., 2009). Además, dado la elevada conciencia social sobre el uso de químicos tóxicos en frutos que luego van a ser consumidos, esta búsqueda está siendo significativamente sustituida por alternativas más sostenibles, como extractos de plantas o control biológico, entre otros (Narayanasamy, 2006).



**Figura 8.** Cereza y melocotón infectados por *Rhizopus* spp. (izquierda y centro, respectivamente). Naranjas infectadas por *Geotrichum candidum* (derecha).

Fuente: Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, España y Google imágenes (Fresh Plaza).

## 1.3 El control biológico o biocontrol

### 1.3.1 Definición, tipos y antecedentes

El control biológico surgió por la necesidad de reducir las aplicaciones fitosanitarias tanto en pre- como en postcosecha. Hace medio siglo la cantidad de químicos agrícolas era mucho más limitada en comparación con la gran variedad de la que se dispone actualmente. Sin embargo, ahora, el abuso de estos pesticidas tanto por su elevada eficacia, fácil aplicación y precio económico está haciendo que se sobrepasen los límites y con ello el aumento de residuos fitosanitarios en los productos hortofrutícolas durante la comercialización. La relación de estos productos con el desarrollo de cáncer y la contaminación del medioambiente ha hecho que los consumidores estén cada vez más concienciados con la necesidad de reducir la cantidad de residuos químicos en los productos que comemos y por ello la sociedad demanda nuevas estrategias de control más sostenibles (Droby et al., 2009).

El control biológico es un componente más que forma parte de las estrategias de gestión integrada de plagas. Se define como la reducción de la población de una plaga



por enemigos naturales y donde normalmente interviene la acción humana. Estas plagas pueden ser insectos, ácaros o enfermedades causadas por microorganismos en plantas y hierbas. Existen tres estrategias básicas para el control biológico de plagas: clásica (importación), donde el enemigo natural de la plaga es introducido con el objetivo de lograr el control; inductiva (aumento), en la cual una gran población de enemigos naturales es administrada para un rápido control de la plaga; e inoculativo (conservación), donde las medidas son tomadas para mantener los enemigos naturales mediante un restablecimiento regular. Los enemigos naturales de las plagas de insectos, también conocidos como agentes de control biológico (ABCs), incluye depredadores, parásitos, patógenos y competidores. Por otro lado, los ABCs en enfermedades de plantas son más conocidos como antagonistas (Flint y Dreistadt, 1998).

El control biológico clásico consiste en la introducción de enemigos naturales de plagas en un nuevo ambiente donde no se encontraban de manera natural. Al principio, este tipo de control se convirtió en un inconveniente debido a la falta de investigación científica antes de realizar las aplicaciones, por lo que finalmente se convirtieron en plagas graves. Para que este tipo de biocontrol sea efectivo, el ABC necesita habilidades para colonizar el organismo, lo cual le permitiría seguir el ritmo de los cambios producidos en el hábitat tanto en espacio como en tiempo. El control es más efectivo si el agente es capaz de mantenerse en el tiempo, es decir, mantener su población incluso aunque haya ausencia de la plaga diana (Follet y Duan, 2000). Los mayores casos de éxito han sido conseguidos mediante el uso de insectos. Uno de los primeros fue el control de *Icerya purchasi*, un insecto que afectaba principalmente a cítricos y que se descubrió por primera vez en Nueva Zelanda en el año 1878 como plaga de la acacia del canguro. Esta plaga se trasladó a Australia y se consiguió controlar mediante el uso de otro insecto llamado *Rodolia cardinalis*, una especie de mariquita endémica de Australia (Figura 9). Otros casos fueron el control de *Antonina graminis*, un escarabajo que infectaba forraje y pastos y que causó enormes pérdidas económicas en Texas en el año 1940, y que fue controlado mediante el parasitoide *Neodusmetia sangwani* (Figura 9) en los 60, entre otros (Caltagirone, 1981).

El tipo de biocontrol denominado inductivo o de aumento se basa en la liberación suplementaria de enemigos naturales que se encuentran en un área particular, impulsando así las poblaciones naturales de allí. En la liberación inoculativa, pequeños números de

agentes de biocontrol son liberados en diferentes intervalos para permitir su reproducción, con el objetivo de que se pueda establecer un control a largo plazo y mantener así una concentración baja de la plaga, actuando de una manera más preventiva que curativa. Por el contrario, la liberación inundativa se corresponde con liberar un gran número de enemigos para controlar la plaga de una manera más drástica debido a la gran problemática que suponen. Este tipo de biocontrol puede ser efectivo, pero no garantiza que funcione ya que depende en gran medida de las interacciones entre las plagas y el agente de biocontrol.

Por último, la conservación de enemigos naturales que ya existen en el medio ambiente es considerado el tercer tipo de biocontrol actualmente. Los enemigos naturales ya están adaptados al hábitat y a la plaga objetivo, por lo que su conservación puede ser simple y económica. Un claro ejemplo es el cultivo de plantas que producen néctar en el borde de los campos de arroz. Estas plantas proveen de néctar a los parasitoides y depredadores de las plagas y han demostrado ser tan efectivos (se han reducido densidad de poblaciones hasta 10 o incluso 100 veces) que los agricultores han llegado a utilizar dosis químicas del 70 % menos (Gurr, 2016).

Como se ha comentado anteriormente, uno de los primeros casos de control biológico fue aplicado en el año 1878 en Australia, y desde entonces, el control de plagas de insectos mediante esta alternativa ha continuado. La mayoría de los casos de éxito han sido mediante el uso de depredadores que no afectaban a los cultivos para desplazar a la plaga diana. Sin embargo, el control biológico con microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras o virus) empezó mucho más tarde debido a las dificultades de aplicación. Esta área de investigación se ha desarrollado activamente en los últimos 20 años, pero la necesidad de realizar diferentes formulados y la dificultad en establecer los mecanismos de acción y en obtener los registros de parte de las Administraciones han hecho que su avance se haya visto frenado (Droby et al., 2009).



**Figura 9.** *Rodolia cardinalis* (izquierda) y *Neodusmetia sangwani* (derecha)

Fuente: *Rodolia cardinalis* ha sido obtenida de Flickr, una plataforma online para compartir fotos científicas, y compartidas por la investigadora Katja Schulz. *Neodusmetia sangwani* se ha descargado de Google imágenes, proporcionada por ICAR-National Bureau of Agricultural Insect Resources.

### 1.3.2 Microorganismos antagonistas

#### 1.3.2.1 Aspectos generales

Durante las últimas tres décadas ha habido una clara tendencia a seleccionar microorganismos antagonistas (bacterias y levaduras, sobre todo) como agentes de biocontrol (Teixidó et al., 2011). Muchos de ellos han sido descritos como agentes efectivos en la reducción de podredumbres postcosecha en fruta de hueso (Gujarro et al., 2006; Larena et al., 2005), peras y manzanas (El-Ghaouth et al., 2007; Zhang et al., 2008), cítricos (Costa et al., 2001; Zheng et al., 2005) y fresas (Karabulut et al., 2004). Sin embargo, la mayoría de las publicaciones científicas se basan en el estudio de los mecanismos de acción y la interacción entre ABC-patógeno. Son pocas las investigaciones centradas en el desarrollo de productos comerciales de biocontrol. Es evidente que antes de desarrollar estos bioformulados que conllevan unos costes de producción elevados, es necesario conocer el comportamiento de los ABCs en contacto con los patógenos y los cultivos, pero no se debe olvidar la aplicación final (Burges et al., 1998).

Los efectos antagonistas pueden ser debidos a una interacción directa con el patógeno, ya sea por la acción de las células microbianas o por los metabolitos producidos, pero también por una acción indirecta, induciendo resistencia o inmunidad a la planta y siendo ella la que se enfrenta al patógeno hospedador. El antagonismo microbiano implica por tanto una interacción entre dos microorganismos que comparten el mismo nicho ecológico, siendo en este caso un cultivo vegetal, interviniendo como un tercer factor que siempre hay que tener en cuenta. Cada cultivo es diferente del otro y por tanto esa interacción BCA-patógeno puede ser significativamente alterada. Hay tres tipos

de interacciones directas que podrían ser definidas como parasitismo, antibiosis y competición por nutrientes, mientras que dentro de las interacciones indirectas se encontraría la inducción sistémica de resistencias (ISR).

### 1.3.2.2 Tipos de mecanismo de acción

El parasitismo de un fitopatógeno por otro microorganismo, incluyendo virus, ha sido notablemente estudiado durante años y es bien conocido. La actividad parásita de especies del género *Trichoderma* hacia patógenos como *Rhizoctonia solani* empezó a estudiarse en los años 80 (Chet y Baker, 1981). Implica el reconocimiento específico entre el antagonista y su patógeno objetivo y varios tipos de enzimas que degradan la pared celular para permitir que el parásito invada las hifas del patógeno. Otros micoparásitos conocidos, como *Coniothyrium minitans* o *Sporidesmium sclerotivorum* son efectivos en controlar enfermedades causadas por *Sclerotinia* spp. Este tipo de antagonismo causa la muerte del patógeno y por tanto una reducción en la densidad del inóculo y parece ser de las más efectivas frente a enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. Por ello, fueron de los primeros productos en registrarse como biofertilizantes, y actualmente pueden encontrarse en la lista de fitosanitarios registrados del MAPAMA como por ejemplo Triatum P®, a base de *Trichoderma harzianum rifai* o Blindar®, una mezcla de *T. asperellum* y *T. gamsii*, entre otros.

La antibiosis es un antagonismo resultante de la producción de metabolitos secundarios tóxicos para otros microorganismos. Es un fenómeno muy común responsable de la actividad antimicrobiana de algunos ABCs como *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* e incluso *Trichoderma* spp. La producción de gran cantidad de metabolitos ha sido ampliamente documentada en la bibliografía científica y su rol en la prevención y control de muchas enfermedades fitopatógenas (Arguelles-Arias et al., 2009; Chen et al., 2006; Fravel, 2005). No solo se incluyen antibióticos, sino también bacteriocinas, enzimas degradadoras de la pared celular o compuestos volátiles orgánicos con actividad antifúngica. Cada ABC puede producir diferentes tipos de metabolitos, ejerciendo distintas actividades en función de la especie patógena fúngica. Para poder establecer el rol de estos metabolitos secundarios en la actividad de cada cepa de ABC, se deben utilizar herramientas de biología molecular o de técnicas instrumentales. En el primer caso, generando mutantes deficientes en metabolitos concretos o en el segundo caso, aislando sustancias de interés para comprobar cuáles son las más activas (Chen et

al., 2016; Romero et al., 2007). Es importante destacar que un solo antibiótico normalmente no es el responsable de toda la actividad del ABC, sino que diferentes metabolitos producidos por una misma cepa pueden ser responsables de la inhibición de distintos patógenos. Por ello, cada antagonista debe ser estudiado individualmente, evitando generalizar entre ABCs sobre todo cuando el principal mecanismo de acción es debido a la producción de metabolitos secundarios.

La competición por nutrientes es un fenómeno que regula las dinámicas poblacionales de microorganismos que comparten el mismo nicho ecológico y que tienen unos requerimientos fisiológicos similares cuando los recursos tróficos son limitados. Esta competición puede ocurrir tanto en las partes de la planta como hojas o tallos como en los frutos o el suelo, de manera que evitan la germinación de las esporas fúngicas y reducen la infección (Fokkema, 1996). Sin embargo, este tipo de interacción suele ser complicado de demostrar científicamente considerando que otros mecanismos de acción como la antibiosis puede intervenir simultáneamente a la competición mediante la producción de metabolitos en la propia planta (Calvo et al., 2019). Normalmente, los microorganismos suelen competir por el carbono como nutriente. La competición por nutrientes más minoritarios suele ocurrir en el suelo. Por ejemplo, la competición por hierro es un modo de acción habitualmente usado por el G<sup>o</sup> *Pseudomonas* para limitar el crecimiento de algunos patógenos fúngicos (Loper and Henkels, 1997). También puede ocurrir en superficie de las raíces, como demostraron Mandeel y Baker (1991) estudiando las interacciones entre *Fusarium oxysporum* patógeno y no patógeno; postularon que en las raíces hay numerosos sitios de infección y que aumentando la densidad poblacional de la microbiota no patógena podría reducirse la misma. También lo demostraron Olivain et al. (2006) en el tomate y aunque hay que señalar que es difícil conseguir una inhibición total del patógeno, la disminución significativa de su población evitaría una infección completa del cultivo.

Las interacciones indirectas consistirían en la inducción de resistencias sistémicas. Cualquier planta reacciona ante un estrés, ya sea por un origen biótico o abiótico mediante la elicitación de reacciones de defensas. Las plantas reaccionan al (i) estrés físico ocasionado por el calor o la congelación, (ii) a la inoculación de organismos patógenos o no patógenos, (iii) a moléculas químicas ya sean de origen natural o sintético; responden mediante unas reacciones de defensa llamadas resistencias sistémicas inducidas (RSI).

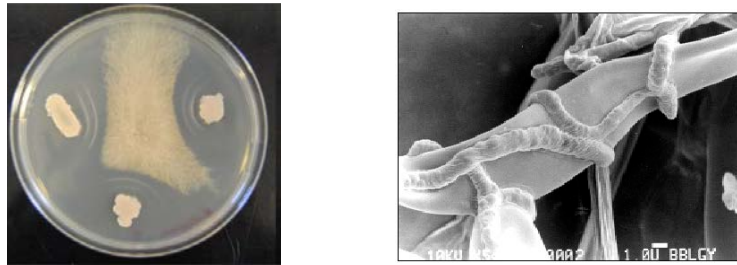
Este fenómeno ha sido y está actualmente siendo estudiado tanto a nivel celular como molecular. Esta elicitación de la defensa de la planta está muy relacionado con la expresión de genes de resistencia, y por lo tanto con la producción de moléculas de defensa como son las fitoalexinas, proteínas de resistencia a patógenos (PR) y de reforzamiento de la pared celular (van Loon et al., 1998). Kuc (1987) evidenció este tipo de resistencia en el pepino frente a *Colletotricum orbiculare* tras una inoculación de los cotiledones de la planta con el mismo patógeno. Los antagonistas no tienen por qué ser inoculados en la propia superficie de la planta, pueden serlo en el suelo, cerca de las raíces para inducir la resistencia. Son extensos los casos de éxito en este tipo de interacción, como *Pseudomonas fluorescens*, seleccionado por su capacidad de incrementar la capacidad de crecimiento de las plantas (Van Loon et al., 1998) y de especies de *Trichoderma* (Harman et al., 2004). Aunque este modo de acción está suscitando gran interés actualmente, se debe añadir que no es exclusivo, y por tanto podría ejercer simplemente un efecto complementario a los otros modos de acción.

### **1.3.2.3 Ventajas y limitaciones del uso de antagonistas**

A pesar de los esfuerzos científicos que se están llevando a cabo con el control biológico y de las ventajas de esta alternativa, la aplicación de estos antagonistas está siendo limitada. Este tipo de bioformulación es mucho más segura en comparación con los productos químicos usados actualmente en el campo hortofrutícola, ya que no tiene riesgos de toxicidad y no se acumulan en los alimentos. Sin embargo, de esta ventaja viene una limitación, y es que, para poder registrar estos productos, hay que hacer estudios toxicológicos tanto para el ser humano como para el medio ambiente, asegurando la total inocuidad del antagonista. Aunque muchos microorganismos sean considerados no patógenos, la cantidad de sustancias que pueden producir y el cambio medioambiental que puede suponer en el nuevo nicho debe estar estudiado. Esto supone unos elevados costes para las empresas, y sumado a la cantidad de pasos que hay que seguir para el registro de estos productos, hace que los productos eficaces de biocontrol en el mercado sean bastante escasos. El uso de este tipo de productos está mucho más normalizado en países como Estados Unidos, Australia o Nueva Zelanda que en Europa. Esto es debido principalmente a la estricta legislación y burocracia existente en la Unión Europea, cuyos registros son menos permisivos que en países como los que se acaban de citar.

Otras ventajas interesantes de estos microorganismos es que son más persistentes en el tiempo, proporcionando un control más eficaz, además de ser compatibles con otros sistemas de control con los que pueden ser aplicados conjuntamente. Otra ventaja a destacar es la estrecha especificidad de los ABCs. Eso significa que el efecto que producen en el balance ecológico de la planta es insignificante ya que sólo interactúan sobre las especies patógenas contra las que son aplicadas, sin interferir sobre el resto de la microbiota natural existente, para no favorecer la aparición de nuevas enfermedades (Schisler et al., 2000). Esto también está relacionado con otro de los inconvenientes del biocontrol microbiológico puesto que en comparación con los pesticidas que normalmente son de amplio espectro, en este caso tienen efectividades contra patógenos específicos. Eso quiere decir que el uso de antagonistas sin ningún otro tipo de tratamiento, ya sean químicos u otro tipo de tratamientos más ecológicos que amplíe su espectro de acción, limita la cantidad de enfermedades contra las que luchar y además raramente consiguen inhibir la enfermedad objetivo por completo, aunque sí disminuir significativamente la severidad de la infección (Janisiewicz, 1991). Las enormes diferencias entre las condiciones del laboratorio y en campo también hace que las aplicaciones finales tengan que ser exhaustivamente estudiadas. Los ABCs pueden ser altamente eficaces en el laboratorio, pero presentar resultados muy dispares en el campo. Es muy importante estudiar el efecto del tipo de inóculo, los periodos de aplicación y en qué momentos deben ser aplicados para asegurar una mayor eficacia (Jones et al., 2004). Estos estudios llevan tiempo, ya que se tiene que hacer durante varios años en los mismos cultivos para poder validar resultados, lo que alarga de una manera considerable los posibles futuros registros, asumiendo unas variabilidades significativas entre las diferentes campañas. Por último, una de las mayores limitaciones es la producción de bioformulados a nivel industrial. El trabajo con seres vivos es mucho más complicado que trabajar con sustancias químicas. Los ABCs deben ser capaces de sobrevivir a las condiciones de limitación de nutrientes y condiciones limitadas de temperatura, desecación, actividad de agua, radiación UV... Por ello, el desarrollo de un buen bioformulado con un conocimiento científico del modo de acción que va a tener sobre el cultivo a tratar es crucial para conseguir las mayores eficacias. Estas limitaciones condicionan a las empresas biotecnológicas, las cuales son esenciales poder hacer un uso adecuado de este tipo de bioformulados. Una inversión económica por parte de las empresas para poder desarrollar nuevos productos apoyados por estudios científicos sobre

cada ABC específico debe ser el siguiente paso para dejar atrás muchas de las limitaciones que se acaban de describir.



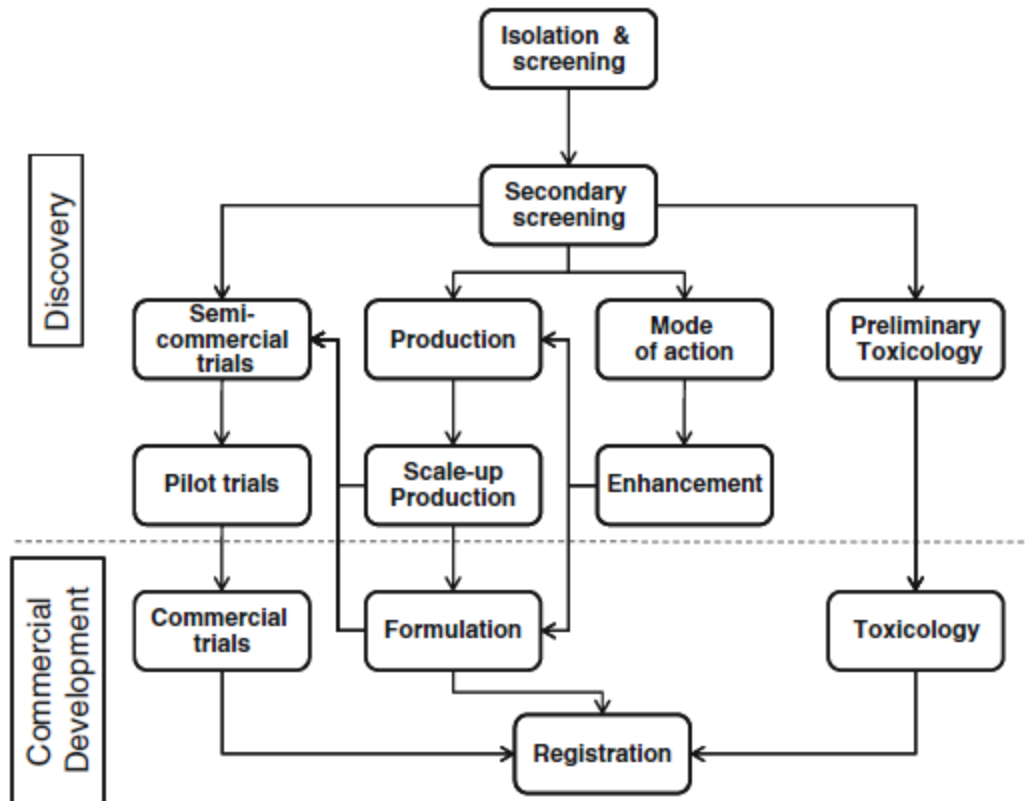
**Figura 10.** *B. amyloliquifaciens* BUZ-14 produce antibióticos que precipitan en el agar al entrar en contacto con *B. cinerea* en una placa de Petri (izquierda). Imagen de microscopía electrónica de barrido al interaccionar *T. harzianum* y *R. solani* ejerciendo una acción de micoparasitismo (derecha).

Fuente: La primera foto fue obtenida del Grupo de Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, mientras que la segunda de un trabajo publicado por Itamar Soares de Melo y Jane L. Faull en un trabajo publicado en la revista Scientia Agricola en el año 2000.

### 1.3.3 Desarrollo de un agente de biocontrol: criterios, etapas y factores

El desarrollo de un agente de biocontrol hasta poder ser comercializable es largo, fatigoso, costoso e incluye numerosos pasos. Este proceso está formado por dos fases principales: caracterización o descubrimiento y desarrollo comercial. El primero incluye ensayos desde el laboratorio hasta pruebas piloto, estudiando el posible modo de acción de los microorganismos, las condiciones de crecimiento, compatibilidad con pesticidas y la mejora de la actividad de biocontrol. La segunda parte consta del desarrollo comercial del ABC, es decir, el escalado industrial, desarrollo de formulados, inocuidad del microorganismo y registro. En la Figura 11 se puede observar un esquema sobre los pasos necesarios para desarrollar un agente de biocontrol.





**Figura 11.** Diagrama de flujo del proceso de producción de un agente antagonista de biocontrol

Fuente: Esquema obtenido de la investigación de (Nunes, 2012)

Antes de comenzar el proceso de desarrollo del producto comercial, es esencial conocer algunos factores como el patógeno diana, epidemiología de la enfermedad frente a la que se quiere luchar, posibles resistencias inducidas o las condiciones ambientales en las que el agente va a ser utilizado. Es de gran importancia conocer tanto el antagonista que se va a utilizar como la enfermedad que se quiere controlar para poder tener un mayor porcentaje de éxito en la aplicación final. El primer paso consiste en aislar, seleccionar e identificar el agente de biocontrol con el que se va a trabajar. Este paso es crucial para que todo el proceso posterior en el desarrollo del producto no sea una pérdida de tiempo y de dinero. Hace casi 20 años, Wisniewski and Wilson, (1992) ya postularon las características que debía tener un antagonista postcosecha, y que se han seguido y siguen utilizando como criterio de selección inicial. Estas características se describen a continuación, aunque con pequeñas modificaciones más actualizadas e incluyendo también la posible aplicación en campo:

- Genéticamente estable
- Efectivo a temperaturas extremas (refrigeración o altas temperaturas) frente a un grupo de patógenos, simulando las posibles condiciones ambientales en campo o durante la distribución y comercialización
- Habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas, como radiación UV, precipitaciones, limitación de nutrientes, sequías...
- Tener unos requerimientos nutricionales simples y económicos de manera que sea barato producirlo a gran escala
- Compatible con las prácticas habituales de cultivo y de proceso, como compatibilidad con pesticidas, fertilización, riego...
- No producir toxicidad ni al ser humano ni al ecosistema donde va a ser aplicado.

Uno de los principales requisitos para la eficacia de un agente de biocontrol es que tienen que tener capacidad para colonizar y sobrevivir en el ambiente donde se encuentre el patógeno, por lo que suele ser recomendable que el antagonista sea aislado del mismo hábitat donde después va a ser aplicado (Janisiewicz 1988, 1997; Manso and Nunes, 2011; Viñas et al., 1998) Además, la multiplicación del agente en ese ambiente puede aumentar el número de modos de acción que intervengan en la interacción, aunque no debe ser considerado un requisito indispensable para su selección inicial. Sin embargo, puede formar parte de un criterio importante a tener en cuenta durante el desarrollo del bioformulado final.

Como se ha hablado anteriormente, la formulación es uno de los factores limitantes en el desarrollo de productos de biocontrol con microorganismos antagonistas. Este proceso es crucial y tiene como objetivo permitir que el agente mantenga la misma actividad antimicrobiana que tenía antes de realizar el formulado. También deben cumplir otras características para que su producción sea considerada exitosa, como mantener una vida útil de al menos 6 meses (preferiblemente 18) a condiciones ambientales (aunque el almacenamiento en refrigeración no tiene por qué ser un factor excluyente), y poder ser aplicado con la tecnología existente (Hofstein y Chapple 1998). Estos formulados de biomasa microbiana pueden ser líquidos o deshidratados. Estos últimos incluyen polvo humectable, en polvo o granulado, normalmente producido con liofilizador, lecho fluidizado o atomizador, mientras que el líquido es simplemente una suspensión de biomasa microbiana en agar, aceites o una combinación de ambos (emulsiones)

habitualmente producidos en bioreactores o fermentadores. En general, el formulado deshidratado tiene periodos de conservación más largos y menos riesgos de contaminación, aunque su producción puede conllevar costes más elevados (Li and Tian, 2006).

Desde un punto de vista industrial, el agente de biocontrol ha tenido que pasar las anteriores etapas para comenzar su escalado industrial y finalmente llevar a cabo el proceso de registro. Los ensayos finales piloto o semi-comerciales deben incluir un gran número de frutos y cultivos y haber sido realizados tanto en campo como en empresas de procesado bajo las condiciones normales de comercialización, trabajando con infecciones naturales de la enfermedad (Torres et al., 2007). El registro es el último paso para poder comercializar el producto. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, en Europa las restricciones son mayores que en otros países y continentes, como EE. UU, Australia o Nueva Zelanda.

#### **1.3.4 Situación actual y perspectivas de futuro**

El biocontrol ha dado un empujón y ha mostrado gran interés industrial en la última década. Se ha hablado anteriormente de que, a pesar de que esta alternativa a químicos agrícolas con microorganismos antagonistas comenzó a utilizarse hace tiempo, las escasas restricciones legales a fitosanitarios químicos y el poco conocimiento sobre el tema hizo que apenas se consiguieran comercializar bioformulados. El mercado global del biocontrol es muy distinto al de los pesticidas químicos. El 90 % de los fitosanitarios químicos han sido producidos por empresas multinacionales, mientras que los productos de biocontrol solían estar manejados por empresas pequeñas (Pertot y Gessler, 2007). Sin embargo, actualmente el escenario está cambiando, siendo las grandes multinacionales las más interesadas en este tipo de productos, principalmente por las nuevas restricciones legislativas con los pesticidas químicos que ya se han producido y que seguirán acaeciendo, tal y como marca el Reglamento (UE) 2015/408, donde se establece una lista de sustancias candidatas a la sustitución. En el año 2012, en Europa se estimó un valor en el mercado de productos de biocontrol microbiano en torno a los 52 millones de euros. Actualmente, el mercado de los biopesticidas se ha valorado en unos 1.300-2.200 millones de euros, en comparación con los 50.000 millones de euros del mercado de los pesticidas convencionales (Droby et al., 2016).

Entre los años 1996 y 2000, se registraron 52 compuestos químicos activos en la Unión Europea, mientras que solo se registraron 10 agentes de biocontrol. Sin embargo, durante el periodo 2011-2016, se han registrado 22 nuevos productos de biocontrol mientras que solo 20 han sido registrados como producto convencional. El incremento anual mundial de este mercado está estimado en un 12,3% frente a solo el 5% en los pesticidas químicos durante el periodo 2012-2020 (Droby et al., 2016). Este interés ha forzado a las Administraciones a buscar soluciones para disminuir el tiempo de registro de estos productos. La EPA (Environmental Protection Agency) es la encargada de regular este proceso de registro en EE. UU, y normalmente necesita unos dos años para completar el proceso. Sin embargo, ese mismo producto puede llegar a tardar hasta 7 años en Europa. Para acelerar este proceso de registro, la Comunidad Europea ha apoyado una acción política denominada REBECA ([www.rebeca-net.de](http://www.rebeca-net.de)). Revisan posibles riesgos de los agentes de biocontrol, comparan legislación americana y europea y propone alternativas burocráticas y más eficientes, siempre manteniendo el mismo nivel de seguridad para los humanos y el medio ambiente, pero acelerando el acceso al mercado y disminuyendo los costes del registro. En Europa, los productos de protección de plantas estaban regulados por la directiva 91/414/EEC, lo que implicaba esos tiempos tan largos y costes que se acaban de comentar (Alabouvette et al., 2006). Esta directiva fue corregida por la Directiva 2001/36/EC y 2005/25/EC para adaptar los requerimientos especiales de estos productos basados en microorganismos en la protección de las plantas. En el año 2009, con el nuevo Reglamento 1107/2009 que derogaba la anterior Directiva 91/414/EEC, se establecieron de manera regulada los plazos de tiempo para el proceso de registro.

Recientemente, el proyecto Europeo denominado BIOCOTES, con la participación de 27 socios, entre los que se encuentran 13 empresas y 14 centros de investigación prestigiosos han desarrollado un proyecto de 4 años para aplicar el biocontrol como alternativa a las enfermedades fúngicas más importantes actualmente, como pueden ser *Monilinia* spp., enfermedades fúngicas de las raíces (*Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phytophthora* spp...), *Fusarium* spp., oidio del cereal, o *Verticillium* como enfermedad transmitida a través del suelo, además de luchar contra numerosas plagas de insectos. El proyecto ha obtenido grandes resultados, tanto técnicos, puesto que se han desarrollado once nuevos agentes de biocontrol y otros dos ya están en fase de

registro ([www.biocomes.eu](http://www.biocomes.eu)), como operativos puesto que un grupo significativo de empresas y centros de investigación han trabajado juntos transfiriendo conocimiento para llegar a un objetivo común.

La EFSA también ha comenzado a formar parte de esta nueva alternativa más sostenible. Recientemente ha publicado varias opiniones científicas sobre algunas cepas de control biológico, para ayudar a los Estados Miembros a tomar decisiones sobre su regulación. Las más recientes han sido sobre la especie *B. amyloliquefaciens*, en concreto las cepas D747, FZB42 y MBI 600 y que fueron publicadas en los boletines de la Autoridad Europea (EFSA, 2014, 2016a, 2016b). Ninguno de los tres informes acabó siendo concluyente, dejando demasiados desconocimientos científicos como para establecer una conclusión definitiva. Esto nos vuelve a remarcar que, a pesar de las numerosas investigaciones y productos comerciales disponibles en el mercado, todavía se necesita seguir investigando en profundidad con nuevas inversiones económicas.

Las nuevas investigaciones científicas para comprender esas interacciones BCA-patógeno y por tanto los modos de acción están apostando por la metagenómica y la ómica. Esta primera tecnología puede ayudar a descubrir la relevancia de las comunidades microbianas residentes en la eficacia de los ABCs (Massart et al., 2015). También la ómica ayudaría a estudiar la virulencia de los patógenos, los mecanismos de defensa de las plantas (Usall et al., 2015) y su interacción con el agente de biocontrol (Hershkovitz et al., 2012). Sin embargo, a pesar de esta posición positiva actual y de desarrollo de estos productos, el mercado cada vez es más competitivo y es fácil observar ciertas contradicciones. Hace unos años se registró un nuevo fungicida sintético, el Scholar®, a base de fludioxonil. Este fungicida es utilizado para postcosecha, y es el único registrado para frutos no cítricos. Es paradójico que se aprueben nuevas sustancias químicas y más en postcosecha cuando no existen plazos de seguridad, en vez de seguir apostando por estas nuevas alternativas. La ausencia de fitosanitarios en postcosecha era un reclamo muy importante para que las inversiones y proyectos siguieran dirigidos hacia este camino. La comercialización de este nuevo fungicida ha hecho que los intereses por la búsqueda de nuevas técnicas no-convencionales hayan disminuido (Usall et al., 2016). Está claro que en un futuro cercano, será necesario incrementar la educación y la formación de aquellas personas que se encuentren envueltas en la aplicación comercial de agentes de biocontrol, ya sean agricultores, comerciantes, distribuidores... ya que son

ellos los últimos factores en el proceso de comercialización. Sin su implicación, será muy difícil implementar esta nueva tecnología tanto en pre- como en postcosecha.

## 1.4 *Bacillus velezensis* como agente de biocontrol

### 1.4.1 Clasificación taxonómica y características microbiológicas

Esta especie ha sido clasificada recientemente englobando varias especies de *Bacillus* que anteriormente eran consideradas especies distintas. Dunlap et al. (2015) propusieron en base a sus investigaciones que *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* era un heterotipo sinónimo de *B. methylotrophicus*, y que por lo tanto debían nombrarse igual. Un año más tarde, Dunlap et al. (2016) volvieron a rebatir esta clasificación, ya que basándose en estudios de filogenómica, descubrieron que especies como las anteriormente nombradas e incluida *B. oryzzicola* compartían coherencia fenotípica y genotípica con *B. velezensis*, y que por tanto todas estas especies debían nombrarse igual. Esta nueva clasificación taxonómica se ha ido modificando con los años conforme las técnicas de biología molecular han aumentado su sensibilidad. Por ejemplo, hace prácticamente una década la especie *B. amyloliquefaciens* era considerada como *B. subtilis*. Sin embargo, actualmente son consideradas dos especies diferentes y además, a la especie *amyloliquefaciens* se le han conocido incluso dos subespecies: *plantarum* y *amyloliquefaciens*. Ahora, la subespecie *plantarum* ha sido englobada dentro de la especie *B. velezensis*, quedando el grupo operacional *B. amyloliquefaciens* como sigue: (i) *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*, (ii) *B. siamensis* y (iii) *B. velezensis*. (Torral et al., 2018) ya clasificaron una antigua cepa patentada de *B. methylotrophicus* como *B. velezensis* en su última publicación, y otros autores como Gotor-Vila et al. (2016) que denominaron *B. subtilis* a su cepa de biocontrol tuvieron que cambiarla en las siguientes publicaciones. Incluso Fan et al. (2018), autores que comenzaron a trabajar con la cepa *B. amyloliquefaciens* FZB42 hace años y que ha servido de cepa de referencia en numerosas investigaciones, también lo han renombrado.

*Bacillus velezensis* pertenece a la familia *Bacillaceae* y al género *Bacillus*. Este género bacteriano se caracteriza por ser Gram-positivo, móvil, catalasa-positivo, aerobio estricto o aero-anaerobio facultativo, productor de endosporos, de antibióticos y de matriz extracelular, también llamada biofilm. Es una especie que comúnmente se encuentra en la rizosfera, por lo que su aislamiento no suele resultar complejo. La rizosfera es un

ambiente altamente competitivo, donde los microorganismos están en constante batalla por encontrar los recursos necesarios para sobrevivir (Sasse et al., 2018). El término rizosfera fue acuñado por primera vez por Lorenz Hiltner en el año 1904 (Hartmann et al., 2008); describe la zona del suelo rica en nutrientes que envuelve las raíces y donde los exudados que se producen por parte de éstas permiten una rápida colonización de las comunidades microbianas (Morgan et al., 2005).

*B. velezensis* es una bacteria promotora del crecimiento de las plantas, conocida en inglés por sus siglas PGPR (Plant Growth-Promoting Rizobacteria), y son reconocidas por su capacidad de mejorar el peso y rendimiento de los cultivos, ya sea por la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos (antagonismo), competición por espacio y nutrientes (colonización) o estimulando resistencias sistémicas inducidas. El género *Bacillus* es muy utilizado en agricultura por su habilidad para formar endosporos; estas formas de resistencia son capaces de sobrevivir en ambientes más extremos que las células vegetativas, como largas exposiciones al calor. Así mismo soportan muy bien la deshidratación por lo que existe la posibilidad de producir formulados deshidratados (en polvo o granulado) para aumentar su vida útil y ser almacenados a temperatura ambiente (Chowdhury et al., 2013).

Actualmente hay una gran variedad de productos de biocontrol a base de cepas de *B. velezensis* comerciales, como es el caso de RhizoVital® (*B. amyloliquefaciens* FZB42; ABiTEP, GmbH, Berlin, Germany), Amylo-X® WG (*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* D747; Certis Europe BV, Netherlands), RhizoPlus® (*B. subtilis* FZB24; ABiTEP, Berlín, Alemania), Sonata® (*B. pumilus* QST2808; AgraQuest, Inc., Davis, California, USA), Taegro® (*B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FZB24; Novozymes Biologicals, Inc., Salem, Virginia, USA) (Rabbee et al., 2019). Estos productos comenzaron su andadura comercial como promotores del crecimiento de las plantas, aunque indirectamente también eran capaces de controlar algunas plagas y enfermedades en ciertos cultivos. Como se ha comentado anteriormente, los registros fitosanitarios son largos y costosos, por lo que la mayoría de las empresas optaron por este tipo de marketing para evitarlos. Actualmente en España solo existen registrados 4 productos de biocontrol como fungicidas formulados con las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*; así el Serifel® (*B. amyloliquefaciens* MBI 600; BASF, Barcelona, España), el anteriormente citado Amylo-x®, el Serenade As® (*B. subtilis* QST 713, Bayer Cropscience S.L.,

Leverkusen, Alemania), y los Serenade Aso® y Serenade Max® (ambos con *B. subtilis* QST 713), ambos perteneciente también a Bayer Cropscience. La diferencia entre los productos a base de la cepa QST 713 es el tipo de formulación (líquido o polvo) y el porcentaje de microorganismo que contiene (MAPAMA). Como se puede observar, los cuatro productos, pertenecen a dos de las mayores multinacionales que existen actualmente en el mercado de los productos fitosanitarios y de las pocas capaces de llevar a cabo los procesos de registro; a las empresas más pequeñas no les queda más remedio que seguir vendiendo sus productos como bioestimulantes.

## 1.4.2 Mecanismos de acción

### 1.4.2.1 Antibiosis: lipopéptidos y policétidos

En el año 2007, *B. amyloliquefaciens* FZB42 fue la primera cepa de biocontrol Gram-positiva de la que se publicó su genoma completo (Chen et al., 2007). Esta cepa contiene nueve grandes grupos de genes que funcionan para producir un amplio espectro de metabolitos secundarios bioactivos. Estos genes modulan unas mega-enzimas conocidas como péptido sintetasa no ribosomales y policétido sintetas. Cinco de estos nueve grupos de genes, como *srf*, *bmy*, *fen*, *nrs* y *dhb*, participan en la síntesis de unas moléculas conocidas como lipopéptidos cíclicos, y entre las que se encuentran la surfactina, la bacillomicina D, la fengicina o la bacilibactina. Por otro lado, otros 3 grupos de genes como *mln*, *bae* y *dfn* modulan la síntesis de policétidos antibacterianos, como por ejemplo macrolactina, bacilaína y difcidina. El noveno grupo de genes (*bac*) está relacionado con la síntesis de un dipéptido antibacteriano denominado bacilisina (Chen et al., 2009). Todos ellos forman parte del 10% de todo el genoma de *B. amyloliquefaciens* FZB42, por lo que se puede decir que el 10% del genoma de esta cepa está dedicado a la producción de metabolitos antimicrobianos entre lipopéptidos, policétidos, sideróforos y bacteriocinas. Hay otras especies de *Bacillus* que también son capaces de producir metabolitos bioactivos, aunque como se puede observar en la Tabla 2, la especie *B. velezensis* sobresale del resto.

Normalmente, los policétidos son los metabolitos más relacionados con su actividad antibacteriana, destacando la difcidina y la bacilisina (Wu et al., 2015), aunque actualmente todavía se sabe muy poco de otros compuestos antibacterianos como la macrolactina o la bacilaína (Romero-Tabarez et al., 2006). Estos antimicrobianos facilitan



el control de algunas enfermedades como las causadas por *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* y *X. oryzae* pv. *Oryzicola*, responsables del tizón bacteriano y la raya roja de la hoja en el arroz, respectivamente (Wu et al., 2015). *Erwinia amylovora* es la bacteria causante del fuego bacteriano en plantas de la familia *Rosaceae*, entre las que se encuentran frutales como perales, manzanos, membrillos o nísperos, además de otras plantas ornamentales y silvestres. Chen et al. (2009) demostraron como un mutante de FZB42 capaz de producir solo difucidina pero no macrolactina ni bacilaína era capaz de controlar la enfermedad igual o incluso mejor que la cepa tipo, aunque también demostraron la actividad de la bacilisina frente a esta enfermedad. Pocos son los estudios que hayan aislado policétidos sin tener que usar biología molecular para estudiar tanto los genes como hacer mutantes selectivos.

Por otro lado, las principales moléculas antifúngicas producidas por *B. velezensis* son los lipopéptidos. Los estudios de estos compuestos frente a enfermedades fúngicas son mucho más numerosos que de los anteriormente nombrados. Los lipopéptidos llevan siendo estudiados desde años y las técnicas analíticas de aislamiento y purificación actuales han permitido poder estudiarlas de una manera más profunda e individual. La actividad antifúngica de *B. amyloliquefaciens* FZB42 se ha asociado a los compuestos lipopeptídicos (Chen et al., 2006). Por ejemplo, un mutante deficiente en bacilomicina D de FZB42 apenas demostró actividad antifúngica, destacando así el importante papel de este compuesto como fungicida (Chen et al., 2009). Otros claros ejemplos son las investigaciones de Calvo et al. (2019), Chen et al. (2016) o Yáñez-Mendizábal et al. (2012), que demostraron que sustancias como la iturina A, la iturina isoformica C14 y la fengicina, respectivamente, eran los principales compuestos responsables de la inhibición de ciertas enfermedades fúngicas, sin descartar posibles sinergias con el resto de compuestos. Estudios recientes en el genoma de FZB42 han revelado la producción de dos nuevos metabolitos, la platazolicina (Scholz et al., 2011) y la amylocyclicina, dos péptidos altamente hidrofóbicos modulados por un grupo de 6 genes cada uno (Scholz et al., 2014).

#### **1.4.2.2 Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs)**

Estos compuestos son una mezcla compleja de compuestos lipofílicos aromáticos y de bajo peso molecular, producidos normalmente por plantas y microorganismos (Schulz-Bohm et al., 2017). Los microorganismos asociados al suelo y las plantas que

producen estos compuestos han demostrado controlar multitud de microorganismos fitopatógenos, indicando por tanto su gran potencial como agentes de biocontrol en plantas (Ossowicki et al., 2017).

Por ello, en los últimos años sus efectos antimicrobianos frente a enfermedades en plantas han sido ampliamente estudiados. Los volátiles podrían ser uno de los mecanismos de control biológico que más eficacia tenga sobre algunas enfermedades en las plantas (Effmert et al., 2012; Ryu et al., 2004). La producción de complejas mezclas de COVs por bacterias ha sido señalada en varias ocasiones (Gotor-Vila et al., 2017a; Kai et al., 2009). Normalmente, estas sustancias suelen ser identificadas por cromatografía de gases y espectrometría de masas, y ya se ha demostrado la gran variedad tanto cualitativa como cuantitativa en función del microorganismo responsable (Arrebola et al., 2010; Wan et al., 2008). Los COVs inhiben o previenen el crecimiento fúngico, dañando las hifas o la esporas, y/o induciendo resistencias a las plantas (Liu and Zhang, 2015; Weisskopf, 2013).

Los COVs producidos por *B. amyloliquefaciens* FZB42 tiene actividad antimicrobiana pero también inducen resistencias (Compant et al., 2005). Por ejemplo, COVs como acetoina o 2,3-butanediol sintetizados por *B. subtilis* GB03 han demostrado estimular la resistencia en semillas de *Arabidopsis* y reducir la severidad de la lesión frente a *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ryu et al., 2004). También los compuestos producidos por *B. amyloliquefaciens* NJN-6 inhibieron el crecimiento fúngico de *F. oxysporum*, llegando a reducir entre el 30 y 40 % la lesión (Yuan et al., 2012). Un estudio parecido con *B. amyloliquefaciens* demostró como una combinación de 22 COVs eran capaces de reducir la marchitez del tomate causada *R. solanacearum* en un 70% (Raza et al., 2016).

**Tabla 2.** Lista de compuestos bioactivos sintetizados por diversas especies del G<sup>o</sup> *Bacillus*

Especie de <i>Bacillus</i>	Metabolitos bioactivos	Referencias
<i>B. velezensis</i>	Amylociclicina, Bacilisina, Bacilomicina D, Bacilibactina, Bacilaína, Dificidina, Fengicina, Macrolactina, Plantazolicin, Surfactina, Iturina A	Chen et al., (2007)
<i>B. subtilis</i>	Bacilibactina, Bacilaína, Bacilisina, Dificidina, Bacitracina, Fengicina, Locilomicina, Subtilosina, Surfactina	Fan et al., (2017); Guo et al., (2015)
<i>B. amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens</i>	Bacilibactina, Bacilaína, Bacilomicina D, Bacilisina, Fengicina, Surfactina, Iturina A	Fan et al., (2017); Rückert et al., (2011)
<i>B. siamensis</i>	Bacilomicina D, Bacilaína, Dificidina, Fengicina, Surfactina	Jeong et al., (2012)
<i>B. licheniformis</i>	Bacitracina, Lichenisina, Lichenina	Harwood et al., (2018)
<i>B. pumilus</i>	Amicoumacin, Bacilisina, Bacircina, Pumilacidina	Sansinenea y Ortiz, (2011)

A diferencia de los compuestos difusibles como lipopéptidos o policétidos, los COVs pueden facilitar las interacciones entre microorganismos físicamente separados, tanto en pre- como en postcosecha mediante biofumigación, aunque la seguridad de estos compuestos bioquímicos debe ser completamente evaluada (Haidar et al., 2016). Aun así, esta mayor difusión también conlleva inconvenientes, y es que fuertes corrientes de aire podrían reducir significativamente la concentración de los COVs y limitar así su eficacia. También se han visto posibles efectos fitotóxicos a concentraciones demasiado elevadas sobre frutos (Bailly and Weisskopf, 2012), e incluso en el tercer capítulo de esta Tesis Doctoral se demostrará como incluso pequeñas concentraciones entre tratamientos pueden marcar la diferencia entre el éxito de inhibir la infección por completo o causar graves daños fitotóxicos en el fruto. Es un procedimiento complicado de aplicar y en el cual hay que seguir investigando dado la alta eficacia de algunos de estos compuestos volátiles.

### 1.4.2.3 Estimulación de resistencias sistémicas inducidas (RSI)

El efecto antagónico de las cepas de *B. velezensis* en la planta podría estar asociado a la actividad de los metabolitos secundarios, como demostraron Calvo et al. (2019) frente a *Monilinia* spp. en melocotón. La producción de iturina A por parte de *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 en el propio fruto en ensayos postcosecha demostró que era suficiente para controlar la podredumbre marrón. Sin embargo, no en todas las enfermedades testadas y en todos los frutos ocurrió esto. Para que esto suceda, es crucial que haya una multiplicación del agente *in situ*, y este hecho suele ser complicado debido a las limitaciones nutricionales en este tipo de productos para el crecimiento de bacterias del G° *Bacillus*. Además, en la propia planta, pocos estudios han encontrado estos metabolitos en las inmediaciones de las raíces o en otros lugares que no sea el propio fruto, exceptuando la surfactina, (Chowdhury et al., 2015; Nihorimbere et al., 2012). Tampoco compuestos antimicrobianos como los policétidos han sido detectados (Debois et al., 2014). Por ello, un modo de acción muy estudiado actualmente y que ha demostrado formar parte de la interacción entre patógeno-ABC-planta es la estimulación de las propias resistencias de la planta, ya sea por la surfactina, compuestos orgánicos volátiles u otros compuestos todavía no identificados. La RSI se define como la mejora de la capacidad defensiva de toda la planta frente a un amplio espectro de patógenos, adquirida mediante la inducción local, por ejemplo, en raíces por microorganismos beneficiosos (Pieterse et al., 2014). La inducción de resistencias fue inicialmente demostrada por *Pseudomonas* sp. y otras bacterias Gram-negativas asociadas a las raíces, pero poco después también se asoció a especies del G° *Bacillus*, incluyendo *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*; éstas inducían resistencias en *Arabidopsis*, varios vegetales, tabaco, y frutos tropicales (Kloepper et al., 2004). Normalmente, las rizobacterias inducen defensas a las plantas a través de la estimulación de los genes que expresan la producción de ácido jasmónico y/o etileno. La RSI difiere de la resistencia sistémica adquirida (RSA) en que la respuesta es desencadenada por los microorganismos patógenos de la planta en vez de por los que forman parte de la microbiota rizosférica. La RSA se caracteriza por incrementar los niveles de ácido salicílico. Interesantemente, numerosas plantas tratadas con el antagonista *B. pumilus* ha aumentado significativamente los niveles de esta hormona, comparado con los tratamientos control (Zhang et al., 2002).

*B. amyloliquefaciens* FZB42 ha sido utilizada en numerosas investigaciones como cepa de referencia ya que fue la primera en ser secuenciada por completo (Chen et al., 2007). Para poder determinar la manera en que FZB42 estimulaba la inducción de estas resistencias, se analizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real la expresión de varios genes en plantas de lechuga expuestas tanto al agente de biocontrol como al patógeno *R. solani* (Chowdhury et al., 2015). En ausencia del patógeno, FZB42 incrementó la expresión del gen PR1 (proteína relacionada con la patogénesis 1, gen marcador ácido salicílico), y del PDF1.2 (factor de defensa 1.2, proteína defensina, marcador ácido jasmónico/etileno). Durante la presencia simultánea de ambos microorganismos, la expresión del gen PDF1.2 se vio notablemente aumentada, sugiriendo entonces una activación sinérgica del mecanismo del ácido jasmónico/etileno, mientras que el ácido salicílico – como se indicó por una disminución de la expresión del gen PR-1 – fue suprimido en presencia de ambos antagonistas. Esto concuerda con otros resultados anteriores de Sarosh et al. (2009), sugiriendo que *B. amyloliquefaciens* puede inducir resistencias sistémicas en semillas de colza oleaginosa frente a *B. cinerea* a través de la expresión de PDF1.2 dependiente del ácido jasmónico.

La producción de estas proteínas relacionadas con la patogénesis es una de las primeras acciones que ocurren en la planta en respuesta a una infección fúngica. La mayoría de estas proteínas asociadas a las resistencias de las plantas son enzimas como peroxidasas (POX), lipoxigenasas (LOX), B-1,3 glucanasa (GLU) y quitinasa (CHI). La enzima LOX cataliza la dioxigenación del ácido linoleico y linolénico en compuestos de hidroperóxido, que a su vez pueden ser metabolizados en ácido jasmónico (Baysal and Demirdöven, 2007). POXs son conocidas como enzimas que protegen las células del daño mediante el cambio de radicales libres y especies reactivas de oxígeno a compuestos fenólicos, H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>. Como consecuencia, estos compuestos han sido envueltos en varios procesos fisiológicos como lignificación, suberización, catabolismo de la auxina, la curación de las heridas y los mecanismos de defensa contra infecciones patógenas (Hiraga et al., 2001). El rol de POXs y LOX asociadas al mecanismo de la RSI, las cuales regulaban el ácido jasmónico y el etileno ha sido ampliamente demostrado (van Loon et al., 1998). Las quitinasas y B-1,3-glucanasas son hidrolasas que generan respuesta defensiva tras sufrir una herida o golpe o al ser atacado por un patógeno (Witmer et al., 2019). Los resultados obtenidos en numerosos estudios han demostrado como estas

enzimas son capaces de degradar la quitina y el B-1,3-glucano, componentes estructurales muy importantes de las paredes celulares fúngicas.

La eficacia de los lipopéptidos de *Bacillus* en la inducción de RSI también ha sido demostrada (García-Gutiérrez et al., 2013). El lipopéptido surfactina y en menor medida la fengicina pueden también actuar como elicitores de la inmunidad de la planta y contribuir a aumentar la resistencia de las plantas frente a fitopatógenos (Raaijmakers et al., 2010). En habas, fengicinas y surfactinas purificadas proporcionaron una resistencia significativa contra *B. cinerea*, parecida a la inducida por las células de *B. amyloliquefaciens* S499 (Ongena et al., 2007). Una fuerte correlación fue encontrada en la inducción de defensas y la cantidad de surfactina producida pertenecientes al grupo microbiano *B. subtilis/amyloliquefaciens* (Cawoy et al., 2014). La aplicación combinada de este lipopéptido y las células del mutante FZB42-AK3 (productor de surfactina pero no de bacilomicina ni fengicina) redujo significativamente la mancha gris de la hoja causada por *Magnaporthe oryzae* en *Lolium perenne*. Se detectaron (i) mayor presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), (ii) aumento de la actividad de la peroxidasa en la pared celular, (iii) deposición de compuestos fenólicos debajo de la apresoria fúngica en hojas, (iv) respuesta hipersensitiva junto con la mejora en la expresión de peroxidasa, oxalato oxidasa, fenilalanina amoniaco liasa, lipoxigenasa y defensinas putativas (Rahman et al., 2015).

Chowdhury et al. (2015) encontraron un gran aumento en la expresión del gen PDF1.2 en presencia simultánea de *B. amyloliquefaciens* y *R. solani* sólo cuando se aplicó la cepa salvaje FZB42. Los mutantes deficientes en lipopéptidos y policétidos no estimularon la expresión del ácido jasmónico/etileno, sugiriendo que los lipopéptidos contribuyen notablemente en la inducción de resistencias desencadenadas por la cepa FZB42.

Muchos *Bacillus* rizosféricos con capacidad de promover el crecimiento de las plantas producen compuestos volátiles orgánicos capaces de elicitar defensas en las plantas. Ryu et al. (2004) demostraron como la exposición de semillas de *Arabidopsis* a compuestos como 2,3-butanediol y acetoina activaba las resistencias inducidas de las plantas. En plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a *B. subtilis* FB17 se redujo la enfermedad causada por *Pseudomonas syringae* comparado con las plantas sin exposición a FB17. Aplicaciones exógenas de acetoina desencadenan estas resistencias

frente a patógenos afincados en las partes aéreas (Rudrappa et al., 2010). En este contexto habría que mencionar que la expresión de la acetolactato sintasa (AlsS) de FZB42, una enzima relacionada con la síntesis de acetoína, fue mucho más manifiesta en presencia de exudados de raíz de maíz al final de la fase exponencial de crecimiento, sugiriendo que estos exudados también podrían provocar la biosíntesis de acetoína (Kierul et al., 2015).

### 1.4.3 *Bacillus velezensis* BUZ-14

Durante todo el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral, el agente de biocontrol con el que se ha trabajado ha sido *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BUZ-14. Sin embargo, su nueva denominación tras el estudio de Dunlap et al. (2016) debería ser *B. velezensis* BUZ-14. Esta cepa fue aislada de melocotones procedentes de campos de Aragón (España), concretamente de la zona de la Almunia de Doña Godina y alrededores. La cepa fue aislada por el Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, y por tanto secuenciada y caracterizada como posible agente de biocontrol.

En primer lugar, se secuenció el gen 16S rDNA, pero dado la gran similitud entre especies de este grupo bacteriano se secuenció además el gen *gyrB* para su confirmación. Los resultados de la identificación taxonómica, así como el árbol filogenético fueron publicados por Calvo et al. (2019). Además, se caracterizó este agente como posible antagonista de varias especies fúngicas postcosecha que mayor incidencia tienen en España. *B. velezensis* BUZ-14 ha resultado ser altamente efectivo frente a *Monilinia fructicola* y *M. laxa* en fruta de hueso, reduciendo casi por completo su incidencia y severidad en el fruto, aunque también demostró que es capaz de inhibir el crecimiento de *Penicillium* spp. en cítricos mediante un tratamiento preventivo en el fruto (Calvo et al., 2017). Otras enfermedades ocasionadas por *P. expansum* en manzana o *B. cinerea* en uva también han sido, aunque en menor medida, controladas de manera relevante. El principal modo de acción de esta cepa parece ser la antibiosis, a través de la producción de lipopéptidos y concretamente de iturina A (Calvo et al., 2019). También los compuestos volátiles orgánicos han mostrado una elevada capacidad antifúngica, aunque a diferencia de los lipopéptidos, estos compuestos pueden producir fitotoxicidad en los frutos si las dosis son demasiado elevadas (tercer capítulo de la presente Tesis). La inducción de resistencias todavía no ha sido demostrada, pero es muy probable que el mecanismo de actuación consista en la acción conjunta de compuestos antifúngicos que interaccionen

de manera simbiótica y que además estimulen las propias resistencias de las plantas (fitoalexinas) al entrar en contacto con ellas.

Además, su capacidad para reproducirse en medios sencillos y baratos, permitirá un desarrollo de formulados a escala industrial sin que el coste suponga pérdidas a las empresas que lo desarrollen. Además, su capacidad para producir compuestos antifúngicos en este tipo de medios sencillos también fue demostrado, como se puede observar en el cuarto capítulo de esta Tesis Doctoral, y que podría ser uno de los modos de acción principales cuando son aplicados en pre- o postcosecha. Su capacidad de generar endosporos bajo condiciones adversas también hace que otros formulados como deshidratados o liofilizados puedan ser desarrollados, mostrando las buenas habilidades de esta cepa para ser un candidato a ser desarrollado como futuro producto comercial.

## **1.5 Producción de un agente de biocontrol**

### **1.5.1 Medios de crecimiento**

La producción de agentes de biocontrol es un paso importante en el uso comercial del producto y además es, en muchas ocasiones, el punto crítico que puede marcar la diferencia entre el éxito y el fracaso de la viabilidad y eficacia del agente en la aplicación final. El principal objetivo en la producción es obtener la mayor cantidad de biomasa en el menor tiempo posible. Los nutrientes del medio deben satisfacer las necesidades básicas para el desarrollo celular pero también para la producción de metabolitos bioactivos (Stanbury et al., 1995). Normalmente, uno de los factores limitantes en este proceso es el alto coste de producción. Esto se debe al elevado precio de los sustratos, la baja productividad de biomasa, o la escasa inversión económica en la formulación a gran escala. Por lo tanto, hoy en día hay un interés considerable en el uso de fuentes nutritivas ricas en nitrógeno y carbono y que sean baratas, como subproductos de la industria agroalimentaria y desechos que no vayan a reutilizarse.

Las fermentaciones en bioreactores suelen producirse tanto en medios líquidos como sólidos, aunque generalmente las bacterias y las levaduras suelen desarrollarse en medios líquidos y los hongos filamentosos o mohos en medios sólidos (Lewis and Papavizas, 1991). Los principales factores que afectan al crecimiento son la aireación, agitación, pH, temperatura y el inóculo, los cuales podrían afectar a la calidad y cantidad



de microorganismos. Por ello, es importante estudiar estas condiciones a escala de laboratorio antes de proceder al escalado industrial.

Hace al menos dos décadas que ya se empezaron a realizar este tipo de escalados. El G<sup>o</sup> *Pseudomonas* fue uno de los primeros grupos bacterianos que se comenzaron a desarrollar. Costa et al. (2001) utilizaron la cepa *P. agglomerans* CPA-2 para optimizar el formulado a partir de levadura seca de cerveza como fuente de nitrógeno, o Abadias et al. (2003a), que usaron un medio a base de melazas y un subproducto de la industria azucarera, obteniendo grandes resultados en el crecimiento de la levadura *C. sake*. Manso et al. (2010) también optimizaron el crecimiento de *P. agglomerans* PBC-1 utilizando subproductos de la industria de la algarroba como fuente de carbono en vez de azúcar para reducir costes y mantener una producción de biomasa similar. Otros subproductos o desechos como extracto de malta, soja en polvo o concentrado de fruta han sido también valorados (Peighami-Ashnaei et al., 2009; Verma et al., 2007). Por otra parte, De Cal et al. (2002) estudiaron un método de producción de biomasa de conidios de *Penicillium frequentans*, un agente de biocontrol frente a *Monilinia laxa*, mediante fermentación sólida en bolsas de plástico específicamente diseñadas (VALMIC®), conteniendo turba : vermiculita (1:1 peso/peso). La producción de *P. frequentans* aumentó cuando se añadió masa de lenteja a la anterior mezcla. Estos nutrientes fueron también beneficiosos y rentables en la producción de conidios de otros hongos antagonistas como *P. oxalicum* (De Cal et al., 2001) o *Epicoccum nigrum* (Larena et al., 2004). Existen dos tipos de medios diferentes que pueden ser utilizados para el desarrollo de los formulados, los sencillos y los complejos, y que son explicados a continuación.

#### **1.5.1.1 Medios de cultivo sencillos**

Este tipo de medios, también llamados químicamente definidos, tienen como principal ventaja su estandarización y estabilidad en el tiempo debido a que se conoce su composición exacta. Sin embargo, estos medios se suelen utilizar para el crecimiento de bacterias a nivel de laboratorio ya que la producción obtenida con ellos no suele ser elevada además de que son medios caros que apenas se utilizan para escalados piloto o industriales (Hernández, 2003; Zhang and Greasham, 1999).

### 1.5.1.2 Medios complejos de bajo coste

Estos medios tienen como característica principal que generan una alta productividad de microorganismos y que contienen ingredientes de origen natural cuya composición no es completamente conocida. Normalmente los substratos utilizados son fuentes de nitrógeno orgánico, como extracto de levadura, de carne, de plantas o digeridos de proteínas (Tortora et al., 2007). Estos medios satisfacen los requerimientos de energía, carbono, nitrógeno y azufre y proporcionan aminoácidos, oligoelementos y vitaminas necesarios para una alta producción (Tortora et al., 2007). Sin embargo, el uso de estos substratos puros tiene un coste elevado para nada válido en el desarrollo de bioformulados. Por ello, se recurre al uso de subproductos, principalmente provenientes de la empresa agroalimentaria y agrícola (Waites et al., 2001).

Las principales ventajas que se derivan del uso de subproductos son el bajo coste, la alta disponibilidad y el beneficio medioambiental ya que son nuevamente reutilizados en la cadena alimentaria. Por otro lado, los principales inconvenientes son la composición química variable en comparación con los medios sencillos y la posible presencia de productos tóxicos o metabolitos que puedan afectar negativamente al crecimiento del agente de biocontrol (Zhang et al., 1996).

Los principales subproductos de bajo coste utilizados para la producción industrial de bacterias, y sobre todo de aquellas pertenecientes al género *Bacillus* son:

- Concentrados proteicos de origen animal, provenientes de la desecación de desechos de pescado y carne y que tienen un alto contenido en aminoácidos esenciales.
- Los subproductos de soja contienen elevados porcentajes de proteínas (40%), carbohidratos (35%), vitaminas y minerales (Ewe et al., 2010; Yu et al., 2008).
- Las melazas son subproductos provenientes de la elaboración del azúcar a partir de la caña de azúcar. Es una de las fuentes de carbono más utilizadas para la producción de microorganismos debido a su bajo coste y a su alta composición en azúcares fermentables (principalmente sacarosa), aunque también la integran sustancias nitrogenadas, vitaminas del grupo B y minerales como hierro, fósforo, potasio, zinc, sodio, cobre y magnesio (Costa et al., 2001; Younis et al., 2010).

- El lactosuero es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la fabricación de quesos. Es un medio rico en lactosa como fuente de carbono, sales minerales, vitaminas, proteínas y algo de grasa (Scott 1991).
- También los subproductos obtenidos de los cereales a partir del proceso de fabricación de la harina de trigo aportan almidón y fibra como fuentes de carbono.

Estudios como el de Yáñez-Mendizábal et al. (2012) demostraron que ingredientes de bajo coste como los citados permitían el crecimiento de *B. amyloliquefaciens* CPA-8, incluso manteniendo la producción de fengicina, lipopéptido responsable de la inhibición de *Monilinia* spp. En el cuarto capítulo de esta Tesis Doctoral se demostrará como una formulación líquida basada en medios de bajo coste permite producir grandes cantidades de biomasa, además de mantener metabolitos como en este caso la iturina A, principal sustancia bioactiva producida por *B. amyloliquefaciens* BUZ-14. Besson et al. (1987) ya publicaron un artículo discutiendo la capacidad de una cepa de *B. subtilis* para producir iturina A en función de los nutrientes disponibles en el medio; (Akpa et al., 2001) estudiaron la influencia tanto del medio como de las condiciones de incubación en la producción de lipopéptidos.

Encontrar medios de cultivo baratos que puedan escalarse a nivel industrial, que mantengan la densidad celular y que permitan la producción de metabolitos antimicrobianos a niveles suficientes como para controlar enfermedades fitopatógenas es uno de los principales cuellos de botella que existen actualmente en el biocontrol, antes de comenzar el proceso de registro.

### 1.5.2 Etapas del proceso de producción

Los microorganismos usados como agentes de biocontrol, especialmente las bacterias, generalmente se producen mediante cultivos líquidos sumergidos (Stanbury et al., 1995; Tortora et al., 2007). A continuación, se detallan los pasos a seguir para producir un agente de biocontrol a nivel industrial:

- 1- Crecimiento del inóculo: se parte de un cultivo bacteriano puro, normalmente conservado en refrigeración o criocongelación, que se siembra en un medio de cultivo estandarizado o comercial líquido o sólido con el fin de obtener un cultivo fresco denominado inóculo o cultivo iniciador.

- 2- Crecimiento en biorreactor a escala piloto: consiste en una etapa de producción a pequeña escala con el objetivo de conseguir altas velocidades de crecimiento y disponer de niveles elevados de biomasa viable y en un estado fisiológico adecuado para ser utilizada como inóculo en la siguiente etapa. En este paso, se cultiva el microorganismo en un medio igual o muy similar al que se utilizará en la producción industrial posterior (Waites et al., 2001).
- 3- Crecimiento a nivel industrial (Figura 12): en esta etapa se trabaja con un medio y condiciones de fermentación o crecimiento optimizadas que permitan tener producciones con altos rendimientos de masas celulares viables y metabolitos (Ward 1991).
- 4- Obtención del producto final y eficacia: las etapas de recuperación y purificación representan una parte muy importante en el proceso de producción de una bacteria. El objetivo es recuperar el máximo número de células microbianas y/o de compuestos activos y con el mayor grado de pureza con un mínimo tiempo y coste. Después de la producción, los componentes del cultivo, dependiendo si el compuesto de interés es la biomasa o el sobrenadante, se pueden separar mediante centrifugación o filtración (Hernández 2003). Finalmente, es muy importante comprobar que la bacteria y sus metabolitos continúan siendo activos contra el patógeno.

### **1.5.3 Formulación de agentes de biocontrol**

#### **1.5.3.1 Bases para la formulación de agentes de biocontrol**

Junto con la producción, la formulación de agentes de biocontrol es otro de los pasos esenciales para su uso comercial. Las formulaciones microbianas deben mantener la actividad frente a los patógenos igual que el microorganismo fresco. Además, deben conservar su viabilidad durante un largo periodo de vida útil y ser fáciles de aplicar y manipular (Rhodes 1993).

El principal inconveniente de los formulados con agentes de biocontrol respecto a los químicos es mantener la viabilidad de los microorganismos. Es necesario garantizar su supervivencia durante largos periodos de tiempo, tanto en el formulado como en la planta. La pérdida de esta viabilidad durante el almacenamiento y la distribución es un grave problema. Los productos formulados deberían poder almacenarse entre 2 y 4 años

sin perder su actividad y sin suponer unas condiciones estrictas o críticas de almacenamiento (Rhodes 1993). Esto conlleva realizar unos estudios más exhaustivos del agente y, por tanto, encarecer más aún su comercialización. El trabajo con microorganismos vivos implica un gran número de problemas técnicos que pueden conducir a la pérdida de viabilidad, inactivación e incluso muerte durante el proceso de formulación (Rudge 1991).

También es sumamente importante conseguir que los envases de almacenamiento y la manera de aplicación sean similares a aquellos a los que el productor está acostumbrado, aplicándose mediante técnicas y equipos ya existentes. De esta manera, el cambio de productos químicos a biológicos no será tan drástico y por lo tanto el rechazo a utilizarlos puede verse notablemente disminuido (Butt et al., 1999).

### **1.5.3.2 Tipos de formulación**

Las formulaciones de los agentes de biocontrol se pueden realizar por diferentes métodos divididos principalmente en líquidos y sólidos. Las técnicas de formulación pueden variar desde un simple formulado líquido, donde se mantenga el microorganismo fresco y conservado a 4° C, hasta complejos sistemas como la liofilización, atomización, lecho fluido y conservación en atmósfera de nitrógeno (Powell, 1992; Morgan et al., 2006).

### **1.5.3.3 Formulación líquida**

El principal inconveniente de las formulaciones líquidas es que necesitan normalmente ser almacenadas y distribuidas bajo refrigeración y que tienen una vida comercial más corta que los sólidos. Sin embargo, también tiene ventajas, y es que el proceso de producción es más sencillo y por lo tanto más económico que los formulados sólidos, además de que las pérdidas de viabilidad, propias de en los formulados sólidos, son prácticamente inexistentes. Abadias et al. (2003b) demostraron que una formulación isotónica líquida de la levadura *C. sake* podía mantener la viabilidad celular mucho mejor que los formulados sólidos. En ese estudio, los mejores resultados se obtuvieron cuando *C. sake* fue cultivada en un medio modificado con sorbitol y mantenida en una solución isotónica de trehalosa; la viabilidad fue del 77% tras 7 meses a 4° C. Resultados similares se obtuvieron cuando se formuló en medio líquido *Rhodotorula minuta*, utilizando glicerol para reducir la actividad de agua y goma xantana como agente espesante. Sin

embargo, se observó una ligera pérdida de viabilidad tras 6 meses de almacenamiento a 4° C (Patiño-Vera et al., 2005).

En el cuarto capítulo de esta Tesis Doctoral también se presentará un caso exitoso de formulación líquida de *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 en medios complejos de bajo coste; se probaron a pequeña escala diferentes medios elaborados con ingredientes baratos para comprobar tanto el crecimiento como la producción de metabolitos antifúngicos. Tras la selección del mejor medio, se escaló industrialmente en un bioreactor y se guardó en garrafas de 25 L para ser almacenadas tanto a temperatura ambiente como en refrigeración. Los resultados mostraron que el almacenamiento a temperatura ambiente puede posibilitar el crecimiento de otros microorganismos, aunque el cierre hermético de las garrafas disminuye significativamente las probabilidades de contaminación cruzada.

La formulación líquida no conlleva muchos más pasos que los explicados en el punto 1.5.2. Esto hace que la formulación sea relativamente sencilla. Los problemas de almacenamiento pueden ser notablemente ignorados tratando de llevar a cabo una buena gestión del producto. Esto quiere decir que los formulados líquidos deberían ser aplicados durante la misma campaña o año en el que se hayan producido. El almacenamiento de estos productos está claro que es complicado, por ello su producción por campañas o años y en cantidades ajustadas a las necesidades del agricultor puede hacer que este almacenamiento sea relativamente corto. La venta de este tipo de formulados en recipientes pequeños y ajustados a las dosis de aplicación necesarias por tratamiento haría que se gaste todo lo que se produce evitando así largos periodos de almacenamiento. Evidentemente, para ello hay que conocer muy bien el producto, saber frente a qué patógenos es eficaz, qué cultivos, que dosis hay que aplicar... es un trabajo costoso pero necesario igualmente para el registro de los productos. El formulado es directamente añadido a la cuba con la proporción de agua correspondiente y será listo para aplicar. Este paso tan sencillo suele ser del gusto de los productores ya que es muy fácil de aplicar. Esta mejora en la gestión de la venta de formulados líquidos ahorraría los costes y el complejo proceso de producción de los formulados sólidos acarreados actualmente.

Se pueden distinguir dos tipos de formulaciones líquidas:

- En base oleosa: consisten en la mezcla de un cultivo microbiano procesado con un aceite vegetal y emulsionantes que favorezcan su dispersión en agua. Un ejemplo de este sistema sería el Dipel ESNT, un bioinsecticida formulado con *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, en el cual el ingrediente activo está encapsulado y después suspendido en una base oleosa (Butt et al., 1999).
- En base acuosa: en las cuales, tras la producción del microorganismo, se separa la biomasa y se resuspende en un medio líquido que puede contener estabilizantes, adherentes o nutrientes adicionales (Abadias et al., 2003a). Estos coadyuvantes cumplen varias funciones, como optimizar la actividad del ingrediente activo, mejorar las características del producto formulado durante su aplicación y mantener la estabilidad de la formulación durante el proceso de aplicación (Rhodes 1993).



**Figura 12.** Bioreactor para el crecimiento de microorganismos antagonistas y desarrollo de formulados líquidos de biocontrol

Fuente: Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, España.

#### 1.5.3.4 Formulación sólida

La preservación de los microorganismos en estado sólido mediante diferentes métodos de deshidratación se ha utilizado durante décadas ya que proporcionan una larga vida útil. La eliminación del agua ralentiza el metabolismo de las células, previene la acumulación de productos tóxicos y disminuye la desnaturalización de las proteínas. Esta alternativa es usada con éxito en bacterias, levaduras y mohos. Sin embargo, no todos los microorganismos muestran el mismo comportamiento y muchos de ellos pueden perder viabilidad durante el proceso de deshidratación debido a las altas temperaturas de secado y al estrés osmótico y oxidativo, sobre todo cuando se almacenan a temperatura ambiente (Silva et al., 2002).

Para evitar este tipo de daños durante la desecación, se suelen añadir protectores, ya sea antes del secado o durante el crecimiento del microorganismo. Normalmente, estos protectores dependen mucho del microorganismo con el que se esté trabajando, pero generalmente hay algunos que suelen funcionar bien como es el caso de los sólidos no grasos de leche, suero, trehalosa, glicerol, betaína, adonitol, sacarosa, glucosa, lactosa o polímeros como el dextrán y polietilenglicol (Hubálek, 2003). Estudios realizados por (Teixidó et al., 2006) han demostrado que la conservación de microorganismos utilizados como agentes de biocontrol en seco puede mejorarse induciendo la acumulación de solutos intracitoplasmáticos, de forma que se logre un equilibrio osmótico entre el interior y el exterior celular. Esto se consigue sometiendo al microorganismo a un crecimiento en medios de cultivo con baja actividad de agua. De este modo, se provoca un estrés hídrico y se acumulan y producen solutos compatibles como polihidroxi Alcoholes, carbohidratos o aminoácidos. Otras investigaciones para la obtención de formulados a base de cepas del género *Bacillus* incluyen el uso de choques térmicos para incrementar la producción de endosporos resistentes al calor (Chung et al., 2007; Sorokulova et al., 2008).

La formulación de microorganismos en estado sólido puede realizarse por diferentes métodos que se muestran a continuación:

- Adsorción en turba: muy utilizado para la formulación de inóculos de *Rhizobium* o *Pseudomonas fluorescens* (McIntyre y Press 1991). La función de la turba es la de dispersante y medio de protección de los microorganismos. Sin embargo, esta técnica tiene el principal inconveniente de que la turba es un material poco uniforme y de que la vida útil de la turba no estéril es muy limitada.
- Encapsulación: esta técnica consiste en la inclusión del agente de biocontrol en poliacrilamida o alginato sódico (Glass 1993). Su principal inconveniente es la lenta hidratación y liberación de la materia activa. Uno de los ejemplos de este formulado es la encapsulación en alginato de *Gliocladium virens* (Lumsden et al., 1995).
- Matrices de polisacáridos: uso de polisacáridos como la metilcelulosa o la goma xantana para la desecación y protección de células microbianas. También tiene un inconveniente importante, y es que estas formulaciones suelen perder viabilidad durante el almacenamiento. Se han formulado mohos utilizando una matriz de gluten de trigo (Quimby et al., 1999).



- Liofilización: es la técnica más usada para la conservación de microorganismos ya que se puede mantener la viabilidad de los microorganismos durante más de veinte años y no requiere condiciones especiales de baja temperatura (Morgan et al., 2006). El fundamento de la técnica consiste en extraer el agua de las células congeladas usando presión reducida (sublimación) dentro de una cámara de vacío. Así, el agua de las células que estaba congelada en estado sólido pasa directamente a vapor mediante vacío. Normalmente se suelen utilizar sustancias crioprotectoras como la leche, suero o glutamato de sodio. Sin embargo, no todos los microorganismos mantendrán la misma viabilidad. Esto dependerá de la cepa microbiana o de la eficacia del agente protector, entre otros.
- Atomización: este es el método más barato usado para la producción y formulación industrial de cultivos probióticos (Santivarangkna et al., 2008), aunque son muy pocos los estudios sobre el uso de la atomización para la formulación de agentes de biocontrol (Abadias et al., 2005; Guijarro et al., 2006) y la mayoría con niveles bajos de supervivencia. En la atomización se produce polvo seco a partir de una suspensión o cultivo microbiano líquido. Existen muchos tipos de atomizadores, por lo que el resultado final dependerá significativamente del equipo utilizado y es necesario optimizar las condiciones para cada agente que se vaya a utilizar.
- Secado por contacto de aire: este es un método sencillo que consiste en depositar el material a secar sobre una bandeja o tambor caliente, aunque presenta el inconveniente de que el secado depende notablemente de la superficie de contacto. Además, el secador suele tener gran tamaño y trabaja en forma discontinua (Oakley 1997).
- Secado por corriente de aire: en este método, una capa de material a secar se deposita sobre una cinta que va pasando a través de un túnel de secado donde una corriente de aire caliente evapora el agua del producto. Este sistema permite trabajar de forma continua, aun cuando los tiempos de secado sean elevados (Oakley 1997). Este tipo de método con secadores de cinta y túnel son utilizados para la producción de levadura seca activa (Reed and Nagowithana 1991).
- Lecho fluido: el microorganismo es mezclado con coadyuvantes hasta formar una pasta que se extrusiona y se deposita sobre bandejas perforadas; a través de las perforaciones se hace pasar una corriente de aire caliente que fluidifica el producto produciéndose el secado. Una de las ventajas es que se pueden obtener productos de

reducida humedad en corto tiempo de secado con temperaturas moderadas (35-45° C) y a bajos costes de mantenimiento. El lecho fluido y la liofilización han sido descritos como los más exitosos para la conservación de los agentes de biocontrol *Epicoccum nigrum* (Larena et al., 2004), *Penicillium oxalicum* (Larena et al., 2003), *Penicillium frequentans* (Guijarro et al., 2006), *Candida sake* CPA-1 (Carbó et al., 2017) y *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 (Gotor-Vila et al., 2017d).

El género *Bacillus* es un grupo microbiano muy interesante para este tipo de formulados ya que es capaz de generar endosporos tras la destrucción de las células vegetativas. Estas endosporos son formas de resistencia que sobreviven a ambientes extremos, como altas temperaturas o deshidratación. Gotor-Vila et al. (2017b) compararon tres tecnologías diferentes (líquido, liofilización y lecho fluido) para desarrollar el formulado, y el efecto de varios protectores como MgSO<sub>4</sub> o leche desnatada en la estabilidad de *B. amyloliquefaciens* CPA-8. Estos autores observaron cómo los protectores evitaron pérdidas de viabilidad significativas en el liofilizado, pero no en el formulado líquido ni en el lecho fluidizado con o sin protectores. Todos los formulados mantuvieron la eficacia antimicrobiana en nectarina, y sugirieron el lecho fluidizado como la mejor técnica, dadas sus ventajas como el coste moderado y la alta vida útil del producto. Por otro lado, el cuarto capítulo de esta Tesis Doctoral también ha mostrado que formulados deshidratados, liofilizados y líquidos mantuvieron la viabilidad y eficacia de la cepa *B. amyloliqueafaciens* BUZ-14; sin embargo, se propondrá el formulado líquido como la mejor alternativa dada su facilidad de producción a nivel industrial en comparación con los formulados sólidos. Recientemente, Carbó et al. (2017) también han desarrollado un formulado sólido de la levadura *C. sake* CPA-1 mediante lecho fluido. Utilizaron almidón de patata como coadyuvante y el que probablemente también sirvió de protector. El lecho fluido es una técnica muy interesante para microorganismos que no producen esporos, como las levaduras, ya que son capaces de sobrevivir a las temperaturas moderadas empleadas esta técnica de secado.

Parece ser por tanto que las mejores técnicas de desarrollo de formulado y que mayor éxito han mostrado durante los últimos años son líquidas y sólidas mediante secado con lecho fluido. Será importante seguir investigando este tipo de técnicas para poder obtener los mejores resultados durante la aplicación final en campo y postcosecha.

## 1.6 Aplicación del agente de control biológico

### 1.6.1 Precosecha

Lo estudios científicos basados en aplicaciones de productos de control biológico durante la precosecha son bastante escasos en comparación con la postcosecha. Una vez superadas todas las etapas anteriores y llegados hasta este punto, la manera y momentos de aplicación en el campo son las principales cuestiones a resolver. El modo de acción estudiado previamente es el principal factor a tener en cuenta durante esta última fase, ya que, en función de la manera de interacción entre los dos microorganismos y la planta, las fenologías en las que aplicar y el número de tratamientos pueden variar significativamente. Este tipo de productos son aplicados como los pesticidas convencionales, ya sea mediante pulverización o de manera sistémica a través del riego o radicularmente, y aunque no son tan eficaces como los fitosanitarios químicos (Bardin et al., 2015), una combinación adecuada entre ambos podría hacer que aumentase su eficacia considerablemente. Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han centrado en probar productos biológicos por sí solos, confiando toda la actividad antimicrobiana en un solo microorganismo (Calvo-Garrido et al., 2019; Carbó et al., 2019). Sin embargo, los resultados siguen sin ser todavía demasiado positivos como para poder prescindir de los pesticidas de síntesis. Por ello, las nuevas tendencias del biocontrol se basan en combinar diferentes antagonistas, extractos antimicrobianos, otros métodos físicos sostenibles, e incluso con químicos en dosis mucho más bajas que las actuales con el fin de disminuir la cantidad de residuos que se acumulan en plantas y medioambiente (Gotor-Vila et al., 2017b; Ji et al., 2019). Para esto, son imprescindibles estudios que demuestren la compatibilidad de los ABCs con todas estas sustancias con las que se va a combinar, y además, con aquellos fitosanitarios que se apliquen en parcelas cercanas ya que, por la acción de viento, podrían desplazarse a la zona de aplicación biológica e influir en la supervivencia de los agentes.

La colonización es una característica esencial en los ABCs durante la aplicación en el campo. Esto favorece la persistencia de los agentes durante un tiempo prolongado en la rizosfera, pudiendo ejercer así su acción antimicrobiana sin la necesidad de aplicar el producto en periodos de tiempo muy cortos. Esta es una de las principales razones por las que el género *Bacillus* está siendo tan estudiado. La producción de endosporos permite

su supervivencia en ambientes extremos durante un largo periodo de tiempo, a diferencia de lo que ocurre con otros microorganismos como levaduras y bacterias que no forman esporas. Por otra parte, esto podría evitarse si las células no formaran parte del modo de acción, es decir, que fueran los metabolitos producidos los responsables de ese antagonismo.

Cuando se habla de precosecha, normalmente se asocia a un campo abierto donde las condiciones climatológicas son incontrolables por el ser humano. Sin embargo, hay muchos estudios que se han centrado en testar estos productos en invernaderos, lugares cerrados con condiciones controladas por el agricultor y donde los efectos del tiempo no pueden estropear los resultados de toda una campaña (Ji et al., 2019). Generalmente, estos estudios se realizan en productos hortícolas, ya que son los que más se cultivan en este tipo de terreno. Los resultados obtenidos en estos cultivos muestran como el control biológico es una alternativa prometedora que en condiciones controladas como invernaderos o tras la recolección han demostrado cierta consistencia en los resultados, a diferencia de los obtenidos en la precosecha, donde muy pocos estudios han mostrado unas eficacias consistentes durante los 3-4 años de pruebas que deben realizarse para validar los resultados (Calvo-Garrido et al., 2019)



**Figura 13.** Aplicación de un formulado líquido basado en *B. velezensis* BUZ-14 mediante mochila (izquierda) y tractor (derecha), en viñedos de Cariñena, Zaragoza, España.

Fuente: Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza. Ensayos correspondientes al proyecto PATBIOCONTROL (Proyecto RTC-2015-4121-2)

## 1.6.2 Postcosecha

La literatura científica refleja claramente como el uso de los agentes de biocontrol en postcosecha tiene un uso práctico y eficacias antagonistas significativamente mejores que mediante su uso en precosecha. Como ya se ha comentado anteriormente, unas condiciones de conservación controladas, así como su aplicación son mucho más

sencillas para que los ABCs ejerzan su acción antimicrobiana. Las aplicaciones postcosecha suelen ser realizadas tanto por spray, mediante el uso de drenchers o duchas, o mediante inmersión en soluciones antagonistas (Figura 14) (Barkai-Golan, 2001; Irtwange, 2006). Las investigaciones basadas en aplicaciones postcosecha son más numerosas dada su facilidad para realizar los ensayos piloto en comparación con la precosecha, donde normalmente se necesitan al menos 3 años de estudios para poder publicar los resultados y validar su efectividad. Hace años ya comenzaron a realizarse estudios de este tipo, como los de Pratella and Mari (1993) que observaron cómo varias cepas de *Trichoderma harzianum*, *T. viride* o *Gliocladium roseum* controlaban mejor la enfermedad en postcosecha que en precosecha. También observaron como *Pseudomonas variotii* era más efectiva en el control de *Aspergillus* en limones que el uso del fungicida iprodiona, o como la aplicación de *T. harzianum* prevenía mejor la infección por *Fusarium* spp. que el benomilo. Otros microorganismos como las levaduras han demostrado elevada actividad antifúngica en postcosecha. El contacto directo con *Debaryomyces hansenii* en cítricos ha conseguido disminuir significativamente enfermedades causadas por *Penicillium digitatum* o *P. italicum* (Chalutz and Wilson, 1990), aunque también *Candida oleophila* frente a *B. cinerea* en manzanas demostró elevada actividad antifúngica (Mercier and Wilson, 1995).

En 1984 se descubrió como *B. subtilis* B-3 era capaz de controlar la podredumbre marrón en melocotones causada por *M. fructicola* (Pusey and Wilson, 1984), siendo el microorganismo patentado. Sin embargo, al demostrar que el principal responsable de la inhibición era la iturina, se dejó de perseguir su posible comercialización, a pesar de los buenos resultados comparables con los fungicidas sintéticos. Las especies del género *Bacillus* mostraron una gran adaptación al ambiente y eficacia antifúngica, pero los problemas de registro debidos a la producción de antibióticos hicieron que el control biológico en postcosecha se encaminara más al uso de levaduras.

En el año 2000 solo había 3 productos de biocontrol disponibles para postcosecha, Aspire™ (registrado solo para EE. UU e Israel), Bio-Save™ (EE. UU) y YieldPlus™ (Sudafrica). A pesar de todos los esfuerzos realizados y las publicaciones llevadas a cabo, su comercialización era muy limitada y envolvía una pequeña parte de todo el mercado. El principal problema, como ya se ha discutido en revisiones como (Droby et al., 2003) o El Ghaouth et al. (2004), es la inconsistencia en los resultados a la hora de sustituir un

pesticida de síntesis. Hace ya dos décadas se combinaban otros métodos junto con estos productos para aumentar la efectividad, como por ejemplo el uso de cloruro de calcio, aire caliente, UV, etc (Stevens et al., 1997) igual que se está realizando actualmente.

A diferencia de la precosecha y según el Reglamento (UE) N° 540/2011, actualmente no existen productos comerciales de biocontrol para postcosecha registrados en Europa y a pesar de que estos productos no conllevan un plazo de seguridad. Estos productos llevan estudiándose años, pero los problemas de registro han generado un gran retraso en su comercialización. Hace años las empresas de fitosanitarios químicos eran enormemente fuertes, y la legislación todavía era partidaria de usar ese tipo de productos. Sin embargo, hoy en día el rechazo social es cada vez más fuerte, tanto por la concienciación por el medio ambiente como por la salud humana. La legislación ha decidido empezar a prohibir gran cantidad de pesticidas y las grandes empresas se han interesado por las nuevas alternativas sostenibles como el biocontrol, entre otras. Esperemos que esta presión y la necesidad de encontrar nuevas alternativas haga que la comercialización de productos efectivos de biocontrol frente a fitopatógenos tenga una mayor fluidez comercial.



**Figura 14.** Tratamiento postcosecha mediante inmersión de nectarinas (izquierda) en un formulado líquido de *B. velezensis* BUZ-14 y duchado de naranjas con el fungicida imazalil (derecha).

Fuente: Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, España.

## Referencias

Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., & Viñas, I. (2003a). Optimization of growth conditions of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in a lab-scale fermenter. *J. Appl. Microbiol.* 95, 301–309. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01976.x>.

- Abadias M, Usall J, Teixidó N and Viñas I. (2003b). Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology* 93, 436–442.
- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Solsona, C., Viñas, I., 2005. Survival of the postharvest biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 after dehydration by spray-drying. *Biocontrol Sci. Technol.* 15, 835–846. <https://doi.org/10.1080/09583150500187041>
- Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., Thonart, P., 2001. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91–93, 551–561. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:551>
- Alabouvette, C., Olivain, C., Steinberg, C., 2006. Biological control of plant diseases: The European situation. *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 329–341. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0233-0>
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P., 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Fact.* 8, 63. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Korsten, L., 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biol. Control* 53, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.010>
- Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M.M., Rajković, A., Verlinden, B., Nicolai, B., Debevere, J., De Meulenaer, B., 2007. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.061>
- Baker, K., & Heald, F. (1934). An investigation of factors affecting the incidence of lenticel infection of apples by *Penicillium expansum*. *Bulletin of The Washington State Agricultural*. 48
- Baggio, J.S., Gonçalves, F.P., Lourenço, S.A., Tanaka, F.A.O., Pascholati, S.F., Amorim, L., 2016. Direct penetration of *Rhizopus stolonifer* into stone fruits causing rhizopus rot. *Plant Pathol.* 65, 633–642. <https://doi.org/10.1111/ppa.12434>
- Bailly, A., Weisskopf, L., 2012. The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth current knowledge and future challenges. *Plant Signal. Behav.* 7. <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18418>
- Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillet, B., Siegwart, M., Nicot, P.C., 2015. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Front. Plant Sci.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00566>
- Barkai-Golan, R., 2001. Postharvest diseases of fruit and vegetables: development and control. Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands.
- Battilani, P., Chiusa, G., Cervi, C., Trevisan, M., & Ghebbioni, C. (1996). Fungal growth and ergosterol content in tomato fruits infected by fungi. *Italian Journal of Food Science*, 8, 283–289. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00566>

- Baysal, T., Demirdöven, A., 2007. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.11.025>
- Besson, F., Chevanet, C., Michel, G., 1987. Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 767–72. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-3-767>
- Brown, G.E., 1988. Efficacy of guazatine and iminoctadine for control of postharvest cecays of oranges. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/pd-72-0906>
- Bullerman, L.B., 2004. SPOILAGE | Fungi in Food – An Overview. *Encycl. Food Sci. Nutr.* 5511–5522. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/01129-9>
- Burges HD (1998) Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 412.
- Butt, T.M., Harris, J.G., Powell, D.A. (1999) Microbial pesticides. En: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.) *Biopesticides Use and delivery*. Humana Press, New Jersey, pp 23–43.
- Caltagirone, L. E. (1981). "Landmark examples in classical biological control". *Annual Review of Entomology.* 26: 213–232.
- Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., Venturini, M.E., 2017. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiol.* 63, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.004>
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D., Venturini, M.E., 2019. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. *Food Microbiol.* 82, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.010>
- Calvo-Garrido, C., Roudet, J., Aveline, N., Davidou, L., Dupin, S., Fermaud, M., 2019. Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00105>
- Carbó, A., Torres, R., Usall, J., Fons, E., Teixidó, N., 2017. Dry formulations of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 using fluidised bed drying to control the main postharvest diseases on fruits. *J. Sci. Food Agric.* 97, 3691–3698. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8229>
- Carbó, A., Torres, R., Usall, J., Marín, A., Chiralt, A., Teixidó, N., 2019. Novel film-forming formulations of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1: biocontrol efficacy and performance at field conditions in organic wine grapes. *Pest Manag. Sci.* 75, 959–968. <https://doi.org/10.1002/ps.5200>
- Carla Casals, Neus Teixidó, Rosario Torres y Josep Usall (2018). *Rhizopus* spp., una enfermedad de relevancia en el panorama actual de la fruta de hueso. Nota de prensa INNOVAGRI, departamento I+D+I: protección de cultivo, frutales.
- Casals, C., Segarra, J., De Cal, A., Lamarca, N., Usall, J., 2015. Overwintering of monilinia spp. on mummified stone fruit. *J. Phytopathol.* 163, 160–167. <https://doi.org/10.1111/jph.12298>
- Casals, C., García, C., Usall, J., Bernat, M., De Cal, A., 2018. Artículo técnico



Podredumbre parda del melocotón y nectarina en postcosecha - Factores que afectan su incidencia en central hortofrutícola y conservación

- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommes, J., Ongena, M., 2014. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 87–100. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>
- Chalutz, E., Wilson, C.L., 1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PD-74-0134>
- Chen, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., Wang, Q., 2016. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biol. Technol.* 115, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>
- Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W.R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P.R., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Borriss, R., 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.* 25, 1007–1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>
- Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., M??gel, G., Kunz, S., Borriss, R., 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol.* 140, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.015>
- Chen, X.-H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsis, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A.W., Gottschalk, G., Süßmuth, R.D., Borriss, R., 2006. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* 188, 4024–4036. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-06>
- Chet I and Baker R (1981). Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma harmatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71: 286–290.
- Chowdhury, S.P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., Hartmann, A., Grosch, R., 2013. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS One* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068818>
- Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X.W., Borriss, R., 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Front. Microbiol.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- Chung, S., Lim, H.M., Kim, S.D., 2007. Formulation of stable *Bacillus subtilis* AH18 against temperature fluctuation with highly heat-resistant endospores and micropore inorganic carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 217–224. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0992-y>
- Coleman, M.D., O’Neil, J.D., Woehrling, E.K., Ndunge, O.B.A., Hill, E.J., Menache, A., Reiss, C.J., 2012. A preliminary investigation into the impact of a pesticide combination on human neuronal and glial cell lines *in vitro*. *PLoS One* 7.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042768>

- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E., 2005. Minireview: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects 71, 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951>
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés, E., Viñas, I., 2001. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 367–371. <https://doi.org/10.1007/s002530100666>
- De Cal, A., Larena, I. & Melgarejo, P. (2001). (Inventors), Spain, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (assignee). Procedimiento para la producción de conidios de un hongo filamentoso en fermentación sólida. Patent number 2001100758.
- De Cal, A., Larena, I., Guijarro, B., Melgarejo, P., 2002. Mass production of conidia of *Penicillium frequentans*, a biocontrol agent against brown rot of stone fruits. *Biocontrol Sci. Technol.* 12, 715–725. <https://doi.org/10.1080/0958315021000039897>
- De Cal, A., Melgarejo, P. 2000. Momificado de los frutales de hueso (*Monilinia* spp.). En: Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso. E. Montesinos, P. Melgarejo, M.A. Cambra y J. Pinchet (eds). Ed. Mundi-Prensa. Pp 66-67.
- Debois, D., Jourdan, E., Smargiasso, N., Thonart, P., De Pauw, E., Ongena, M., 2014. Spatiotemporal monitoring of the antibiome secreted by *Bacillus* biofilms on plant roots using MALDI mass spectrometry imaging. *Anal. Chem.* 86, 4431–4438. <https://doi.org/10.1021/ac500290s>
- Droby, S., Wisniewski, M., El Ghaouth, A., Wilson, C., 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biol. Technol.* 27, 127–135. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00046-7)
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol. Technol.* 52, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., Jijakli, M.H., 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biol. Technol.* 122, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>
- Dunlap, C.A., Kim, S.J., Kwon, S.W., Rooney, A.P., 2015. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 2104–2109. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000226>
- Dunlap, C.A., Kim, S.J., Kwon, S.W., Rooney, A.P., 2016. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenom. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1212–1217. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>

- Eckert, J.W., Brown, G.E., 1988. Sour rot. In: Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Timmer, L.W. (Eds.), compendium of citrus diseases. APS Press, St Paul MN, pp. 37-38.
- Eckert, J.W., Ogawa, J.M., 1989. Chemical Control of POSTHARVEST DISEASES : deciduous fruits, berries , Vegetables and Root / Tuber Crops. Annu. Rev. Phytopathol. 26, 433–469.
- Economou, A., Botitsi, H., Antoniou, S., Tsipi, D., 2009. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1216, 5856–5867. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.031>
- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., Piechulla, B., 2012. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. J. Chem. Ecol. 38, 665–703. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0135-5>
- EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain D747. EFSA Journal 2014;12(4):3624, 29 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3624
- EFSA (European Food Safety Authority), 2016. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB24. EFSA Journal 2016;14(6):4494, 18 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4494
- EFSA (European Food Safety Authority), 2016. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI 600. EFSA Journal 2016;14(1):4359, 37 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4359
- El Ghaouth, A., Droby, S., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Smilanick, J. and Korsten, L., 2004. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. In: Khachatourians, G.G and Arora, D.K (eds) Applied Mycology and Biotechnology: Agriculture and Food Production. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp. 11-27.
- Elad, Y., Vivier, M., and Fillinger, S., 2016. “Botrytis, the good, the bad and the ugly,” in *Botrytis* – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems, eds S. Fillinger, and Y. Elad (Cham: Springer International Publishing), 1–15.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., 2004. *Botrytis*: biology, pathology and control.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Wisniewski, M., Wilson, C.L., 2007. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-Deoxy-D-Glucose . Plant Dis. 84, 249–253. <https://doi.org/10.1094/pdis.2000.84.3.249>
- Elmer, P.A.G., Reglinski, T., 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. Plant Pathol. 55, 155–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01348.x>
- Errampalli, D., 2014. Chapter 6–*Penicillium expansum* (Blue Mold). Postharvest Decay: Control Strategies. 189-231
- Esteve-Turrillas, F.A., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., Mercader, J. V., Abad-Fuentes, A., 2016. Fungicide multiresidue monitoring in international wines by immunoassays. Food Chem. 196, 1279–1286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.102>

- Europe, P., 2008. Message in a Bottle. PAN Europe Available online at: [http://www.pan-europe.info/Resources/Briefings/Message\\_in\\_a\\_Bottle.pdf](http://www.pan-europe.info/Resources/Briefings/Message_in_a_Bottle.pdf) (Accessed May 23, 2018).
- Ewe, J.A., Wan-Abdullah, W.N., Liong, M.T., 2010. Viability and growth characteristics of *Lactobacillus* in soymilk supplemented with B-vitamins. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 61, 87–107. <https://doi.org/10.3109/09637480903334163>
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., Borriss, R., 2018. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Front. Microbiol.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>
- Flint, Maria Louise, Dreistadt, Steve H., 1998. Clark, Jack K. (ed.). *Natural Enemies Handbook: the illustrated guide to biological pest control*. University of California Press. ISBN 978-0-520-21801-7.
- Fokkema N.J., 1996. Biological control on aerial plant surfaces. *Food and fertilizer technology center for the ASPAC Region Book Series 42*: 41–48.
- Follett, P. A. and Duan, J. J. (2000). *Nontarget effects of biological control*. Kluwer.
- Fravel, D., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 26: 75–91.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- García-Benitez, C., Melgarejo, P., De Cal, A., Fontaniella, B., 2016. Microscopic analyses of latent and visible *Monilinia fructicola* infections in nectarines. *PLoS One* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160675>
- García-Gutiérrez, L., Zerriouh, H., Romero, D., Cubero, J., de Vicente, A., Pérez-García, A., 2013. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microb. Biotechnol.* 6, 264–274. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12028>
- Glass, D.J., 1993. Commercialization of soil microbial technologies. En: Blaine Metting, F. (Ed.) Marcel Dekker, New York, pp 595–618.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Usall, J., Dashevskaya, S., Torres, R., 2016. Development of a SCAR marker and a strain-specific genomic marker for the detection of the biocontrol agent strain CPA-8 *Bacillus amyloliquefaciens* (formerly *B. subtilis*). *Ann. Appl. Biol.* 169, 248–256. <https://doi.org/10.1111/aab.12298>
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., Mari, M., 2017a. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiol.* 64, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Casals, C., Torres, R., De Cal, A., Guijarro, B., Usall, J., 2017b. Biological control of brown rot in stone fruit using *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 under field conditions. *Crop Prot.* 102, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.08.010>

- Gotor-Vila, A., Usall, J., Torres, R., Abadías, M., Teixidó, N., 2017c. Formulation of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using different approaches: liquid, freeze-drying and fluid-bed spray-drying. *BioControl* 62, 545–555. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9802-3>
- Gotor-Vila, A., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Teixidó, N., 2017d. Biocontrol products based on *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using fluid-bed spray-drying process to control postharvest brown rot in stone fruit. *LWT - Food Sci. Technol.* 82, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.034>
- Guijarro, B., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A., 2006. Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia* spp. *Biocontrol Sci. Technol.* 16, 257–269. <https://doi.org/10.1080/09583150500335897>
- Gurr, G. M., 2016. "Multi-country evidence that crop diversification promotes ecological intensification of agriculture". *Nature Plants*. 2 (3): 16014.
- Haidar, R., Fermaud, M., Calvo-garrido, C., Roudet, J., Deschamps, A., 2016. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria 301–322. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312, 7–14. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- Hernández, A. (2003) *Microbiología industrial*. Editorial EUNED, Costa Rica, pp 296.
- Hershkovitz, V., Ben-Dayana, C., Raphael, G., Pasmanik-Chor, M., Liu, J., Belausov, E., Aly, R., Wisniewski, M., Droby, S., 2012. Global changes in gene expression of grapefruit peel tissue in response to the yeast biocontrol agent *Metschnikowia fructicola*. *Mol. Plant Pathol.* 13, 338–349. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00750.x>
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42, 462–468. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>
- Hofstein, R., Chapple, A., 1998. Commercial development of biofungicides. In F. R. Hall & J. J. Menn (Eds.), *Biopesticides: Use and delivery* (pp. 77–102). Totowa: Humana Press.
- Hubálek, Z., 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46, 205–229. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
- Irtwange, S., 2006. Application of Biological Control Agents in pre- and post-harvest operations. *Agri. Eng. Intl.* 8, Invited Overview 3, A & M University Press, Texas.
- Janisiewicz, W., 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Phytopathology*, 78, 194–198.

- Janisiewicz, W., 1991. Biological control of postharvest fruit diseases. En: Handbook of applied mycology. Vol. 1: Soil and plants. Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G., Knudsen, G.R., (Eds.) Marcel Dekker, New York, pp 301–326.
- Janisiewicz, W., 1997. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruit. In G. J. Boland & L. D. Kuykendall (Eds.), Plant–microbe interactions and biological control (pp. 171–198). New York: Marcel Dekker
- Ji, X., Li, J., Meng, Z., Zhang, S., Dong, B., and Qiao, K., 2019. Synergistic effect of combined application of a new fungicide fluopimomide with a biocontrol agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for management of gray mold in tomato. Plant Disease. In press.
- Jones, E.E., Mead, A., Whipps, J.M., 2004. Effect of inoculum type and timing of application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*: control of sclerotinia disease in glasshouse lettuce. Plant Pathol. 53, 611–620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01071.x>
- Kai, M., Hausteiner, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., Piechulla, B., 2009. Bacterial volatiles and their action potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81, 1001–1012. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1760-3>
- Karabulut, O.A., Tezcan, H., Daus, A., Cohen, L., Wiess, B., Droby, S., 2004. Control of preharvest and postharvest fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. Biocontrol Sci. Technol. 14, 513–521. <https://doi.org/10.1080/09583150410001682287>
- Kasfi, K., Taheri, P., Jafarpour, B., Tarighi, S., 2018. Identification of epiphytic yeasts and bacteria with potential for biocontrol of grey mold disease on table grapes caused by *Botrytis cinerea*. Spanish J. Agric. Res. 16, e1002. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-11378>
- Kierul, K., Voigt, B., Albrecht, D., Chen, X.H., Carvalhais, L.C., Borriss, R., 2015. Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Microbiol. (United Kingdom) 161, 131–147. <https://doi.org/10.1099/mic.0.083576-0>
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., Zhang, S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. . Phytopathology 94, 1259–1266. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.11.1259>
- Kong, J., Zhang, Y., Ju, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Quek, S.Y., Yao, W., 2019. Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes. Food Chem. 285, 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.099>
- Kuc J., 1987. Plant immunization and its applicability for disease control. In: Chet I (ed.) Innovative approaches to plant disease control (pp. 255–274) John Wiley and Sons, New York
- Ladaniya, M.S., 2008. 16-Postharvest diseases and their management. Citrus Fruit. 417-449.
- Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A., 2003. Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a

- biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. *J. Phytopathol.* 151, 600–606. <https://doi.org/10.1046/j.0931-1785.2003.00772.x>
- Larena, I., De Cal, A., Melgarejo, P., 2004. Solid substrate production of *Epicoccum nigrum* conidia for biological control of brown rot on stone fruits. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.007>
- Larena, I., Torres, R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., Bellini, A., Mandrin, J.F., Lichou, J., De Eribe, X.O., Usall, J., 2005. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biol. Control* 32, 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.10.010>
- Lewis, J.A., Papavizas, G.C., 1991. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Crop Prot.* 10, 95–105. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(91\)90055-V](https://doi.org/10.1016/0261-2194(91)90055-V)
- Li, B.Q., Tian, S.P., 2006. Effects of trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii*. *J. Appl. Microbiol.* 100, 854–861. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02852.x>
- Liu, X.-M., Zhang, H., 2015. The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 6, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00774>
- Loper, J.E., Henkels, M.D., 1997. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 99–105.
- Lumsden, R.D., Walter, J.F., 1995. Development of the biocontrol fungus *Gliocladium virens* risk assessment and approval for horticultural use. En: Hokkanen, H.M.T., Lynch, J.M. (Eds.) *Biological Control: Benefits and Risks*, Cambridge Univ Press. Cambridge, pp 263–69.
- Lynne Boddy, 2016. Chapter 8-Pathogens of Autotrophs. *The fungi.* 293-336.
- Mandeel Q and Baker R., 1991. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81: 462–469.
- Manso, T., Nunes, C., 2011. *Metschnikowia andauensis*: A novel biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Acta Hortic.* 905, 261–268. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.905.28>
- Manso, T., Nunes, C., Raposo, S., Lima-Costa, M.E., 2010. Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent *P. agglomerans* PBC-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 1145–1155. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0762-1>
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), 2019. *Cifras del sector de Frutas y Hortalizas*
- Massart, S., Margarita, M.M., Jijakli, M.H., 2015. Biological control in the microbiome era: Challenges and opportunities. *Biol. Control* 89, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.003>
- McIntyre, J.L., Press, L.S., 1991. Formulation, delivery systems and marketing of biocontrol agents and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). En: Keister, D.L., Cregan, P.B. (Eds.) *The rhizosphere and plant growth*. Academic Publishers, Netherlands, pp 90–112.

- Mercier, J., Smilanick, J.L., 2005. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biol. Control* 32, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.12.002>
- Mercier, J., Wilson, C.L., 1995. Effect of wound moisture on the biocontrol by *Candida oleophila* of gray mold rot (*Botrytis cinerea*) of apple. *Postharvest Biol. Technol.* 6, 9–15. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(94\)00050-3](https://doi.org/10.1016/0925-5214(94)00050-3)
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., Vesey, G., 2006. Preservation of microorganisms by drying; A review. *J. Microbiol. Methods* 66, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Morgan, J.A.W., Bending, G.D., White, P.J., 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56, 1729–1739. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri205>
- Narayanasamy, P. 2006. Postharvest pathogens and disease management. John Wiley and Sons Inc., Wiley-Interscience, Hoboken, NJ
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., Ongena, M., 2012. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 176–191. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x>
- Nunes, C.A., 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur. J. Plant Pathol.* 133, 181–196. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9919-7>
- Oakley, D.E., 1997. Produce uniform particles by spray drying. *Chemical Engineering Progress* 93, 48–54.
- Olivain, C., L'Haridon, F., Alabouvette, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1523–1531. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1523-1531.2006>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9, 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Orton, F., Rosivatz, E., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2011. Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as *in vitro* antiandrogens. *Environ. Health Perspect.* 119, 794–800. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002895>
- Ossowicki, A., Jafra, S., Garbeva, P., 2017. The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLoS One* 12, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174362>
- Palou, L., Smilanick, J.L., Crisosto, C.H., 2009. Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. *J. Food Prot.* 72, 1037–1046. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1037>
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G., 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* 47, 85–92.



<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>

- Patiño-Vera, M., Jiménez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A., Galindo, E., 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *J. Appl. Microbiol.* 99, 540–550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02646.x>
- Peigham-Ashnaei, S., Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh, M., Behboudi, k., 2009. Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mould of apple. *J. Plant Pathology.* 91, 65-70.
- Pelajić, M., Peček, G., Mutavdžić Pavlović, D., Vitali Čepo, D., 2016. Novel multiresidue method for determination of pesticides in red wine using gas chromatography-mass spectrometry and solid phase extraction. *Food Chem.* 200, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.018>
- Pertot, I., Gessler, C., 2007. Is it possible to improve bio-control efficacy in some plant/pathogen systems? *IOBC/ WPRS Bulletin*, 30,3–9.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., Bakker, P.A.H.M., 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Powell, K.A., 1992. Biocontrol product fermentation, formulation and marketing. En: MacCarthy, D. (Ed.) *Concentration and drying of food*. Elsevier Applied Science Publisher, London, pp 203–220.
- Pratella, G.C., Mari, M., 1993. Effectiveness of *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Paecilomyces* in postharvest fruit protection. *Postharvest Biol. Technol.* 3, 49–56. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(93\)90026-Y](https://doi.org/10.1016/0925-5214(93)90026-Y)
- Pusey, L., Wilson, C.L., 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PD-69-753>
- Pusey, P.L., Wilson, C.L., 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 68, 753–756.
- Quimby, P.C., Zidack, N.K., Boyette, C.D., Grey, W.E., 1999. A simple method for stabilizing and granulating fungi. *Biocontrol Sci. Technol.* 9, 5–8. <https://doi.org/10.1080/09583159929857>
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Rabbee, M.F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C., Baek, K. hyun, 2019. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules.* <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Rahman, A., Wallis, C.M., Uddin, W., 2015. Silicon-induced systemic defense responses in perennial ryegrass against infection by *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology* 105, 748–757. <https://doi.org/10.1094/phyto-12-14-0378-r>
- Raza, W., Wei, Z., Ling, N., Huang, Q., Shen, Q., 2016. Effect of organic fertilizers

- prepared from organic waste materials on the production of antibacterial volatile organic compounds by two biocontrol *Bacillus amyloliquefaciens* strains. J. Biotechnol. 227, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.014>
- Reed, G., Nagowithana, T.W., 1991. Yeast Technology. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Reglamento (CE) N° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo.
- Reglamento (UE) 2015/408 de la Comisión que establece una lista de sustancias candidatas a la sustitución, en aplicación del artículo 80, apartado 7, del Reglamento (CE) no 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios.
- Reglamento (UE) N° 540/2011 de la Comisión por el que se aplica el Reglamento (CE) no 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas.
- Rhodes, D.J., 1993. Formulation of biological control agents. En: Jones, D.G. (Ed.) Exploitation of microorganisms. Chapman & Hall, London, pp 411–439.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A., 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca*. Mol. Plant-Microbe Interact. 20, 430–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- Romero-Tabarez, M., Jansen, R., Sylla, M., Lünsdorf, H., Häubler, S., Santosa, D., Timmis, K., Molinari, G., 2006. 7-O-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 1701–1709. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2010.12.003>
- Rudge, R.H., 1991. Formulation of biocontrol agents. En: Kirsop, B.E., Doyle A. (Eds.) Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods. Academic Press, London, pp 411–439.
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L., Kunjeti, G., Donofrio, N.M., Czymmek, K.J., 2010. Rudrappa 2010 3, 1–9.
- Ryu, C., Farag, M.A., Hu, C., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Pare, P.W., 2004. Bacterial volatiles induced resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 134, 1017–1026. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>.with
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P., 2008. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. J. Appl. Microbiol. 105, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x>
- Sarosh, B.R., Danielsson, J., Meijer, J., 2009. Transcript profiling of oilseed rape (*Brassica napus*) primed for biocontrol differentiate genes involved in microbial interactions with beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* from pathogenic *Botrytis cinerea*. Plant Mol. Biol. 70, 31–45. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9455-4>

- Sasse, J., Martinoia, E., Northen, T., 2018. Feed your friends: Do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci.* 23, 25–41. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003>
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Hanson, L.E., Loria, R., 2000. Potato cultivar, pathogen isolate and antagonist cultivation medium influence the efficacy and ranking of bacterial antagonists of *Fusarium* dry rot. *Biocontrol Sci. Technol.* 10, 267–279. <https://doi.org/10.1080/09583150050044547>
- Scholz, R., Molohon, K.J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A.L., Süssmuth, R.D., Mitchell, D.A., Borriss, R., 2011. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 193, 215–224. <https://doi.org/10.1128/JB.00784-10>
- Scholz, R., Vater, J., Budiharjo, A., Wang, Z., He, Y., Dietel, K., Schwecke, T., Herfort, S., Lasch, P., Borriss, R., 2014. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 196, 1842–1852. <https://doi.org/10.1128/JB.01474-14>
- Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., Garbeva, P., 2017. Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Front. Microbiol.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02484>
- Scott, P.M., 2001. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins, *Journal of AOAC International* 84: 1809-1817
- Scott, R., 1991. Fabricación de queso. Acribia. Zaragoza
- Silva, J., Carvalho, A.S., Teixeira, P., Gibbs, P.A., 2002. Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 77–81. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01055.x>
- Smilanick, J.L., Mansour, M.F., Sorenson, D., 2006. Pre- and postharvest treatments to control green mold of citrus fruit during ethylene degreening. *Plant Dis.* 90, 89–96. <https://doi.org/10.1094/pd-90-0089>
- Sorokulova, I., Mandell, A., Vodyanoy, V., 2008. Articles: formulation and engineering of biomaterials. Novel methods for storage stability and release *Bacillus* spores. *Culture* 1147–1153. <https://doi.org/10.1021/bp.22>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. J., 1995. Media for industrial fermentations. In P. F. Stanbury, A. Whitaker, & S. J. Hall (Eds.), *Principles of fermentation technology* (2nd ed., pp. 93–121). Oxford: Perjamon Press.
- Stevens, C., Khan, V.A., Lu, J.Y., Wilson, C.L., Pusey, P.L., Kabwe, M.K., Igwegbe, E.C.K., Chalutz, E. and Droby, S., 1997. Integration of ultraviolet (UV-C) light with yeast treatment for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biological Control* 10, 98-103.
- Teixidó, N., Cañamás, T.P., Abadías, M., Usall, J., Solsona, C., Casals, C., Viñas, I., 2006. Improving low water activity and desiccation tolerance of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 by osmotic treatments. *J. Appl. Microbiol.* 101, 927–937. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02948.x>
- Teixidó, N., Torres, R., Viñas, I., Abadías, M., Usall, J., 2011. Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. En: Lacroix, C. (Ed.) *Protective*

- cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 201. Cambridge, pp 364–402.
- Teixidó, N., Usall, J., Palou, L., Asensio, A., Nunes, C., Viñas, I., 2001. Improving control of green and blue molds on oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *Eur J Plant Pathol* 107, 685–694.
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., Sampedro, I., 2018. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>
- Torres, R., Nunes, C., García, J.M., Abadias, M., Viñas, I., Manso, T., Olmo, M., Usall, J., 2007. Application of *Pantoea agglomerans* CPA-2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases affecting citrus fruit at several mediterranean locations. *Eur. J. Plant Pathol.* 118, 73–83. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9120-1>
- Tortora G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2007. *Microbiology: an introduction*. 9na. edición, pp 931.
- Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M.E., 2014. *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot), postharvest decay: control strategies. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00005-3>
- Tuset, J.A., 1987. *Podredumbres de los frutos cítricos*. Generalitat Valenciana. Valencia. España. 206 pp.
- Usall, J., Casals, C., Sisqueira, M., Palou, L., De Cal, A., 2015. Alternative technologies to control postharvest diseases of stone fruits. *Stewart Postharvest Rev.* 11, 1–6. <https://doi.org/10.2212/spr.2015.4.2>
- Usall, J., Torres, R., Teixidó, N., 2016. Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative? *Curr. Opin. Food Sci.* 11, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.002>
- Van Loon JC., 2000. Induced resistance. In: Slusarenko AJ, Fraser RSS and Van Loon JC (eds.) *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* (pp. 521–574) Kluwer Academic publishers, Dordrecht, NL.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valero, J.R., 2007. Industrial wastewaters and dewatered sludge: Rich nutrient source for production and formulation of biocontrol agent, *Trichoderma viride*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1695–1703. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9417-4>
- Villarino, M., Egüen, B., Lamarca, N., Segarra, J., Usall, J., Melgarejo, P., De Cal, A., 2013. Occurrence of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* after introduction of *M. fructicola* in peach orchards in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 137, 835–845. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0292-6>
- Villarino, M., Melgarejo, P., De Cal, A., 2016. Growth and aggressiveness factors affecting *Monilinia* spp. survival peaches. *Int. J. Food Microbiol.* 227, 6–12.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.023>

- Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J., Lamarca, N., de Cal, A., 2012. Secondary inoculum dynamics of *Monilinia* spp. and relationship to the incidence of postharvest brown rot in peaches and the weather conditions during the growing season. *Eur. J. Plant Pathol.* 133, 585–598. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9931-y>
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V., 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00009-9)
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higton, G., 2001. *Industrial microbiology: an introduction* Blackwell Science. Oxford, 293 pp.
- Wan, M., Li, G., Zhang, J., Jiang, D., Huang, H.C., 2008. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biol. Control* 46, 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.05.015>
- Ward, O.P., 1991. *Biología de la fermentación*. Acribia, Zaragoza.
- Weisskopf, L., 2013. The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. *Microb. Pathog. Strateg. Combat. them Sci. Technol. Educ.* 1352–1363.
- Wisniewski, M., & Wilson, C. L., 1992. Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables: recent advances. *HortScience*, 27, 94–98.
- Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience* 27, 94–98.
- Witmer, X., Nonogaki, H., Beers, E.P., Bradford, K.J., Welbaum, G.E., 2019. Characterization of chitinase activity and gene expression in muskmelon seeds 167–178. <https://doi.org/10.1079/SSR2003134>
- Wu, L., Wu, H.J., Qiao, J., Gao, X., Borriss, R., 2015. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Front. Microbiol.* 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01395>
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Teixidó, N., 2012. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biol. Control* 60, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>
- Yáñez-Mendizábal, Viviana, Zerriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., Pérez-García, A., Teixidó, N., 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 609–619. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9905-0>
- Younis, M. a M., Hezayen, F.F., Nour-Eldein, M. a, Shabeb, M.S. a, 2010. Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. *Am. J. Agric. Environ. Sci.* 31–37.
- Yu, B., Lu, Z.X., Bie, X.M., Lu, F.X., Huang, X.Q., 2008. Optimisation of the medium composition for production of protease and soybean peptides by *Bacillus subtilis* SHZ using response surface methodology. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 1143–1151.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01580.x>

- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q., 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5942–5944. <https://doi.org/10.1128/aem.01357-12>
- Zhang, B., Bai, Z., Hoefel, D., Tang, L., Yang, Z., Zhuang, G., Yang, J., Zhang, H., 2008. Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* 284, 102–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01178.x>
- Zhang, H., Wang, S., Huang, X., Dong, Y., Zheng, X., 2008. Integrated control of postharvest blue mold decay of pears with hot water treatment and *Rhodotorula glutinis*. *Postharvest Biol Technol* 49, 308–313.
- Zhang, J., Greasham, R., 1999. Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 407–421. <https://doi.org/10.1007/s002530051411>
- Zhang, J., Marcin, C., Shiffet, M.A., Salmom, P., Brix, T., Greasham, R., Buckland, B., Chartrain, M., 1996. Development of a defined medium fermentation process for physostigmine production by *Streptomyces griseofuscus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 44, 568–575.
- Zhang, S., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., 2002. Development of assays for assessing induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biol. Control* 23, 79–86. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0992>
- Zheng, X.D., Zhang, H.Y., Sun, P., 2005. Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. *Eur. Food Res. Technol.* 220, 353–357. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1056-5>

## 2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En el apartado anterior se ha hablado sobre la importancia del sector hortofrutícola en España, tanto desde un punto de vista de producción como de exportación. España produce el 20 % de las frutas y hortalizas que se generan en Europa, colocándose a la cabeza del continente. Este sector es por tanto una gran fuente económica del país, ya que las exportaciones a Europa y el resto del mundo supusieron 13.554 millones de Euros anuales (periodo 2013-2017, Eurostat). Sin embargo, las plagas e infecciones microbianas hacen que estos ingresos sean inferiores a los que podrían conseguirse si fuésemos capaces de minimizarlas. Para luchar contra plagas y enfermedades se llevan utilizando desde hace décadas pesticidas de síntesis químicos, que si bien reducen notablemente las pérdidas productivas generan problemas medioambientales y de salud pública.

Los pesticidas son sintetizados en el laboratorio mediante sustancias activas que poseen un elevado poder antimicrobiano, aunque numerosos estudios científicos avalan que muchos de ellos son cancerígenos para el ser humano y destructivos para los ecosistemas. Además, el desarrollo de resistencias por los fitopatógenos microbianos reduce la eficacia de los pesticidas por lo que las enfermedades y por tanto la pérdida de los cultivos está aumentando significativamente. Por ello, otras alternativas más sostenibles con el medio ambiente están siendo objeto de numerosas investigaciones; a ello también contribuye el Reglamento (UE) 2015/408, que establece una lista de sustancias candidatas a ser eliminadas o prohibidas. Esta lista, de momento, está sólo compuesta por algunas de ellas, pero a buen seguro que nuevas disposiciones legales continuarán restringiendo otras sustancias y no autorizando los nuevos registros una vez expirado el periodo de comercialización.

Una de las alternativas que lleva años estudiándose pero que todavía no ha conseguido resultados prometedores a nivel comercial es el control biológico o biocontrol mediante agentes microbiológicos. Los duros y extensos registros que se precisan hace que las empresas no se impliquen en su desarrollo. Sin embargo, desde al año 2012 donde el valor de mercado de estos productos era de 52 millones de euros hemos pasado a unos actuales de 1.300-2.200 millones de euros, lo que demuestra la tendencia creciente de esta alternativa. Las Administraciones quieren colaborar en facilitar el desarrollo de este tipo

de productos, pero como se comentará y quedará claro a lo largo de la Tesis Doctoral, es un proceso lento y costoso

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de la eficacia antifúngica de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 frente a algunas de las enfermedades fúngicas postcosecha de frutas más frecuentes; ello nos permitirá obtener un formulado que pueda registrarse hasta un nivel comercial siguiendo los requisitos establecidos en el Reglamento (CE) 1107/2009 del Parlamento Europeo relativo a la comercialización de productos fitosanitarios. Dicho objetivo principal se ha conseguido a través de una serie de objetivos parciales que han sido llevados a cabo durante la Tesis y se relacionarán con los Capítulos de los que consta este manuscrito:

**1- Identificación y caracterización del agente de biocontrol *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 (Capítulo 1):**

- 1.1- Identificación molecular mediante secuenciación y elaboración de árboles filogenéticos.
- 1.2- Conocer las condiciones biológicas y físicas de BUZ-14 como temperatura de crecimiento, tolerancia de pH o producción de endosporas.
- 1.3- Estudios *in vivo* e *in vitro* para determinar la eficacia del agente frente a los principales mohos fitopatógenos postcosecha de frutas.
- 1.4- Establecer las condiciones de crecimiento óptimas y el tipo de tratamiento curativo o preventivo para maximizar la actividad antifúngica del agente de biocontrol.

**2- Elucidación del modo de acción (antibiosis) (Capítulos 2 y 3):**

- 2.2- Identificación y cuantificación de los compuestos lipopeptídicos y su comportamiento postcosecha *in planta*.
- 2.3- Determinación del lipopéptido responsable de la actividad antifúngica.
- 2.3- Identificación de los compuestos orgánicos volátiles y valoración de su actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo*.



**3- Producción y formulación del ABC (Capítulo 4):**

3.1- Búsqueda de medios de crecimiento basados en ingredientes de bajo coste para un futuro escalado industrial y estudios de eficacia *in vitro* e *in vivo*

3.3- Formulación líquida, desecada y liofilizada: viabilidad y estabilidad en el tiempo.

3.4- Escalado industrial del formulado líquido para posterior aplicación.

**4- Aplicación final en pre- y postcosecha (Capítulo 4):**

4.1- Optimización de la aplicación en viñedos.

4.2- Compatibilidad con los pesticidas habitualmente utilizados en vid.

4.3- Evaluación de la eficacia del bioformulado en campo mediante la determinación de la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea*.

4.4- Establecer la dosis de aplicación postcosecha en nectarinas y evaluación de la incidencia y severidad de *Monilinia* spp.



### 3 ESTRUCTURA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para poder llevar a cabo los objetivos previamente descritos, esta Tesis se ha dividido en 4 capítulos con formato científico. El Capítulo 1 y 2 han sido publicados en la revista *Food Microbiology* (14 de 135 en la categoría *Food Science and Technology*), mientras que el tercero está siendo formateado para su envío a *Postharvest Biology and Technology* (18 de 135 en la categoría *Food Science and Technology*). Por otro lado, el cuarto capítulo será publicado más adelante con nuevos resultados obtenidos del tratamiento de frutos de hueso en pre- y postcosecha con la cepa antagonista objeto de esta Tesis Doctoral. A continuación, se muestra el esquema general seguido para poder desarrollar un producto de biocontrol que contenga al antagonista BUZ-14 como microorganismo activo (Figura 1), además de la metodología y el desarrollo experimental dividido en los cuatro pilares fundamentales de este estudio: identificación y caracterización del agente microbiano, modo de acción, producción y formulación y aplicación.

#### 1. Identificación y caracterización del agente de biocontrol BUZ-14 (Capítulo 1)

El primer Capítulo está centrado en identificar y caracterizar la cepa antagonista *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 para determinar frente a qué enfermedades fúngicas, en qué productos hortofrutícolas y en qué condiciones este agente es capaz de evitarlas o minimizarlas (Figura 2). Para ello, primero se determinaron las condiciones de crecimiento óptimas (temperatura, pH y tiempo de incubación) así como su curva de crecimiento y producción de endosporos en estas condiciones. La eficacia antifúngica *in vitro* se determinó mediante la inhibición del crecimiento radial e incluyó la actividad de las células vegetativas, los endosporos y sobrenadante libre de células a distintas concentraciones y tiempos de incubación. Los mohos testados fueron *Botrytis cinerea*, agente causal de la podredumbre gris en muchos productos hortofrutícolas destacando las uvas, fresas y hortalizas, *Monilinia laxa* y *M. fructicola*, especies causantes de la podredumbre marrón en frutas de hueso, *Penicillium expansum*, agente causal de la podredumbre azul en frutas de pepita fundamentalmente, y *P. digitatum* y *P. italicum* que ocasionan las podredumbres verde y azul, respectivamente, en cítricos. Con los datos obtenidos se procedió a realizar los estudios de actividad en frutas (*B. cinerea* en uvas,

*M. laxa* y *M. fructicola* en cerezas, *P. expansum* en manzanas y *P. digitatum* y *P. italicum* en naranjas). Los últimos ensayos de este capítulo se centraron en determinar el efecto preventivo o curativo de los cultivos y en profundizar en el mecanismo de acción frente a *Monilinia* spp. en melocotones estableciendo su dinámica poblacional y su eficacia simulando las condiciones reales de conservación y comercialización.

## 2. Modo de acción (Capítulos 2 y 3)

Los Capítulos 2 y 3 se basan en el estudio de la antibiosis como principal modo de acción entre el antagonista y el patógeno. Los lipopéptidos y los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) fueron los principales metabolitos estudiados en la cepa BUZ-14. En el caso de los lipopéptidos, primero se aisló la fracción lipopeptídica mediante su extracción del sobrenadante con n-butanol, quedando por otro lado la fracción no butanólica donde se encontrarían el resto de compuestos generados. Ambas fracciones y el sobrenadante se sometieron a estudios *in vitro* en medio líquido (Potato Dextrose Broth) en placas microtiter, y en frutas frente a los fitopatógenos nombrados en el capítulo anterior. La identificación de los lipopéptidos se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina en primer lugar, seguido de una autografía y de HPLC para confirmar las identificaciones y cuantificar los compuestos. Por último, se evaluó la capacidad de BUZ-14 de crecer en el melocotón y la producción de lipopéptidos en el propio fruto siguiendo la misma metodología de extracción y aislamiento que *in vitro*.

Por otro lado, se determinó la actividad antifúngica del volatoloma de BUZ-14, es decir, la capacidad que tenía el conjunto de volátiles producidos por la bacteria para inhibir el crecimiento de los mohos fitopatógenos. *In vitro* se utilizó la técnica de placas enfrentadas, e *in vivo* se utilizaron botes en los que el ABC era inoculado en la parte inferior mientras el fruto se situaba en la superior sujetado por una gasa sin que hubiera contacto entre ambos. La identificación de los volátiles mediante CG-MS (cromatografía de gases masas) permitió averiguar los principales compuestos generados por el agente y por tanto el estudio de los volátiles por separado, tanto *in vitro* como en los frutos. En ambos casos se usó la misma técnica que para el volatoloma, aunque se sustituyó la bacteria por un disco de celulosa impregnado con el compuesto a testar. La Figura 3 muestra un esquema con los pasos seguidos para llevar a cabo los objetivos propuestos.

### 3. Producción y formulación (Capítulo 4)

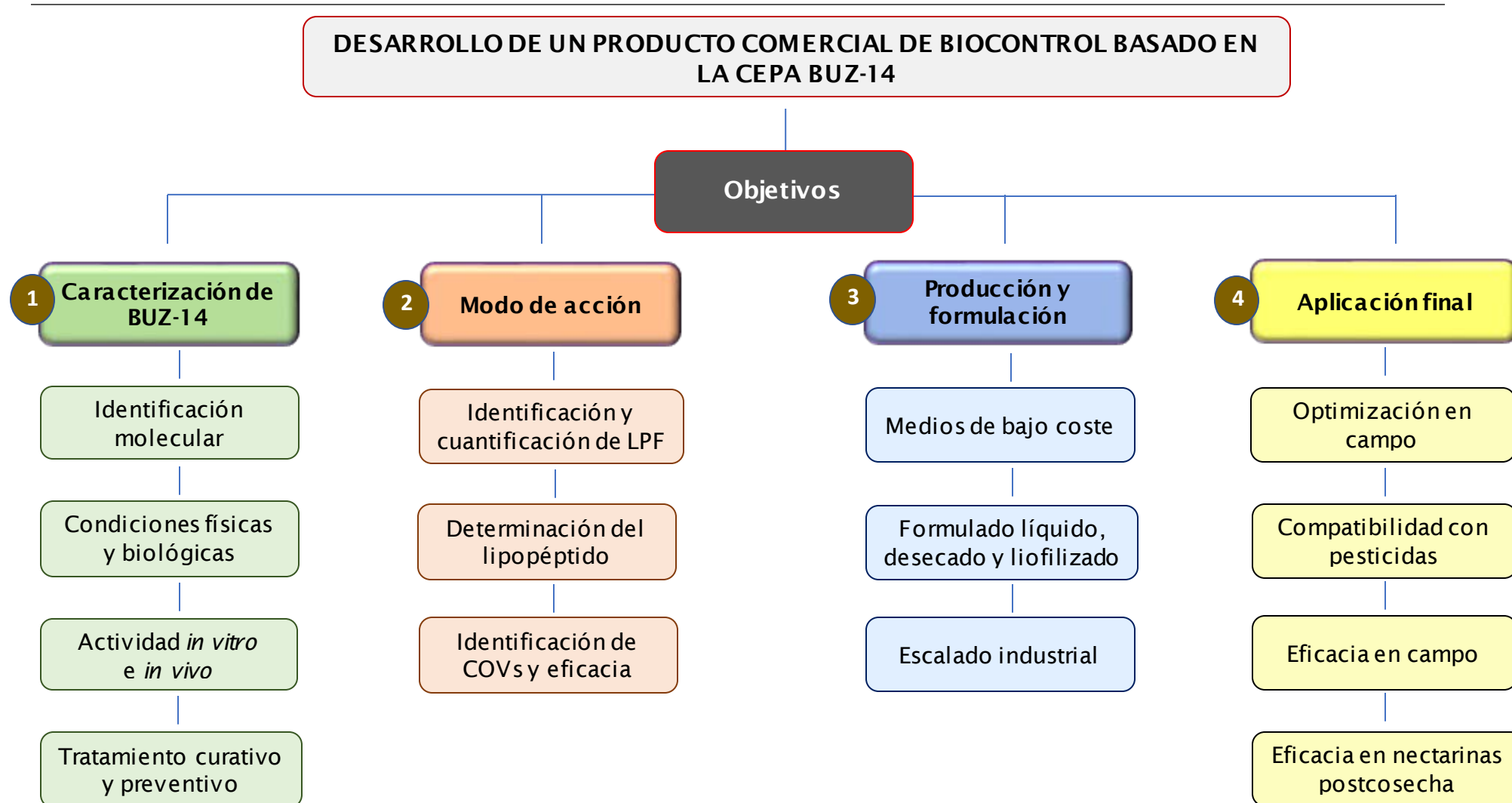
Una de las partes de las que consta el Capítulo 4 es la producción y formulación del agente de biocontrol. Se elaboraron diferentes medios de cultivo con ingredientes de bajo coste que fueran ricos en nitrógeno y carbono y se evaluó tanto la capacidad de BUZ-14 de multiplicarse en ellos como la producción de metabolitos antifúngicos. La actividad *in vitro* de la fracción lipopéptica frente a todos los fitopatógenos se determinó en placas microtiter, previa extracción de los compuestos de cada uno de los medios. Se identificaron los lipopéptidos producidos en cada medio y se cuantificaron mediante HPLC. Con el medio que mayor actividad demostró se elaboró un formulado líquido a gran escala mediante un biorreactor, a partir del cual se elaboraron el desecado y el liofilizado. Para producir el desecado, alícuotas del medio líquido fueron centrifugadas obteniendo un pellet, el cual fue deshidratado a 30 °C durante 24 h. El sobrenadante con los metabolitos fue almacenado en refrigeración (4 °C) para estudiar su estabilidad en el tiempo. Otras alícuotas sin centrifugar fueron liofilizadas, obteniendo el formulado con las células y los metabolitos en conjunto. Estos formulados deshidratados fueron almacenados durante un año para evaluar su viabilidad y estabilidad.

### 4. Aplicación pre- y postcosecha

La aplicación en campo para combatir *B. cinerea* se llevó a cabo en viñedos próximos a Zaragoza (España) en la localidad de Cariñena. Primero se evaluó la compatibilidad de BUZ-14 con los pesticidas habitualmente utilizados por los agricultores en el campo a través de ensayos en el laboratorio en placas de Petri a diferentes dosis de sustancias activas. El tratamiento en campo fue realizado con un tractor y la aplicación en forma de pulverización, con dosis de 600 L/Ha. Se realizaron cuatro tratamientos en diferentes fenologías durante toda la campaña (inicio y plena floración, tamaño guisante y envero). Por último, se determinó la incidencia y la severidad de *B. cinerea* en las uvas tratadas una vez recolectadas y llevadas al laboratorio.

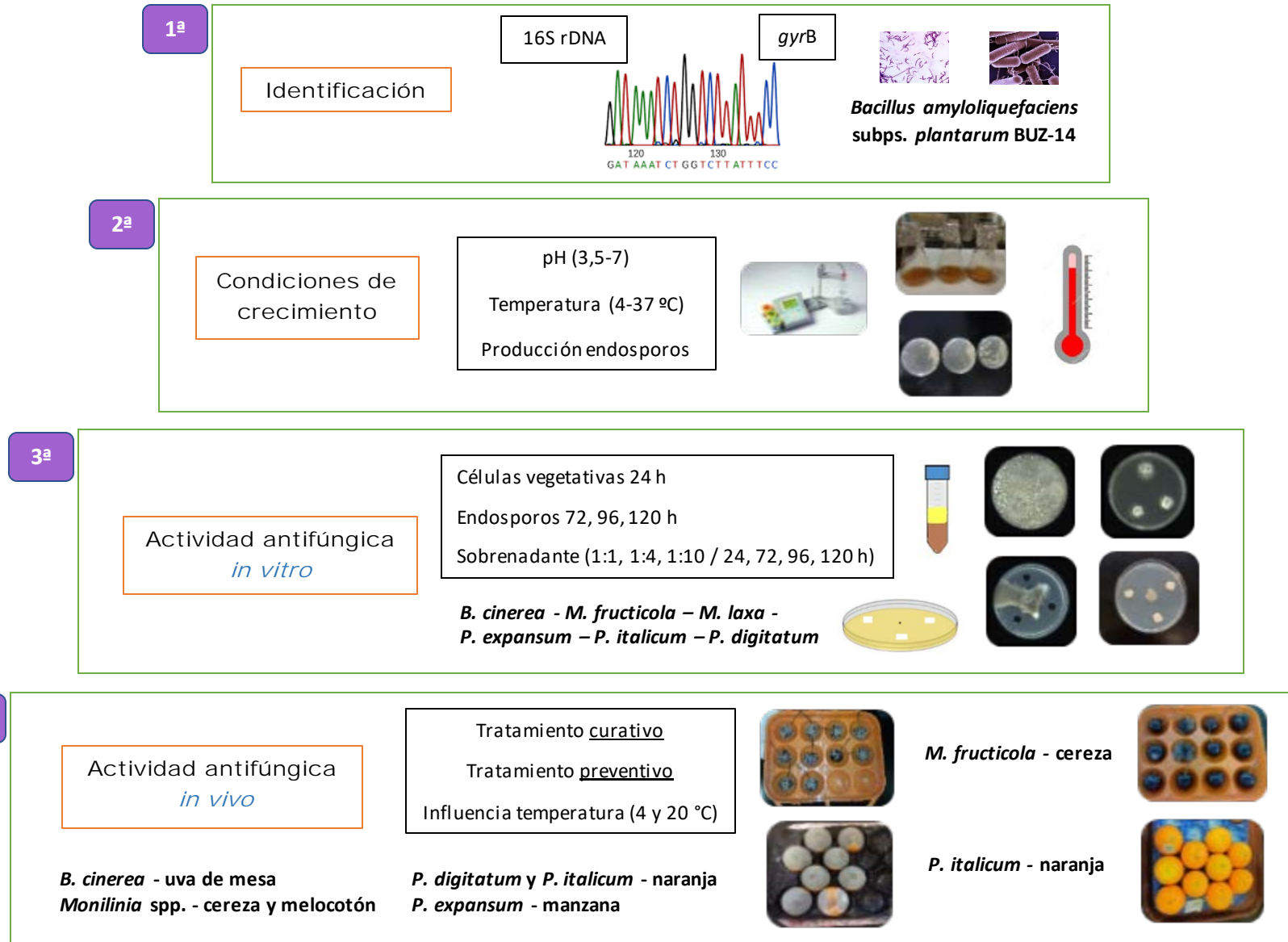
Por otro lado, los tratamientos en postcosecha se realizaron en nectarinas recolectadas en parcelas experimentales de la Estación Experimental de Aula Dei (centro del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)). Las nectarinas fueron tratadas mediante inmersión en el formulado líquido a concentraciones de 1:5 y 1:10

(formulado : agua). Tras un periodo de incubación a temperatura ambiente (20 °C) y en frío (4 °C), se determinó la incidencia y severidad de *Monilinia* spp. en los frutos. El diagrama o esquema referente a la metodología utilizada en este capítulo se puede observar en la Figura 4.



**Figura 1.** Esquema general seguido en la Tesis Doctoral para desarrollar un producto comercial de biocontrol basado en la cepa BUZ-14.

LPF: Fracción Lipopeptídica; COVs: Compuestos Orgánicos Volátiles



**Figura 2.** Esquema de las etapas llevadas a cabo para identificar y caracterizar BUZ-14 como agente de biocontrol. [Capítulo 1]




Modo de acción: antibiosis

Lipopéptidos

Volátiles

**Aislamiento y obtención de las fases LPF, NBF y CFS**

N-butanol

$$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ | & | & | & | \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ | & | & | & | \\ \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \end{array}$$



**Act. antifúngica *in vitro* del volatoloma**



Placas enfrentadas *B. cinerea*

**Ensayos *in vitro***

LPF	1:6	1:48
NBF	1:12	1:80
CFS	1:24	1:100



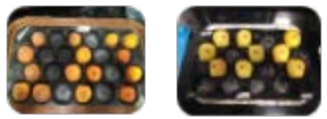
Placas microtiter

**Act. antifúngica *in vivo* del volatoloma**



**Ensayos *in vivo***

LPF	1:6	1:24
CFS	1:12	1:48

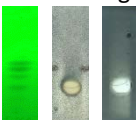


**Identificación compuestos del volatoloma (COVs)**

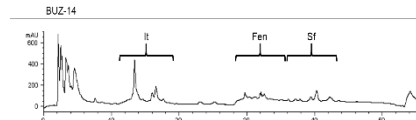

CC(=O)C

**Identificación y cuantificación de lipopéptidos (LPF)**

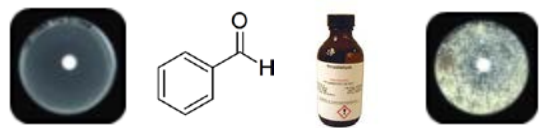
TLC + autobiografía




HPLC



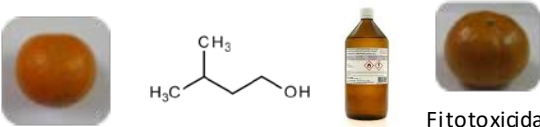
**Act. antifúngica de COVs puros: *in vitro***



**Crecimiento del ABC y producción de iturina A en fruta**



**Act. antifúngica de COVs puros: *in vivo***



Fitotoxicidad

Figura 3. Diagrama que esquematiza los estudios llevados a cabo sobre la antibiosis como modo de acción de BUZ-14. [Capítulos 2 y 3]

### 1º) Producción

**Crecimiento de BUZ-14 en medios de cultivo de bajo coste**

0 24 48 72 96

**Actividad *in vitro* del sobrenadante**

Placas microtiter *P. italicum* en los pocillos

**Identificación y cuantificación de lipopéptidos (LPF)**

0 24 48 72 96

### 2º) Formulación

**Líquida**

BUZ-14 Medio sin escalar Bioreactor Medio escalado

**Desecada** **Liofilizada**

**Vida útil y eficacia *in vitro***

5 y 20 °C 20 °C

### 3º) Aplicación

**Precosecha** **Incidencia y severidad**

Viñedos DOP Cariñena

**Postcosecha**

1:5 y 1:10 20 °C 4 °C Nectarinas Venus x Big Top

Figura 4. Diagrama que esquematiza la producción, formulación y aplicación del agente de biocontrol BUZ-14. [Capítulo 4]

## **4 CAPÍTULOS**



## Capítulo 1. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases

**Adaptado de:** Calvo, H., Marco, P., Blanco, D. and Venturini, M.E. 2017. *Potential of a new strain of Bacillus amyloliquefaciens BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases*. Food Microbiology, 63: 101-110. doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.004

Food Microbiology 63 (2017) 101–110



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fm](http://www.elsevier.com/locate/fm)



Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases



H. Calvo, P. Marco, D. Blanco, R. Oria, M.E. Venturini\*

Plant Food Research Group, Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 - (Universidad de Zaragoza-GTA), Miguel Servet, 177, 50013, Spain

### Highlights

- *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 inhibited major postharvest rots in fruits
- Preventive treatments were effective against *Penicillium* spp. in oranges and apples
- *B. amyloliquefaciens* exhibited a curative effect against brown rot in stone fruits
- BUZ-14 survived at cool temperatures making it suitable for postharvest treatment

**ABSTRACT**

The biocontrol potential of the *Bacillus amyloliquefaciens* strain BUZ-14 was tested against the main postharvest diseases of orange, apple, grape and stone fruit. After characterizing the temperature and pH growth curves of strain BUZ-14, its *in vitro* antifungal activity was determined against *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *M. laxa*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum* and *P. italicum*. Subsequently, *in vivo* activity was tested against these pathogens by treating fruit with cells, endospores and cell-free supernatants. The *in vitro* results showed that BUZ-14 inhibited the growth of all the pathogens tested corresponding to the least susceptible species, *P. italicum*, and the most susceptible, *M. laxa*. *In vivo* tests corroborated these results as most of the treatments decreased the incidence of brown rot in stone fruit from 100 % to 0 %, establishing  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> as the minimum inhibitory concentration. For the *Penicillium* species a preventive treatment inhibited *P. digitatum* and *P. italicum* growth in oranges and reduced *P. expansum* incidence in apples from 100 % to 20 %. Finally, it has been demonstrated that BUZ-14 was able to survive and to control brown rot in peaches stored at cool temperatures, making it a very suitable biocontrol agent for application during the post-harvest storage and marketing of horticultural products.

**Keywords:** biocontrol, *Botrytis cinerea*, *Monilinia* spp., *Penicillium* spp.

## 1. Introduction

It has been estimated that about 20-25 % of harvested fruits and vegetables decay by filamentous fungi during postharvest handling even in developed countries, so control of fungal infections at this stage is critical (Droby, 2006; Singh and Sharma, 2007). Currently control measures of phytopathogens during pre- and post-harvest practices are primarily based on synthetic chemicals (El-Ghaouth et al., 2004; Ismail and Zhang, 2004; Droby, 2006; Korsten, 2006; Zhu, 2006; Singh and Sharma, 2007). However, the use of such chemicals is becoming increasingly problematic due to stricter legislation (Dir. 91/414/CEE) and growing public pressure resulting from their toxicological risks to human health (Dir. 2009/128/CE; U.S. National Research Council, 1987), especially children's health (U.S. National Research Council, 1993) and possible environmental pollution. A further limiting factor for chemical application is the development of fungicide-resistant strains for the main phytopathogenic fungi (Kinay et al., 2007; Zhao et al., 2010; Chen et al., 2013; Panebianco et al., 2015; Vitale et al., 2016). Consequently, researchers are currently looking for alternative methods to control postharvest diseases (Romero et al., 2007; Dimkic et al., 2013; Oro et al., 2014; Jiang et al., 2015; Parafati et al., 2015).

Biological control, which includes the use of antagonist microorganisms (BCAs-biological control agents) such as yeast and bacteria, has been a promising alternative to synthetic fungicides since it is safer for both human health and the ecosystem (Wilson and Wisniewski, 1994; Janisiewicz and Korsten, 2002; Korsten, 2006). During the last 30 years, over one thousand articles on postharvest biocontrol have been published and several microorganisms have been tested against various postharvest fungal pathogens on fruit. However, only few biologicals are commercially available for control of fruit diseases during the postharvest phase. These include, Bio-Save® 10 LP (*Pseudomonas syringae*; Jet Harvest Solutions, USA) (Janisiewicz and Jeffers, 1997), registered in the USA by the EPA (Environmental Protection Agency) and used mostly for the control of sweet potato and potato diseases, BoniProtect® (*Aureobasidium pullulans*; Bio-Protect GmbH, Germany) for the control of apple storage diseases and Candifruit (*Candida sake* CPA-1, Sipcam Inagra S.A.) (Viñas et al., 1998), commercialized in Spain and recommended against the major postharvest diseases of pome and citrus fruit.



*Bacillus* species are widely distributed in the rhizosphere. They have high thermal tolerance, grow rapidly in liquid cultures, readily form spores and are not phytopathogenic. Their spores are resistant to physical and chemical treatments such as desiccation, heat, UV irradiation or organic solvents (Leelasuphakul et al., 2008), and some species are able to produce biofilms. Several strains of the *Bacillus* genus have been studied for their production of anti-fungal metabolites, which are potential BCAs against a wide range of fungal pathogens (Touré et al., 2004; Ongena et al., 2005; Chung et al., 2008; Arguelles-Arias et al., 2009; Torres et al., 2016). *B. subtilis* is the species most extensively used against plant diseases and 4-5 % of its genome is dedicated to antibiotics' production (Stein 2005). Some strains have been employed to develop commercial products such as Subtilex® (*B. subtilis* MBI 600; BASF), registered in the USA by the EPA and used for the control of fruit, herb and vegetable diseases, and Serenade® Max (*B. subtilis* QST 713, AgraQuest Inc., California, USA and BASF, Ludwigshafen, Germany), currently registered for the use against *B. cinerea*, *Pseudomonas* spp., *Sclerotinia* spp. *Venturia* spp. and *Monilinia* spp. in more than 20 countries in Europe, Africa, Middle East, Asia and Latin America. *B. amyloliquefaciens*, closely related to *B. subtilis*, dedicates 8.5 % of its genome to produce several bioactive compounds with high antifungal activity such as lipopeptides including surfactin (Ahimou et al., 2000; Hsieh et al., 2004) iturin (Hsieh et al., 2008; Yu et al., 2002) or fengycin (Lin et al., 1999; Ongena et al., 2007) and several polyketides such as macrolactin, bacillaene, bacilysin, bacillomycin and difficidin (Chen et al., 2009). Furthermore, other antibiotics such as plantazolicin or chlorotetaine, all of which have substantial antimicrobial and antifungal activity, are also secreted (Scholz et al., 2011; Mudgal et al., 2013; Wang et al., 2016). Recently, Taegro® (*B. amyloliquefaciens* FZB24); Novozymes (Copenhagen, Denmark) and Syngenta (Basel, Switzerland) (Lecomte et al., 2016), recommended for suppressing selected soil-borne and foliar diseases of fruits and leafy vegetables, cucurbits, and ornamentals, have been registered in the USA by the EPA.

The main objective of this study is to evaluate the potential of the *B. amyloliquefaciens* strain BUZ-14 for controlling postharvest diseases in orange, apple, grape and stone fruit. Our study has four phases: (1) to characterize the strain growth at different temperature and pH values; (2) to determine its *in vitro* antifungal activity

against several postharvest pathogens; (3) to establish the efficacy of cells, endospores and cell-free supernatants against the main postharvest pathogens in fruit models; and (4) to assess its survival rate and antifungal activity under cold storage temperatures.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Pathogens**

*Penicillium expansum* CECT 20140 and *Monilinia fructicola* ATCC 44557 were obtained from the respective culture collections. *Botrytis cinerea* VG 1, *Penicillium digitatum* VG 20, *Penicillium italicum* VG 101, and *Monilinia laxa* VG 105 were obtained from the Plant Food Research Group culture collection at Zaragoza University (Spain). All pathogens were incubated on potato dextrose agar (PDA) (Oxoid Ltd; Basingstoke, Hampshire, England) Petri dishes supplemented with 1 % acetone in the case of *M. fructicola* and *M. laxa* to induce conidia production (Pascual et al., 1990). Periodically, the strains were transferred to fresh fruit to induce infection and spore production.

### **2.2 Bacillus strain and inoculum production**

The strain BUZ-14 used in this study was obtained from the Plant Food Research Group Collection at Zaragoza University. It was isolated from the surface of peach fruit from an orchard in Zaragoza and tested for its preliminary antifungal potential against *M. fructicola* (data not shown). A partial 16s rRNA sequence from the BUZ-14 strain was conducted by the Spanish Type Culture Collection (CECT). It was identified as a member of the *B. amyloliquefaciens* species complex. Cultures were stored at 5 °C and subcultured on tryptose soy agar (TSA, Oxoid Ltd) supplemented with 0.6% yeast extract at 30 °C for 24 h when required. Criobilles (Deltalab, Barcelona, Spain) were used for long-term storage at -80 °C. To prepare the initial fresh cell suspension of BUZ-14, the 24 h-old culture on TSA was transferred to 7 mL of tryptose soy broth (TSB, Oxoid Ltd). This initial suspension was incubated for 24 h at 30 °C and adjusted to  $40 \pm 5$  % transmittance at 700 nm with a spectrophotometer, corresponding to  $2 \times 10^8$  colony forming units (CFU) per milliliter. 100  $\mu$ L of this suspension was transferred to 250 mL conical flasks containing 50 mL of 863 medium (10 g L<sup>-1</sup> peptone, 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract and 20 g L<sup>-1</sup> glucose; pH 7) (Yáñez-Mendizábal et al., 2010) to obtain the initial cultures. Cultures were always incubated on a rotary shaker at 150 rpm.

### **2.3 BUZ-14 growth temperature, pH curves and endospore production**

Three Erlenmeyer flasks containing 50 mL of 863 medium inoculated with 100  $\mu$ L of the initial suspension were disposed per time, temperature and pH on a rotary shaker at 150 rpm.

BUZ-14 strain growth ( $\log_{10}$  CFU mL<sup>-1</sup>) at 4, 10, 20, 30 and 37 °C at 150 rpm was determined by subsampling bacterial cultures every 2 h from 0 to 24 h, and at 36, 48, 72, 96 and 120 h. Besides, its growth at different pH values at 30 °C was studied (3.0, 4.0, 4.5, 5.0 and 7.0) using citric acid (Merck) to adjust the medium. In this case BUZ-14 growth was determined by subsampling bacterial cultures at 0, 10, 24, 48 and 120 h. Endospore production at 30 °C was determined from 24, 48, 72, 96 and 120 h old BUZ-14 strain cultures. Bacterial cells (vegetative cells + endospores) were separated from the supernatant (antifungal metabolites) by centrifugation for 10 min at 9000 x g at 10 °C (Beckman Coulter™). The pellet obtained was resuspended in buffered peptone water and vegetative cells were killed by heat treatment at 80 °C for 12 min. The entire experiment was repeated three times. Bacteria and endospores counting (CFU mL<sup>-1</sup>) were done by dilution and plated on TSA.

### **2.4 In vitro antifungal activity**

Cultures (vegetative cells + endospores + supernatant), endospores and cell-free supernatant from the *B. amyloliquefaciens* strain BUZ-14 were tested against *B. cinerea*, *M. fructicola*, *M. laxa*, *P. digitatum*, *P. expansum*, and *P. italicum*. An agar plug (5 mm diameter) from actively-growing margins of fungal colonies (7 day-old culture on PDA) was placed at the center of PDA dishes for each *M. fructicola* and *M. laxa*. For *B. cinerea*, *P. digitatum*, *P. expansum* and *P. italicum*, the inoculum was obtained from a 7-day old culture in potato dextrose broth (PDB) (Oxoid Ltd). The concentrations of CFU units were determined using a haemocytometer and a Leica microscope (Leica Microsystems, Germany) and the suspensions were adjusted to 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup> and inoculated at the center of PDA dishes using a sterile needle. Then, BUZ-14 strain obtained from a 24 h-old culture on 863 broth (10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) was inoculated using a sterile needle in three equidistant parts from the center of the plate (3 cm) where the fungal pathogens was previously placed. The fungal pathogens with slow growth (*M. fructicola* and *M. laxa*) were inoculated 24 h prior to the bacteria. To test the efficacy of the endospores 30  $\mu$ L

aliquots of endospore suspension from 72, 96 and 120 h-old cultures in 863 medium, adjusted to  $10^7$  endospores  $\text{mL}^{-1}$  by decimal dilution, were dispensed in 3 wells (6 mm diameter) made in the gel medium with a sterile scalpel before placing the fungal inoculum. Supernatant samples obtained by centrifugation at  $9000 \times g$  from 72, 96 and 120 h-old BUZ-14 cultures in 863 medium at  $30^\circ\text{C}$  were mixed with PDA in proportions of 1:1, 1:4 and 1:10. Each mixture was then sterilized at  $121^\circ\text{C}$  for 15 min and poured into 90 mm diameter Petri plates. After solidification, single agar plugs of *M. fructicola* and *M. laxa* 7 day-old cultures were placed on each plate, whereas *B. cinerea*, *P. digitatum*, *P. expansum* and *P. italicum* inocula from PDB liquid culture ( $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) were punctured at three equidistant places from each other and at 3 cm from the center of the plate. The control samples consisted of PDA Petri dishes with only the fungal inoculum. The PDA Petri dishes were incubated for 7 days at  $25^\circ\text{C}$  under aerobic conditions. Fungal growth inhibition was evaluated by measuring the diameter of the fungal colony and expressed as the percentage of fungal growth inhibition compared to that of the control plates. Mean values and standard errors of the mean were calculated from five PDA dishes for each pathogen and treatment.

## **2.5 Antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 strain on fruit**

### **2.5.1 Fruit**

The fruit used in this study were obtained from local packinghouses and were grown in different areas of Spain (La Almunia de Doña Godina, Tarragona, and Teruel). Fruit free of visible wounds and rot and homogeneous in size and maturity were stored at  $1^\circ\text{C}$  and used for experiments within 3 days of collection. Prior to the experiments, all fruit were surface-disinfected by immersion for 2 min in 1 % sodium hypochlorite, rinsed with tap water, and allowed to air-dry at room temperature ( $20^\circ\text{C}$ ).

### **2.5.2 Phytopathogenic fungal and bacteria inocula preparation**

The pathogenic fungal inocula consisted of aqueous conidial suspensions prepared from 7 day-old cultures of *B. cinerea*, *P. digitatum*, *P. expansum* and *P. italicum* grown on PDA at  $25^\circ\text{C}$  and 80 % RH. *M. fructicola* and *M. laxa* isolates were inoculated onto peaches or nectarines in order to obtain a high conidia production (Casals et al., 2010). Fruit were wounded with a sterilized steel rod (1 x 2 mm) and conidia and mycelium were transferred to the wound site with a sterile pipette tip. Fruit were then incubated at  $25^\circ\text{C}$

and 80 % RH for 7 days. Conidia were loop-washed from the PDA plates or from the surface of infected fruits, filtrated through four layers of sterile cheesecloth and transferred to a test tube with 9 mL of sterile distilled water with 0.01 % Tween 80. The suspensions were adjusted at  $10^5$  conidia (CFU)  $\text{mL}^{-1}$  for *B. cinerea*, *P. digitatum*, *P. expansum* and *P. italicum* and at  $10^4$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  for *Monilinia* spp. Cultures (vegetative cells + endospores + supernatant), cells (vegetative cells + endospores), at different concentrations ( $10^8, 10^7, 10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ), endospores ( $10^7$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) and cell-free supernatant undiluted and 1:10 diluted were prepared from cultures at different incubation times (24, 28, 72, 96 and 120 h). To obtain the cell suspensions, the supernatant was separated by centrifugation at  $9000 \times g$  for 10 min at  $10^\circ\text{C}$  and the pellet obtained was resuspended in buffered peptone water. Endospores and cell-free supernatants were obtained as described in sections 2.3. and 2.4, respectively. Cultures and cells were adjusted by spectrophotometry to  $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  and subsequent concentrations were obtained by dilution and verified via viable counts on TSA.

### ***2.5.3 Efficacy of cultures, endospores and cell-free supernatant curative treatments against the main postharvest pathogens***

The efficacy of cultures ( $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ), endospores ( $10^7$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ), and cell-free supernatant (undiluted and 1:10 diluted) from 72, 96 and 120 h-old cultures were determined on fruit. For this purpose, oranges (cv. Valencia) were inoculated with *P. digitatum* and *P. italicum*, apples (cv. Golden Delicious) with *P. expansum*, grapes (cv. Sultanina) with *B. cinerea* and cherries (cv. Lapins) with *M. fructicola* and *M. laxa*. Apples and oranges were inoculated by making two wounds (3 x 3 mm width and depth) on the fruit surface with a sterile micropipette tip, but only one wound was made in the case of cherries and grapes. Each wound was inoculated with 10  $\mu\text{L}$  of  $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  for *B. cinerea*, *P. digitatum*, *P. expansum* and *P. italicum* and 10  $\mu\text{L}$  of  $10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  for *M. fructicola* and *M. laxa* prior to bacterial treatment. The fruits were stored for 1 hour at room temperature to permit the absorption of the conidia suspension. After that, 10  $\mu\text{L}$  of bacterial treatment was inoculated in each wound. Fruit with only fungal inocula served as control treatments. All the samples were stored at  $20^\circ\text{C}$  and 80 % RH for 7 days. Incidence (percentage of rotted wounds) and severity were measured to compare the treatments. In the case of small fruits (grapes and cherries) the severity rating scale of infected wounds was: 0 = no symptoms; 1 = 1-25 % of the fruit infected; 2 = 25-50% of

the area infected; 3 = sporulation cover 50-75 %; 4 > 75% of the fruit infected. In addition, the lesion diameter (mm) around the wound was measured for the rest of the fruits to determine the severity. Ten fruits were used for each treatment and pathogen. The entire experiment was repeated three times.

#### **2.5.4 Efficacy of BUZ-14 curative and preventive treatments against *B. cinerea* and *Penicillium* species**

In the case of *B. cinerea* and *Penicillium* species, the effects of curative and preventive treatments using 24 h-old cultures were tested. Oranges (cv. Valencia) were inoculated with *P. digitatum* and *P. italicum*, apples (cv. Golden Delicious) with *P. expansum* and grapes (cv. Sultanina) with *B. cinerea* as previously described. For the preventive treatments, the strain BUZ-14 was first inoculated. Thus, 10  $\mu$ L from a 24 h-old culture in 863 medium ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) were transferred to each wound and fruits were placed at 20 °C and 80 % RH for 24 h. Afterwards, 10  $\mu$ L from  $10^5$  conidia mL<sup>-1</sup> suspension of the pathogen was inoculated to the fruits and stored at 20 °C and 80 % RH for 7 days. For the curative treatment, fruits were inoculated with 10  $\mu$ L of conidia suspensions ( $10^5$  conidia mL<sup>-1</sup>) 1 h prior to the bacterial treatment (10  $\mu$ L from a 24 h-culture at  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) and incubated at 20 °C and 80 % RH for 7 days. In both cases, a control treatment with only pathogen conidia (controls) was included. Incidence and severity were measured to compare the treatments as described above. Ten fruits were used for each treatment and pathogen. The entire experiment was repeated three times.

#### **2.5.5 Efficacy of different concentrations of culture, cell and cell-free supernatant treatments against *M. fructicola* and *M. laxa* on wounded stone fruit**

Cultures (vegetative cells + endospores + supernatant in 863 medium) adjusted to  $10^8$ ,  $10^7$  and  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>, cells (vegetative cells + endospores resuspended in buffered peptone water) adjusted to  $10^8$ ,  $10^7$  and  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> and cell-free supernatant treatments (undiluted and 1:10 diluted) from 24, 48 and 72 h-old culture of the *B. amyloliquefaciens* strain BUZ-14 were tested against both *Monilinia* species on stone fruit (peaches cv. Calante). Treatment with Serenade<sup>®</sup> Max at the commercial dose of 2.5 g L<sup>-1</sup> (approximately  $1.8 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>), with the fungicide Scholar at the recommended dose of 2 mL L<sup>-1</sup>, and a control treatment with only distilled water were also included. Bacterial concentrations were verified after the application by plate count on TSA.

Peaches were inoculated by making two wounds (3 x 3 mm width and depth) on the fruit surface with a sterile micropipette tip. Each wound was inoculated with 10 µL of *M. fructicola* and *M. laxa* ( $10^4$  conidia mL<sup>-1</sup>) 2 h prior to bacterial treatment. After that, 10 µL of bacterial treatments was inoculated in each wound. Fruits with only fungal inocula served as control treatments. Treated peaches were stored at 20 °C, 80 % RH for 7 days. Incidence (percentage of rotted wounds) and severity (lesion diameter (mm)) were measured to compare the treatments. Ten peaches were used for each treatment and pathogen. The entire experiment was repeated three times.

#### ***2.5.6 Survival and efficacy against brown rot of B. amyloliquefaciens in wounded fruit at cool and room temperatures***

Peaches cv. Calante inoculated with *M. fructicola* or *M. laxa* and treated with *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 were used to determine bacterial survival and efficacy against brown rot at cool and room temperatures. For the bacterial survival experiment, peaches were inoculated by making two wounds (3 x 3 mm width and depth) on the fruit surface with a sterile micropipette tip. Each wound was inoculated with 10 µL of  $10^4$  conidia mL<sup>-1</sup> of *M. fructicola* and *M. laxa* prior to bacterial treatment. The fruits were stored for 2 hours at room temperature to favour the absorption of the conidia suspension. After that, 10 µL ( $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>) obtained from a 24 h-old culture (vegetative cells + endospores + supernatant) was inoculated in each wound. Then, one batch of fruits were stored for 10 days at 1 °C followed by a shelf-life period of 3 days at 20 °C and another batch was disposed at room temperature (4 days at 20 °C). BUZ-14 counts were determined on days 0, 5 and 10 at cool temperature and daily during the shelf-life period. At room temperature the counts were conducted daily during the four days of the experiment. A plug sample (10 x 5 mm, diameter and depth) of the wound previously inoculated with bacterial inoculum was removed with a sterile scalpel. The peach plugs were placed in filter blender bags with 0.1 % sterile peptone water. The mixture was homogenized in a laboratory blender Stomacher 400 Circulator (Seward Laboratory, London, England) for 120 s at 260 rpm and the resulting suspension was diluted, plated on TSA plates and counted after 24 h at 30 °C. Three peaches (2 wounds per peach) were analyzed at each sampling point and the results were expressed as CFU *Bacillus* per wound (CFU wound<sup>-1</sup>). The entire experiment was repeated three times. The antifungal activity was studied in parallel to the BCA survival experiments. For that purpose, ten peaches for each

*Monilinia* species and storage conditions were wounded and inoculated retracing the steps described above, and stored at cool and room temperatures. The entire experiment was repeated three times.

## **2.6 Statistical analysis**

The data were statistically analyzed using an SPSS software package for Windows version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences in the mean values of parameters were tested by one-way analysis of variance and separated by Tukey's honestly significant difference test ( $P < 0.05$ ).

## **3. Results and discussion**

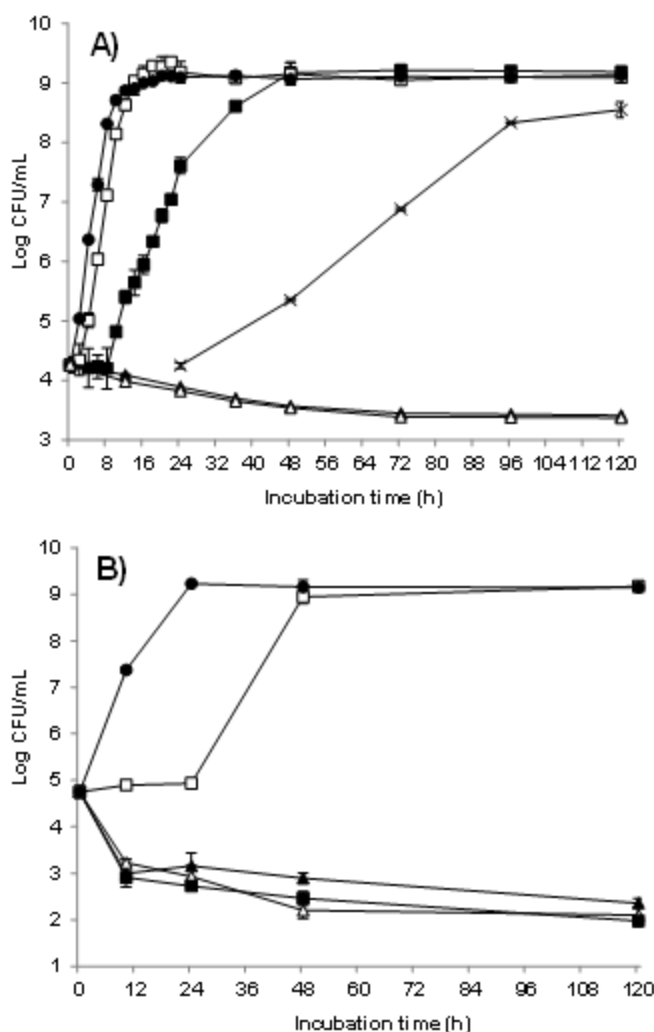
### **3.1 Characterization of *B. amyloliquefaciens* strain BUZ-14 growth**

Characterization of the growth of the *B. amyloliquefaciens* strain BUZ-14 at different temperatures and pH values is necessary to ascertain whether this strain will be able to survive in the intrinsically acidic conditions of the fruit and at the cool temperatures employed during postharvest storage, distribution and commercialization. These tests were conducted previously on laboratory media and subsequently on fruit as described in section 2.5.6.

#### **3.1.1 Growth temperature and pH curves and endospore production**

The growth temperature curve of *B. amyloliquefaciens* (Figure 1A) showed that the population increased from 4.1 to 5.0 log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup> in only 2 h at 37 °C. At this temperature, the lag phase was almost inexistent and the maximum population of 9.1 log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup> was reached after 16 h. At 20 °C the lag phase was prolonged during 8 h of incubation, after which logarithmic growth was observed to reach the stationary phase after 48 h. This means that the BUZ-14 strain at 20 °C needs around 40 hours to attain the stationary phase, keeping large differences with higher temperatures. It can also be observed that the population decreased 1-1.5 log units after 120 h of incubation at cool temperatures (4 and 10 °C).





**Figure 1.** Growth of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in 863 medium. Effect of the temperature: 4 (▲), 10 (△), 20 (■), 30 (□) and 37 (●) °C and endospore production at 30 °C (×) (A). Effect of the pH: 3.0 (▲), 4.0 (△), 4.5 (■), 5.0 (□) and 7.0 (●) (B). Each value is the mean of three separate replicates of three Erlenmeyer flasks each and vertical bars represent the standard error of the mean.

The growth curves of the *B. amyloliquefaciens* strain BUZ-14 at different pH values are shown in Figure 1B. At pH 7, used as control, the population increased from 4.8 to 9.0  $\log_{10}$  CFU mL<sup>-1</sup> in the first 24 h whereas at pH 5 the same maximum concentration was achieved after 48 h of incubation following a lag phase of 24 h. At lower pH values (4.5, 4.0 and 3.5) the counts decreased by 2 log units in just 12 h of incubation, the final counts after 120 h being about 2-2.5  $\log_{10}$  CFU mL<sup>-1</sup>. It is clear that a pH below 5 has an inhibitory effect on BUZ-14 growth, decreasing the initial populations by almost 3 log units. Although it would be expected that the concentration of BUZ-14 in acid fruits such as strawberry or oranges should be significantly reduced, its survival was observed instead. However, its growth can be assured in fruits with higher pH such as such as ripe peaches used in this study (section 3.4).

Endospore production (Figure 1A) reached 4.3 log units after 24 h and increased by more than 1 log unit per day until the fourth day of incubation, achieving 8.5 log units after 120 h of incubation. The BUZ-14 spore production ( $3.2 \times 10^8$  spores mL<sup>-1</sup>) and sporulation efficiency (33 %) on 683 culture media were in the range reported for other *Bacillus* strains, with densities from  $1.0 \times 10^5$  spores mL<sup>-1</sup> (Cayuela et al., 1993) to  $3.0 \times 10^9$  spores mL<sup>-1</sup> (Warriner and Aites, 1999) and typical efficiencies of 30-100% (Nicholson and Setlow, 1990). Industrial exploitation of spores requires high cell density bioreaction and good sporulation efficiency. For that purpose the cultivation parameters (pH, dissolved oxygen concentration, and media composition) have to be optimized. Monterio et al. (2005) for *B. subtilis* strain MB24 established an optimal pH value of 7.5, no significative influence of the dissolved oxygen concentration within the studied range (10-50% of the oxygen saturation concentration) and that as nutrient depletion is the main stimulus for sporulation, it is very important to achieve glucose depletion at the end of the exponential growth phase.

### **3.2 *In vitro* antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* strain BUZ-14**

The strain BUZ-14 was able to inhibit mycelium growth of all the tested postharvest fungal pathogens *in vitro* (Table 1). Vegetative cells (24 h-old cultures) reduced fungal growth between 39 %, for *P. italicum*, and 73 %, for *M. laxa*, in comparison with the untreated pathogen control. Endospores also showed strong antifungal activity, those obtained from 96 and 120 h-old cultures being the most effective. BUZ-14 cell-free supernatants obtained after 72, 96 and 120 h of incubation completely inhibited the growth of all tested pathogens, except for *P. digitatum* and *P. italicum*. Total inhibition of *P. digitatum* was obtained with metabolites 1:1 and 1:4 diluted obtained after 72 h, and at any concentration in the case of 96 and 120 h of incubation. The worst results were observed for *P. italicum* as total reduction was only achieved with 1:1 and 1:4 supernatant dilutions obtained from 96 and 120 h cultures.

Vegetative cells, endospores and cell-free supernatants of BUZ-14 have shown strong *in vitro* antifungal activity against *B. cinerea*, *M. fructicola*, *M. laxa*, *P. digitatum*, *P. expansum*, and *P. italicum*. The activity of cells and endospores was associated with white precipitates surrounding the bacterial colonies inwards from the zone of mycelium inhibition. Touré et al. (2004) observed these white precipitates when testing the *in vitro* activity of *B. subtilis* GA1 endospores against *B. cinerea* and suggested that they were

related with the excretion of fungitoxic compounds which precipitate in contact with the acidified medium induced by the mold growth. This hypothesis was exemplified by testing filter-sterilized crude supernatants and verifying their high antifungal activity. Several studies with different strains of *B. subtilis* suggested that antibiosis could be the principal mode of action in postharvest disease suppression and some of them have identified the presence of powerful antifungal metabolites, in special lipopeptides of surfactin, iturin and fengycin families (Touré et al., 2004; Ongena et al. 2005; Stein 2005; Chung et al., 2008; Joshi et al., 2008; Waewthomgrak et al., 2015; Torres et al., 2016). The ability to produce a wide range of antifungal compounds has also been reported for *B. amyloliquefaciens* strains (Yoshida et al., 2001; Arguelles-Arras et al., 2009; Arrebola et al., 2010; Hao et al., 2011; Ben Ayed et al., 2015; Torres et al., 2016). Chen et al. (2006) revealed the capacity of *B. amyloliquefaciens* FZB42 to produce several lipopeptides such as surfactin, bacillomycin, fengycin and bacillibactin with antifungal, antibacterial and even nematocidal activity. Subsequently, Schneider et al. (2007) detected that this strain was also able to produce some polyketides with high antifungal activity such as difficidin and bacylisin. The *in vitro* antifungal activity of BUZ-14 cell-free supernatants, that equal or better that of cells and endospores, supported the role of these antifungal compounds in the biocontrol activity of the strain. However, there are some bacteria that produce great amounts of antibiotics *in vitro*, but cannot always do so in fruit (Droby et al. 1992, Bull et al., 1997; Touré et al. 2004; Kim et al., 2007; Lai et al., 2012). Consequently, *in vitro* assays should be followed by *in vivo* assays to check that the mechanism of action does not change.

### ***3.3 In vivo assays of B. amyloliquefaciens strain BUZ-14 to control postharvest incidence and severity of representative postharvest diseases***

#### ***3.3.1 Efficacy of cells, endospores and cell-free supernatant curative treatments against postharvest pathogen molds***

The efficacy of cultures, endospores and cell-free supernatant treatments at 72, 96 and 120 h of incubation against postharvest pathogenic fungi is shown in Figure 2. *B. amyloliquefaciens* treatments did not significantly reduce the incidence (% of rotted wounds) or severity (lesion diameter) of the diseases caused by *Penicillium* species, neither by *P. digitatum* or *P. italicum* in oranges neither by *P. expansum* in apples. Nevertheless, *P. expansum* decreased its growth from 23 mm to 17 mm with undiluted

cell-free supernatant obtained after 120 h of incubation. Similar results were obtained against gray mold on grapes in terms of incidence, although the severity reduction was higher. The best reduction was provided by undiluted cell-free supernatants, since the severity decreased from 2.5 (untreated samples) to 1.2. These data show that BUZ-14 treatments were not effective in controlling previous *Penicillia* and *Botrytis* fruit infections. Our results are consistent with those found by Yáñez-Mendizábal et al. (2011) that testing the activity of *B. subtilis* CPA-8 against *P. digitatum* and *P. italicum* found minimal or no efficient control of green and blue mold decay on orange, despite the good results achieved in the *in vitro* assays.

In this study the inoculation of the pathogens was prior to that of the BCA. It seems that in the case of *Bacillus* species the preventive application of the BCA is crucial to achieving a good control of *Penicillia* and *Botrytis* infections. Leelasuphakul et al. (2008) with *B. subtilis* 155 endospores applied prior to *P. digitatum* spores in citrus fruit obtained better results in terms of decay incidence and severity than when the two microorganisms were inoculated together. Hang et al. (2005) detected that a pre-application of *Bacillus subtilis* S1-0210 before *B. cinerea* inoculation was more effective in controlling gray mold in strawberry than a post-application, concluding that the pre-colonization of antagonistic agents on host plants can be a critical factor in protecting the host from infection of fungal pathogens. Lai et al. (2012) also detected that the control of postharvest green mold on citrus fruit improved when the period between the treatment with *Paenibacillus polymyxa* strain SG-6 and the inoculation with the fungal pathogen was increased. In view of these results, the effect of preventive treatments with BUZ-14 cultures,  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> applied 24 h prior to *Penicillium* species and *B. cinerea*, was investigated (section 3.3.2). *M. fructicola* and *M. laxa* were the most susceptible species as the incidence obtained with undiluted cell-free supernatant at any incubation times and 72 and 96 h-old cultures treatments was reduced to 0 % in comparison with 100 % for the untreated sample. For endospores, the best result was achieved with those collected after 96 h of incubation as *M. fructicola* growth was totally inhibited and the incidence and severity of *M. laxa* was reduced to 10 % and 1.2, respectively.

**Table 1.** Antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* strain BUZ14 on PDA plates against several postharvest mold pathogens.

Treatment	Percentage of inhibition <sup>a</sup> against:					
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Monilinia fructicola</i>	<i>Monilinia laxa</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Penicillium italicum</i>
Veg. cells <sup>b</sup> 24 h	52.0 ± 10.9ab,AB <sup>e</sup>	66.6 ± 0.7a,AB	73.1 ± 4.2a,B	54.5 ± 2.5a,AB	56.8 ± 6.3a,AB	39.3 ± 7.5a,A
End <sup>c</sup> 72 h	65.4 ± 7.2b,A	66.4 ± 2.2a,AB	81.5 ± 2.1b,C	76.5 ± 1.8bcd,BC	59.5 ± 1.3a,A	36.3 ± 1.2a,D
End 96 h	97.0 ± 2.4c,A	60.0 ± 3.9b,B	89.6 ± 1.2c,AC	81.9 ± 0.7d,CD	79.2 ± 2.0b,D	68.5 ± 1.2bc,B
End 120 h	92.1 ± 4.7c,A	57.0 ± 1.2b,BC	88.2 ± 0.9c,AD	80.9 ± 4.4cd,D	51.6 ± 1.7a,B	63.8 ± 2.8b,C
CF Sup <sup>d</sup> 1:1 24 h	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0d,A	77.4 ± 6.6bcd,B	32.11 ± 0.82c,C	84.8 ± 7.6de,D
CF Sup 1:4 24 h	62.0 ± 6.1ab,A	80.9 ± 1.7d,B	100.0 ± 0.0d,C	73.2 ± 7.7bc,B	8.65 ± 0.78d,D	79.7 ± 10.2cd,B
CF Sup 1:10 24 h	50.3 ± 6.1a,A	76.0 ± 2.5e,B	45.5 ± 6.7e,A	70.9 ± 8.4b,B	1.29 ± 0.46d,C	2.8 ± 2.4f,C
CF Sup 1:1 72 h	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0d,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0e,A	96.6 ± 0.8eg,B
CF Sup 1:4 72 h	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0d,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0e,A	88.4 ± 1.9de,B
CF Sup 1:10 72 h	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0d,A	92.4 ± 0.8e,B	100.0 ± 0.0e,A	84.3 ± 1.4de,C
CF Sup 1:1 96 h	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0d,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0g,A
CF Sup 1:4 96 h	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0d,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0g,A
CF Sup 1:10 96 h	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0d,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0e,A	81.7 ± 0.8de,B
CF Sup 1:1 120 h	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0d,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0g,A
CF Sup 1:4 120 h	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0d,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0g,A
CF Sup 1:10 120 h	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0c,A	100.0 ± 0.0d,A	100.0 ± 0.0e,A	100.0 ± 0.0e,A	92.6 ± 1.6eg,B

<sup>a</sup> Data are expressed as percentage of fungal growth inhibition compared with control plates without bacteria or supernatant and represent mean values of five plates (replicates) ± standard errors.

<sup>b</sup> Cells at 10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup> Endospores at 10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup>.

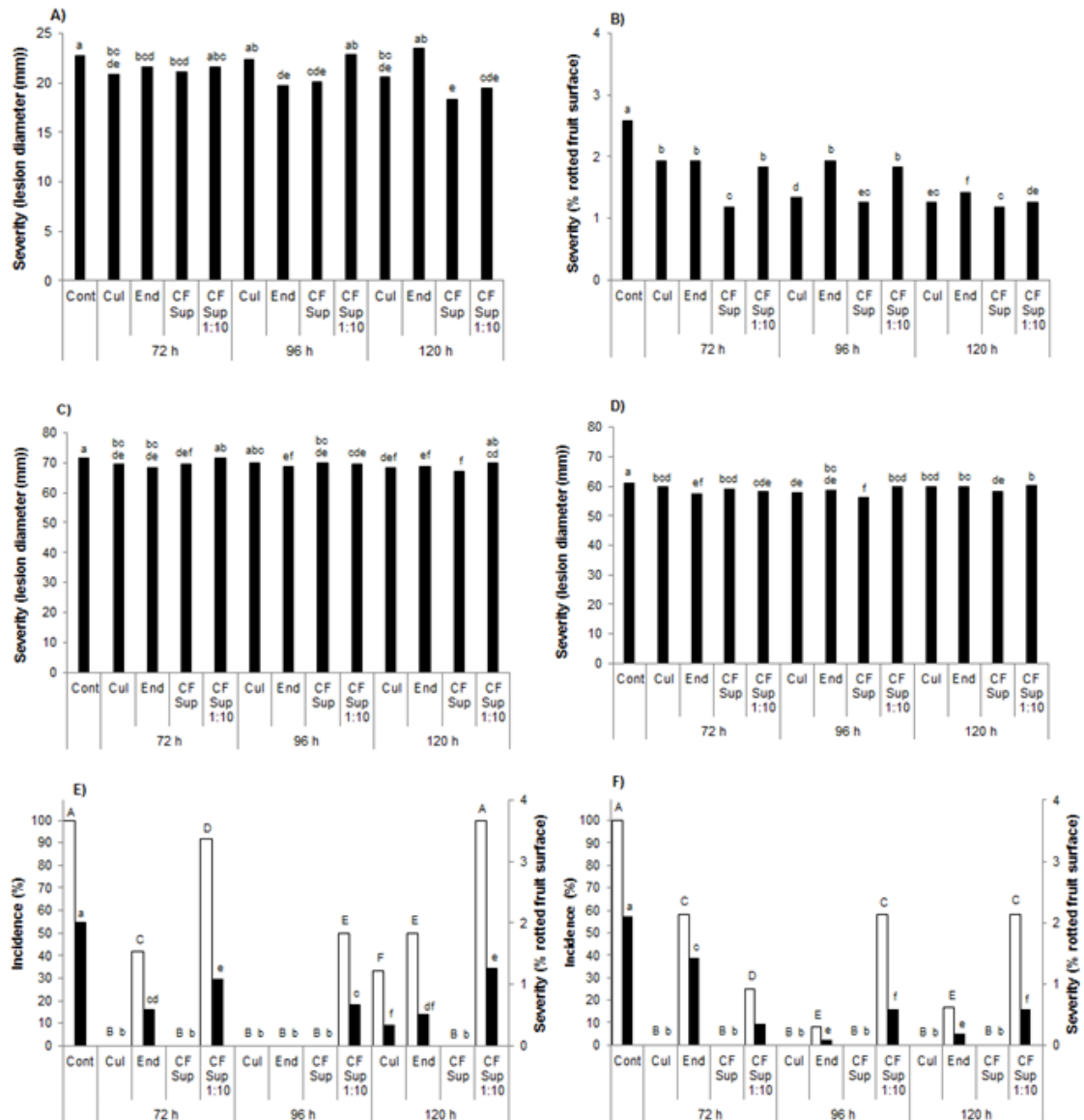
<sup>d</sup> Cell-free supernatant.

<sup>e</sup> Values in the same column followed by different lower-case letters show significant differences between treatments for the same fungal pathogen ( $P < 0.05$ ). Values in the same line followed by different capital letters show significant differences between fungal pathogens for the same treatment ( $P < 0.05$ ).

These results confirm the potential of cultures, endospores and cell-free supernatants of BUZ-14 to control decay by *M. fructicola* and *M. laxa* already reported in previous studies for other *Bacillus* strains (Pusey and Wilson, 1984; Altindag et al., 2006; Yañez-Mendizabal et al., 2010; Liu et al., 2011; Rungjindamai et al., 2013; Gao et al., 2016). The high efficacy against brown rot of BUZ-14 endospores is very interesting as they are more stable than vegetative cells maintaining their viability for years and far more resistant to drying processes for powder formulations (Brannen and Kenney, 1997), all of them being crucial aspects to develop a commercial formulation. In addition, the cell free supernatant, composed by bioactive compounds, such as lipopeptides and polyketides, with low toxicity, high biodegradability and environmentally friendly characteristics, show great potential for future applications, being an effective alternative to the chemical pesticides usually applied to control brown rot. In section 3.3.3. the relationship between the number of cells and the protection level is elucidated and compared to those of BUZ-14 cell-free supernatants, fungicide Scholar® and Serenade® Max.

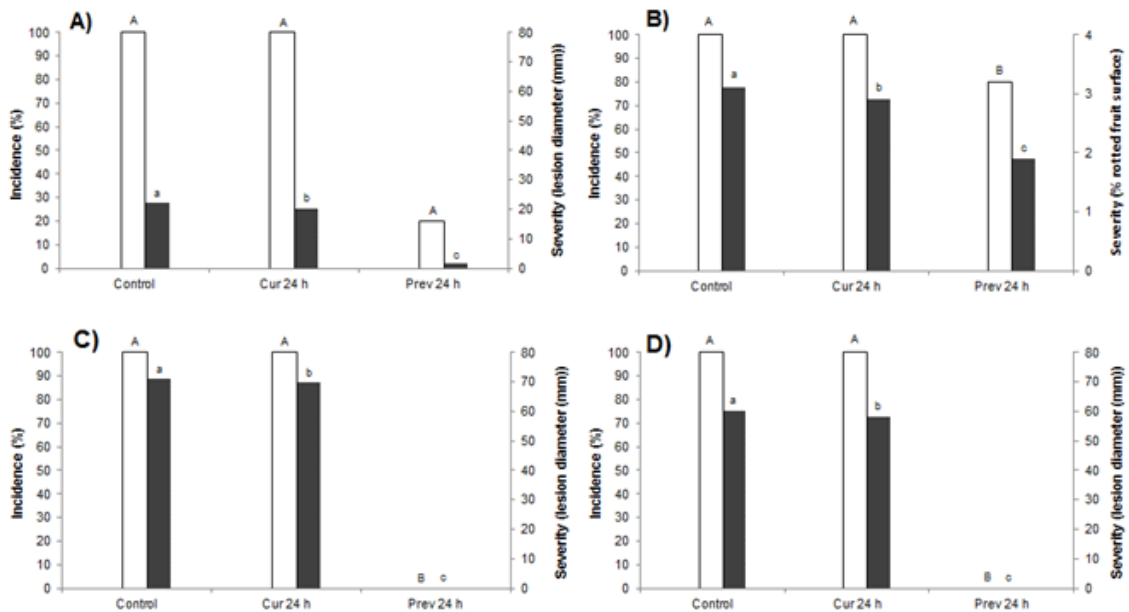
### **3.3.2 Efficacy of curative and preventive treatments against *B. cinerea* and *Penicillium* species**

The results of preventive and curative treatments from 24 h-old cultures against *B. cinerea* and *Penicillium* species are shown in Figure 3. Preventive inoculation avoided *P. digitatum* and *P. italicum* growth in oranges and reduced *P. expansum* incidence in apples from 100 % to 20 %. For *B. cinerea*, only a 20 % of incidence reduction was observed, although the severity decreased by 40 %. Curative treatments using 24 h-old cultures had no effect on the incidence and slightly reduced the severity, showing similar results to those obtained with 72, 96 and 120 h-old cultures, except in the gray mold severity that was greater (Figure 2). These data confirmed that BUZ-14 cultures have a limited curative effect on *P. expansum*, *P. digitatum* and *P. italicum* infections and, as has been discussed in the previous section, preventive inoculation of the BCA is crucial to achieve a good disease control. For these species, the bacterial tissue colonization and a certain level of antifungal compounds production that protect the fruit against the pathogen infection could be necessary (Arrebola et al., 2010, Hang et al., 2005).



**Figure 2.** Effect of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 curative treatments from 72, 96 and 120 h-old cultures against fruit postharvest rots caused by several mold pathogens. Incidence as % of rotted wounds (□) and severity as lesion diameter (mm) for apples and oranges and % of the single fruit rotted referred to 0-to-4 scale for grapes and cherries (■). Golden delicious apples infected with *P. expansum* (A); Sultanina seedless grapes infected with *B. cinerea* (B); Valencia oranges infected with *P. digitatum* (C) and *P. italicum* (D); Lapins cherries infected with *M. fructicola* (E) and *M. laxa* (F). Fruit were stored at 20 °C for 7 d. Cont: untreated pathogen control; Cul: vegetative cells + endospores + supernatant ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>); End: endospores at  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>; CF Sup.: cell-free supernatant undiluted and 1:10 diluted. Each value is the mean of three replicates of ten fruits each, 30 fruits per treatment. For each pathogen, different letters above the columns (capital letters for rot incidences and lower-case letters for lesion severities) indicate statistical difference at  $P < 0.05$ . Incidence columns for A, B, C and D are omitted since their values are similar (about 100%) without statistical differences.

However, Arrebola et al. (2010) demonstrated that the effectiveness of the treatments with the antagonist *B. amyloliquefaciens* PPCB004 applied 1 day after or 1 day before pathogen application depends on the pathogen tested. For example, to control *Alternaria citri* or *Penicillium crustosum* the antagonist treatment 1 day before showed promise; however, for *Colletotrichum gloeosporioides* the antagonist application 1 day after was more effective so the efficacy of curative and preventive treatments should be determined for each antagonism and pathogen. Hao et al. (2011) and Hong et al. (2014) obtained good control of citrus green and blue mold and sour rot inoculating the pathogens almost immediately after the BCA (*B. amyloliquefaciens* HF-01) and three hours later, respectively. So, another aspect to study is the determination of the optimal interval of time between the BCA and the pathogen inoculation (also in reverse order of inoculation) to obtain the maximum postharvest disease control.

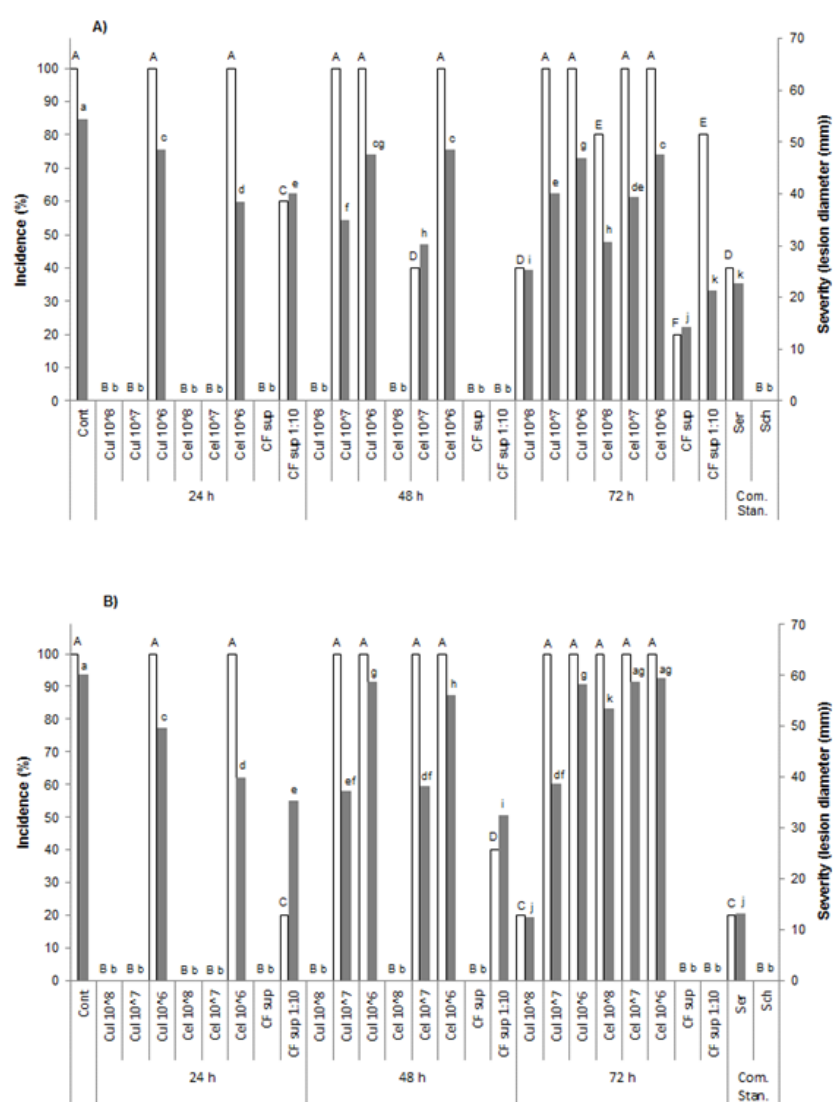


**Figure 3.** Curative and preventive effect of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 treatments from 24 h-old cultures on fruit. Golden delicious apples infected with *P. expansum* (A); Sultanina seedless grapes infected with *B. cinerea* (B) and Valencia oranges infected with *P. digitatum* (C) and *P. italicum* (D). Incidence as % of rotted wounds (□) and severity as lesion diameter (mm) for apples and oranges and % of the single fruit rotted referred to 0-to-4 scale for grapes (■). Fruit were stored at 20 °C for 7 d. Control: untreated pathogen control; Cur 24 h: 24 h-old culture (vegetative cells + endospores + supernatant ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>)) inoculated 1 h after pathogen infection; Prev 24 h: 24 h-old culture inoculated 1 day prior to pathogen infection. Each value is the mean of three replicates of ten fruits each, 30 fruits per treatment. For each pathogen, different letters above the columns (capital letters for rot incidences and lower-case letters for lesion severities) indicate statistical difference at  $P < 0.05$ .



### 3.3.3 Efficacy of different concentrations of culture, cell and cell-free supernatant treatments against *M. fructicola* and *M. laxa* on wounded stone fruit

Since our previous data show that *M. fructicola* and *M. laxa* are most susceptible to BUZ-14 applications, these fungi were chosen for subsequent bioassays in Calante peaches. The activity of 24, 48 and 72 h-old cultures were tested in this assay to shorten incubation times, which are always preferred when obtaining BCAs. The results of the culture, cells and cell-free supernatant treatments are shown in Figure 4.



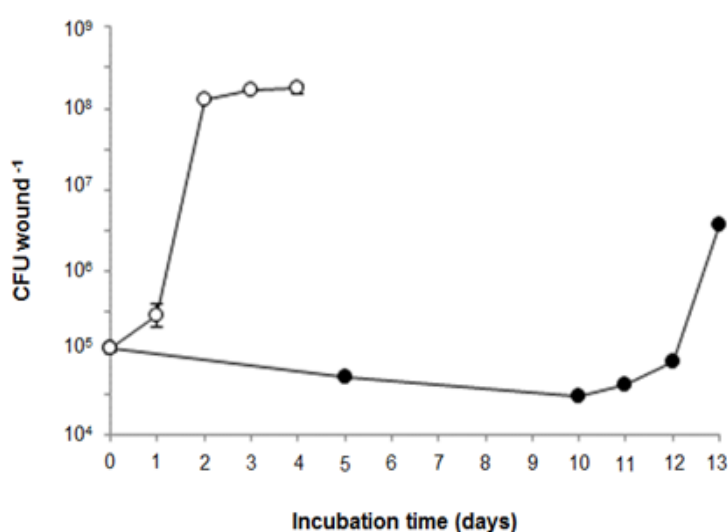
**Figure 4.** Efficacy of several concentrations of culture, cell and cell-free supernatant curative treatments of *B. amyliquesfaciens* BUZ-14 from 24, 48 and 72 h-old cultures against *Monilinia* species in Calante peaches. Incidence (% of rotted wounds): □ and severity (lesion diameter (mm)): ■. *M. fructicola* (A) and *M. laxa* (B). Peaches were stored at 20 °C for 7 d. Cont: untreated pathogen control (10<sup>4</sup> conidia mL<sup>-1</sup>); Cul: vegetative cells + endospores + supernatant at 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup> and 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>; Cel: Cell suspensions at 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup> and 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>; CF sup: Cell-free supernatant; CF sup 1:10: CF sup 1:10 diluted; Com. Stand.: Commercial standards (Ser: *M. fructicola*; Sch: *M. laxa*).

Serenade® Max ( $1.8 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>), Scho: Scholar® (2 mL L<sup>-1</sup>). Each value is the mean of three replicates of ten fruits each, 30 fruits per treatment. For each pathogen, different letters above the columns (capital letters for rot incidences and lower-case letters for lesion diameters) indicate statistical difference at  $P < 0.05$ .

Cultures and cells at  $10^8$  and  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> and cell free supernatant obtained from 24 h-old cultures reduced the incidence of brown rot to 0 %, compared to 100 % in the untreated control. However,  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> treatments were ineffective since the disease incidence was similar to that of untreated samples although the lesion diameter was reduced. A notable decrease of efficacy was detected with treatments obtained from 48 h-old cultures since only cultures and cells at  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> and undiluted cell free supernatant reduced disease incidence to 0% for both species. Cultures and cells obtained from a 72 h-culture were also unable to control the disease and only the cell free supernatant obtained a total inhibition of *M. laxa* growth. The BUZ-14 treatments were compared with two commercial standards, Serenade® Max, a biocontrol product formulated with *Bacillus subtilis* QST-713, and Scholar®, a postharvest treatment based on fludioxonil. No evidence of disease was detected with Scholar®. Serenade® Max ( $1.7 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>) significantly reduced the incidence and severity compared to untreated control samples but did not fully control the disease.

For both species the experimental data show that concentrations of  $10^8$  and  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> of cultures and cells obtained after 24 h of incubation of the BCA provided a total control of brown rot in peaches. Data reported by Zhang and Dou (2002), Touré et al. (2004) and Yáñez-Mendizábal et al. (2010) using *B. subtilis* to green mold, brown rot and gray mold control indicated that  $>10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> was the appropriate concentration for bacterial treatments. An evident decrease in efficacy was detected with the reduction of the number of cells in the treatment and with the increasing of previous incubation times of the BUZ-14 cultures. Touré et al. (2004) suggested that antibiosis could play a major role in the inhibition of the disease since the protection level by the bacterium increased proportionally with the number of bacterial cells used for treatment although competition for nutrients cannot obviously be ruled out. Treatment of fruits with BUZ-14 cell free supernatants also provided a strong protective effect against brown rot that was similar to, or higher than the one observed with live cells. This indicated the important role of the antifungal compounds in the biocontrol activity of BUZ-14. However, the maximum inhibition of supernatants (that is, no evidence of disease detected with

undiluted and 1:10 diluted treatments) was obtained with extracts from different times of incubation, 48 h-old cultures for *M. fructicola* and 72 h-old cultures for *M. laxa*. This could be due to the different amounts and types of antifungal compounds in the supernatant and the different susceptibility of each species. Although several authors have revealed the major role of fengycin-like lipopeptides in the biological control of *Bacillus* species against fungal pathogens (Ongena et al., 2005; Romero et al., 2006; Hu et al., 2007; Alvarez et al., 2012) including *M. fructicola* (Lui et al., 2011; Yáñez-Mendizábal et al., 2012), the activity of other lipopeptides such as iturins (Yu et al., 2002; Arrebola et al., 2010) or other antimicrobial compounds such as plantazolicin (Scholz et al., 2010) or chlorotetaine (Wang et al., 2016) and the presence of synergistic effects (Maget-Dana et al., 1992; Lui et al., 2011; Tao et al., 2011) could not be ruled out. Thus, the characterization of the bioactive compounds produced by BUZ-14 in terms of identity, antifungal activity using non-producing mutants, total and individual amounts, relative proportions and progressive accumulation both in culture media and in fruit are key aspects to understand the mechanism of action of this BCA against both fungal pathogens.



**Figure 5.** *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 growth in wounded *Calante* peaches during cold storage and at ambient temperature. 10 days at 1 °C followed by a shelf life period of 3 days at 20 °C (●) and 4 days at 20 °C (○). Each value is the mean of three replicates (3 fruits with 2 wounds per peach per replicate) and vertical bars correspond to standard deviation.

### **3.4 B. amyloliquefaciens survival and efficacy against brown rot on wounded stone fruit stored at room and cool temperatures**

Our experimental data show that BUZ-14 was more effective than Serenade® Max in reducing brown rot caused by *M. laxa* and *M. fructicola* in peaches, providing opportunities for the use of a new *Bacillus* strain to develop commercial formulations. However, given that fruits are usually stored and distributed at cool temperatures (1-10 °C), the BCA strain must be able to grow in this temperature range or at least not decrease during the postharvest storage period. Thus, it is important to establish the survival and antifungal activity of BUZ-14 in fruit stored at cool temperatures. These data were compared with those obtained at room temperature (Figure 5).

Bacterial populations of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 on wound inoculated peaches (pH 5.1) at 20 °C was characterized by a 24 h lag-phase followed by a constant increase of cell population from  $3.2 \times 10^5$  CFU wound<sup>-1</sup> to values up to  $10^8$  CFU wound<sup>-1</sup> from the 48 h and onwards (Figure 5) indicating a good bacterial survival and growth. BUZ-14 bacterial concentration after 10 days of storage at 1 °C and 80 % RH decreased from  $1.3 \times 10^5$  to  $2.5 \times 10^4$  CFU wound<sup>-1</sup>. When the fruits were transferred to room temperature conditions (20 °C) in order to simulate a period of commercialization, the populations recovered after 48 h reached  $4 \times 10^6$  CFU wound<sup>-1</sup> in 72 h (Figure 5). Compared with the initial concentration ( $10^5$  CFU wound<sup>-1</sup>), the bacterial population only decreased by 0.7 log units after 10 days at cool temperature. These data coincide with those obtained previously in 863 medium at 4 °C, where bacterial growth decreased by around 0.8 log units. No symptoms of decay were detected in any of the inoculated and treated peaches so we can be sure that BUZ-14 survived and colonized the injured fruit tissue and maintained its antifungal activity even after a cool storage period of 10 days.

## **4. Conclusions**

The results obtained in this study have demonstrated that *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 is a promising BCA for major postharvest fruit diseases. Its relevance in curative treatments against *M. fructicola* and *M. laxa* and preventive treatments against *P. expansum*, *P. digitatum* and *P. italicum* should be highlighted. In addition, the BUZ-14 strain survives at cool temperatures, as low as 1 °C, which make it suitable for postharvest application. Its mode of action, antibiotics' production and activity, and biotechnological

issues of production and formulation are the subjects of ongoing research.

## Acknowledgements

This work was supported by the European Project Life +12 ENV/ES/000902 “ZERO RESIDUES”, the Department of Industry and Innovation of the Aragón Government and the European Social Fund: Project 229402/1 (Plant Food Research Group). H. Calvo is the beneficiary of a predoctoral grant from the Aragón Regional Government (Spain).

## References

- Ahimou, F., Jacques, P., Deleu, M., 2000. Surfactin iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 749-754.
- Altindag, M., Sahin, M., Esitken, A., Ercisli, S., Guleryuz, M., Donmez, M.F., Sahin, F., 2006. Biological control of brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacihaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* application under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Biol. Control* 38, 369-372.
- Álvarez, F., Castro, M., Principe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofre, E., 2012. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 112, 159-174.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P., 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Fact.* 8:63.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., Korsten, L., 2010. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Prot.* 29, 369-377.
- Ben Ayed, H., Maalej, H., Hmidet, N., Nasri, M., 2015. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3, 255-261.
- Brannen, P.M., Kenney, D.S., 1997. ‘Kodiak®’ - A successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 169-171.
- Bull, C.T., Stack, J.P., Smilanick, J.L., 1997. *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biol. Control* 8, 81-88.
- Casals, C., Vinas, I., Landl, A., Picouet, P., Torres, R., Usall, J., 2010. Application of radio frequency heating to control brown rot on peaches and nectarines. *Postharvest Biol. Technol.* 58, 218-224.
- Cayuela, C., Kai, K., Park, Y.S., Iijima, S., Kobayashi, T., 1993. Insecticide production by recombinant *Bacillus subtilis*-1a96 in fed-batch culture with control of glucose-concentration. *J. Ferment. Bioeng.* 75, 383-386.
- Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, L., Morgenstem, B., Voss, B., Hess, W.R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P.-J., Vater, J., Süssmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A.,

- Gottschalk, G., Borriss, R., 2006. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat. Biotechnol.* 25, 1007-1014.
- Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Borriss, R., 2009. More than anticipated production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Mol. Microb. Biotech.* 16, 14-24.
- Chen, F., Liu, X., Schnabel, G., 2013. Field strains of *Monilinia fructicola* resistant to both MBC and DMI fungicides isolated from stone fruit orchards in the eastern United States. *Plant Dis.* 97, 1063-1068.
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.D., Roberts, D.P., 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 115-123.
- Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. Official Journal of the European Communities. N° L230/1 published 19.8.91.
- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., 2013. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biol. Control* 65, 312-321.
- Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. Official Journal of the European Communities. N° L309/71 published 24.11.2009.
- Droby, S., 2006. Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *Acta Hortic.* 709, 45-51.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L., Wisniewski, M. E., 1992. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica* 20, 149-153.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., 2004. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In: Naqvi, S.A.M.H. (Ed.), *Diseases of Fruit and Vegetables*, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 511-535.
- Gao, H.Y., Xu, X.X., Dai, Y.W., He, H.X., 2016. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* CF-3, a bacterium from fermented bean curd for controlling postharvest diseases of peach fruit. *Food Sci. Technol. Res.* 22, 377-385.
- Hang, N., Oh, S., Kim, G., Hur, J., Koh, Y., 2005. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Plant Pathol. J.* 21, 59-63.
- Hao, W., Li, H., Meiyang H., Liu Y., Muhammad, R., 2011. Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin. *Postharvest Biol. Technol.* 59, 316-323.
- Hong, P., Hao, W.N., Luo, J.J., Chen, S.H., Hu, M.Y., Zhong, G.H., 2014. Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 88, 96-102.
- Hsieh, F.C., Li, M.C., Lin, T.C., Kao, S.S., 2004. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Curr. Microbiol.* 49, 186-191.
- Hsieh, F.C., Lin, T.C., Meng, M., Kao, S.S., 2008.

- Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr. Microbiol.* 56, 1-5.
- Hu, L.B., Shi, Z.Q., Zhang, T., Yang, Z.M., 2007. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. *FEMS Microbiol. Lett.* 272, 91-98.
- Ismail, M., Zhang, J., 2004. Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks Pest Manage.* 15, 29-35.
- Janisiewicz, W., Korsten, L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 411-441.
- Janisiewicz, W.J., Jeffers, S.N., 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Prot.* 16, 629-633.
- Jiang, C., Wu, F., Yu, Z., Xie, P., Ke, H., Li, H., Yu, Y., Guo, J., 2015. Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Microbiol. Res.* 170, 95-104.
- Joshi, S., Bharucha, C., Desai, A.J., 2008. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technol.* 99, 4603-4608.
- Kim, S.Y., Kim, J.Y., Kim, S.H., Bae, H.J., Yi, H., Yoon, S.H., Koo, B.S., Kwon, M., Cho, J.Y., Lee, C.E., Hong, S., 2007. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. *FEBS Lett.* 581, 865-871.
- Kinay, P., Mansour, M.F., Gabler, F.M., Margosan, D.A., Smilanick, J.L., 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Prot.* 26, 647-656.
- Korsten, L., 2006. Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce. *Int. J. Postharvest Technol. Innov.* 1, 48.
- Lai, K.P., Chen, S.H., Hu, M.Y., Hu, Q.B., Geng, P., Weng, Q.F., Jia, J.W., 2012. Control of postharvest green mold of citrus fruit by application of endophytic *Paenibacillus polymyxa* strain SG-6. *Postharvest Biol. Technol.* 69, 40-48.
- Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Robert, F., Steinberg, C., 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review. *Biol. Control* 101, 17-30.
- 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 Biol. Technol.* 48, 113-121.
- Lin, T.P., Chen, C.L., Chang, L.K., Tschen, J.S.M., Liu, S.T., 1999. Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, fenC, from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 5060-5067.
- Liu, J., Zhou, T., He, D., Li, X.Z., Wu, H.J., Liu, W.Z., Gao, X.W., 2011. Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20, 43-52.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M., 1992. Surfactin iturin-A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin-A. *Biochimie.* 74, 1047-1051.
- Monteiro, S.M., Clemente, J.J., Henriques, A.O., Gomes, R.J., Carrondo, M.J., Cunha, A.E., 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Progr.* 21, 1026-1031.
- Mudgal, S., De Toni, A., Tostivint, C., Hokkanen, H., Chandler, D., 2013. Scientific support,

literature review and data collection and analysis for risk assessment on microbial organisms used as active substance in plant protection products – Lot 1 Environmental Risk characterization. EFSA supporting publications 2013:EN-518. [149 pp.].

Nicholson, W. L., Setlow, P., 1990. Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood CR, Cutting SM (Eds), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 391-450.

Ongena, M., Jacques, P., Toure, Y., Destain, J., Jabrane, A., Thonart, P., 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 29-38.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpingny, J.L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* 194 as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9, 1084– 1090.

Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., 2014. Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces*. *Postharvest Biol. Technol.* 96, 64-68.

Panebianco, A., Castello, I., Cirvilleri, G., Perrone, G., Epifani, F., Ferrara, M., Polizzi, G., Walters, D.R., Vitale, A., 2015. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Prot.* 77, 65-71.

Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G., 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing postharvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* 47, 85-92.

Pascual, S., De Cal, A., Melgarejo, P., 1990. Induction of conidia production by *Monilinia laxa* on agar media by acetone. *Phytopathol.* 80, 494–

496

Pusey, P.L., Wilson, C.L., 1984. Postharvest biological-control of stone fruit brown rot by *Bacillus-subtilis*. *Plant Dis.* 68, 753-756.

Romero, D., Pérez-García, A., Veening, J.W., de Vicente, A., Kuipers, O.P., 2006. Transformation of undomesticated strains of *Bacillus subtilis* by protoplast electroporation. *J. Microbiol. Methods* 66, 556-559.

Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R., Dufour, S., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F., Kuipers, O., Paquot, M., Pérez-García, A., 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microbe In.* 20, 430-440.

Rungjindamai, N., Xu, X-M., Jeffries, P., 2013. Identification and characterisation of new microbial antagonists for biocontrol of *Monilinia laxa*, the causal agent of brown rot on stone fruit. *Agronomy* 3, 685-703.

Schneider, K., Chen, X., Vater, J., Franke, P., Nicholson, G., Borriss, R., Süßmuth, R. D., 2007. Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Nat. Prod.* 70, 1417-1423.

Scholz, R., Molohon, K.J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A.L., Süßmuth, R.D., Mitchell, D.A., Borriss, R., 2011. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 193, 215-224.

Singh, D., Sharma, R.R., 2007. Postharvest diseases of fruits and vegetables and their management. In: Prasad, D. (Ed.), *Sustainable Pest Management*. Data Publishing House, New Delhi, India.

Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56, 845-857.



- Tao, Y., Bie, X. M., Lv, F. X., Zhao, H. Z., Lu, Z. X., 2011. Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. *J. Microbiol.* 49, 146–150.
- Torres, M.J., Brandan, C.P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C., 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiol. Res.* 182, 31-39.
- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1151-1160.
- United States National Research Council, Board Agric., 1987. Regulating pesticides in food—The delaney paradox. *Nat. Acad. Press*, Washington DC, 272 pp.
- United States National Research Council, Board Agric., 1993. Pesticides in the diets of infants and children. *Nat. Acad. Press*, Washington DC, 408 pp.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V., 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 9-16.
- Vitale, A., Panebianco, A., Polizzi, G., 2016. Baseline sensitivity and efficacy of fluopyram against *Botrytis cinerea* from table grapes in Italy. *Ann. Appl. Biol.* 169, doi: 10.1111/aab.12277.
- Waewthongrak, W., Pisuchpen, S., Leelasuphakul, W., 2015. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 99, 44–49.
- Wang, T., Wu, M.B., Chen, Z.J., Lin, J.P., Yang, L.R., 2016. Separation, determination and antifungal activity test of the products from a new *Bacillus amyloliquefaciens*. *Nat. Prod. Res.* 30, 1215-1218.
- Warriner, K., Waites, W.M., 1999. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose: ribose. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 97-102.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M. (Eds.), 1994. Biological control of postharvest diseases: Theory and practice. CRC Press, Boca Raton, FL, 182 pp.
- Yáñez-Mendizábal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Solsona, S., Teixidó, N., 2010. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. *Biol. Control* 21, 409-426.
- Yáñez-Mendizábal, V., Zerouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., Pérez-García, A., Teixido, N., 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *Eur. J. Plant. Pathol.* 132, 609-619.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., Shirata, A., 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91, 181-187.
- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., Bertagnolli, B.L., 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34, 955-963.
- Zhang, J., Dou, H., 2002. Evaluation of *Bacillus subtilis* as potential biocontrol agent for postharvest green mold control on 'Valencia' Orange. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society.* 115, 60-64.
- Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C., Gu, Y., 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and

identification of its antifungal components.  
Bioresour. Technol. 101,292–297.

Zhu, S.J., 2006. Non-chemical approaches to decay control in postharvest fruit. In: Noureddine, B., Norio, S. (Eds.), *Advances in Postharvest Technologies for Horticultural Crops*. Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 297.

## Capítulo 2. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots

**Adaptado de:** Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D. and Venturini, M.E. 2019. *The role of iturin A from B. amyloliquefaciens BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots.* Food Microbiology, 82: 62-69. doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.010

Food Microbiology 82 (2019) 62–69



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fm](http://www.elsevier.com/locate/fm)



The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots



H. Calvo, I. Mendiara, E. Arias, D. Blanco, M.E. Venturini\*

*Plant Food Research Group, Instituto Agroalimentario de Aragón – IIA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), Miguel Servet, 177, 50013, Spain*

### **Highlights**

- Lipopeptides of BUZ-14 are the main metabolites for controlling postharvest rots
- Iturin A is the key lipopeptide responsible for direct antibiosis
- Only 17 and 34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  is necessary to suppress brown and blue rots, respectively
- BUZ-14 is able to grow and produce significant iturin A in peaches
- First report quantifying the production of iturin A in fruit

**ABSTRACT**

The aim of this work was to elucidate the role of the secondary metabolites produced by *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 against *B. cinerea*, *M. fructicola*, *M. laxa*, *P. digitatum*, *P. italicum* and *P. expansum* both *in vitro* and *in planta*. The entire cell free supernatant (CFS) and the lipopeptide fraction (LPF) showed similar antifungal activities, completely inhibiting all the fungi at dilutions of 1:24 or even lower, whereas the non-butanolic fraction (NBF) barely inhibited the fungi. However, when the LPF and CFS were applied on fruit, only brown rot in peaches and blue rot in apples was totally inhibited. The main families of metabolites in the LPF were iturin A, fengycin and surfactin with maximum concentrations of 407, 853 and 658  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Subsequently, a TLC-bioautography revealed iturin A as the key metabolite in the inhibitions and allowed us to establish *in vivo* MICs of 16.9 and 33.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *Monilinia* species and *P. expansum*, respectively. The application of 24 h-old BUZ-14 cultures suppressed brown rot in peaches and also blue rot in apples but failed to inhibit the other diseases. However, BUZ-14 was only able to grow and produce iturin A in peaches so we can deduce that the amount of iturin A brought with the cultures ( $36 \pm 14 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) could be enough to control both diseases. The strong antifungal activity of the iturin A present in the BUZ-14 CFS suggests that it could be successfully used for postharvest disease control. However, future research is necessary to maximize the iturin A production by *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in order to optimize a commercial application.

**Keywords:** biocontrol, *Monilinia* spp., *P. expansum*, lipopeptides, iturin A.

## 1. Introduction

Nowadays, pesticides and fungicides are the main system used to control biotic agents responsible for pre- and postharvest rot. However, current legislation covering pesticides has become stricter by reducing the MRLs (Maximum Residue Limits) in plants and forbidding numerous effective fungicides because of the development of fungicide-resistant strains of pathogens, the detection of chemical residues in the food chain and their toxicity for human health and the environment. Therefore, new alternatives such as biological control by using natural antagonistic microorganisms are currently being studied in depth (Chung et al., 2008; Zhao et al., 2013). Several wild-type *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* strains have been reported for their effectiveness in the biocontrol of multiple plant diseases caused by soil borne and postharvest pathogens (Alvarez et al., 2012; Arguelles-Arias et al., 2009; Arrebola et al., 2009; Calvo et al., 2017; Chen et al., 2016; Chen et al., 2009; Chung et al., 2008; Gong et al., 2015; Hinarejos et al., 2016; Romero et al., 2007; Toral et al., 2018; Torres et al., 2017; Touré et al., 2004; Yáñez-Mendizábal et al., 2012). Most authors sustain that antibiosis is the main mechanism of action against pathogens since some *Bacillus* strains are capable of producing a substantial number of antifungal secondary metabolites, especially the non-ribosomally synthesised cyclic lipopeptides (Alvarez et al., 2012; Torres et al., 2017; Veras et al., 2016). These substances are divided into three families according to their structure: surfactin, fengycin and iturin. The chemical structure has previously been studied by numerous authors, regarding the type and sequence of amino acid residues, the nature of the peptide and length and branching of the fatty acid chain (Hinarejos et al., 2016; Ongena and Jacques, 2008; Stein, 2005; Torres et al., 2016; Xu et al., 2013). The mechanism of direct antibiosis associated with *Bacillus* strains against foliar and postharvest diseases has been attributed mostly to iturins and fengycins (Arrebola et al., 2010; Romero et al., 2007; Yáñez-Mendizábal et al., 2012) although other metabolites such as polyketides (Chen et al., 2006; 2009), siderophores (Li et al., 2014), bacteriocins (Ayed et al., 2015) and volatile organic compounds (VOCs) (Gotor-Vila et al., 2017) must not be forgotten. These metabolites and compounds can be produced by the biological control agent (BCA) in the formulation prior to the application with the mechanism of action based on a direct antibiosis. Otherwise, these compounds could be produced directly in the plant while the BCA is growing *in situ* (Touré et al.,

2004). The latter option would increase the possibility of success because the mechanisms of action such as competition for nutrients or colonization would be taken into account, as well as the fact that the direct inhibition provoked by the metabolites could be stronger. Nevertheless, direct antibiosis has not only been cited as a mechanism for controlling disease since it has also been demonstrated that most of the metabolites produced by *B. subtilis* or *B. amyloliquefaciens* strains can induce systemic resistances (ISR) in plants (Cawoy et al., 2014; Choudhary and Johri, 2009; Ryu et al., 2004). The role of lipopeptides from *B. subtilis* (Ongena and Jacques, 2008; Ongena et al., 2005; 2007) and from *B. amyloliquefaciens* (Chowdhury et al., 2015) has been studied on various plants for inducing immune responses. As an example, fengycins from *B. subtilis* M4 could be involved in the systemic resistance-eliciting effect of this strain, as these molecules may induce the synthesis of plant phenolics involved in or derived from the defence-related phenylpropanoid metabolism (Ongena et al., 2005).

The aim of this work was to elucidate the role of the secondary metabolites produced by *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 against *B. cinerea*, *M. fructicola*, *M. laxa*, *P. digitatum*, *P. italicum* and *P. expansum* both *in vitro* and *in planta*. For this purpose, 4 steps were addressed (i) characterisation of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of CFS, LPF and NBF through the determination of their MICs, (ii) identifying and quantifying the lipopeptides produced (iii) determining the lipopeptide responsible for the antagonistic activity and (iv) quantifying the lipopeptide production on fruit.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Fungal pathogens

The fungal pathogen strains used in this study were *Botrytis cinerea* VG 1, *Monilinia fructicola* VG 104, *M. laxa* VG 105, *Penicillium digitatum* VG 20, *P. expansum* CECT 20140 and *P. italicum* VG 101. They were obtained from the Plant Food Research Group culture collection (Zaragoza, Spain) and incubated on potato dextrose agar (PDA) (Oxoid Ltd; Basingstoke, Hampshire, England) and potato dextrose broth (PDB).

## 2.2 Fruit samples

In this study different fruits were used depending on the diseases tested. Peaches (cv. Calante), strawberries (cv. Fortuna), mandarins (cv. Clementina) and apples (cv. Golden Delicious) were used for *Monilinia* spp., *B. cinerea*, *P. digitatum* and *P. italicum*, and *P. expansum* inoculations, respectively. All fruits were collected from local packing greenhouses and were grown in different areas of Spain (La Almunia de Doña Godina, Tarragona and Teruel). Prior to the experiments, all fruits were surface-disinfected by immersion for 2 min in 1% sodium hypochlorite, rinsed with tap water, and allowed to air-dry at room temperature (20 °C).

## 2.3 Bacterial strain identification

*B. amyloliquefaciens* BUZ-14 was identified through a phylogenetic analysis of its 16S rDNA and partial gyrase gene sequences *gyrB*. The genomic DNA of BUZ-14 was extracted using a FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corporation, Taiwan). The 16S rDNA was amplified by PCR using the universal primers 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') and 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT -3') (Microsynth AG, Switzerland). Part of the *gyrB* sequence was amplified with *gyrB*-BUZ-14F (5'-ACC GGA ACG ATT ACG CAC TT -3') and *gyrB*-BUZ-14R (5'-AGG GTC CAT TGT CGT TTC CC -3') (Microsynth AG, Switzerland) primers previously designed with Primer3 v. 0.4.0 software (Untergasser et al., 2007), based on the type strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. The concentrations of the primers, polymerase, and DNA used in the PCR were 10 µM, 5.0 U·µL<sup>-1</sup>, and 50 ng µL<sup>-1</sup>, respectively. PCR amplification (in a total volume of 25 µL, including 1 µL of each primer, 2.5 µL of 10 × buffer, 2 µL of 2.5 mM dNTP, 0.125 µL of Taq polymerase, and 2 µL of DNA template) was achieved using a PCR Takara Amplification kit (Takara Bio Inc, Japan). The amplifications were performed using a DNA thermal cycler Veriti 96-well (Applied Biosystems (ABI), USA). The protocol for amplifying included an initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 45 s, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The size of the expected products was confirmed by electrophoresis (Agarose 2%, 100V, 90 minutes) and these were purified using ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Isogen, Life Science B.V, The Netherlands). The concentration and purity was determined by a Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)



and sent for sequencing at STAB VIDA Co, Ltd (Portugal). Multiple alignment sequences with closely related strains were compared using the BLAST program in the GenBank nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

The phylogenetic trees of strain BUZ-14 based on 16S rDNA and the *gyrB* sequences were constructed using the neighbor-joining method and run using MEGA 7.0 software (Tamura et al., 2004).

#### **2.4. PCR detection of lipopeptide biosynthesis genes**

Genomic DNA extraction from BUZ-14 was carried out by using a FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corporation, Taiwan) and the further amplification of 21 antibiotic biosynthesis genes was performed using specific primers. These primers were previously designed using Primer3, based on sequences from different control strains obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) listed in Table 2. The size of the expected products was predicted *in silico*, also using Primer3, and finally confirmed by electrophoresis.

PCR amplifications were achieved in 25  $\mu$ L of reaction mixtures containing 1  $\mu$ L of each primer, 2.5  $\mu$ L of 10  $\times$  buffer, 2  $\mu$ L of 2.5 mM dNTP, 0.125  $\mu$ L of Taq polymerase, and 2  $\mu$ L of DNA template. The cycle conditions were the same as those proposed by Zouari et al. (2016).

#### **2.5 *In vitro* antifungal activity of the cell-free supernatant (CFS), non-butanolic fraction (NBF) and lipopeptide fraction (LPF) from B. amyloliquefaciens BUZ-14 against fungal pathogens**

The antifungal activity of CFS, NBF and LPF was tested *in vitro* against the fungal pathogens cited in section 2.1. BUZ-14 was incubated in 863 medium (20 g L<sup>-1</sup> dextrose, 10 g L<sup>-1</sup> peptone, 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract) at 30 °C for 96 h. The separation of supernatant from cells was done by centrifugation (Megafuge Heraeus 1.0R, Thermo Fisher, UK) at 4000  $\times$  g for 10 min in 50 mL falcon tubes containing 25 mL of bacterial culture. The supernatant was decanted and consecutively autoclaved at 121 °C for 15 min. Lipopeptide extraction was carried out following a method described in the bibliography (Yazgan et al., 2001), by which n-butanol was added to the supernatant (ratio 1:4) and the sample was centrifuged at 4000  $\times$  g in order to separate the butanolic layer containing all the

lipopeptides. On the other hand, the non-butanolic layer contained the rest of the substances produced by BUZ-14 in the conditions explained above. Finally, each fraction was dried using a rotary evaporator. The three fractions were processed in order to maintain the same ratio of concentration throughout the experiment. The fractions were stored at -80 °C until their laboratory use.

For the *in vitro* inhibition tests, 48-well plates were used. The MIC (Minimal Inhibitory Concentration) of each fraction was found by diluting the antimicrobial into PDB medium. Five hundred  $\mu\text{L}$  of the medium were added into the well, followed by 30  $\mu\text{L}$  of each pathogen ( $10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ). Finally, different quantities of LPF, NBF or CFS were transferred until obtaining 1:6, 1:12, 1:24, 1:48, 1:80 and 1:100 dilutions. A positive control without the antimicrobial fraction and a negative control without the pathogen were also included. The plates were incubated at 25 °C for 7 days. The results were obtained by observing visually the presence (growth) or absence (non-growth) of fungi. Five replicates per pathogen were conducted and the experiment was done in three independent days.

### ***2.6 Antifungal activity of CFS and LPF from BUZ-14 on fruit***

In this study, the antimicrobial activity on fruit of the CFS and LPF obtained from 96 h-old cultures was assessed. Fruit were wounded with a sterile tip and 10  $\mu\text{L}$  of the respective pathogen ( $10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) was inoculated. After 1 hour of absorption of the conidial suspensions, the CFS and LPF were inoculated at 1:6, 1:12, 1:24 and 1:48 dilutions. The fruits were stored at 20 °C for 5 days and 80 % R.H. (relative humidity). The severity was evaluated as a percentage of reduction of the disease by measuring the lesion diameter in treated fruits and the control. Fifteen fruits per pathogen and treatment (one wound per fruit) were disposed. The entire experiment was repeated in three different days.

### ***2.7 Isolation and identification of antifungal lipopeptides***

In order to find out the lipopeptides responsible for direct antibiosis, a Thin Layer Chromatography (TLC) followed by bioautography was performed and the active fractions identified by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS<sup>E</sup>) analysis. The lipopeptides present in the LPF were also identified and quantified.

### **2.7.1 Thin Layer Chromatography (TLC) and bioautography**

Ten  $\mu\text{L}$  aliquots from the lipopeptide fraction produced by BUZ-14 and the reference strain *B. amyloliquefaciens* FZB42 after 96 h of incubation at 30 °C were spotted onto TLC aluminium sheets coated with silica gel 60 F254 5 x10 cm (Sigma Aldrich, Spain). The sheets were placed in a separation chamber containing chloroform/methanol/water (65:25:4, v/v/v) as mobile phase, following the protocol proposed by Razafindralambo et al. (1993). The spots were detected under 254 nm UV light and their retention factor ( $R_f$ ) determined. The strain FZB42, purchased from the DSMZ collection (Germany), was used as a bacillomycin producer since no commercial standard was found.

The bioautography was performed as described by Chen et al. (2016) in order to identify the family of lipopeptides responsible for fungal inhibition. Briefly, the TLC plates were placed in 90 x 90 mm Petri plates and covered with melted PDA medium inoculated with pathogens at  $1-3 \times 10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . The moulds tested were those cited in Section 2.1. The plates were incubated at 25 °C for 7 days and the  $R_f$  of the active fraction was determined. Then, the  $R_f$  was compared to that in the previously conducted TLC and the active lipopeptide was established. Moreover, each antifungal compound was scraped from the silica gel and extracted with 2 mL of methanol under magnetic conditions stirred at 300 rpm overnight. Afterwards, the sample was centrifugated at 10000 x g and the resulting supernatant was subjected to Liquid Chromatography-Mass Spectrometry analysis as detailed in section 2.6.3. Five replicates were used per pathogen and the experiment was repeated on three different days.

### **2.7.2 High Performance Liquid Chromatography Diode-Array Detector (HPLC-DAD)**

The lipopeptides were identified and quantified after 24, 48, 72 96 and 120 h of incubation using an Agilent 1100 liquid chromatograph coupled to an Agilent 1200 Series DAD detector (Agilent, USA) with a Lichrospher RP18 column, 5 $\mu\text{m}$  250x4 mm (Sigma Aldrich, Spain). The mobile phase A was 0.1% formic acid in acetonitrile, and mobile phase B was 0.1% formic acid in Milli-Q water. The flow rate was 1  $\text{mL min}^{-1}$  and the temperature of the column was set at 30 °C. The gradient started at 35% A and was held for 8 min. From 8 min to 10 min the gradient was raised to 40% A and kept for 15 min. Then, the gradient was raised to 80% for 5 min and held at 80% for 15 min. Finally, the

gradient reached 100% for 5 min and returned to the initial conditions during 5 min. The total run time was 60 min. Lipopeptides were monitored at 214 nm. The analytical standards were iturin A (purity  $\geq 95\%$ ), Chemical Abstract Service identification number: 52229-90-0; surfactin  $\geq 98\%$ , 24730-31-2 and fengycin  $\geq 90\%$ , 102577-03-7. All of them were purchased from Sigma Aldrich, Spain. These analytical standards were used for the identification and quantification of the samples. The calibration curve was determined by using standard solutions containing 20, 100, 400, 1000 and 1400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of each compound. In all cases, the solutions were injected in the chromatograph three times and the extraction process was carried out on three separate days.

### ***2.7.3 Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS<sup>E</sup>) analysis***

The lipopeptide fractions obtained after 96 h of incubation time were also subjected to an LC-ESI-MS<sup>E</sup> analysis to identify the different isoforms of each lipopeptide as well as the compounds which exhibited antifungal activity on the TLC plates. For this purpose, an Acquity UPLC H-CLASS system supplied by Waters (Milford, USA) was used. Chromatographic separation was performed on a Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm $\times$ 100 mm) at 40 °C. Mobile phase A was MilliQ-water with 0.1% formic acid and mobile phase B acetonitrile with 0.1 % formic acid. The flow rate was 0.50 ml $\cdot$ min<sup>-1</sup> and the injection volume 10  $\mu\text{L}$ . The time program for multi-step gradient was 0–5 min, 70% A-30 % B to 5 % A-95 % B, 5–10.10 min, 5 % A-95 % B to 70 % A-30 %. The run time was 12 min and the sample temperature was set at 10 °C. Mass spectra were acquired using a time-of-flight (TOF) MS Synapt G2 High Definition Mass Spectrometer supplied by Waters (Milford, USA). Nitrogen was used as a desolvation gas at 800 L $\cdot$ h<sup>-1</sup> flow. The cone gas flow was 40 L $\cdot$ h<sup>-1</sup>. The ion source parameters were corona current 3  $\mu\text{A}$ , sample cone 40 V and desolvation gas temperature 500 °C. Electrospray ionization mode (ESI) in positive polarity was selected; the source temperature was 120 °C. The scan time was 1 s and the mass range considered was  $m/z$  100–2400. MassLynx v4.1 software supplied by Waters (Milford, USA) was used for the analysis of the results obtained, which considers the isotopic model and the elemental composition.

### **2.8 BUZ-14 growth and iturin A production on fruit**

The growth curves of BUZ-14 and the production of iturin A in fruit were determined. Fruits were wounded as described in section 2.5 and 10  $\mu\text{L}$  of the respective pathogen ( $10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) was inoculated. After 1 hour at room temperature to favour the absorption of the conidia suspension, a 24 h-old culture (10  $\mu\text{L}$ ) of *B. amyloliquefaciens* ( $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) was inoculated and the fruit was stored at 20 °C and 80 % R.H. for 7 days. The percentage of reduction of the fungal growth was then recorded. To determine the growth of the BCA, 10 grams of fruit wound was cut through with a sterile scalpel. The fruit plugs were placed in filter blender bags and diluted 1:5 with 0.1% sterile peptone water. The mixture was homogenized in a Stomacher 400 Circulator laboratory blender (Seward Laboratory, London, England) for 120 s at 260 rpm and the resulting suspension was diluted, plated on TSA plates and counted after 24 h at 30 °C. The extraction of lipopeptides was carried out in the homogenate following the procedure described in section 2.4. The subsequent quantification was conducted with the HPLC-DAD (see section 2.6.2) and the amount of lipopeptides quantified and expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  of fruit tissue. Fifteen fruits per fungal pathogen were used as replicates and the experiment was carried out on 3 separate days.

### **2.9 Statistical analysis**

Data were statistically treated by t-student analysis using SPSS software (SPSS statistics 22.0). The statistical differences between means of different treatments were assessed at  $P < 0.05$ .

## **3. Results and discussion**

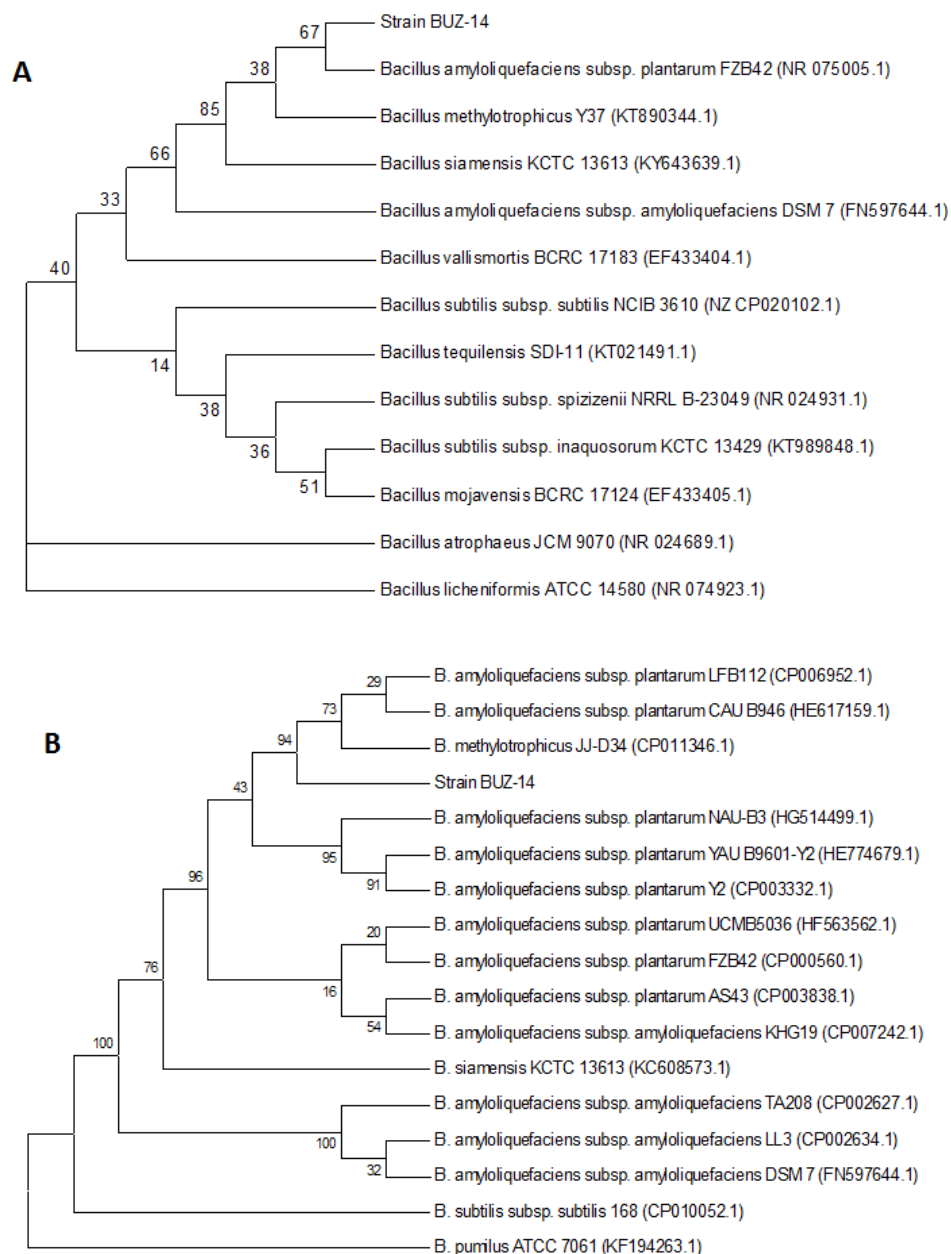
### **3.1 B. amyloliquefaciens BUZ-14 strain phylogenetic identification**

The bacterial strain tested in this study has been previously identified by Calvo et al. (2017) as *Bacillus amyloliquefaciens* and named BUZ-14. However, due to the genetic similarity among species of the *Bacillus* group and the several recently renamed subspecies, we have made a more in-depth study of its identification. *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 16S rDNA and *gyrB* sequences were obtained and deposited in Genbank with accession numbers MF461174 for 16S rDNA and MF770248 for *gyrB*. The sequences were processed using the BLAST tool provided by Genbank. The

information obtained from these results enabled a phylogenetic tree to be constructed (Figure 1 A and B). In order to achieve a more reliable level of identification, the subunit B protein of DNA gyrase (*gyrB*) was subjected to sequencing (Hossain et al., 2015; Wang et al., 2007). This strain was designated as *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BUZ-14, although recent studies have proposed including this classification within *B. velezensis* together with other *Bacillus* species (Dunlap et al. 2016). Plant-associated *B. amyloliquefaciens* strains belonging to subsp. *plantarum* are distinguished from others such as subsp. *siamensis* or *amyloliquefaciens* by their capacity to stimulate plant growth, to colonize the plant rhizosphere and to suppress competing phytopathogenic bacteria and fungi.

### **3.2 In vitro antifungal activity of the cell-free supernatant (CFS), non-butanolic fraction (NBF) and lipopeptide fraction (LPF) from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 against fungal pathogens**

The aim of this assay was to characterize the antifungal activity of BUZ-14 secondary metabolites by establishing differences among the CFS, the NBF and the LPF. The activity of the three fractions was evaluated in liquid medium after 96 h of incubation at 30 °C in 863 broth against the fungal pathogens cited in section 2.1. In this study, we have separated the lipopeptides (LPF) from other compounds (NBF) and we have observed that all the phytopathogens were greatly inhibited by the LPF (Table 1). The results showed that the NBF was barely effective against the six postharvest fungal pathogens tested. However, the LPF achieved the inhibition of all the pathogens in a 1:24 dilution for *B. cinerea* and *P. digitatum*, 1:48 for *M. fructicola*, *P. italicum* and *P. expansum* and with *M. laxa* as the most susceptible species with a MIC below 1:100. The activity observed *in vitro* in the CFS is related to all the active compounds produced by BUZ-14, so a maximum inhibition was expected. However, the MICs obtained were only slightly higher or even the same as those of the LPF, supporting the idea that the antifungal activity lies with the lipopeptides. Nevertheless, not all the pathogens needed the same concentration, and it was observed that *M. laxa* was much more sensitive to these compounds.



**Figure 1.** Phylogenetic identification of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14. A) Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14. B) Neighbour-joining tree based on *gyrB* gene sequences of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14. Numbers at nodes of the tree indicate the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates).

It is known that the same substance can exert different antimicrobial activity depending on the target microorganism (Ambrico and Trupo, 2017; Chen et al., 2009; Ji et al., 2013). Accordingly, Yáñez-Mendizábal et al. (2012) identified a fengycin-like lipopeptide as the main metabolite responsible for *Monilinia* spp. inhibition by *B. subtilis* CPA-8. However, Zhao et al. (2013) determined that in the case of the *Bacillus* BH072 strain, iturin A was

the main inhibitor of *B. cinerea*. Additionally, these kinds of plant-growth-promoting bacteria produce several non-ribosomal polyketides and lipopeptides, apart from iron-siderophores, bacteriocins and volatile compounds with relevant antifungal activity (Alvarez et al., 2012; Arguelles-Arias et al., 2009; Ayed et al., 2015; Borriss et al., 2011; Romero et al., 2007).

**Table 1.** *In vitro* antifungal activity assayed by the well-dilution method in liquid medium of the Cell-Free Supernatant (CFS), the Lipopeptide Fraction (LPF) and the Non-Butanolic Fraction (NBF) produced by *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 after 96 h of incubation at 30 °C in 863 medium against six postharvest fungal pathogens. Five replicates per pathogen and dilution were conducted on 3 different days.

Fraction	Concentration	<i>B. cinerea</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. laxa</i>	<i>P. digitatum</i>	<i>P. italicum</i>	<i>P. expansum</i>
Lipopeptide fraction (LPF)	1:6	NG <sup>a</sup>	NG	NG	NG	NG	NG
	1:12	NG	NG	NG	NG	NG	NG
	1:24	NG	NG	NG	NG	NG	NG
	1:48	G <sup>b</sup>	G	NG	G	NG	NG
	1:80	G	G	NG	G	G	G
	1:100	G	G	NG	G	G	G
Non-butanolic fraction (NBF)	1:6	NG	NG	NG	NG	G	G
	1:12	G	NG	G	G	G	G
	1:24	G	G	G	G	G	G
	1:48	G	G	G	G	G	G
	1:80	G	G	G	G	G	G
	1:100	G	G	G	G	G	G
Cell-free supernatant (CFS)	1:6	NG	NG	NG	NG	NG	NG
	1:12	NG	NG	NG	NG	NG	NG
	1:24	NG	NG	NG	NG	G	G
	1:48	NG	G	NG	G	G	G
	1:80	NG	G	G	G	G	G
	1:100	G	G	G	G	G	G

<sup>a</sup> Non-growth of the fungal pathogen

<sup>b</sup> Growth of the fungal pathogen

### 3.3 LPF and CFS antifungal activity on fruit

The substantial activity demonstrated by the metabolites produced by BUZ-14 against fungal pathogens *in vitro* does not ensure the same effect on a food matrix. Usually, MICs are significantly higher *in vivo* since the fungi efficiently used the nutrients available in the fruit while the low pH, acids and phenols are all barriers to the development of many bacteria. Therefore, the LPF and CFS were also tested in fruit against the six postharvest pathogens used in the study. In this context, the NBF was



discarded due to the poor activity observed in the *in vitro* tests. The results of the LPF and CFS antifungal activity are shown in Table 2. As can be observed, the LPF controlled brown rot caused by *M. fructicola* and *M. laxa* in peaches even by 20-fold dilution (1:24). However, a 10-fold dilution (1:12) was necessary to prevent blue rot in apples. The efficacy against *B. cinerea* was also high, reducing the disease in strawberry by 72 % at a 1:6 proportion. However, blue and green rot in mandarins was barely controlled at any concentration. No significant differences were observed between the fractions in most of the pathogens, although the CFS was slightly better at a 1:48 ratio against both *Monilinia* species.

**Table 2.** Percentage of reduction of the lesion diameter of *B. cinerea* in strawberries, *M. fructicola* and *M. laxa* in peaches, *P. digitatum* and *P. italicum* in mandarins and *P. expansum* in apples. The LPF and CFS were obtained from a 96 h-old culture of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 incubated at 30 °C in 863 medium. Fruits were stored at 20 °C and 80 % R.H. for 5 days.

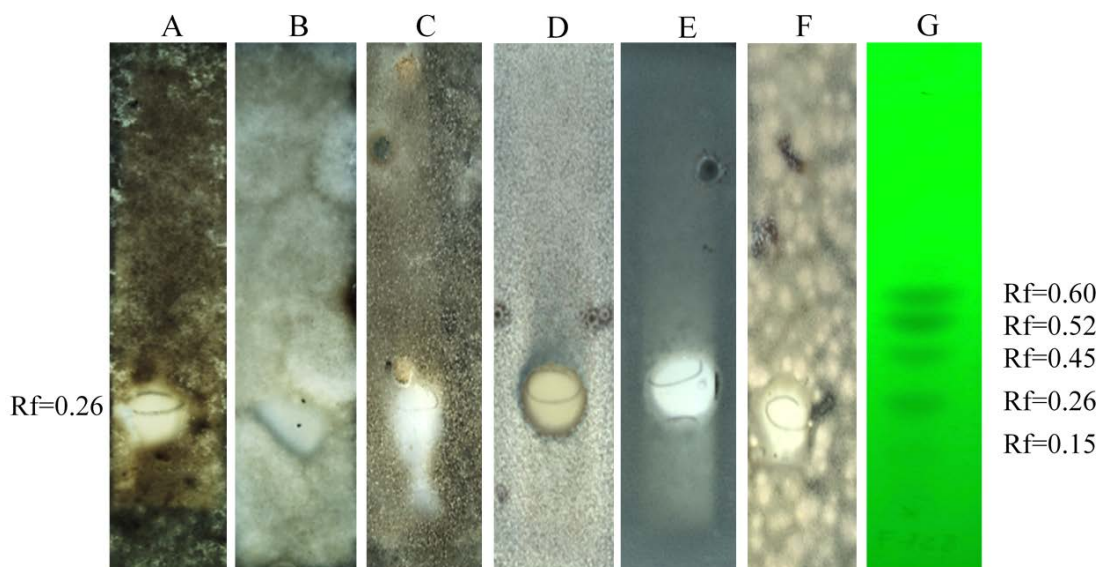
Fraction	Concentration	<i>B. cinerea</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. laxa</i>	<i>P. digitatum</i>	<i>P. italicum</i>	<i>P. expansum</i>
Lipopeptide fraction (LPF)	1:6	72.6 ± 5.7	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	9.5 ± 3.3	7.1 ± 2.1	100.0 ± 0.0
	1:12	31.6 ± 9.6	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	8.1 ± 3.1	6.4 ± 5.0	100.0 ± 0.0
	1:24	11.1 ± 4.8	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	7.1 ± 2.6	5.1 ± 2.5	16.0 ± 5.3
	1:48	ND <sup>a</sup>	78.3 ± 5.2a	81.6 ± 3.9a	ND	ND	ND
Cell-free supernatant (CFS)	1:6	76.6 ± 4.4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	13.2 ± 4.2	9.1 ± 4.1	100.0 ± 0.0
	1:12	24.0 ± 13.7	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	10.3 ± 3.5	8.3 ± 3.0	100.0 ± 0.0
	1:24	9.1 ± 5.4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	8.6 ± 3.2a	7.9 ± 3.4	20.6 ± 4.1
	1:48	ND	90.3 ± 4.6b	92.1 ± 2.5b	ND	ND	ND

<sup>a</sup>Data are expressed as percentages of fungal growth inhibition compared with control fruits without treatment. Each value is the mean ± standard deviation of three replicates, done in 3 separate days, of 15 fruits each.

<sup>b</sup>No letter means no significant differences between fractions for the same phytopathogen and the same concentration. Different letters indicate significant differences at P < 0.05 according to the Tukey test.

### 3.4 Isolation and identification of lipopeptides from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14

In order to determine the families of lipopeptides present in the LPF after 96 h of incubation in 863 medium, a TLC analysis of BUZ-14 and FZB42 (as a bacillomycin producer) was performed and their R<sub>f</sub> established. Briefly, marks of all the families were observed in the TLC under UV-light. However, no differences were observed between the two BCAs since the same spots and R<sub>f</sub> were detected. To identify the active compounds from the lipopeptide fraction of both BCAs, a TLC-bioautography was developed. Only one active fraction was found in BUZ-14 (0.26) resulting in a very strong inhibition against all the pathogens tested (Figure 2).



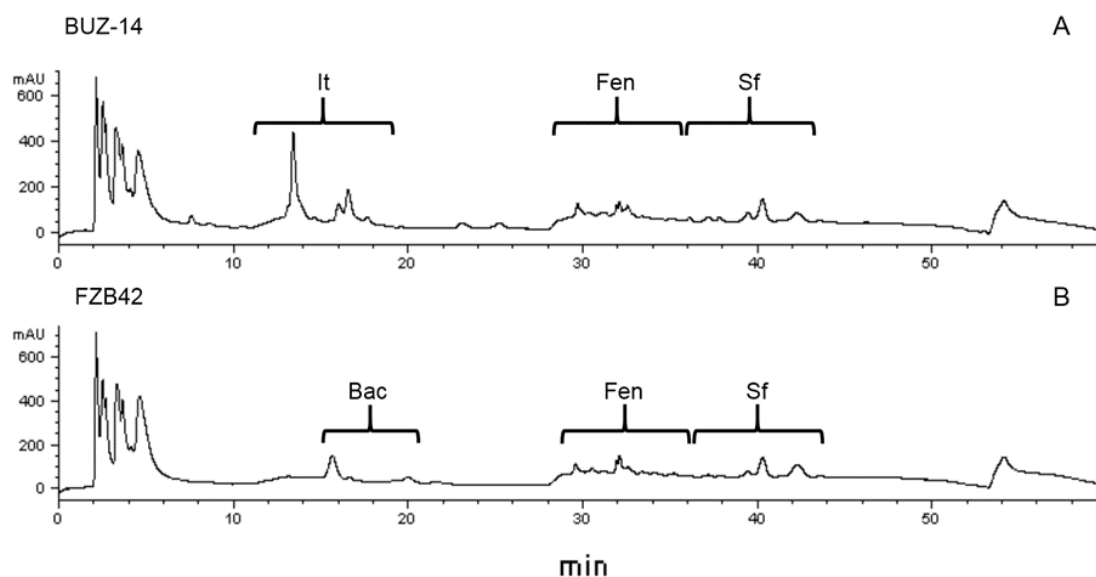
**Figure 2.** Thin layer chromatography (TLC)-bioautography analysis of the lipopeptide fraction (LPF) of BUZ-14 after 96 h of incubation in 863 medium at 30 °C. TLC plates A; B; C; D; E and F were covered with PDA inoculated with a fungal spore suspension at a concentration of  $1\text{-}3 \times 10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  and incubated for 7 days at 25 °C. A- *M. fructicola*; B- *M. laxa*; C- *B. cinerea*; D- *P. italicum*; E- *P. expansum*; F- *P. digitatum*. View in a fluorescence chamber at 254 nm of TLC three family spots (fengycin, iturin and surfactin). The inhibition zone for A, B, C, D, E and F can be observed at  $R_f=0.26$ .

According to the literature, this  $R_f$  should belong to mycosubtilin, a typical lipopeptide of the species *B. subtilis* with a large antifungal spectrum range (Duitman et al., 1999). To elucidate this finding, forty-two primers were designed to detect 21 genes described as lipopeptide producers in the literature. The FZB42 strain was selected as a pattern for the design of the primers of *FenA, B, C, D, E* genes, *BacA, B, C, D* genes, and *SrfA, B, C, D* genes. Since FZB42 iturin and mycosubtilin genes were not detected, as reported in previous works the *Bacillus subtilis* ZK8 strain (accession number KT781919.1) was selected as a reference for the design of iturin primers *ItuA, B, C, D*. In the case of mycosubtilin genes *mycA, B, C*, including *FenF*, the pattern strain was *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (accession number AF184956.1). The mycosubtilin gene was neither found in BUZ-14 (Table 3) nor later detected by HPLC, so this first option was discarded. Arrebola et al. (2010) found that iturin A produced by *B. amyloliquefaciens* PPCB004 appeared at a  $R_f$  of 0.3 but Yáñez-Mendizábal et al. (2012) obtained the same  $R_f$  for bacillomycin D. These findings, added to the fact that FZB42 produces another lipopeptide with a  $R_f$  of 0.3 (bacillomycin), make it impossible to elucidate by TLC whether BUZ-14 was an iturin A or a bacillomycin D producer. Moreover, FZB42 did

not show inhibition in the bioautography against any pathogen, indicating that both metabolites developed in the TLC at the same R<sub>f</sub> could be different.

Amplicons obtained for BUZ-14 had the expected size predicted by Primer3 for the reference strains for all the primer pairs, confirming the presence of the genes in BUZ-14. By contrast, no amplifications were observed for BUZ-14 in the case of mycosubtilin genes, showing the same behavior as FZB42 (Table 3).

The lipopeptides from both BCAs were identified by HPLC-DAD. By comparing these metabolites with the analytical standards, three groups of peaks were observed (Figure 3A), corresponding to iturin A, fengycin and surfactin, respectively for BUZ-14, although neither bacillomycin or nor mycosubtilin were detected. However, as expected, no iturin A was detected in the FZB42 chromatogram (Figure 3B). Even so, additional information was required in order to confirm the results, so more sensitive chromatographic analyses using LC-MS-MS<sup>E</sup> were carried out.



**Figure 3.** Detection of lipopeptides at 214 nm by HPLC-DAD after 96 hours of incubation time. **A)** Lipopeptides from BUZ-14: three groups of peaks were found corresponding to iturin (It), Fengycin (Fen) and Surfactin (Sf). **B)** Lipopeptides from FZB42: three groups of peaks were detected: Bacillomycin (Bac); Fengycin (Fen) and Surfactin (Sf).

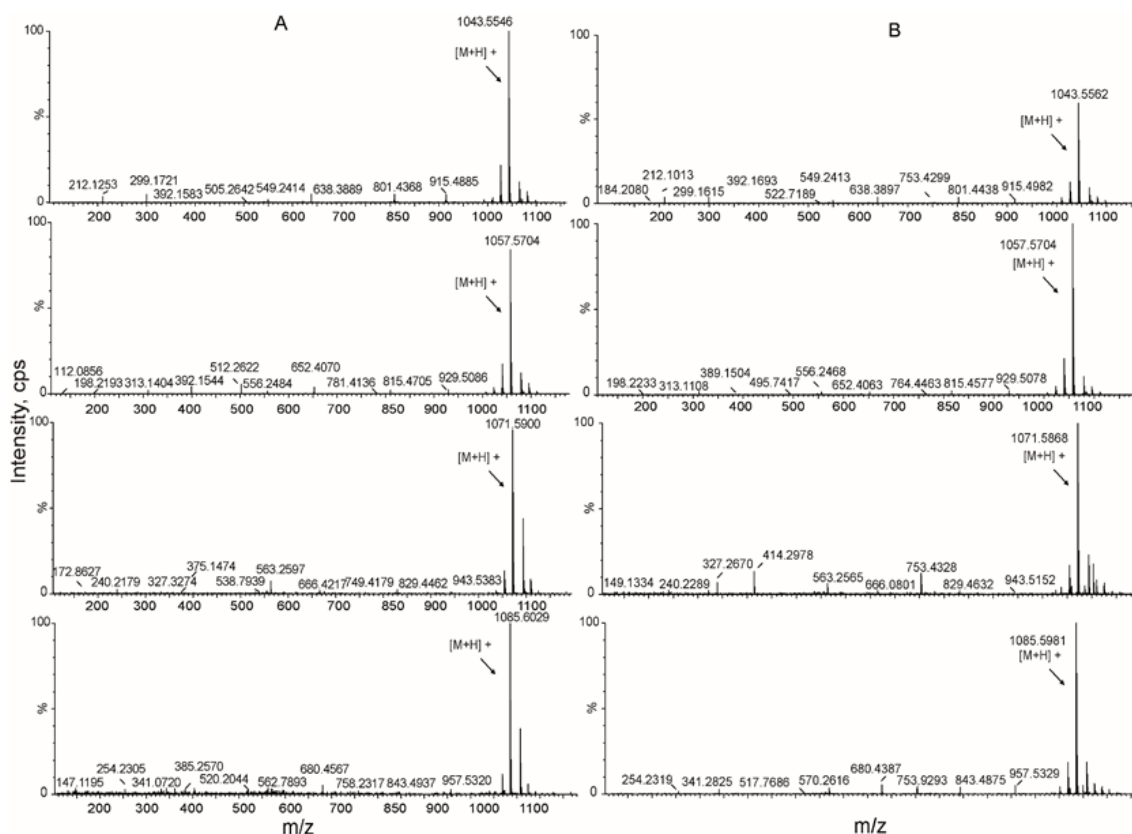
**Table 3.** PCR detection of lipopeptide biosynthesis genes from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14.

Lipopeptide	Gene	Pattern strain	GenBank accession number	Primer (5'→ 3')		Size	Detection in BUZ-14
				FW	RV		
Iturina A	ItuA	<i>Bacillus subtilis</i> ZK8 (Iturin genes, complete cds)	KT781919.1	ATACTTCGGGGATCAGAGCG / CGGAACATTCTCTTGAGGCG		233	+
	ItuB			AGCAGCAAACAGTACGC AAA / CTTTCTGCATCGGAGTGAGC		226	+
	ItuC			GCAGCTCACCCATATGAAGC / TCTCCTGACAAGTAAGCGCA		215	+
	ItuD			GGCAGCGGGGAATTCTTATG / CGCCATCTTGATGACACGTT		209	+
Bacillomycin D	bacA			GAACTCAGCTTTTCCGGCAA / TTTGAAAGAATTGCGGGC GA		190	+
	bacB			ATGGAGCCTGACTGAGATCG / TTGGAAGGCAGGATGGACAT		223	+
	bacC			AAAGGCGGGAAACAGAACAC / CAGCGACCCGGGAATTAAAG		246	+
	bacD			CGCCATCTTGATGACACGTT / TTGTAAGGGAGCGGGGAATT		215	+
Fengycin	FenA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 (complete genome)	NC_009725.1	ACATCTTCAGCGTTCCCTCA / TGTTTACCCGGTGCTTTTGG		218	+
	FenB			CTTCAGTTGTCCGTATGCC / CGCTGTTCCACTCCTATTGC		218	+
	FenC			TGTGCGGCCGGTTAATAATG / TGCTGAAACAAATCGCGTCA		244	+
	FenD			TCAGTCAGCTCCCAGATC / TACATGAAACGGGAGCAGT		219	+
	FenE			TCGGTTGGAAATCATCACGC / ATCGCCGATATGCTCACTGA		225	+
Surfactin	SurfA			TCTTTGAGCTGAACGGACCT/ GGGTTCAATGCCTTGCTTCA		242	+
	SurfB			TCCGTGCTGCTGTCTTCTTA / CCGCGCACCCTAAACGAAG		248	+
	SurfC			GCCGGTCCAAGTCGTATTG / TAAGTACCCGCGCCAGTAAT		388	+
	SurfD			AATGTCCGCCGTTGAGGATT / AGAATCAGACGGACGGAAGC		364	+
Mycosubtilin	FenF	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633(mycosubtilin operon)	AF184956.1	GTCAGCGCCCTTTTCATAG / TCGATGACTTCCGTGACTCC		215	+
	micA			AACGATTGACCGCTGCTTTT / CAGTCCCCTCGCATTAAACG			nb*
	micB			AGCATCGCATTGACGTAACC / CGACACAAGTTTCGGTTGGT			nb*
	micC			ATTGATTTCGGCTTCTGGTGC / ATGAACTCGCTGCGTTGATC			nb*

The previously obtained LPF containing the lipopeptide families and the active fraction ( $R_f=0.26$ ) scraped from TLC plates were subjected to mass spectrometry analysis. The molecular masses were monitored in the  $m/z$  range of 100–2400 uma. By analysing the lipopeptide profiles after 96 h of BUZ incubation, three isoforms of surfactin (C13, C14 and C15), four of fengycins (C16A, C16B, C17A and C17B) and four of iturins (C13, C14, C15 and C16) were identified (Table 4). The  $m/z$  obtained of the active compound scraped from the TLC-bioautography corresponded to iturin A (Hiradate et al., 2002; Yu et al., 2002; Ongena and Jacques, 2008; Athukorala et al., 2009). In addition, this result was confirmed by injecting the iturin A standard in the LC-MS-MS<sup>E</sup>. It was observed that both the active fraction and the standard shared the same retention times and masses for the four peaks detected: 1.76 min for  $m/z$  1043.5562; 1.98 min for  $m/z$  1057.5704; 2.33 min for  $m/z$  1071.5900 and 2.53 min for  $m/z$  1085.5981. Finally, comparisons of MS<sup>E</sup> spectra of the active fraction and the commercial standard of iturin A confirmed its identification (Figure 4) and we could establish iturin A as the main lipopeptide responsible for antifungal activity against these postharvest moulds.

**Table 4.** Lipopeptides and isoforms of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 detected by LC-MS-MS<sup>E</sup> in 863 medium after 96 h of incubation at 30 °C

Product and $m/z$ observed	Assignment	24h	48h	72h	96h	120h
Surfactin						
1008.660;1030.642;1046.642	C13-surfactin [M+H,Na,K] <sup>+</sup>	+	+	+	+	+
1022.676;1044.660;1060.660	C14-surfactin [M+H,Na,K] <sup>+</sup>	+	+	+	+	+
1036.691;1058.676;1074.676	C15-surfactin [M+H,Na,K] <sup>+</sup>	+	+	+	+	+
Fengycin						
1463.804; 1485.804	C16-fengycin A [M+H,Na] <sup>+</sup>	+	+	+	+	+
1477.820;1499.799;1515.822	C17-fengycin A [M+H,Na,K] <sup>+</sup>	+	+	+	+	+
1491.804; 1529.804	C16-fengycin B [M+H,K] <sup>+</sup>				+	+
1505.814; 1527.804;1543.804	C17-fengycin B [M+H,Na,K] <sup>+</sup>		+	+	+	+
Iturin						
1043.5562;1065.5403;1082.4514	C14-iturin A [M+H,Na,K] <sup>+</sup>	+	+	+	+	+
1057.5704;1079.5516;1095.5531	C15-iturin A [M+H,Na,K] <sup>+</sup>		+	+	+	+
1071.5900;1093.5695;1110.5402	C16-iturin A [M+H,Na,K] <sup>+</sup>		+	+	+	+
1085.5981;1107.5704;1124.5570	C17-iturin A [M+H,Na,K] <sup>+</sup>		+	+	+	+

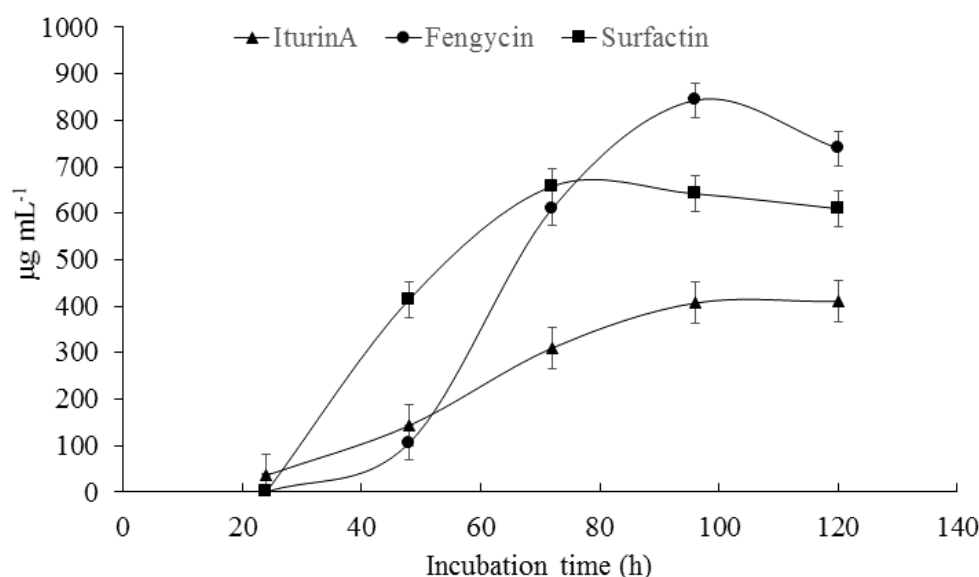


**Figure 4.** Comparison between MS<sup>E</sup> spectra from commercial Iturin **(A)** and the active compound from *B. amyloliquefaciens* BUZ 14 **(B)**. **(A)** MS<sup>E</sup> spectra of the four peaks detected for m/z (1043.5562; 1057.5704; 1071.5900; 1085.5981). **(B)** MS<sup>E</sup> spectra obtained after scraping the active compound from TLC plates at 96 h of incubation time.

### 3.4.3 Lipopeptide production curve

The concentration of the compounds during the incubation time in 863 medium was also determined (Figure 5). After 24 hours of incubation, iturin A reached 36.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  but surfactin and fengycin were not detected. The amount of iturin A increased progressively reaching 407  $\mu\text{g mL}^{-1}$  after 96 h of incubation. Fengycin also achieved the highest concentration after 96 h of incubation with 853  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Otherwise, the top peak of surfactin was obtained after 72 h with 658  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . After 72 h of incubation of *B. subtilis* GA1 in a culture medium optimized for lipopeptide production (named Opt), Touré et al. (2004) obtained concentrations of fengycins, iturins and surfactins of 520, 460 and 340  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Also, Ambrico and Trupo (2017) in High Medium Broth (HMB) achieved the highest amount of iturin, 422  $\text{mg L}^{-1}$ , from *B. subtilis* ET-1 after 50 h of incubation. Thus, the incubation time is an essential factor in the production of secondary metabolites together with the culture medium. The production process of

biocontrol agents is an essential step for their commercial use as bioproducts. A key factor to consider is the development of an economical culture medium that supports both the production of large commercial amounts of the BCA and its metabolites at a low price. In our case, the 863 medium achieved a notable lipopeptide production and although it cannot really be considered a low cost medium, it is very simple as it has 3 ingredients only. However, considering that *B. amyloliquefaciens* may grow and synthesize its metabolites from cheap substrates, our future research will focus on finding a low cost medium based on commercial products or by-products from the food industry that can provide maximum BUZ-14 growth and lipopeptide production in large scale production processes.



**Figure 5.** Quantification of fengycin, surfactin and iturin produced by BUZ-14 in 863 medium during the incubation time. Measurements of concentration were carried out following the lipopeptide extraction protocol at 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h. Analytical standards were used as reference compounds. Data represent the average of three samples extracted on three different days  $\pm$  SD.

### 3.5. Correlation between Iturin A concentration and antifungal activity

Finally, relating the production of iturin A in BUZ-14 cultures (Figure 5) with the data of LPF inhibitions *in vitro* (Table 1) and *in vivo* (Table 2) we can establish the MICs of iturin A (Table 5). Thus, the MICs *in vitro* of iturin A ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were as follows: 4.1 for *M. laxa*, 8.5 for *M. fructicola*, *P. italicum* and *P. expansum* and 16.9 for *B. cinerea* and *P. digitatum* (Table 5). These MICs *in vitro* are in partial agreement with those of Ambrico and Trupo (2017) who determined a MIC of iturin A of 6 and 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *P.*

*digitatum* and *B. cinerea*, respectively, in a solid medium *in vitro* test. These discrepancies could be explained by several factors such as the different *in vitro* test used (solid and liquid medium), the differences in the type and percentages of the isoforms of iturin A produced by the BCA strains, and the different phytopathogen strains used. However, the MICs of iturin A *in vivo* were only achieved in *Monilinia* spp. and *P. expansum* (16.9 and 33.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectively) (Table 5). The growth of the rest of the pathogens were reduced but their respective diseases were manifested (Table 2) since their MICs were higher than the concentration tested in this study (67.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Table 5.** Minimum Inhibitory Concentration of iturin A present on the LPF of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 obtained after 96 h of incubation at 30 °C in 863 medium for the six fungal pathogens tested.

Phytopathogenic fungi	Iturin A ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	
	<i>In vitro</i> <sup>b</sup>	<i>In vivo</i> <sup>c</sup>
<i>B. cinerea</i>	16.9	> 67.8
<i>M. fructicola</i>	8.5	16.9
<i>M. laxa</i>	4.1	16.9
<i>P. digitatum</i>	16.9	> 67.8
<i>P. italicum</i>	8.5	> 67.8
<i>P. expansum</i>	8.5	33.9

<sup>a</sup>LPF started at an iturin concentration of 407  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and was serially diluted by a factor of two until a concentration of 4.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was reached

<sup>b</sup>*In vitro* activity was assayed by the well-dilution method in liquid medium

<sup>c</sup>*In vivo* activity was tested by the puncture method: fruits were wounded with a sterile tip and 10  $\mu\text{L}$  of the respective pathogen ( $10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ) was inoculated (*B. cinerea* in strawberries, *M. fructicola* and *M. laxa* in peaches, *P. digitatum* and *P. italicum* in mandarins and *P. expansum* in apples).

### 3.6 BUZ-14 growth and iturin A production in fruit

The results showed that the 24 h-old cultures of BUZ-14 suppressed brown rot by *M. fructicola* and *M. laxa* in peaches and also blue rot by *P. expansum* in apples but failed in the rest of the diseases (Table 6). The final concentration of iturin A in peaches achieved 1.6-1.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  and BUZ-14 populations reached  $10^8$  CFU  $\text{g}^{-1}$  whereas neither growth nor iturin A production was detected in the rest of the fruits. We could deduce that the amount of iturin A brought with the culture ( $36 \pm 14$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) could be enough to inhibit the growth of *Monilinia* species in peaches and *P. expansum* in apples, with MICs *in vivo* of 16.9 and 33.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. However, this concentration was insufficient to control the rest of the pathogens (*B. cinerea*, *P. digitatum* and *P. italicum*).



Thus, BUZ-14 cultures drastically prevent *Monilinia* spp. in peach fruit since the microorganism is able to grow and produce significant levels of iturin A but, as in the case of *P. expansum*, a cell free supernatant would also be effective. For the rest of the fruit-pathogen binomials where no growth of the BCA was detected, a more concentrated supernatant in iturin A would need to be tested in order to inhibit the diseases.

**Table 6.** Reduction of the fungal growth, BUZ-14 counts and iturin A produced in fruits after 7 days at 20 °C. Data shown are means  $\pm$  standard deviation.

<sup>a</sup>Inoculated with 10  $\mu$ L of the respective pathogen ( $10^4$  conidia mL<sup>-1</sup>) and 10  $\mu$ L of a BUZ-14 24 h-old culture ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>).

Fruit (fungal pathogen) <sup>a</sup>	% inhibition <sup>b</sup>	BUZ-14- counts <sup>c</sup> (log CFU g <sup>-1</sup> )	Iturin A <sup>d</sup> ( $\mu$ g g <sup>-1</sup> )
Strawberries ( <i>B. cinerea</i> )	15.4 $\pm$ 3.4	4.9 $\pm$ 0.5	nd <sup>e</sup>
Peach ( <i>M. fructicola</i> )	100.0 $\pm$ 0.0	8.3 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.3
Peach ( <i>M. laxa</i> )	100.0 $\pm$ 0.0	8.6 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.5
Mandarins ( <i>P. digitatum</i> )	8.4 $\pm$ 2.3	5.3 $\pm$ 0.4	nd
Mandarins ( <i>P. italicum</i> )	7.2 $\pm$ 2.4	5.1 $\pm$ 0.5	nd
Apple ( <i>P. expansum</i> )	100.0 $\pm$ 0.0	5.2 $\pm$ 0.4	nd

<sup>b</sup>The percentage of inhibition of the disease was determined by measuring the lesion diameter in treated fruits and the control.

<sup>c</sup>The initial counts of BUZ-14 in the fruits were 5.0 log CFU g<sup>-1</sup>.

<sup>d</sup>The initial concentration of iturin A in the fruit tissue was 0.036  $\pm$  0.014  $\mu$ g g<sup>-1</sup>. These data were calculated from the iturin A concentration quantified in the 24 h-old cultures.

<sup>e</sup>nd: not detected

Improving our knowledge of the mechanisms of action of BCAs and their behaviour *in planta* could help to select the most efficient form of application (BCA cultures, BCA cultures enriched in a specific substance, CFS or iturin A enriched fractions). Finding a BCA able to grow and produce a sufficiently active metabolite *in planta* could be the easiest and cheapest application method but, as our results have shown, this behaviour is highly specific since it could be influenced by many conditions such as pH or temperature, and the available nutrients (Ashis and Kishore, 2005; Monteiro et al., 2016). The use of CFS with the maximum concentration of active metabolites may have more advantages than cultures but the difficulty of determining its complex composition does not allow the innocuousness of its application to be established. On the other hand, formulating a cell free biopesticide enriched in one or various metabolites would require high production costs and yields, but toxicity assays may be easier. Many studies endorse the low toxicity of iturin A (Kim and Lee, 2009; Zhang et al., 2012; Dey et al., 2016; Cao et al., 2017) but strict toxicological studies that guarantee its

innocuousness for humans and the environment are essential for any future application.

#### 4. Conclusions

The present study has shown that iturin A produced by *B. amyloliquifaciens* BUZ-14 is the main lipopeptide family responsible for fungal inhibition and which at low levels provides effective control of brown rot in peaches and blue mould in apples. Thus, a BCA that can produce a sufficiently active metabolite *in planta* could be the most suitable pathway for a commercial application. However, BUZ-14 is only able to grow and produce iturin A in peaches, which reveals the complex and specific nature of the BCA-fruit-pathogen interactions. For the rest of the fruit-pathogen binomials in which no growth of the BCA was detected, an iturin A enriched extract could be applied in order to obtain effective disease control. Thus, optimising the production of iturin A by BUZ-14 and testing the antifungal efficacy of these enriched culture extracts will be the focus of our future research.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain through funds awarded for the Project RTC-2015-4121-2. Funding from the Diputación General de Aragón (T41) and Fondo Social Europeo is also acknowledged. H. Calvo is the beneficiary of a pre-doctoral grant C195/2015 from the Aragón Regional Government (Spain). We would also like to thank CIC University of Granada (Spain) for helping us with the MS analysis.

#### References

- Ambrico, A., Trupo, M., 2017. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. *Postharvest Biol. Technol.* 134, 5-10. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.08.001
- Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofré, E., 2012. The plant-associated *Bacillus amyloliquifaciens* strains MEP 218 and ARP 23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 112, 159–174. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P., 2009. *Bacillus amyloliquifaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Fact.* 8, 63. doi:10.1186/1475-2859-8-63
- Arrebola, E., Jacobs, R., Korsten, L., 2010. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquifaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 108, 386–395. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x

- Ashis, K. M., Kishore, D., 2005. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. FEMS Microbiol. Ecol. 54, 479-489. doi: 10.1016/j.femsec.2005.06.003
- Athukorala, S.N.P., Fernando, W.G.D., Rashid, K.Y., 2009. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. Can. J. Microbiol. 55, 1021–1032. doi:10.1139/W09-067
- Ayed, H. Ben, Maalej, H., Hmidet, N., Nasri, M., 2015. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6. J. Glob. Antimicrob. Resist. 3, 255–261. doi:10.1016/j.jgar.2015.07.001
- Borriss, R., Chen, X.H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Spröer, C., Junge, H., Vater, J., Pühler, A., Klenk, H.P., 2011. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM7 T and FZB42 T: A proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete gen. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61, 1786–1801. doi:10.1099/ijs.0.023267-0
- Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., Venturini, M.E., 2017. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. Food Microbiol. doi:10.1016/j.fm.2016.11.004
- Cao, Y., Cheng, W., Huang, D., Zheng, L., Cai, M., Lin, D., Yu, Z., Zhang, J., 2017. Preparation and characterization of iturin A microcapsules in sodium alginate/Poly( $\gamma$ -glutamic acid) by spray drying. Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater. 66 (10). doi: 10.1080/00914037.2016.1233417
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommès, J., Ongena, M., 2014. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. Mol. Plant-Microbe Interact. 27, 87–100. doi:10.1094/MPMI-09-13-0262-R
- Chen, X.-H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsis, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A.W., Gottschalk, G., Sussmuth, R.D., Borriss, R., 2006. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. J. Bacteriol. 188, 4024–4036. doi:10.1128/JB.00052-06
- Chen, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., Wang, Q., 2016. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. Postharvest Biol. Technol. 115, 113–121. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.12.021
- Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., Borriss, R., 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. J. Biotechnol. 140, 38–44. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.10.015
- Choudhary, D.K., Johri, B.N., 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiol. Res. 164, 493–513. doi:10.1016/j.micres.2008.08.007
- Chowdhury, S.P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., Schmitt-Kopplin, P., Borriss, R., Hartmann, A., 2015. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defence responses towards the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. Mol Plant Microbe Interact. 28, 17–18. doi:10.1094/MPMI-03-15-0066-R
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.D., Roberts, D.P., 2008.

- Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 115–123. doi:10.1007/s00253-008-1520-4.
- Dey, G., Bharti, R., Banerjee, I., Das, A.K., Das, C.K., Das, S., Jena, B.C., Misra, M., Sen, R., Mandal, M., 2016. Pre-clinical risk assessment and therapeutic potential of antitumor lipopeptide 'Iturin A' in an in vivo and in vitro model. *RSC Adv.* 6 (75), 71612–71623. doi: 10.1039/c6ra13476a.
- Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., Vater, J., 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13294–9. doi:10.1073/pnas.96.23.13294
- Dunlap C., Kim S. J., Kwon S. W., Rooney A., (2016). *Bacillus velezensis* not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1212–1217. doi: 10.1099/ijsem.0.000858
- Gong, A.D., Li, H.P., Yuan, Q.S., Song, X.S., Yao, W., He, W.J., Zhang, J.B., Liao, Y.C., 2015. Antagonistic mechanism of iturin a and plipastatin a from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 10, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0116871
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., Mari, M., 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiol.* 64, 219–225. doi:10.1016/j.fm.2017.01.006
- Hinarejos, E., Castellano, M., Rodrigo, I., Bellés, J.M., Conejero, V., López-Gresa, M.P., Lisón, P., 2016. *Bacillus subtilis* IAB/BS03 as a potential biological control agent. *Eur. J. Plant Pathol.* 146, 597–608. doi:10.1007/s10658-016-0945-3
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., Fujii, Y., 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry* 61, 693–698. doi:10.1016/S0031-9422(02)00365-5
- Hossain, M.J., Ran, C., Liu, K., Ryu, C.-M., Rasmussen-Ivey, C.R., Williams, M.A., Hassan, M.K., Choi, S.-K., Jeong, H., Newman, M., Kloepper, J.W., Liles, M.R., 2015. Deciphering the conserved genetic loci implicated in plant disease control through comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. *Front. Plant Sci.* 6, 631. doi:10.3389/fpls.2015.00631
- Ji, S.H., Paul, N.C., Deng, J.X., Kim, Y.S., Yun, B.S., Yu, S.H., 2013. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology* 41, 234–242. doi:10.5941/MYCO.2013.41.4.234.
- Kim, H.Y., Lee, T.S., 2009. Toxicity and characteristics of antifungal substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03. *J. Life Sci.* 19 (11), 1672–1678. doi: 10.5352/JLS.2009.19.11.1672
- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., Zhang, R., 2014. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Front. Microbiol.* 5, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2014.00636
- Monteiro, F. P., de Medeiros, F. H. V., Ongena, M., Franzil, L., de Souza, P.A., de Souza, J.T., 2016. Effect of temperature, pH and substrate composition on production of lipopeptides by

- Bacillus amyloliquefaciens* 629. Afr. J. Microbiol. Res. 10, 1506-1512. doi: 10.5897/AJMR2016.8222
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., and Jabrane, A., 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69, 29–38. doi: 10.1007/s00253-005-1940-3
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ. Microbiol. 9, 1084–1090. doi: 10.1111/j. 1462-2920.2006.01202.x
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16, 115–125. doi:10.1016/j.tim.2007.12.009
- Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Jacques, P., Thonart, P., 1993. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 639, 81–85.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A., 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Mol. Plant-Microbe Interact. 20, 430–440. doi:10.1094/MPMI-20-4-0430
- Ryu, C., Farag, M.A., Hu, C., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Pare, P.W., 2004. Bacterial volatiles induced resistance in Arabidopsis. Plant Physiol. 134, 1017–1026. doi:10.1104/pp.103.026583.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. Mol. Microbiol. 56, 845–857. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., Sampedro, I., 2018. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. Front. Microbiol. 9, 1315. doi: 10.3389/fmicb.2018.01315
- Torres, M.J., Brandan, C.P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C., 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. Microbiol. Res. 182, 31–39. doi:10.1016/j.micres.2015.09.005
- Torres, M.J., Pérez Brandan, C., Sabaté, D.C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C., 2017. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. Biol. Control 105, 93–99. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.12.001
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P., 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. J. Appl. Microbiol. 96, 1151–1160. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.M., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res. 35, 71–74. doi:10.1093/nar/gkm306
- Veras, F.F., Correa, A.P.F., Welke, J.E., Brandelli, A., 2016. Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. Int. J. Food Microbiol. 238, 23–32. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.035
- Wang, L.T., Lee, F.L., Tai, C.J., Kasai, H., 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1846–1850.

doi:10.1099/ij.s.0.64685-0

Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., Zhang, R., 2013. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 808–815. doi:10.1128/AEM.02645-12

Yáñez-Mendizábal, V., Zerriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., Pérez-García, A., Teixidó, N., 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 609–619. doi:10.1007/s10658-011-9905-0

Yazgan, A., Özcengiz, G., Marahiel, M.A., 2001. Tn10 insertional mutations of *Bacillus subtilis* that block the biosynthesis of bacilysin. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1518, 87–94. doi:10.1016/S0167-4781(01)00182-8

Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., Bertagnolli, B.L., 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34, 955–963. doi:10.1016/S0038-0717(02)00027-5

Zhang, S.M., Wang, Y.X., Meng, L.Q., Li, J., Zhao, X.Y., Cao, X., Chen, X.L., Wang, A.X., Li, J.F., 2012. Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6 (8), 1747–1755. doi:10.5897/AJMR11.1025

Zhao, X., Zhou, Z. jiang, Han, Y., Wang, Z. zhong, Fan, J., Xiao, H. zhi, 2013. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. *Microbiol. Res.* 168, 598–606. doi:10.1016/j.micres.2013.03.001

**Capítulo 3. Antifungal activity and identification of the volatile organic compounds (VOCs) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strains**

### **Highlights**

- The VOCs produced by *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 and I3 have antifungal activity.
- The production of VOCs is influenced by the nutrients in the medium.
- Diacetyl, benzaldehyde and isoamyl alcohol were the most active.
- Diacetyl controls the grey mould in grapes at only 0.02  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- The phytotoxicity is fruit and VOC dose-dependent.



**ABSTRACT**

It has been suggested that VOCs (Volatile Organic Compounds), amongst several other mechanisms, are responsible for the antagonistic activity produced by microorganisms. In this work the volatilome of three biocontrol *Bacillus amyloliquefaciens* strains showed total and partial inhibition in a MOLPA medium against *Botrytis cinerea*, *Monilinia* spp., *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum*. In addition, significant reductions were found in terms of incidence and severity in grapes and apricots against *B. cinerea* and *Monilinia* spp., respectively. The VOCs were then identified by solid phase microextraction (SPME) coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and the antifungal activity of some of them tested both *in vitro* and on fruit against the fungal pathogens. The main volatiles identified ranged from 12 to 15 compounds including 2-nonanone, 2-undecanone, 2-heptanone, 1-butanol, acetoin, benzaldehyde, butyl format, diacetyl, nonane, or pyrazine, among others. The most active were diacetyl, benzaldehyde, 2-heptanone or isoamyl alcohol according to the *in vitro* inhibition tests. To the best of our knowledge, this study reports the lowest *in vitro* MICs (Minimum Inhibitory Concentrations) of diacetyl and benzaldehyde for the inhibition of postharvest fungal pathogens. Diacetyl was able to control the grey mould caused by *B. cinerea* in table grapes with only 0.02  $\mu\text{L mL}^{-1}$  and to reduce the blue rot in mandarins at the same dose up to 60 %. This is a preliminary study about the volatiles produced by the strain *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in which diacetyl has been identified as a promising compound to be applied in active packaging during the postharvest commercialization and storage of fruits. The main drawback is the possible phytotoxicity, although this is highly dependent on the fruit species, the volatile and the dose.

**Keywords:** volatilome, *Bacillus amyloliquefaciens*, diacetyl, benzaldehyde.

## 1. Introduction

The use of biocontrol with antagonistic microorganisms as an alternative to chemical pesticides has gained importance in recent years. The prohibition of numerous active substances by legislation and the easier commercialization of biopesticides based on biological agents has led to an increase in research on this subject. The bacterial genus *Bacillus* has been studied for its high metabolite production capacity, and antibiosis has been reported as the main mode of action against pathogens (Alvarez et al., 2012; Chen et al., 2009; Romero et al., 2007). Normally, these metabolites are soluble compounds such as lipopeptides (iturin A, fengycin, surfactin), polyketides (bacilysin, bacillobactin, difficidin...), lytic enzymes (chitinase, galactanase, isoamylase, lipase...), siderophores (hydroxymate, catecholet or carboxylate) (Kesaulya et al., 2018) or bacteriocins (lantibiotics, pediocin or thuricin) (Abriouel et al., 2011). However, the gaseous metabolites from the species *B. amyloliquefaciens* have also been recently studied as potential antifungals (Asari et al., 2016; Raza et al., 2016; Yuan et al., 2012). These metabolites are commonly denominated as Volatile Organic Compounds (VOCs) and can act directly against the pathogen (direct antibiosis) by destroying the cell wall or indirectly, inducing systemic resistance to the plant (Chen et al., 2008; Zheng et al., 2013). Chemically, these lipophilic compounds (normally alcohols, alkanes, acids or ketones), have low molecular weight and are derived from microorganism biosynthetic pathways as part of their primary and secondary metabolism (Gotor-Vila et al., 2017). They are used for different purposes such as increasing productivity in agriculture or plant protection from fungal diseases (Kai et al., 2007). Numerous bacterial agents belonging to the genus *Streptomyces* or *Pseudomonas* (Karimi et al., 2012; Paulitz et al., 2000; Zhang et al., 2019) and several yeasts such as *Wickerhamomyces*, *Metschnikowia*, *Aureobasidium* or *Saccharomyces* (Contarino et al., 2019; Di Francesco et al., 2015) are able to produce VOCs. However, those synthesized by the genus *Bacillus* have demonstrated high antifungal activity (Chaurasia et al., 2005). This bacterial group produces a wide range of VOCs, also denominated volatilome, including aldehydes, ketones, hydrocarbons, alcohols, etc (Gotor-Vila et al., 2017). The most relevant factor which influences the production of these metabolites is the microorganism. There are many differences in the number of VOCs and their concentration, depending on the bacteria or the yeast, the type of *Bacillus* species or even differences within strains of the

same species. Moreover, the substrate where the antagonist is grown also significantly influences the production due to the differences in the nitrogen or carbon sources (Fiddaman and Rossall, 1994; Gotor-Vila et al., 2017; Raza et al., 2016).

Volatiles are increasingly used as a potential sustainable alternative against phytopathogens. Their application is still uncertain, but considerable progress has been made in research into biofumigation in the preharvest and active packaging in the postharvest phases (Di Francesco et al., 2016; Mari et al., 2016). The easy volatilization of these compounds would allow their displacement through the entire orchard and cultivars, facilitating their scattering and dispersion. In the postharvest stage, VOCs could be considered as ideal antimicrobials since their activity does not require contact between the biocontrol agent and the pathogen or between the biocontrol agent and the food. However, in order to accomplish a reliable application, the study of the mode of action of the antagonist and the pathogen is crucial for understanding the interaction between both microorganisms and their biology. The plant or the fruit as a third factor must also be taken into account (Parafati et al., 2015). The integration of VOCs as a different strategy to achieve higher levels of disease control will contribute to a more successful handling of postharvest diseases. Moreover, the pooling of research results and the identification of the most significant modes of action will result in more effective and productive bioproduct formulation and field and postharvest management.

In this study we have assessed the antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of the volatilome produced by three strains of *B. amyloliquefaciens*, BUZ-14, I3 and I5. The identification of the most predominant gaseous metabolites and their antifungal activity *in vitro* and on fruit has also been tested.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Fungal pathogens**

The fungal pathogen strains used in this study were *Botrytis cinerea* VG1, *Monilinia fructicola* VG 104, *M. laxa* VG 105, *Penicillium digitatum* VG 20, *P. expansum* CECT 20140 and *P. italicum* VG 101. These were obtained from the Plant Food Research Group culture collection (Zaragoza, Spain) and incubated on potato dextrose agar (PDA) (Oxoid Ltd; Hampshire, England) and potato dextrose broth (PDB, Oxoid). Periodically, the strains were transferred to fresh fruit to induce infection and

spore production for their subsequent use as primary inoculum. The spores were transferred to peptone water 0.1 % and counted through a haemocytometer. Finally, the spore solution was adjusted to the corresponding concentration through serial dilutions.

## **2.2 Biocontrol agents**

The antagonistic bacteria used in this study belong to the *Bacillus amyloliquefaciens* species. BUZ-14 was previously identified by Calvo et al. (2019), and the identification of I3 and I5 followed the same protocol as that used by those authors. In short, 16S rDNA was amplified using universal primers (8F and 1492R) and the *gyrB* gene using previously designed specific primers (Calvo et al., 2019).

The phylogenetic trees can be observed in the Supplementary Figures 1 and 2. The strains were grown in 250 mL conical flasks containing 50 mL of 863 medium (10 g L<sup>-1</sup> peptone, 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract and 20 g L<sup>-1</sup> glucose; pH 7) (Yáñez-Mendizábal et al., 2011). A 24 h-old culture on TSA was transferred to 7 mL of Tryptose Soy Broth (TSB, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, U.K.) to prepare a fresh cell suspension of the BUZ-14 strain. The suspension was incubated for 24 h at 30 °C and adjusted to 40 ± 5 % transmittance at 700 nm with a spectrophotometer, corresponding to 2 x 10<sup>8</sup> colony forming units (CFU) per milliliter. This was verified by dilution and plated on TSA medium for 24 h at 30 °C. A hundred µL of this suspension was transferred to each flask with the corresponding low-cost media.

## **2.3 Fruit**

Different fruits were used for this study according to the pathogen tested. Apricots (cv. Pinkcot), grapes (cv. Thomson Seedless), apples (cv. Golden Delicious) and mandarins (cv. Clemenules) were used for *Monilinia* spp., *B. cinerea*, *P. expansum*, *P. digitatum* and *P. italicum*, respectively. All fruits were at the commercial maturity stage and were collected from local packing greenhouses, having been grown in different areas of Spain (La Almunia de Doña Godina, Castellon and Murcia). All fruits were surface-disinfected by immersion in 1 % sodium hypochlorite, rinsed with tap water, and allowed to air-dry at room temperature (20 °C).

#### **2.4 *In vitro* antifungal activity of the volatile fraction or volatilome of BUZ-14, I3 and I5 strains**

Two solid culture media, MOLPA (casein peptone, 30 g L<sup>-1</sup>; saccharose, 20 g L<sup>-1</sup>; yeast extract, 7 g L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.9 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>, 0.45 g L<sup>-1</sup>; citric acid, 0.01 g L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub>, 0.001 mg L<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub>, 0.005 mg L<sup>-1</sup>; NaMoO<sub>4</sub>, 0.004 mg L<sup>-1</sup>; KCl, 0.002 mg L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>, 3.6 mg L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>, 0.14 mg L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05 mg L<sup>-1</sup>; agar-agar, 15 g L<sup>-1</sup>) (Ahimou et al., 2000) and 863A (casein peptone, 10 g L<sup>-1</sup>; yeast extract, 10 g L<sup>-1</sup>; D-glucose, 20 g L<sup>-1</sup>; agar-agar, 15 g L<sup>-1</sup>) were selected for this study since the nutrients present in the medium could significantly influence the metabolite production (Gotor-Vila et al., 2017; Raza et al., 2016). The double sealed technique (Rouissi et al., 2013) was used to determine the *in vitro* antifungal activity of volatiles of BUZ-14, I3 and I5 against the postharvest phytopathogens cited in section 2.1. Briefly, Petri plates were spread with each strain of BCA (section 2.2) onto the surface of each medium and placed against PDA Petri plates previously inoculated with the corresponding pathogen. For the fungal inoculation, an agar plug (5 mm diameter) from actively-growing margins of fungal colonies (7 day-old culture on PDA) was placed at the center of PDA dishes for each *M. fructicola* and *M. laxa*. For *B. cinerea*, *P. expansum* and *P. italicum*, the inoculum was obtained from a 7-day old culture in potato dextrose broth (PDB) (Oxoid Ltd). The concentrations of CFU units were determined using a haemocytometer and a Leica microscope (Leica Microsystems, Germany). The suspensions were adjusted to 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup> and inoculated at the center of PDA dishes using a sterile needle. The plates were sealed with parafilm and incubated at 25 °C for 5 days. Afterwards, the fungal diameter was measured and compared to control plates (without BCA). The results were expressed as the percentage of inhibition (%) in comparison to the control. Five replicates were used per pathogen and BCA, and the experiment was conducted twice.

#### **2.5 Antifungal activity of VOCs produced by BUZ-14, I3 and I5 strains on fruit**

The fruits were wounded with a sterile micropipette tip and subsequently inoculated with 10 µL of pathogen spore suspension (10<sup>4</sup> conidia mL<sup>-1</sup>). The fruits were then arranged for 30 min at ambient temperature to allow the absorption of the inoculum. Afterwards, the incubation chambers were prepared. Cylindrical plastic boxes (1000 mL capacity, disinfected with isopropanol 70 % for 3 min under UV-C) containing 50 mL of MOLPA at the bottom were surface-spread with 250 µL of BCA suspension (10<sup>7</sup> CFU

mL<sup>-1</sup>). The fruits previously inoculated with the pathogen were arranged in the plastic box onto sterile gauze avoiding direct contact between the BCA and the fruit. In the case of the grapes, 3 fruits were placed per box and 3 boxes were used per treatment. Otherwise, one mandarin, apple and apricot were placed individually per box and 6 boxes were used per treatment. In addition, one wound per grape and two wounds in the rest of fruits were made and used as replicates. The boxes were closed, sealed with parafilm and incubated at 25 °C for 5 days. Boxes without BCA inoculation in the agar were included as controls and the experiment was conducted on 3 different days. After incubation, the incidence (percentage of infected fruits) and the severity (diameter of lesion) was determined. In grapes, a severity scale was used due to the difficulty of measuring the diameter. The percentage of the infected area was: 0 = no symptoms; 1 = 1-25 %; 2 = 25-50 % ; 3 = 50-75 %; 4 > 75 %.

The formula followed for the severity evaluation was:

$$DS (\%) = \frac{\sum(dx f) N x D}{x} 100$$

where d= scale of fruit infection; f= frequency of fruits with the infection scale; N= number of fruits examined; D= highest scale found.

And the percentage of inhibition was:

$$PI (\%) = \frac{C - T}{C} x 100$$

where C= lesion diameter of control; T= lesion diameter of treated samples

## **2.6 Identification of VOCs**

The volatiles produced by the bacterial strains were identified. Thus, 100 µL of a 24 h-old 863 liquid culture (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) was inoculated in vials containing 20 mL of MOLP liquid medium. Samples were hermetically closed and incubated at 30 °C for 24 h. Vials without bacterial inoculation were used as controls.

The detection of volatile compounds was carried out using solid phase microextraction (SPME) coupled with gas-chromatography tandem mass spectrometry analysis, following the method previously described by Chaves-López et al. (2015). Briefly, a SPME fibre (75 mm, carboxen/polydimethylsiloxane) was exposed to the headspace of the vials while maintaining the sample at 35 °C for 40 min. Compounds were then desorbed for 10 min in the injection port of the gas chromatograph at 220 °C

for 10 min with the purge valve off (split-less mode). An Agilent Hewlett-Packard 6890 GC gas-chromatograph equipped with a MS detector 5970 MSD (Hewlett-Packard, Geneva, Switzerland) was used for peak separation and detection. A fused silica capillary column was used: a CP-Wax 52 CB (50 m x 0.32 mm – Chrompack – Middelburg, Netherlands) coated with polyethyleneglycol. The injector and FID temperature was 250 °C; the detector temperature 220 °C; and the carrier gas (He) flow rate, 1 mL min<sup>-1</sup>.

Volatile peak identification was carried out by computer matching of mass spectral data with those of the compounds contained in the chromatograph and the Wiley ver. 6 mass spectral database (probability set at >90 %). Positive identification of each chemical constituent was performed whenever possible by comparison with that of authentic standards (Sigma-Aldrich, Germany).

### **2.7 Antifungal activity of single VOCs**

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of previously detected individual volatile compounds were determined both *in vitro* and *in vivo*.

#### **2.7.1 In vitro**

The 11 standards used during the assay can be seen in Table 3, all of them purchased from Sigma-Aldrich (Germany). For the test *in vitro*, the double sealed method (Rouissi et al., 2013) was used similar to that described in section 2.4, although commercial volatiles were used instead of the antagonist. Thus, 100 µL of the pathogen suspension (10<sup>4</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) was spread onto the PDA surface facing one 13 mm diameter disc of cellulose impregnated with the volatile. The Petri plates were sealed and incubated for 96 h at 25 °C. The control was included without the volatile compound. The results were expressed as the MIC needed to suppress the growth of the fungal pathogen. Five plates per pathogen and compound were used as replicates and the experiment was done twice.

#### **2.7.2 In vivo**

In this case, the methodology was similar to that described in section 2.5, although the volatile compound rather than the antagonist was impregnated in a 90 mm diameter Whatman n°4 paper disc (Whatman paper Ltd, Springfield Mill, Maidstone, UK) at the bottom of the box. The single volatiles used in this assay were benzaldehyde, diacetyl, 1-butanol and 3-methyl-1-butanol (isoamyl alcohol), following the *in vitro* results (lower

concentrations were taken into account). The incubation chambers were stored at 25 °C for 120 h and the evaluation of the disease determined as described in section 2.5. The same replication as described in section 2.5 was also carried out.

## 2.8 Statistical analysis

Data were statistically treated by T-student analysis and one-way analysis of variance, and separated by Tukey's honestly significant difference test ( $P < 0.05$ ) using SPSS software (SPSS statistics 22.0).

## 3. Results and discussion

### 3.1 In vitro antifungal activity of volatiles produced by BUZ-14, I3 and I5 strains

The objective of this assay was to determine the most suitable medium for the production of active antifungal volatiles. The results shown in Table 1 revealed significant differences between the two media tested (863A and MOLPA), but also amongst the bacterial strains.

**Table 1.** *In vitro* percentage of inhibition (%) of the volatiles produced by BUZ-14, I3 and I5 against postharvest fungal pathogens. Five replicates were used per pathogen and BCA, and the experiment was conducted twice. Different letters between media mean significant differences for the same BCA and pathogen.

Culture medium	BCA	Percentage of inhibition (%)					
		<i>M. laxa</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>P. italicum</i>	<i>P. expansum</i>	<i>P. digitatum</i>
863A	BUZ-14	2.1 ± 0.6a	58.3 ± 3.1a	3.7 ± 1.1a	54.0 ± 4.5a	0.0 ± 0.0a	0.0 ± 0.0a
	I3	42.8 ± 9.0a	5.3 ± 2.2a	77.1 ± 8.5a	41.1 ± 19.7a	5.1 ± 1.0a	28.0 ± 9.5a
	I5	37.4 ± 5.7a	60.6 ± 12.2a	47.3 ± 3.9a	35.8 ± 15.2a	19.4 ± 4.1a	8.2 ± 7.2a
MOLPA	BUZ-14	65.8 ± 10.4b	72.0 ± 3.3b	54.1 ± 9.9b	80.6 ± 2.2b	6.0 ± 1.2b	20.3 ± 5.6b
	I3	38.9 ± 15.1a	19.3 ± 2.4b	100.0 ± 0.0b	70.1 ± 4.7b	13.5 ± 5.6b	15.3 ± 0.9b
	I5	39.3 ± 0.8a	0.0 ± 0.0b	100.0 ± 0.0b	34.4 ± 11.9a	0.0 ± 0.0b	12.0 ± 9.2a

In general, the volatiles produced in MOLPA was more active than that produced in 863A. For the species *M. laxa*, *M. fructicola*, *P. italicum* and *P. digitatum*, BUZ-14 showed the highest percentages of inhibition (65.8, 72.0, 80.6 and 20.3 %, respectively), although I3 and I5 were more effective against *B. cinerea* (100 % of inhibition). Strain I5 was the least effective against the genus *Penicillium* and the species *M. fructicola*. Therefore, and given that its activity was lower or similar to I3, the strain I5 was omitted from the subsequent studies. These results provided an indication of the different spectrum of volatiles produced by the 3 biocontrol agents.



Some studies have been published concerning the importance of the nutrients used by the bacteria for the production of antibiotics. Normally, these studies have been conducted with lipopeptides (Fernando et al., 2016; Singh et al., 2014), although there are other studies focused on VOCs. For instance, Gotor-Vila et al. (2017) observed differences in the production of VOCs depending on the culture medium. The antifungal activity against *M. laxa*, *M. fructicola* and *B. cinerea* was significantly higher when *B. amyloliquefaciens* CPA-8 was grown in TSA instead of NYDA or NAglu20 (Nutrient Agar supplemented with glucose). Moreover, Raza et al. (2016) tested the influence of two organic fertilizers (BOF) in the production of VOCs by using two *B. amyloliquefaciens* strains against *Ralstonia solanaceum* in tomato. They related the kind of nutrients and also the concentration of nutrients present in the medium with the antimicrobial activity.

On the other hand, Fiddaman and Rossall (1994) pointed out the variation in the production of these volatiles depending on the carbohydrate used as a source of carbon. For example, they observed that a strain of *B. subtilis* grown in basic nutrient agar did not provide high levels of volatile production. However, the addition of *D*-glucose or complex substrates such as cellulose gum or carboxymethylcellulose to the medium significantly increased the activity. Similar to the case of carbohydrates, the nitrogen sources showed significantly different results depending on the type of peptone. The bacteriological peptone and the proteose peptone showed the lowest antifungal activity, although this activity was significant in comparison with the control and nutrient agar, reducing the growth of *Rhizoctonia solani* PJF1 by about 50 %. Nevertheless, the use of mycological peptone and tryptone achieved up to 80 % of reduction of the disease. Normally, the production of volatiles is merely associated with the bacterium growth. However, Fiddaman and Rossall (1994) suggested that this question required some reconsideration. They observed that the nutrient agar supplemented with *L*-glucose was not able to enhance the growth of *B. subtilis*, but able to increase the activity of volatiles. The stimulation of volatile production by nutritional amendments to an inactive basal medium probably reflects the specific metabolism of the components, rather than a simple stimulation of overall biological activity. Our study has shown that the MOLPA medium provides greater antifungal activity against most of the fungal pathogens tested than 863A. MOLPA is a richer medium which, as well as having a greater number of

ingredients, including minerals, contains a 3-fold higher concentration of peptone. In addition, saccharose has been used instead of glucose. Maybe this disaccharide is better exploited by the bacteria to produce the antifungal volatiles.

The importance of the medium can also be observed in fruits. Calvo et al. (2019) studied the production of lipopeptides and the growth capacity of BUZ-14 in different fruits such as peach, orange and apple. BUZ-14 was only able to grow in peaches, probably influenced by the pH, the kind of organic acids and the nutrients available. In addition, the bacterium was able to produce enough metabolites *in planta* to prevent the brown rot caused by *Monilinia* spp, but it was unable to do so in apples and oranges. The initial *in vitro* tests might help to improve the screening of microorganisms and to identify the appropriate formulation in order to produce a bioformulate rich in the essential nutrients required by the BCAs to produce the desirable antifungal VOCs.

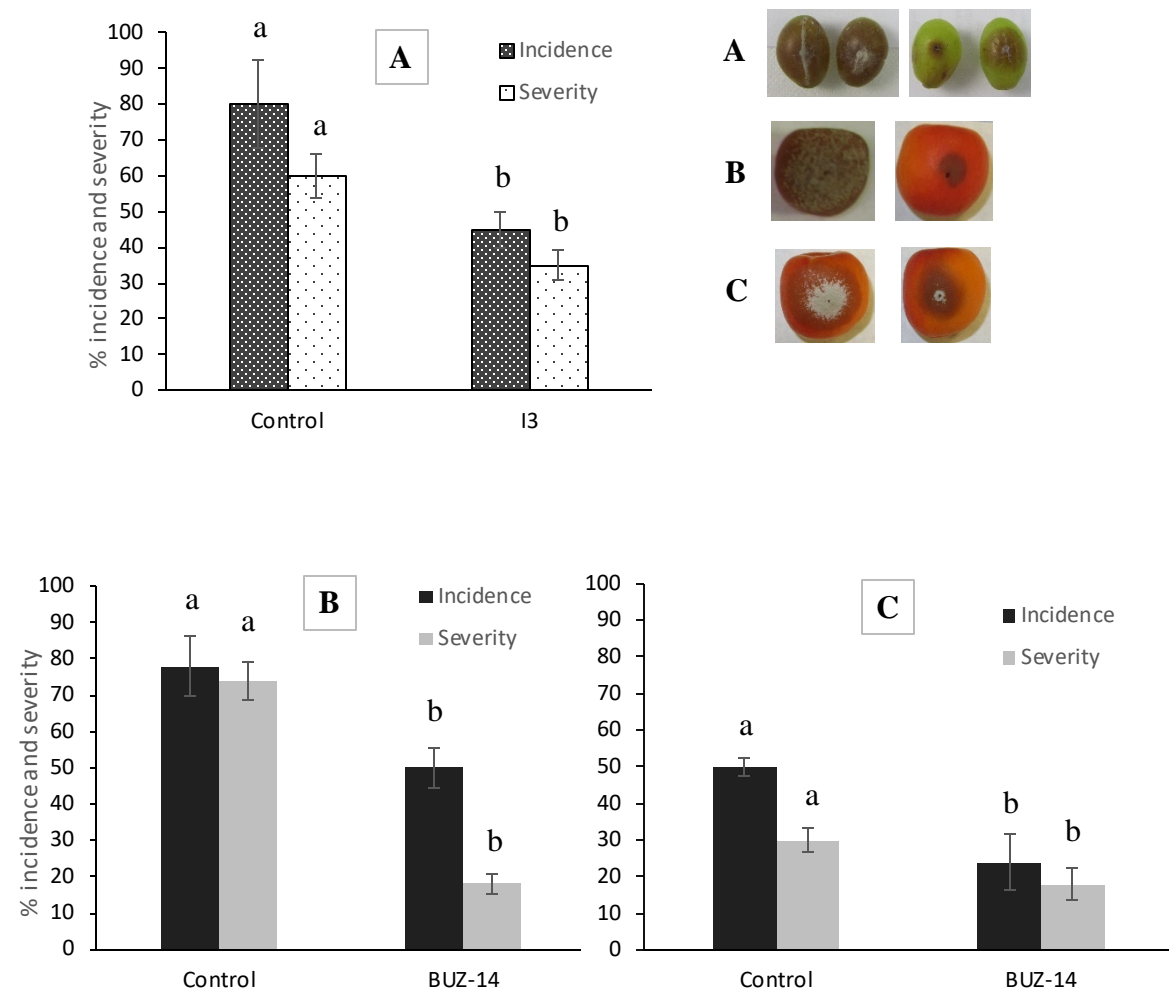
### **3.2 Antifungal activity of VOCs produced by BUZ-14, I3 and I5 strains on fruit**

Following the *in vitro* results, the assays in fruit were conducted on mandarins, table grapes and apricots inoculated with *P. italicum*-BUZ-14, *B. cinerea*-I3, and *M. fructicola* and *M. laxa*-BUZ-14, respectively.

In contrast to the *in vitro* results, BUZ-14 was unable to reduce either the incidence or the severity of *P. italicum* in mandarins. However, the inhibitions correlated more closely with the *in vitro* results in the case of apricots and grapes. As can be observed in Figure 1, the strain I3 reduced the incidence and severity of *B. cinerea* from 80 to 45 % and from 60 to 35 %, respectively. This is approximately a 50 % reduction, suggesting that the volatiles are another kind of relevant substances with which to continue working and testing. Similar results were obtained against *Monilinia* spp., where both the incidence and the severity were significantly reduced.

Gotor-Vila et al. (2017) also studied the antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* CPA-8 against *M. fructicola*, *M. laxa* and *B. cinerea* in sweet cherry fruits, although they only reduced significantly the incidence against *M. fructicola*. These results are in agreement with the present study since *M. fructicola* was the most susceptible against the VOCs produced by BUZ-14. On the other hand, we do not think that one BCA would be able to exert an inhibitory effect against several pathogens and on several cultivars. As many studies show, BCAs have more affinity, in terms of

antifungal activity, against some specific pathogens and cultivars (Calvo et al., 2017; Gao et al., 2016; Yáñez-Mendizábal et al., 2011). The strain I3 has been used against *B. cinerea* because the *in vitro* results were remarkably better than with BUZ-14. This preliminary screening might be useful in order to obtain better subsequent *in vivo* inhibitions. Other studies such as those conducted by Arrebola et al. (2010), Gao et al. (2018) or Lim et al. (2017) agree on the importance of the biocontrol agent chosen. The results can be notably different depending on the interaction between the BCA and the pathogen, making the commercial product more or less effective during the final application.



**Figure 1.** Incidence and severity of *B. cinerea* (A) in table grapes and *M. fructicola* (B) and *M. laxa* (C) in apricots treated with the volatiles produced by the strains I3 and BUZ-14

### 3.3 Identification of VOCs produced by *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 and I3

For the identification of volatile compounds, an extraction from the vial headspace containing MOLP medium was carried out. Table 2 shows the qualitative analysis of VOCs produced by *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 and I3. The table shows some compounds detected both in the medium with the bacteria and in the medium alone (control). These volatiles were 2-heptanone, 2-ethylhexanol, 1-phenylethanol, isovaleric acid, 2,3-dimethylpyrazine and tetramethylpyrazine. However, there were others detected in both antagonistic strains or only produced by one of them, i.e. benzaldehyde, butyl format, nonane and pyrazine or 8-methylheptadecane and 2-undecanone. Although the analysis was exclusively qualitative, a preliminary classification with the areas of the compounds obtained during the analysis might be estimated. Hence, the highest areas and therefore the highest concentration of the compounds produced by BUZ-14 were identified in the following order: isoamyl alcohol > benzaldehyde > 1-butanol > 2-nonanone > acetoin > pyrazine; whereas those produced by I3 were as follows: isoamyl alcohol > 1-butanol > 2-nonanone > acetoin > 2-undecanone > pyrazine. These metabolites have been partially found in other *Bacillus* strains reported in the bibliography. For example, Arrebola et al. (2010) compared the volatiles produced by two strains of *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* and their effect on the reduction of *Penicillium* spp. in oranges. They observed significant differences in the volatile production: 21 compounds were detected in *B. subtilis* PPCB001 and only 8 were identified in *B. amyloliquefaciens* PPCB004. However, the acetoin was the predominant compound in both BCAs (45.98 and 97.52 %, respectively), but only the strain PPCB004 was able to suppress the rot caused by *P. crustosum* in oranges. Some of the compounds produced by PPCB004 are consistent with the findings of the present study in which volatiles such as isoamyl alcohol, acetoin, 2-heptanone, 2-nonanone or 2-undecanone have also been detected. This study shows the difference in volatile production depending on the strain used and suggests that the number of volatiles is not the most important factor given that the prevalence of the active volatile might be the crucial factor in the prevention of postharvest diseases. Another study conducted by Chaves-López et al. (2015) also with *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* strains showed about 30 compounds produced by each strain. They also detected volatiles such as benzaldehyde, 2-heptanone,

isoamyl alcohol, pyrazines. The study demonstrated that isoamyl alcohol, 2-methyl propanoic acid, 3-methyl butanoic acid and carbon disulphide reduced the growth of the fungal pathogens *Moniliophthora perniciosa* and *Fusarium oxysporum* in *in vitro* tests.

On the other hand, it is important to point out that the methodology applied to collect and detect the VOCs might strongly influence the results and confuse the comparison between studies (Gotor-Vila et al., 2017). Therefore, the variation in volatile identification among studies is to be expected due to the use of different types of equipment and material.

### 3.4 Antifungal activity of single volatile compounds

After the identification of the volatiles produced by the biocontrol agents, the objective was to identify those with antifungal activity. Both *in vitro* and *in vivo* studies as described in section 2.7 were carried out and the MICs were established.

#### 3.4.1 *In vitro* tests

The *in vitro* results corresponding to the single volatile MICs can be observed in Table 3. Some compounds were removed from these assays due to their toxicity, availability or extremely bad odour (2-ethylhexanol, butyl formate, nonane, 8-methylheptadecane, isovaleric acid and tetramethylpyrazine). Other volatiles such as acetoin, 2,3-butanediol or 2,3-dimethylpyrazine only exerted a partial inhibition (PI), meaning that the MIC was not achieved and above 18.24  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , the highest concentration tested. 2-nonanone and 2-undecanone were very effective against *B. cinerea* and *Monilinia* spp., but were unable to inhibit completely the growth of the three *Penicillium* strains tested. The isoamyl alcohol also showed a notable antifungal activity against *B. cinerea* and *Monilinia* spp., with MICs of 1.25  $\mu\text{L mL}^{-1}$  for *B. cinerea* and *M. laxa*, and even higher for *M. fructicola* a MIC of 0.38  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . However, for *Penicillium* spp. the MICs were significantly higher, inoculating 9.38  $\mu\text{L mL}^{-1}$  to suppress *P. italicum* and *P. digitatum* and 12.50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  for *P. expansum*. The most active volatiles were benzaldehyde and diacetyl, obtaining the lowest MICs for all the pathogens tested. For example, only 0.06  $\mu\text{L mL}^{-1}$  of diacetyl were necessary to inhibit *Monilinia* spp. in Petri plates and 0.25  $\mu\text{L mL}^{-1}$  in the case of *P. digitatum* and *P. italicum*. The benzaldehyde inhibited the growth of *B. cinerea* and *P. expansum* with only 0.63  $\mu\text{L mL}^{-1}$  and *M. fructicola* with 0.38  $\mu\text{L mL}^{-1}$ .

**Table 2.** Identification of the volatiles produced by *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 and I3 in MOLP medium after 24 h of incubation at 30 °C.

Nº	Family	Identified compound	Molecular formula	Molecular weight	Molecular (g/mol)	Retention time	Blank	BUZ-14	I3
1	Aldehydes	Benzaldehyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O		106.12	16.3	nd <sup>a</sup>	x	nd
2		Diacetyl/Butane-2,3-dione	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		86.08	7.0	nd	x	x
3		2-heptanone	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O		114.18	13.25	x <sup>b</sup>	x	x
4	Ketones	Acetoin/3-hydroxy-2 butanone	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>		88.11	17.31	nd	x	x
5		2-nonanone	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O		176.22	19.98	nd	x	x
6		2-undecanone	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O		170.29	25.26	nd	nd	x
7		1-butanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O		74.12	12.08	nd	x	x
8		Isoamyl alcohol/3-methyl-1-butanol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O		88.15	14.29	nd	x	x
9	Alcohols	2-ethylhexanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O		130.23	22.75	x	x	x
10		2,3-butanediol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>		90.12	24.21	nd	x	x
11		1-phenylethanol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O		122.16	33.06	x	x	x
12	Esters	Butyl format	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>		102.13	12.00	nd	x	nd
13	Hydrocarbures	Nonane	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>		128.20	8.55	nd	x	nd
14		8-methylheptadecane	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>		254.50	14.63	nd	nd	x
15	Acids	Isovaleric acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>		102.13	27.55	x	x	x
16		2,3-dimethylpyrazine	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>		108.14	18.04	x	x	x
17	Pyrazines	Pyrazine	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>		80.09	14.50	nd	x	nd
18		Tetramethylpyrazine	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>		136.19	22.38	x	x	x

<sup>a</sup>nd: not detected<sup>b</sup>x: detected

Other studies have reported the single antifungal activity *in vitro* of VOCs produced by various antagonistic strains. Zheng et al. (2013) used single volatiles identified from *B. pumilus* and *B. thuringiensis* strains and observed that 2-nonanone,  $\beta$ -benzeneethanamine and 2-decanone completely inhibited the growth *in vitro* of *Colletotrichum gloeosporioides* (a causal agent of Anthracnose in mango fruit) at only  $0.1 \mu\text{L mL}^{-1}$  while the thymol required between 50 and  $100 \text{ mg L}^{-1}$  for its total inhibition. Our study has demonstrated that compounds such as 2-nonanone or 2-undecanone also needed low concentrations to completely inhibit *Monilinia* spp. or *B. cinerea*, ranging between  $0.25$  and  $1.25 \mu\text{L mL}^{-1}$ . However, the MICs were higher when the genus *Penicillium* was tested ( $> 18.24 \mu\text{L mL}^{-1}$ ). Gotor-Vila et al. (2017) established that the thiophene produced by *B. amyloliquefaciens* CPA-8 was the volatile responsible for the inhibition of *Monilinia* spp and *B. cinerea*. Chaves-López et al. (2015) found that 2-butanone was the most suppressive volatile against *Moniliophthora perniciosa* and 3-methyl butanoic acid against *Fusarium oxysporum*, while Fernando et al. (2005) identified n-decanal produced by *Bacillus* sp. as being responsible for *Sclerotinia sclerotiorum* inhibition. The thiazole family has also been described as powerfully antifungal, as Yuan et al. (2012) reported. The benzothiazole phenol or 2,3,6 trimethylphenol from *B. amyloliquefaciens* also exerted a significant effect against *F. oxysporum*.

The current study demonstrates that diacetyl has the highest antifungal capacity against the fungal pathogens. The antimicrobial properties of diacetyl have been studied over many years (Jay, 1982). However, most of the studies have focussed on its antibacterial activity. Jay (1982) reported its bactericidal capacity against gram negative bacteria and the bacteriostatic effect against gram positives with doses ranging from  $200$ - $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Lanciotti et al. (2003) also reported the antimicrobial activity of this volatile against 3 pathogenic bacteria (*E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*).  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  was necessary for *E. coli* and *S. aureus* suppression whereas *L. monocytogenes* proved to be the most resistant microorganism. On the other hand, there are fewer references to its antifungal activity in the literature. Major studies have investigated the diacetyl produced by *Lactobacillus* strains during fermentation, such as Aunsbjerg et al. (2015) who reported this volatile as the main inhibitor of *Penicillium* spp. strains isolated from fermented dairy products.

Benzaldehyde is the second most powerful single volatile produced by BUZ-14 after diacetyl (Table 3), its MIC being very low for all the fungal pathogens. Other studies such as that by Gao et al. (2018) have observed a positive correlation between this VOC and the inhibition of *M. fructicola* *in vitro*. However, it was unable to reduce the disease in peaches. Rajer et al. (2017) demonstrated the effect of benzaldehyde against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, the bacterium responsible for ring rot in potato. It was able to reduce the microbial counts up to 6 log units. Benzaldehyde has also been reported as a promising alternative against *Colletotrichum acutatum* *in vitro* (Che et al., 2017).

This information provides clues to the importance of testing the pathogens individually as they are mould-specific. However, the concentration produced by these antagonists is normally very low, so it is unlikely that the antifungal activity would be uniquely due to single VOCs. The synergisms between them might be the most important reason for the activity. In our opinion, single tests are mandatory in order to identify the most relevant volatiles, but further studies to find out the relationship amongst all of them will be required in future investigations. To the best of our knowledge, this is the first study showing such low MICs of benzaldehyde and diacetyl against *M. fructicola*, *M. laxa*, *B. cinerea* and *Penicillium* spp. (see Table 3). In addition, 2-nonanone and 2-undecanone have shown low concentrations for the *in vitro* inhibition of *Monilinia* spp. and *B. cinerea*.

#### **3.4.1 In vivo tests**

Following the *in vitro* results, three pure volatiles (diacetyl, benzaldehyde and isoamyl alcohol) were tested against some postharvest fungal rots in different fruits: *P. italicum* in mandarins, *B. cinerea* in table grapes, *P. expansum* in apples and *M. fructicola* and *M. laxa* in apricots. The results can be observed in Table 4 as well as the standards used and the fruits tested. Moreover, some of the most representative inhibitions are shown in Figure 2.

*P. italicum* was suppressed from the mandarin up to 80 % when treated with 0.025  $\mu\text{L mL}^{-1}$  of diacetyl. However, phytotoxicity caused by the volatile appeared when the dose was increased up to 0.05  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Benzaldehyde was not able to totally inhibit the blue rot in this fruit even at 0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (37 % of inhibition). Isoamyl alcohol at 0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$



$\text{mL}^{-1}$  did not show any inhibition although it caused phytotoxicity at  $0.2 \mu\text{L mL}^{-1}$ . Interestingly, *B. cinerea* in grapes showed the best results *in vivo*. Diacetyl at  $0.02 \mu\text{L mL}^{-1}$  was enough to control the grey mould in grapes and no phytotoxicity occurred even at  $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$ .

Benzaldehyde also inhibited the growth of this mould at  $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$  but by doubling the dose phytotoxic damage appeared. This fact could generate uncertainty during the development of new applications due to the proximity between the active and the phytotoxic doses. Isoamyl alcohol was also able to inhibit the pathogen, although at higher doses ( $0.1 \mu\text{L mL}^{-1}$ ). The apple showed significant sensitivity to the volatiles used in this study since most of the compounds, except benzaldehyde, caused phytotoxicity to the fruit at the doses employed. The phytotoxic dose of diacetyl was  $0.025 \mu\text{L mL}^{-1}$  and that of isoamyl alcohol was  $0.1 \mu\text{L mL}^{-1}$ . On the other hand, benzaldehyde was able to inhibit blue rot up to 22 % by treating the fruit with  $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$ , but even doubling the dose did not improve the inhibition (Table 4). Finally, the apricots showed the highest sensitivity to diacetyl and benzaldehyde since doses as low as  $0.02 \mu\text{L mL}^{-1}$  caused phytotoxicity. However, significant differences were found between both species when isoamyl alcohol was applied (Table 4). *M. fructicola* did not suffer any antifungal effect but *M. laxa* was completely inhibited with  $0.02 \mu\text{L mL}^{-1}$  of isoamyl alcohol.

The phytotoxicity in the fruits used during the study was generally manifested as browning/darkening affecting the entire fruit, rendering the product completely uncommercial. The fruits with phytotoxicity did not show any disease. This could be due to the excessive doses of the volatiles, which might directly inhibit the growth of the pathogens, or because of the negative correlation between the phytotoxicity and the fungi. It could be that the effect on the plant physiology caused by the volatiles also has an influence over the hyphal or spore development. More studies are required in order to obtain clearer conclusions about this issue. These results demonstrate, firstly, the importance of the type of cultivar when these volatiles are applied. The sensitivity shown by the apricots and also the apples differs completely from that shown by the grapes or mandarins. During the *in vitro* assays the dose of volatile was also shown to be a relevant factor. This study also shows that depending on the volatile used, the doses must be regulated depending on the cultivar and the pathogen.

**Table 3.** *In vitro* Minimum Inhibitory Concentrations of several pure volatiles produced by *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 against some fungal postharvest pathogens

Volatile	MIC ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ of head space) <i>in vitro</i>					
	<i>B. cinerea</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. laxa</i>	<i>P. italicum</i>	<i>P. expansum</i>	<i>P. digitatum</i>
Benzaldehyde	0.63	0.38	1.25	1.25	0.63	1.25
Diacetyl	0.05	0.06	0.06	0.25	0.30	0.25
2-heptanone	2.5	3.12	3.12	8.75	6.25	10
Acetoin	PI <sup>a</sup>	PI	PI	PI	PI	PI
2-nonanone	0.63	1.25	1.25	PI	PI	PI
2-undecanone	0.25	1.25	0.38	PI	PI	PI
1-butanol	6.08	7.60	10.10	15.2	PI	PI
Isoamyl alcohol	1.25	0.38	1.25	9.38	12.50	9.38
2,3-butanediol	PI	PI	PI	PI	PI	PI
1-phenylethanol	9.38	PI	9.38	PI	PI	PI
2,3-dimethylpyrazine	PI	PI	PI	PI	PI	PI

<sup>a</sup>Partial inhibition at  $18.24 \mu\text{L mL}^{-1}$  (maximum concentration tested)

As can be observed in Table 4, the suppression of *B. cinerea* in grapes was very successful. The four compounds are able to control the grey mould and at low doses, mainly in the case of diacetyl and benzaldehyde, although it is important to highlight the close proximity between the MIC and the phytotoxicity in the latter compound.

To the best of our knowledge, *in vivo* studies regarding the volatiles produced by microorganisms and mainly by bacteria in fruit are scarce. Most of the published reports have focused on the identification of the volatiles produced by the strains and subsequent *in vitro* tests (Lim et al., 2017; Morita et al., 2019; Wu et al., 2019). Probably many authors have decided to reject the tests *in planta* due to the difficulties in their implementation. However, we are optimistic about active packaging with these compounds, either including the bacteria or the VOCs as pure compounds. The residue remaining in the fruit must also be studied in order to ensure safety for human health since some of these compounds could have a certain degree of toxicity, as well as to test for any possible undesirable odour remaining in the product. A combination of strains which produce different VOCs or different pure VOCs in minimum doses that do not produce phytotoxicity or insignificant undesirable aromas might be an interesting solution to take into account for the final implementation. Diacetyl has hardly any toxicity and has been classified as GRAS (Generally Recognized As Safe) by the American Food and Drug Administration (FDA). Moreover, no scientific reports examining the antifungal activity of diacetyl against spoilage postharvest moulds have been found in the bibliography. Most reports address its antibacterial activity so, to the best of our knowledge, this is the first article showing the antifungal activity of this VOC.

Benzaldehyde has also been shown to have low toxicity. Benzaldehyde is another volatile produced by BUZ-14 whose *in vitro* antifungal activity has been amply demonstrated (Table 3). As previously mentioned, there are numerous publications in the literature about VOCs *in vitro* and their effectiveness against many diseases. However, the activity of this VOC against postharvest rots in fruit has not been studied neither in depth in the scientific literature. Benzaldehyde has been classified as a GRAS substance by the FDA and as a flavouring substance in the European Union. The oral LD<sub>50</sub> of benzaldehyde in rats and mice ranged from 800 to 2850 mg Kg<sup>-1</sup> (Andersen, 2006).

Zhou et al. (2019) have recently studied the antifungal activity of VOCs produced by *B. subtilis* CF-3 against *M. fructicola* in peaches. In this case, benzothiazole was the

compound responsible for the inhibition. These authors studied the mode of action of this volatile against the pathogens in depth, concluding that this VOC is able to activate disease-resistant enzymes to prevent the invasion of pathogenic fungi and induce resistance in peach. They suggest that their study should serve as a theoretical basis for future applications. However, they do not mention the toxicological risks. Ginsberg et al. (2011) reported the possible toxic effects in rats when they are exposed to this compound, but also conclude that more studies would be needed in order to support their preliminary study. This means that there remain many gaps in our knowledge of this compound and many others. In the present study we suggest diacetyl as a strong volatile compound whose ability to control *B. cinerea* in grapes has been demonstrated. Furthermore, the *in vitro* results suggest that the compound could be very effective against *Monilinia* spp. in other stone fruits less sensitive than apricots. An active packaging with diacetyl might be a good alternative to maintain the shelf-life of fruits during transportation and commercialization. Restrictions on the use of postharvest pesticides in some cultivars could encourage the design of new forms of packaging with VOCs as active substances.



**Figure 2.** Mandarins (left) grapes (centre) and apples (right) treated with diacetyl  $0.01 \mu\text{L mL}^{-1}$ , benzaldehyde  $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$  and diacetyl  $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$ , respectively. The pictures located above are the control and those below correspond to the treated fruit.

**Table 4.** Percentage of inhibition of several pure volatiles produced by *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 against four fungal postharvest pathogens.

Pathogen	Fruit	Volatile	Concentration (μL/mL)	% inhibition		
<i>P. italicum</i>	mandarin	diacetyl	0.01	60		
			0.025	80		
			0.05	100		
						(phytotoxicity)
		benzaldehyde	0.025	10		
			0.05	16		
			0.1	37		
		isoamyl alcohol	0.1	NI		
			0.2	100		
					(phytotoxicity)	
<i>B. cinerea</i>	grape	diacetyl	0.01	80		
			0.02	100		
			0.05	100		
		benzaldehyde	0.01	9		
			0.025	12		
			0.05	100		
					100	
					(phytotoxicity)	
		isoamyl alcohol	0.025	20		
			0.05	60		
0.1	100					
diacetyl	0.01	25				
	0.025	100				
	0.05	(phytotoxicity)				
		100				
		(phytotoxicity)				
<i>P. expansum</i>	apple	benzaldehyde	0.01	NI		
			0.025	15		
			0.05	22		
			0.1	24		
		isoamyl alcohol	0.1	100		
				(phytotoxicity)		
		diacetyl	0.006	NI		
			0.02	100		
				(phytotoxicity)		
				100		
<i>M. fructicola</i>	Apricot	benzaldehyde	0.02	100		
				(phytotoxicity)		
		isoamyl alcohol	0.02	4.2		
				NI		
				100		
<i>M. laxa</i>	Apricot	diacetyl	0.006	NI		
			0.02	100		
			(phytotoxicity)			
		benzaldehyde	0.02	100		
				(phytotoxicity)		
isoamyl alcohol	0.02	100				

<sup>a</sup> No inhibition

## 4. Conclusions

This study has assessed a mode of action based on the production of Volatile Organic Compounds produced by different strains belonging to the *B. amyloliquefaciens* species and mainly to the strain BUZ-14. The identification has shown at least 12 compounds for which *in vitro* tests have highlighted diacetyl, benzaldehyde, 2-heptanone and isoamyl alcohol whose MICs were lower than those previously reported in the scientific literature. The study in fruits has demonstrated the considerable potential of compounds such as diacetyl or benzaldehyde as promising antifungal volatiles. Diacetyl was able to control the disease caused by *B. cinerea* in table grapes at doses ranging between 0.01-0.02  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and reduced the blue rot in mandarins up to 60 % at 0.01  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The application of antagonist volatile-producers or pure compounds considered as GRAS in active packaging might be an alternative means of postharvest disease control to compensate for the lack of pesticides authorized by the regulations.

## Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain through funds awarded for the Project RTC-2015-4121-2 and also by the Aragon Government for the Project LMP130\_18. Funding from the Diputación General de Aragón and Fondo Social Europeo is also acknowledged (grant T07\_17R). H. Calvo is the beneficiary of a pre-doctoral grant C195/2015 from the Aragón Regional Government (Spain).

## References

- Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N. Ben, Galvez, A., 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 201–232. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
- Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofré, E., 2012. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP 218 and ARP 23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 112, 159–174. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Korsten, L., 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biol. Control* 53, 122–128. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.11.010
- Asari, S., Matzén, S., Petersen, M.A., Bejai, S., Meijer, J., 2016. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: Plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, 1–11. doi:10.1093/femsec/fiw070
- Aunbjerg, S.D., Honoré, A.H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F.K., Benfeldt, C., Skov, T., Knøchel, S., 2015. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *Int. J. Food Microbiol.* 194, 46–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.007
- Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., Venturini, M.E., 2017. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases.

- Food Microbiol. 63, 101–110. doi:10.1016/j.fm.2016.11.004
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D., Venturini, M.E., 2019. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. Food Microbiol. 82, 62–69. doi:10.1016/j.fm.2019.01.010
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B., Colvin, N., 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. Microbiol. Res. 160, 75–81. doi:10.1016/j.micres.2004.09.013
- Chaves-López, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., Stellarini, A., Corsetti, A., Paparella, A., 2015. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. J. Appl. Microbiol. 119, 487–499. doi:10.1111/jam.12847
- Che, J., Liu, B., Liu, G., Chen, Q., Lan, J., 2017. Volatile organic compounds produced by *Lysinibacillus* sp. FJAT-4748 possess antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. Biocontrol Sci. Technol. 27, 1349–1362. doi:10.1080/09583157.2017.1397600
- Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., Yu, Z., 2008. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. Biotechnol. Lett. 30, 919–923. doi:10.1007/s10529-007-9626-9
- Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., M??gel, G., Kunz, S., Borriss, R., 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. J. Biotechnol. 140, 38–44. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.10.015
- Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L., Restuccia, C., 2019. Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. Food Microbiol. 82, 70–74. doi:10.1016/j.fm.2019.01.008
- Di Francesco, A., Martini, C., Mari, M., 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? Eur. J. Plant Pathol. 145, 711–717. doi:10.1007/s10658-016-0867-0
- Di Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L., Mari, M., 2015. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. Biol. Control 81, 8–14. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.10.004
- Fernando, P.M., Flavio, H.V. de M., Marc, O., Laurent, F., Paulo, E. de S., Jorge, T. de S., 2016. Effect of temperature, pH and substrate composition on production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* 629. African J. Microbiol. Res. 10, 1506–1512. doi:10.5897/AJMR2016.8222
- Fernando, W.G.D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A.S., Savchuk, S.C., 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biol. Biochem. 37, 955–964. doi:10.1016/j.soilbio.2004.10.021
- Fiddaman, P.J., Rossall, S., 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 76, 395–405. doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb01646.x
- Gao, H., Li, P., Xu, X., Zeng, Q., Guan, W., 2018. Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. Front. Microbiol. 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00456
- Gao, H., Xu, X., Dai, Y., He, H., 2016. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* CF-3, a bacterium from fermented bean curd for controlling postharvest diseases of peach fruit. Food Sci. Technol. Res. 22, 377–385. doi:10.3136/fstr.22.377
- Ginsberg, G., Toal, B., Kurland, T., 2011. Benzothiazole toxicity assessment in support of synthetic turf field human health risk assessment J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues 74, 1175–1183. doi:10.1080/15287394.2011.586943
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., Mari, M., 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. Food Microbiol. 64, 219–225. doi:10.1016/j.fm.2017.01.006
- Jay, J.M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl 44, 525–532.
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G., Piechulla, B., 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Arch. Microbiol. 187, 351–360. doi:10.1007/s00203-006-0199-0
- Karimi, E., Sadeghi, A., Dehaji, P.A., Dalvand, Y., Omidvari, M., Kakuei Nezhad, M., 2012. Biocontrol activity of salt tolerant *Streptomyces* isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet. Biocontrol Sci. Technol. 22, 333–349. doi:10.1080/09583157.2012.658552
- Kesaulya, H., Hasinu, J. V., Tuhumury, G.N.C., 2018. Potential of *Bacillus* spp. produces siderophores insuppressing thewilt disease of banana plants. IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.

102. doi:10.1088/1755-1315/102/1/012016

Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M.E., Gardini, F., 2003. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* 20, 537–543. doi:10.1016/S0740-0020(02)00159-4

Lim, S.M., Yoon, M.Y., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Shin, T.S., Park, H.W., Yu, N.H., Kim, Y.H., Kim, J.C., 2017. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. Plant Pathol. J. 33, 488–498. doi:10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073

Mari, M., Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., 2016. Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. Postharvest Biol. Technol. 122, 70–81. doi:10.1016/j.postharvbio.2016.04.014

Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., Ueno, D., Someya, T., 2019. Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. Heliyon 5, e01817. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01817

Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G., 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. Food Microbiol. 47, 85–92. doi:10.1016/j.fm.2014.11.013

Paulitz, T., Nowak-Thompson, B., Gamard, P., Tsang, E., Loper, J., 2000. A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens. J. Chem. Ecol. 26, 1515–1524. doi:10.1023/A:1005595927521

Rajer, F.U., Wu, H., Xie, Y., Xie, S., Raza, W., Tahir, H.A.S., Gao, X., 2017. Volatile organic compounds produced by a soil-isolate, *Bacillus subtilis* FA26 induce adverse ultra-structural changes to the cells of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the causal agent of bacterial ring rot of potato. Microbiol. (United Kingdom) 163, 523–530. doi:10.1099/mic.0.000451

Raza, W., Wei, Z., Ling, N., Huang, Q., Shen, Q., 2016. Effect of organic fertilizers prepared from organic waste materials on the production of antibacterial volatile organic compounds by two biocontrol *Bacillus amyloliquefaciens* strains. J. Biotechnol. 227, 43–53. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.04.014

Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H.,

Dufour, S.E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A., 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Mol. Plant-Microbe Interact. 20, 430–440. doi:10.1094/MPMI-20-4-0430

Rouissi, W., Ugolini, L., Martini, C., Lazzeri, L., Mari, M., 2013. Control of postharvest fungal pathogens by antifungal compounds from *Penicillium expansum*. J. Food Prot. 76, 1879–1886. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-072

Singh, A., Rautela, R., Cameotra, S., 2014. Substrate dependent *in vitro* antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2. Microb. Cell Fact. 13, 67. doi:10.1186/1475-2859-13-67

Wu, Y., Zhou, J., Li, C., Ma, Y., 2019. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. Microbiologyopen 1–14. doi:10.1002/mbo3.813

Yáñez-Mendizábal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C., Teixidó, N., 2011. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. Biocontrol Sci. Technol. 21, 409–426. doi:10.1080/09583157.2010.541554

Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., Huang, Q., 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5942–5944. doi:10.1128/aem.01357-12

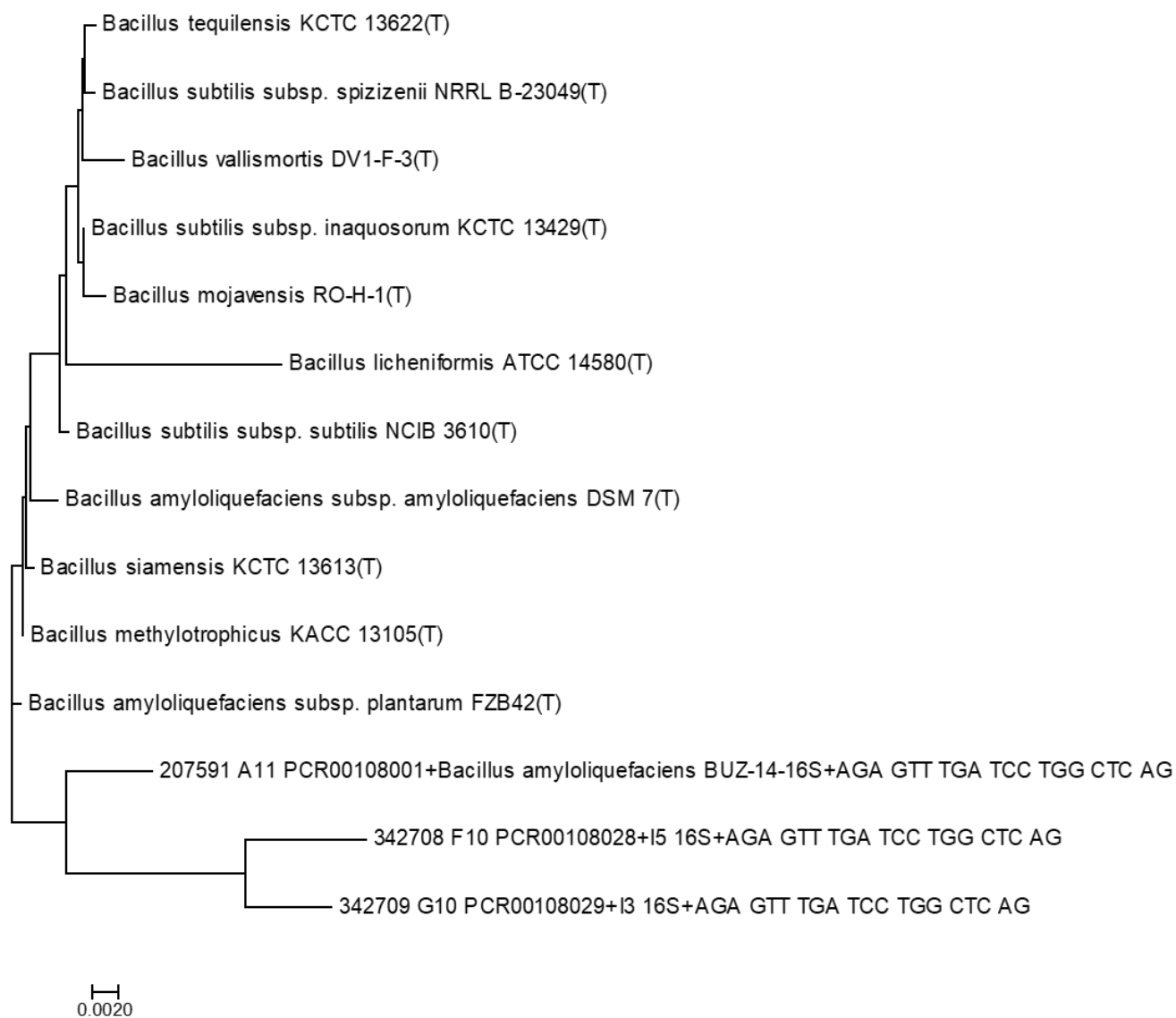
Zhang, Y., Li, T., Liu, Y., Li, X., Zhang, C., Feng, Z., Peng, X., Li, Z., Qin, S., Xing, K., 2019. Volatile Organic Compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 as biological fumigants to control *Ceratocystis fimbriata* in postharvest sweet potatoes. J. Agric. Food Chem. 67, 3702–3710. doi:10.1021/acs.jafc.9b00289

Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., Li, Y., 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. Biol. Control 65, 200–206. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.02.004

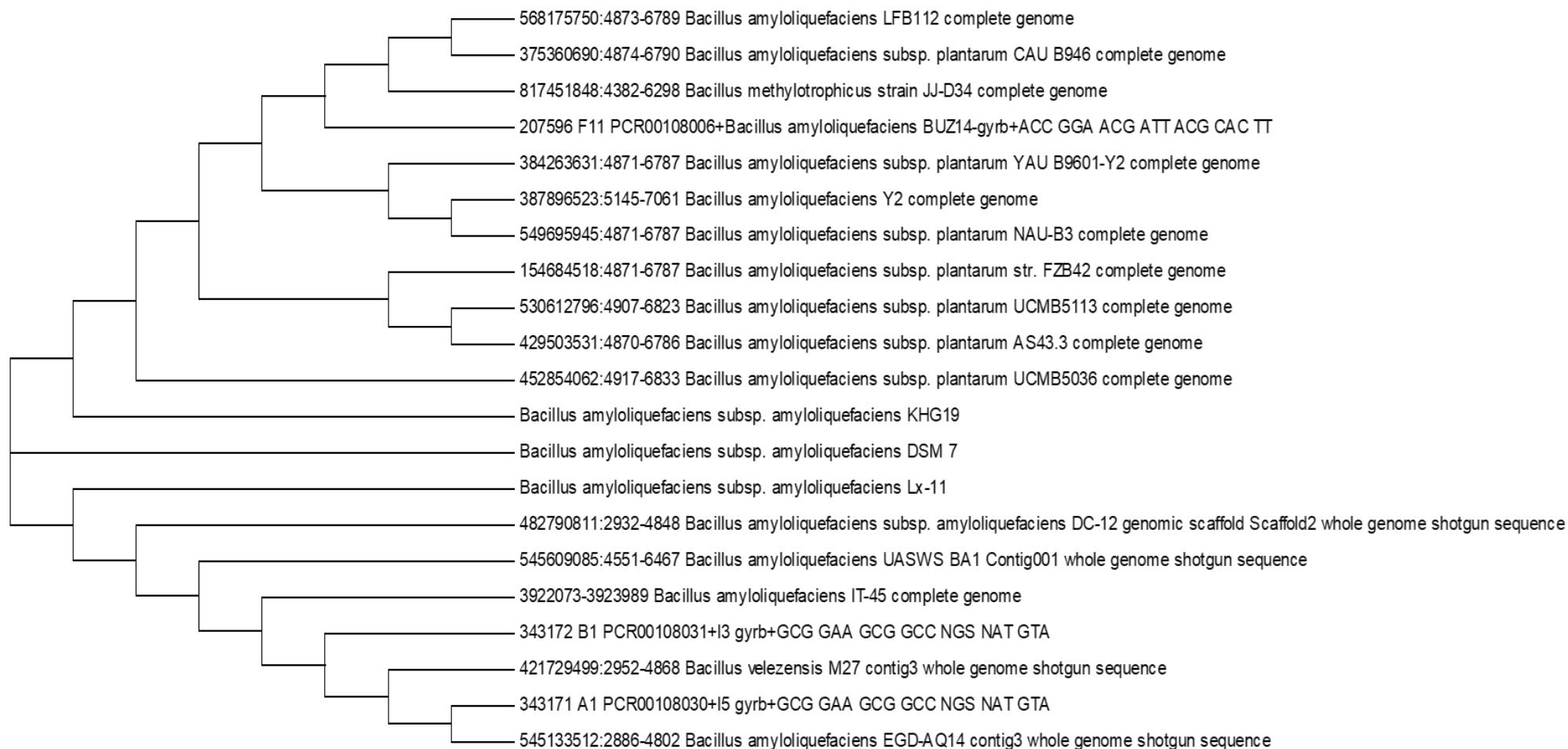
Zhou, M., Li, P., Wu, S., Zhao, P., Gao, H., 2019. *Bacillus subtilis* CF-3 Volatile Organic Compounds inhibit *Monilinia fructicola* growth in peach fruit. Front. Microbiol. 10, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2019.01804



Supplementary material



**Supplementary Figure 1.** Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14, I3 and I5. Numbers at nodes of the tree indicate the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates).



**Supplementary Figure 2.** Neighbour-joining phylogenetic tree based on *gyrB* gene sequences of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14, I3 and I5. Numbers at nodes of the tree indicate the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates)

**Capítulo 4. Development of bioformulates based on *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 through low cost ingredients and their preliminary field trials against grey mould in vineyards and postharvest brown rot in nectarines**

### **Highlights**

- MM medium found to be the most suitable liquid medium for large-scale formulation.
- *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 reduced the incidence of *B. cinerea* in grapevines by 50%.
- BUZ-14 achieved 43 % brown rot reduction in postharvest nectarines.

**ABSTRACT**

This work studies the development of suitable low cost bioformulates effective against several postharvest pathogens such as *Monilinia laxa* and *M. fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *P. italicum* or *P. digitatum in vitro*. Moreover, a preliminary field trial has been carried out to test the effectiveness of the bioformulates against grey rot in vineyards and for postharvest treatment in nectarines stored at ambient and cool temperatures. Dehydrated and freeze-dried formulates have been developed in addition to another liquid medium denominated MM, which has been large-scaled for further field and postharvest trials. This formulate remained stable for one year when maintained at cool temperatures (10 °C) and kept enough lipopeptides concentration to suppress all the diseases *in vitro*. In addition, the reduction of *B. cinerea* in Garnacha vineyards by up to 50 % in terms of both incidence and severity of infection has also been demonstrated, although the combination with some non-*B. cinerea* specific pesticides was required. The field trials were carried out only once and clearly more trials will be required in future years in order to validate the results. The postharvest treatments with BUZ-14 on nectarines achieved percentages of inhibition of 32 % in the incidence and 43 % in the severity of brown rot at a concentration of 1:5 (formulate : water) when stored at ambient temperature for six days.

**Keywords:** Biocontrol, formulation, application, fungal pathogens

## 1. Introduction

*B. cinerea* is a necrotrophic fungal pathogen which feeds on dead cells and is the main cause of grey rot in vineyards (Elmer and Reglinski, 2006). This pathogen causes between 30-40 % of fruit losses in favourable climatic conditions (Kasfi et al., 2018). *Botrytis* is able to produce enzymes such as lipases or cutinases, and thus degrades the cell walls of plants rich in pectins. Currently, fungicides are the main alternative used to fight against this pathogen. However, the development of resistances by the pathogens and the toxicity of the chemicals for human health and environment, means that new sustainable alternatives are necessary. *Monilinia* spp. is another pathogen which causes brown rot in stone fruits such as cherries, peaches or nectarines. Brown rot is one of the most serious diseases affecting stone fruits and the main symptoms are wilting, canker and fruit decay. *Monilinia* is a latent mould which can remain in the fruit until the environmental conditions are favourable for its development. This fungus can cause up to 80 % of fruit losses, affecting the preharvest and the storage, distribution and commercialization of the fruit (Larena et al., 2005). The main species in Europe are *M. fructicola* and *M. laxa*, the former being an invasive species coming from the USA and now established in countries such as Spain (Villarino et al., 2013).

Of the several alternatives available to fight against fungal pathogens, biocontrol has gained considerable interest in the last decade. The genus *Bacillus* is able to produce lipopeptides, surface-active molecules that may possess antimicrobial activity, induce plant immune responses and facilitate plant colonization (Hsieh et al., 2008; Raaijmakers et al., 2010). Iturins, fengycins and surfactins are the most frequently reported lipopeptides having an important role in the biological control of phytopathogens. Fengycins and iturins have mostly antimicrobial activity, mainly in the displacement of filamentous fungi and some groups of bacteria from substrates (Steller et al., 1999). However, synergistic effects amongst them in the control of phytopathogens have also been reported by Maget-Dana et al. (1992), Ongena et al. (2007) and Romero et al. (2007). The production of these antifungal compounds depends on the environmental conditions such as the source of nutrients, oxygen transfer rate, temperature or pH (Akpa et al., 2001; Fernando et al., 2016; Singh et al., 2014). These factors are extremely important during the development of novel biocontrol formulates in order to achieve the best antifungal efficacy and stability while also reducing industrial costs. Most scientific reports studying

the antifungal metabolites from antagonist strains have been carried out in laboratory media with a highly nutritive value. However, these media are not reproducible in the agricultural industry since the high cost would force producers to raise their prices to uncommercial levels. Therefore, developing low-cost large-scale formulates based on cheap nutrients in financially viable conditions is crucial for the industry. The constituents for a low-cost medium must satisfy the basic requirements of cell biomass and metabolite production by providing an adequate supply of energy for biosynthesis and cell maintenance (Stanbury et al., 1995). The use of commercial products or by-products from food industries as nitrogen or carbon sources has tended to improve costs and take advantage of industrial residues (Zabriskie et al., 1980).

Recent detailed studies have shown that biocontrol treatments using the antagonistic strain *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 grown in 863 medium are able to prevent several postharvest rots such as brown rot in stone fruits or blue rot in citrus, among others (Calvo et al., 2019). Iturin A has been shown to be the lipopeptide involved in the inhibition of fungal pathogens (Calvo et al., 2019). Therefore, the large-scale production of BUZ-14 containing this type of metabolite is crucial for maintaining its antifungal activity. Moreover, apart from the production of antimicrobial bioformulates, their commercialization and the development of shelf-stable formulations has been a significant issue in the biocontrol market in recent years (Droby et al., 2009; Navarta et al., 2011). A useful bioformulation must be economical to produce, easy to distribute, contain a significant number of colony forming units (CFUs), have a long shelf-life (preferentially stored at room temperatures and remaining stable for at least six months) and finally retain its efficacy against plant pathogens (Teixidó et al., 2011).

Furthermore, all biocontrol formulates must be validated either in the field or during postharvest in order to assess their marketability. The means and timing of their application are the main unknown factors in this final step. Normally, the application is conducted by spraying the product over the plants at different phenological states but always taking into account the weather and environmental conditions (Calvo-Garrido et al., 2019; Gotor-Vila et al., 2017a). The know-how involving the interaction between the Biocontrol Agent (BCA) and the plant in the performance against the pathogen is also a relevant factor. Knowing the behaviour of the antagonist in the plant will enable the development of more specific formulates for each cultivar and pathogen and help to

identify the most efficient treatment (Calvo-Garrido et al., 2019). Hence, the aim of this study was to find an affordable low-cost medium based on commercial products and by-products to be applied both in the pre- and postharvest stages. In addition, large scale trials were conducted in two very different scenarios, vineyards and nectarine orchards, in order to verify the stability and the efficacy of the formulates against grey rot in the field and brown rot during postharvest.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Microorganisms

The fungal pathogens used during the antifungal tests were *Botrytis cinerea* VG 1, *Monilinia fructicola* ATCC 44557, *M. laxa* VG 105, *P. italicum* VG 101 and *P. expansum* CECT 20140, all of them obtained from the Plant Food Research Group culture collection at Zaragoza University (Spain). They were grown in Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid LTD; Basingstone, Hampshire, UK) or Potato Dextrose Broth (PDB, Oxoid) depending on the inhibition tests. Periodically, the strains were transferred to fresh fruit to induce infection and spore production for use as a primary inoculum. The spores were transferred to peptone water 0.1 % and counted with a haemocytometer. Finally, the spore solution was adjusted to the corresponding concentration through serial dilutions. Although the current study *in vivo* is focused on *Monilinia* and *Botrytis*, the genus *Penicillium* was also included *in vitro* due to the successful antifungal activity shown by the BCA (Biocontrol Agent) BUZ-14 in previous studies (Calvo et al., 2019, 2017).

The antagonist bacterial strain was *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14, previously identified and characterized as an effective antifungal strain based on antibiosis as its main mode of action (Calvo et al., 2019, 2017). This strain was grown in 250 mL conical flasks containing 50 mL of 863 medium (10 g L<sup>-1</sup> peptone, 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract and 20 g L<sup>-1</sup> glucose; pH 7) (Yáñez-Mendizábal et al., 2011). A 24 h-old culture in 863 was transferred to 7 mL of Tryptose Soy Broth (TSB, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, U.K.) to prepare a fresh cell suspension of the BUZ-14 strain. The suspension was incubated for 24 h at 30 °C and adjusted to 40 ± 5 % transmittance at 700 nm with a spectrophotometer, corresponding to 2 x 10<sup>8</sup> colony forming units (CFU) per milliliter. It was verified by dilution and plated on TSA medium for 24 h at 30 °C. 100 µL of this suspension was transferred to each flask with the corresponding low-cost media.



## **2.2 Low-cost and commercial culture media**

The culture media used during this study were namely M2, M3, M4, M5, SG and MM. The composition of the media is confidential due to the requirements of the company with which we have worked during this study. The media were developed through low-cost source of nitrogen and carbon such as molasses, soybean and corn flours or starch, amongst others; and inorganic salts in order to favour the production of metabolites. Some by-products such as vinasses were also included in the formulations. The objective was to simulate with low cost ingredients some commercial or laboratory media usually involved in bacterial antibiotic production such as MOLP (casein peptone, 30 g L<sup>-1</sup>; saccharose, 20 g L<sup>-1</sup>; yeast extract, 7 g L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.9 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>, 0.45 g L<sup>-1</sup>; citric acid, 0.01 g L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub>, 0.001 mg L<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub>, 0.005 mg L<sup>-1</sup>; NaMoO<sub>4</sub>, 0.004 mg L<sup>-1</sup>; KCl, 0.002 mg L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>, 3.6 mg L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>, 0.14 mg L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05 mg L<sup>-1</sup>; agar-agar, 15 g L<sup>-1</sup>) or 863 (Ahimou et al., 2000; Calvo et al., 2019; Yáñez-Mendizábal et al., 2012). The pH was adjusted to neutral values (6.5-7) with HCl or NaOH in order to allow the bacterial multiplication.

## **2.3 In vitro viability and efficacy of BUZ-14 produced in different culture media**

The viability of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in all the media cited in section 2.2 was tested. Three flasks per medium containing 100 mL of culture were inoculated with 100 µL of BUZ-14 subculture (10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) and incubated for 24, 48, 72 and 96 h at 30 °C under aerobic conditions and agitation at 150 rpm. After each incubation period, the plate dilution method in TSA (Tryptone Soy Agar) was carried out and the results expressed as CFU mL<sup>-1</sup>. In addition, the antifungal activity of the cell-free supernatant (CFS) of the BCA cultured in each single medium was also determined in 48-well plates in PDB. Hence, the media incubated for 96 h were centrifugated (Beckman Coulter™) at 5000 x g and the supernatant autoclaved at 121 °C for 15 min. Later, 500 µL of PDB was added to each well, followed by 30 µL of each fungal pathogen (10<sup>4</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) and a 1:10 proportion of each CFS. A positive control without the antimicrobial fraction and a negative control without the pathogen was also included. The plates were incubated at 25 °C for 7 days. The results were assessed by observing visually the presence (growth) or absence (non-growth) of fungi. Three replicates (flasks) were used for the viability and 5 wells were replicated per pathogen and medium in the efficacy study. The entire experiments were repeated on three separate days.

#### ***2.4 Lipopeptides identification and quantification subjected to the culture medium tested***

This study was carried out following the methodology previously described by Calvo et al. (2019), in which the lipopeptides were extracted from the supernatant and studied separately from other compounds. Briefly, the supernatant was decanted and consecutively autoclaved at 121 °C for 15 min. After that, n-butanol was added to the supernatant (ratio 1:4) and the sample was centrifuged at 4000 x g in order to separate the butanolic layer containing all the lipopeptides. This fraction was called LPF (Lipopeptide Fraction). Finally, the butanol was removed by drying using a rotary evaporator and substituted by miliQ water. The identification and quantification of the lipopeptides produced in each culture medium by BUZ-14 was accomplished with a HPLC (Agilent 1100 liquid chromatograph coupled to an Agilent 1200 Series DAD detector (Agilent, USA)), as previously reported by Calvo et al. (2019). The analytical standards were iturin A, fengycin and surfactin, all of them purchased from Sigma Aldrich, Spain. The calibration curve was determined by using standard solutions containing 20, 100, 400, 1000 and 1400 µg mL<sup>-1</sup> of each compound. In all cases, the solutions were injected in the chromatograph three times and the extraction process was carried out on three separate days.

#### ***2.5 Shelf-life of liquid formulation and industrial scaling***

The low-cost culture medium which showed the best activity *in vitro* was selected for the development of liquid culture on a large/industrial-scale (300 L) using a fermenter made specifically for the company. The culture medium was concentrated and sterilised at 121 °C for 1 h. The medium was then transferred to the fermenter and mixed with water previously sterilised with UV and sodium hypochlorite. The pH was set at 7.2 ± 0.2 using NaOH and was maintained by means of an automatic continuous current of HCl and NaOH. The inoculation was performed with 8 % of bacterial inoculum in logarithmic phase (10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup>). Incubation was carried out at 30 °C under oxygenation and agitation conditions for 96 h. The bacterial concentration was determined through the plate dilution method in TSA.

For the viability and efficacy studies, the product was packed in 25-L recipients. Small aliquots of 500 mL were kept in bottles in order to test the shelf-life and efficacy

for 1 year at both 22 °C and 4 °C. The viability was expressed as CFU mL<sup>-1</sup> and carried out together with the efficacy study as described in section 2.4. Three replicates were done per month with randomly selected aliquots.

## **2.6 Development and shelf-life of dehydrated and lyophilized formulates**

The industrial liquid formulation was used to develop dehydrated and lyophilized formulates. Five flasks containing 100 mL of liquid formulate were centrifuged at 4000 x g and the resulting pellet dried at 30 °C for 16 h. The supernatant (CFS) was kept at cool temperatures in order to study its efficacy over time. The pellet was stored at ambient temperature (22 °C) for 1 year to determine the viability. The lyophilization was carried out as follows: the content of another 5 flasks containing the culture medium (cells + CFS) and 10% SM (skimmed milk) was deposited in aluminium trays and subsequently placed in a freeze-dryer (Heto PowerDry DW8, Thermo Fischer Scientifics, USA). After pre-freezing for 30 min, the culture medium was dried at -20 °C in vacuum conditions. This was followed by a second drying stage until reaching ambient temperature. As in the case of the dehydrated formulates, the lyophilized product was stored at ambient temperature for 1 year. The viability of the dehydrated formulates was assessed by weighing 0.2 g and diluting 1:10 with 0.1 % peptone water for consecutive plate diluting in TSA. The results were expressed as CFU g<sup>-1</sup>. The antifungal activity in the dehydrated formulates was tested with the CFS stored at cool (4 °C) and ambient (20 °C) temperatures using the procedure described in section 2.3. In addition, 1 g of lyophilized formulate was weighed and diluted 1:10 with peptone water. Then, the same steps as described in section 2.3 were followed. The viability and stability study was carried out once a month. Random aliquots from both formulates were used each month during one year, and three samples were analysed per month.

## **2.7 Field trials in vineyards**

### **2.7.1 Compatibility with pesticides usually applied in vineyards**

Prior to the field trials, it was important to identify the pesticides with which the antagonist was compatible. Therefore, 17 pesticides including fungicides, sulphur, insecticides and acaricides were studied *in vitro* against the strain *B. amyloliquefaciens* BUZ-14. The reference doses used in the lab were those usually applied in the field (Table 1). Hence, the pesticides were combined with TSA (Tryptone Soy Agar) in Petri plates at

the reference dose and dilutions of this dose in order to find the Maximum Concentration of pesticide with which BUZ-14 is able to grow. Finally, the antagonist was inoculated using the isolation method (10  $\mu$ L) with a sterile microbiological loop from a subculture ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) on TSA medium + pesticide and incubated at 30 °C for 24-48 h to verify the growth of the strain.

**Table 1.** Pesticides used in the vineyards of Cariñena (Spain) and their reference doses.

Type of pesticide	Commercial name	Manufacturer (country)	Reference dose
	Arius®	Dow Agrosiences LTD. (UK)	0.025 %
	Armicarb®	Agronaturalis LTD. (UK)	300 L/Ha
	Collis®	BASF SE (Germany)	600 L/Ha
Fungicide	Dynali®	Syngenta AG (Switzerland)	65 mL/HL
	Flint®	Bayer AG (Germany)	0.015 %
	Karathane Star®	Dow Agrosiences LTD. (UK)	45 mL/HL
	Luna Experience®	Bayer S.A.S. (France)	0.38 L/Ha
	Vivando®	BASF SE (Germany)	0.015 %
Sulphur	Cepsul Especial®	CEPSA S.A. (Spain)	25 Kg/Ha
Insecticide	Audace®	FMC Agricultural Solutions S.A.U. (Spain)	0.04 %
Acaricide	Apache®	Industrias Afrasa (Spain)	1000 L/Ha

### 2.7.2 Plot design

The large-scale liquid formulate was applied in vineyards in order to assess its antifungal activity against *B. cinerea* and its viability in the field. The study was conducted in Cariñena, Zaragoza (Spain), 41.337° N, 1.2241° O, and the varieties of wine grape selected were Syrah and Garnacha. For each variety, 0.25 Ha were used, divided into three treatments: control, conventional and BUZ-14, corresponding to 360 vineyards treated with BUZ-14 and 240 as control for the Syrah and 360 with BUZ-14 and 270 as control for the Garnacha varieties. Control refers to the vineyards without any treatment, conventional to the usual treatment with pesticides, and BUZ-14 to the application of the liquid bioformulate. The Syrah was only treated with BUZ-14 but the Garnacha was treated with a combination of BUZ-14 and non-*B. cinerea* specific pesticides such as sulphur, Flint®, Arius® or Dynali®. The location of the fields and the distribution of the Syrah and Garnacha vineyards can be observed in Figures 1 and 2, respectively.

The field tests were carried out in favourable climatic conditions for the development of *B. cinerea*. The minimum temperatures have increased in the last ten

years and during the winter the temperatures have been warmer (from 2° C to 4° C). The average temperature registered this year (2018) was 15 °C, the maximum being 28 °C. The months prior to the trials were marked by high humidity and higher precipitation than the average in recent years (100 L m<sup>2</sup>-<sup>1</sup> in April).

O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O
O	O	X	X	X	C	C	O	O



**Figure 1.** Distribution of treatments in the Syrah plot (red area) located in Cariñena (Spain). The scheme corresponds to the coloured area (purple) in the map and was distributed as follows: O is the edge effect margin; X are the vineyards treated with BUZ-14 and C is the Control treatment. The non-coloured area in the plot received conventional treatment.

O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O



**Figure 2.** Distribution of treatments in the Garnacha plot (red area) located in Cariñena (Spain). The scheme corresponds to the red area in the map (excluding the yellow area) and was distributed as follows: O is the edge effect margin; X are the vineyards treated with BUZ-14 and C is the Control treatment. The yellow area received conventional treatment.

### 2.7.3 Treatment

The conventional treatments were applied following good agricultural practices (Code of Practice for Using Plant Protection Products, 2011). The bioformulate was applied depending on the phenology, climatology and viability of the cells in the plant. The first two applications were carried out during the flowering, followed by applications during the pea-size berry and veraison stages. In total, four applications were done with the bioformulate. For the biotreatment, the product was diluted with water in a proportion of 1:3. It was sprayed from a tank attached to a tractor (tractor speed 4 km/h, operating pressure 2 bar and dose of 600 L Ha<sup>-1</sup> approximately). Hydro sensitive papers were used to check the homogeneity of the spraying over the plots. After each treatment, random bunches of grapes were transferred to the laboratory in order to verify the viability of BUZ-14 through microbiological counting. For this purpose, 15 bunches per treatment were used and a pool of 5 bunches were analysed separately through the serial dilution method and subsequent plate counting in TSA after incubation at 30 °C for 24 h. The results were expressed as log CFU g<sup>-1</sup>. The samples were taken immediately before and periodically (every 15 or 30 days) after the treatments in order to establish a curve of viability of BUZ-14 in the vineyard during the trials. Finally, after harvest (3<sup>rd</sup> October 2018) 100 bunches per treatment and variety were randomly collected from the vineyards and carefully observed in the laboratory to establish the incidence and infection index of *B. cinerea*. The incidence was determined as the number of bunches infected and the infection index was determined with the formula below, taking into account the severity scale where the percentage of the infected area was 0 = no symptoms; 1 = 1-25 %; 2 = 25-50%; 3 = 50-75 % and 4 > 75 % (Figure 3).

$$DS (\%) = \frac{\sum(dx f) N x D}{x} \times 100$$

Where d= scale of fruit infection; f= frequency of fruits with the infection scale; N= number of fruits examined; D= highest scale found.



**Figure 3.** Bunches of Syrah grapes with different degrees of *B. cinerea* infection collected from Cariñena fields (Spain).

### 2.8 Postharvest application on nectarines

A further postharvest trial was conducted with nectarines (cv. *Venus x Big Top*) in order to assess the antifungal capacity of BUZ-14. Nectarines harvested at commercial maturity were taken from orchards belonging to the Aula-Dei experimental station, located in Montañana, Zaragoza, Spain ([41°41'05"N 0°49'36"O](https://www.google.com/maps/place/41.68389°N+0.82333°E/@41.68389,0.82333,15z)). The physical-chemical characteristics of the nectarines after harvest were as follows: Total Soluble Solids (TSS),  $15.8 \pm 4.9$  °Brix; acidity,  $11.3 \pm 3.5$  g of malic acid L<sup>-1</sup>; firmness,  $56.5 \pm 21.0$  durofell units; maturity index (TSS/acidity), 1.5. The TSS were measured with a refractometer (ATAGO DBX 55A, Germany), the firmness with a durometer (Durofel Agrostia 100, UK) and the acidity through acid-base titration (Official Methods of Analysis, AOAC, 1990). The pH was  $4.2 \pm 0.3$ , measured with a PH-meter (Crison, Barcelona, Spain).

The orchard was naturally infected by *Monilinia* spp., having a high incidence of the disease. In previous years, about 40 % of the harvested fruit manifested symptoms of brown rot. The biocontrol treatment was done with the same liquid bioformulate used in the vineyards. Briefly, BUZ-14 was produced in a biofermenter at  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> in a MM medium, and diluted with water at concentrations of 1:5 and 1:10 for the application. The storage period of the fruits depended on the temperature. At 20 °C, the storage lasted 6 days prior to assessment of the brown rot disease. However, at cool temperatures (4 °C), the fruits were stored for 7 and 14 days followed by a shelf-life at 20 °C of 6 days before the evaluation. Thirty fruits were used per treatment and the results were expressed as incidence (number of fruits infected) and severity (percentage of fruit infected). Moreover, BUZ-14 was daily counted on the fruit surface over the 4 days of storage at 20 °C and at the beginning and at the end of the refrigeration period. The counting was done using a sterile window (for surface sampling) of 10 cm<sup>2</sup> in two separate parts of the

nectarine. Later, microbiological serial dilutions were conducted with peptone water 0.1 %, plated in TSA and incubated at 30 °C for 24 h. The experiment was conducted in triplicate and on three different days.

### **2.9 Statistical analysis**

The data were statistically analyzed using an SPSS software package for Windows version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences in the mean values of parameters were tested by one-way analysis of variance and separated by Tukey's honestly significant difference test ( $P < 0.05$ ).

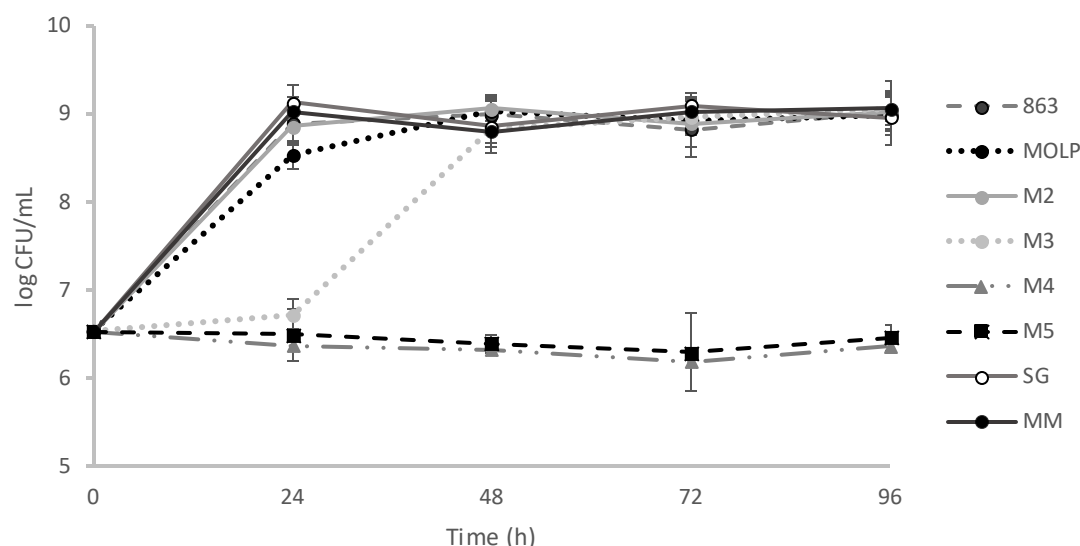
## **3. Results and discussion**

### **3.1 In vitro inhibition tests and viability**

The aim was to characterize the suitability of low-cost media to maximize the microbial counts and the production of secondary metabolites. The results corresponding to BUZ-14 viability can be observed in Figure 4. The BCA was able to grow in all the media excluding M4 and M5. The growth curve in M2 was very similar to those of the reference media (MOLP and 863) with a lag phase of 4 h and an exponential phase of approximately 18 h. The initial population was 6.5 log units and the BCA achieved the maximum counts (9 log units) after 24 h of incubation at 30 °C and 150 rpm. Although M3 achieved the maximum population of 9 log units, it showed a longer lag phase since the exponential phase started from 24 h onwards and the stationary phase began about 48 h from the initial incubation.

The antifungal activity *in vitro* of the supernatants extracted after culture in the different media is shown in Table 2. The metabolites produced by BUZ-14 in the M2 and M3 culture media were unable to suppress any of the fungal pathogens tested. However, the supernatants extracted after the BCA culture in SG and MM exhibited substantial antifungal activity due to their capacity to inhibit all the pathogens *in vitro*. The laboratory media 863 and MOLP also showed good activity, although they could be considered as control media given the findings of previous studies (Calvo et al., 2019; Toral et al., 2018; Touré et al., 2004; Yáñez-Mendizábal et al., 2012) and the richness of their composition.





**Figure 4.** *In vitro* viability of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 incubated in different reference and low-cost culture media for 96 h at 30 °C and 150 rpm. Data represents the average of three samples analysed on three different days. Vertical bars correspond to the standard deviation

**Table 2.** *In vitro* liquid antifungal activity of the CFS produced by BUZ-14 after 96 h of incubation at 30° C in several reference and low-cost media against five postharvest moulds. Three flasks and 5 inhibition wells per flask were used per medium and pathogen, and the experiment was conducted on 3 three different days.

Culture medium	<i>B. cinerea</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. laxa</i>	<i>P. expansum</i>	<i>P. italicum</i>
863	NG <sup>a</sup>	NG	NG	NG	NG
MOLP	NG	NG	NG	NG	NG
M2	G <sup>b</sup>	G	G	G	G
M3	G	G	G	G	G
M4	G	G	G	G	G
M5	G	G	G	G	G
SG	NG	NG	NG	NG	NG
MM	NG	NG	NG	NG	NG

<sup>a</sup> Non-growth of the fungal pathogen

<sup>b</sup> Growth of the fungal pathogen

In this study, M4 and M5 did not allow the development of BUZ-14. These media contained vinasse, which might indicate that this by-product from the winery industry is a limiting factor. The reduction of the pH could be the main reason for this incapacity or simply that this nutriment does not provide the necessary conditions for BUZ-14 proliferation. Evidently, the non-growth of the BCA will not permit the production of metabolites in the medium. The results shown in Table 2 reflect this fact. However, M2

and M3 have been demonstrated to be good sources of carbon and nitrogen for growing, but not enough for the production of antifungal metabolites. Also, the production of antimicrobial compounds is mandatory in order to continue with the development of bioformulates. In these circumstances, the low-cost SG and MM media would be the best candidates for future studies. Both viability and antifungal activity have been demonstrated with similar results to the reference results (863 and MOLP).

This study reflects the importance of nutrients in the development of bioformulates aimed for use as biocontrol commercial products. Several studies have already reported the possible change of behaviour depending on the sources used for their multiplication (Abadias et al., 2007; Pryor et al., 2007; Yáñez-Mendizábal et al., 2012). Soybean products are an excellent ingredient since they contain protein, carbohydrates, vitamins and minerals (Reis et al., 2004). Molasses are widely used in the development of microorganisms due to their high sugar content, vitamins and nitrogen compounds (Costa et al., 2001). Vinasses have scarcely been studied as an ingredient suitable for microorganism multiplication, but they have been used in the present study because of the relevant number of wineries close to our Research Centre and as an opportunity to take advantage of by-products which are usually wasted. However, apart from the ingredients used, the relative concentrations between them is also crucial. For example, an excess of molasses could promote an accumulation of acidic end-products or dramatically diminish the pH and cause the inhibition of the microorganisms (Ohara et al., 1992; Yáñez-Mendizábal et al., 2012).

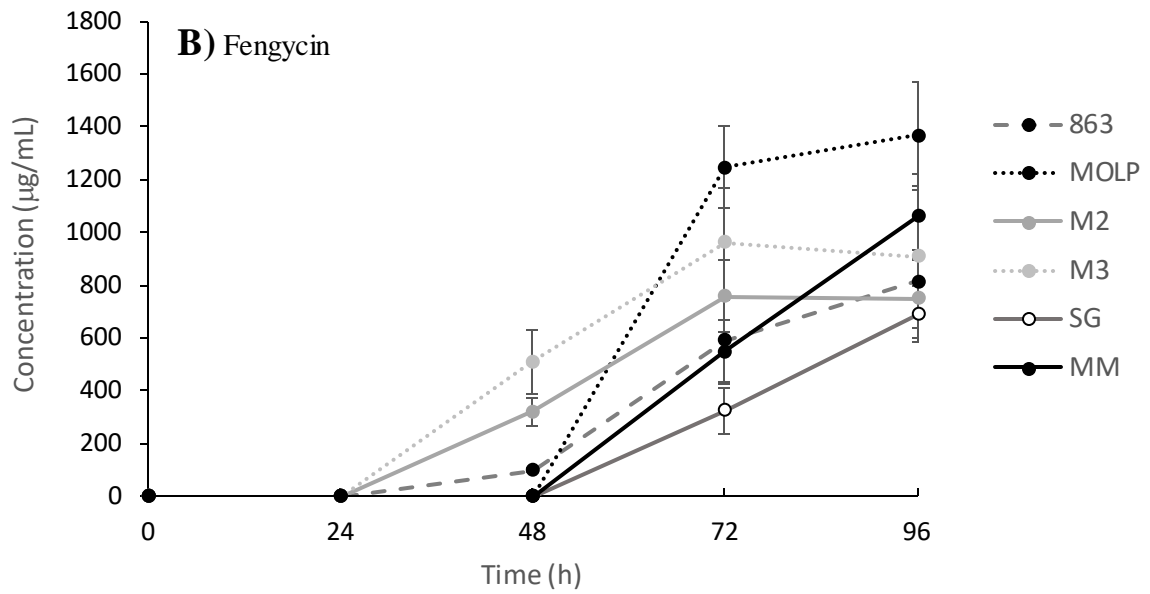
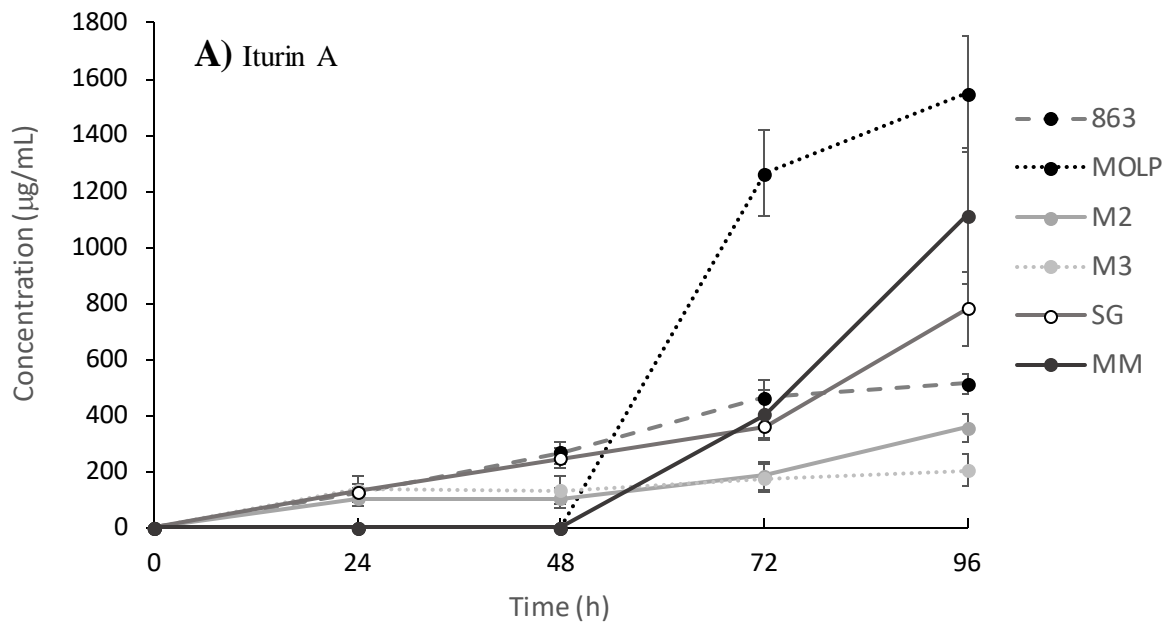
### ***3.2 Identification and quantification of lipopeptides***

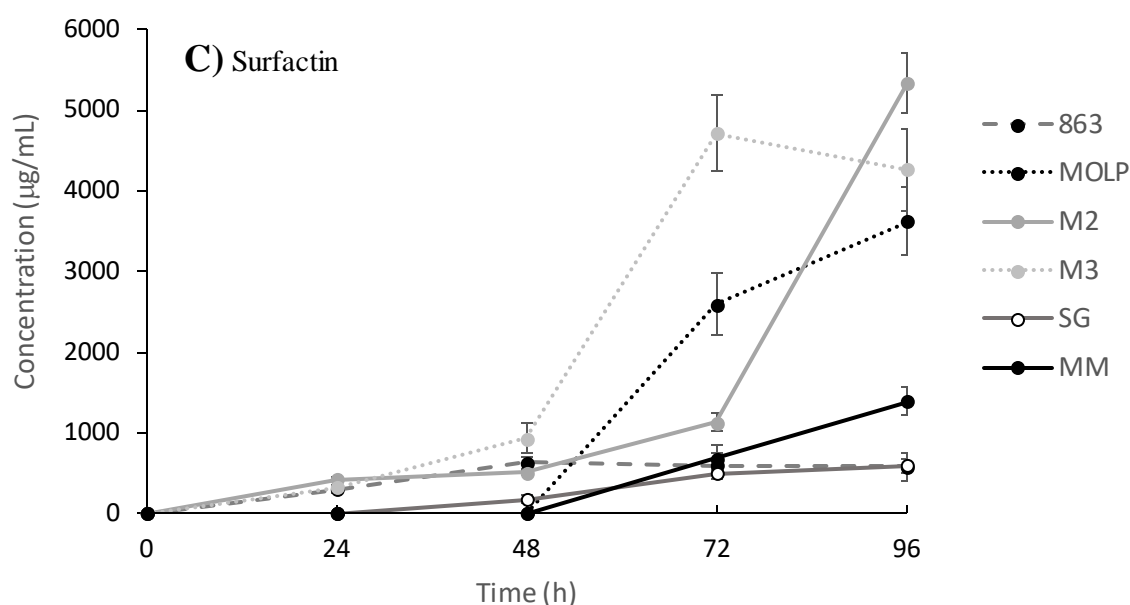
The identification and quantification of the three main families of lipopeptides in the LPF was carried out in the media which had shown cell multiplication and antifungal activity in the *in vitro* tests (863, MOLP, M2, M3, SG and MM). In all the media, iturin A, fengycin and surfactin were detected but in different concentrations (Figure 5). Excepting in MM, the production of iturin A began during the exponential phase in the first 24 h of incubation. However, the fengycin was produced later, during the stationary phase, similarly the production of surfactin. Surprisingly, these three families were produced after 48 h of incubation in the MM medium, diverging from the pattern observed in the other culture media. Probably, the ingredients of this medium are metabolized with more difficulty than the others, although the optimum production was achieved at 96 h of

incubation in all cases. Even in MM the concentrations reached were similar to those of the original MOLP medium although the production began significantly later.

The highest concentrations of iturin A after 96 h of incubation at 30 °C (Figure 5A) were achieved in MOLP and MM (1547 and 1112  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively). The low-cost medium SG also obtained concentrations above those of the reference medium 863, suggesting SG and MM as possible future large-scale growth media. Iturin A has been demonstrated by Calvo et al. (2019) to be the main active antifungal lipopeptide produced by this antagonist. The study also showed that the content of iturin A in 24 h-old BUZ-14 cultures in 863 medium (36  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) was enough to suppress the growth of *Monilinia* spp. in peaches and *P. expansum* in apples. Hence, a bioformulation with high concentrations of this family should be enough to control these diseases and probably others such as *B. cinerea* or *P. italicum* / *P. digitatum* in strawberries/grapes or mandarins, respectively (Calvo et al., 2019). The results of iturin A are consistent with the *in vitro* tests, where M2 and M3 were unable to inhibit any of the postharvest pathogens.

Significant concentrations of fengycin and surfactin were detected in all the low-cost media studied. MOLP and MM were the media with the highest fengycin concentrations, while few differences were observed amongst the others (Figure 5B). However, M2 and M3 allowed better surfactin production in comparison with MM, SG and 863 (Figure 5C). Some authors such as Medeot et al. (2017) and Ongena et al. (2007) have reported the antifungal activity of surfactin to be the result of a symbiotic performance with fengycin or iturin A, but it is clear that the poor results obtained *in vitro* show that high concentrations of surfactin alone did not influence the antifungal activity of BUZ-14. Toral et al. (2018) also compared the MOLP and SG culture media in the production of lipopeptides with a strain of *B. methylotrophicus* CECT 8661 (currently renamed as *B. velezensis*) as well as another commercial medium based on beef and yeast extract. The results were in agreement with our study, since the total amount of lipopeptides quantified by Toral et al. (2018) in MOLP and SG were 2800 and 10000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively (2000 and 6500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in the current study). Moreover, the same authors found 2100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of total lipopeptides in the commercial product used as reference, indicating the similarity between the novel formulates developed in the current study and some media commercially available on the market.





**Figure 5.** Concentration of iturin A (A), fengycin (B) and surfactin (C) produced by *B. amyloliquifaciens* BUZ-14 in several culture media. Data represent the average of three samples per day extracted on three different days. Vertical bars indicate the standard deviation.

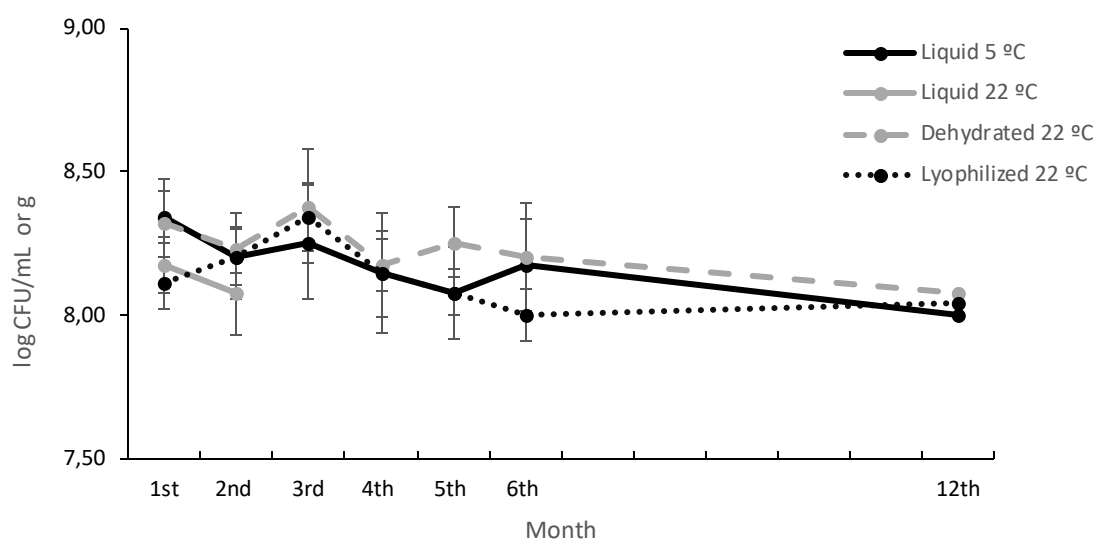
### 3.3 Formulates viability, stability and industrial-scaling

In the previous section, both the SG and MM media demonstrated good attributes to be used in further large-scale production. The cell viability ( $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>), the total *in vitro* antifungal inhibition of the CFS diluted 1:10 against all the pathogens tested and the high concentration of iturin A make them promising media for the development of commercial formulates. However, industry always looks for cost reducing choices, so MM was selected as the medium for further study because the costs associated with its production were approximately 40 % lower in comparison to SG. Thus, the liquid and therefore the dehydrated and freeze-dried formulates were developed with MM. The results corresponding to the viability of all the formulates can be observed in Figure 6. All the formulates maintained the viability of the antagonist for at least 1 year, although the liquid culture stored at ambient temperature was very unstable. In the 3<sup>rd</sup> month other microorganisms distinct from the *B. amyloliquifaciens* morphology were detected in the Petri plates, probably because the container had been previously opened for experimentation. On the other hand, during the *in vitro* antifungal assays carried out every month during the first semester and after a year of storage, none of the pathogens tested

were able to grow in the well plate test for inhibitory activity (data not shown). This means that the active lipopeptides remaining in the CFS kept their antifungal activity, even those stored at 20 °C. The non-necessity of refrigeration would avoid extra costs for commercial companies and users. The dehydrated or freeze-dried products are in high demand because their storage is easier, they are much more stable and they are easy to handle.

On the other hand, the costs during production are higher than for liquid formulates, so probably the price to the consumer would also be higher. In this study, economical and easily available equipment was sufficient for carrying out the development of dehydrated or lyophilized large-scale formulates. (Gotor-Vila et al., 2017b) used fluid-bed spray-drying technology to produce bioformulates. We agree with these authors that producing formulations with this technology is more likely to maintain the purity of the product and to avoid external contamination. However, the initial investment is greater and the previous steps prior to obtaining the product are longer than simply using a fermenter to multiply the microorganisms and therefore to produce the antifungal metabolites. In contrast to these authors, we have opted for the development of liquid formulates based on MM as a culture medium before the final field applications. We think that despite the cool storage recommendation, many farmers would be willing to invest money if the product is highly effective and allows them to use significantly fewer and smaller doses of pesticides. We must point out that during this assay, the container was opened because all the liquid was stored in 25-L containers. It is quite likely that unopened bottles would avoid contamination and therefore the shelf-life would be increased, similarly to the CFS stored at 20 °C which was able to maintain the antifungal efficacy of the metabolites during at least one year.

All formulates have advantages and disadvantages, so finding the balance between costs and good management should be the objective in the development of biocontrol products. Finally, industrial-scaling was carried out for further field treatments. Twenty-five-litre containers were made and 300 L of the liquid formulate were produced in the fermenter as previously described.



**Figure 6.** Viability of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in different formulatés and storage conditions. Data from each single month represent the average of three random samples and vertical bars indicate the standard deviation.

### 3.4 Compatibility with pesticides

The results corresponding to the compatibility of BUZ-14 with pesticides can be observed in Table 3. Most of the pesticides tested demonstrated great compatibility with the strain, allowing its survival when they were combined, such as Arius®, Dynali® or Flint®. However, others such as Armicarb® or Karathane Star® were diluted 10-fold or even 20-fold (respectively in these two cases) to allow the multiplication of the strain, so their combination in the field should be avoided. The acaricides and insecticides used were compatible with the biocontrol agent, which is a positive point given that BUZ-14 is considered, to date, only as an antifungal antagonist. However, all the fungicides utilised are effective and registered for use against oidium, so products such as Armicarb®, Karathane Star® or Collis® should be substituted by others which are more compatible. Moreover, Armicarb® is also registered against *Botrytis*, but due to its strong antibacterial effect against BUZ-14, another fungicide must be selected.

The importance of this study lies in the combination of chemicals and biocontrol treatments. Nowadays, biocontrol is still undergoing continuous testing, trying to demonstrate its good capability as a substitute for synthetic chemicals. However, it is currently too premature to dispense with pesticides completely. The main objective should be to try to reduce as much as possible the doses and number of applications of

these chemicals. Depending on the BCA, its antimicrobial spectrum might be limited in some cases, so its complementation with other alternatives or compounds which might enhance and enlarge the spectrum of action should be mandatory. An example can be observed in the investigation conducted by da Silva et al. (2018), who studied the compatibility of *Trichoderma* against several pesticides in lettuce crops. They demonstrated that each fungus species of *Trichoderma* is more or less specific depending on the pesticide used. Therefore, the importance of this kind of study is once again completely justified.

**Table 3.** Compatibility between several pesticides usually used in vineyards and the antagonist strain *B. amyloliquefaciens* BUZ-14.

Type of pesticide	Commercial name	Dose of reference	Maximum Concentration <sup>a</sup>
	Arius®	0.025 %	0.025 % (Reference)
	Armicarb®	300 L/Ha	30 L/Ha (Reference/10)
	Collis®	600 L/Ha	300 L/Ha (Reference)
Fungicide	Dynali®	65 mL/HL	65 mL/HL (Reference)
	Flint®	0.015 %	0.015 % (Reference)
	Karathane Star®	45 mL/HL	2.25 mL/HL (Reference/20)
	Luna Experience®	0.38 L/Ha	0.095 L/Ha (Reference/4)
	Vivando®	0.015 %	0.015 % (Reference)
Sulphur	Cepsul Especial®	25 Kg/Ha	25 Kg/Ha (Reference)
Insecticide	Audace®	0.04 %	0.04 % (Reference)
Acaricide	Apache®	1000 L/Ha	1000 L/Ha (Reference)

<sup>a</sup> Maximum Concentration of pesticide that allows the multiplication of *B. amyloliquefaciens* of BUZ-14.

### 3.5 Field trials

The objective of this study was to undertake a preliminary assay with BUZ-14 in vineyards against *B. cinerea* by applying it in the most susceptible phenological states in order to test the viability and efficacy of this new BCA. Hence, the optimisation of the dose and the application procedure was examined. The viability of the bacterial strain can be observed in Figure 7. As is shown, BUZ-14 was able to maintain its cell viability and therefore to survive throughout the trials. However, no multiplication in the vineyards was observed. This fact could negatively influence the mechanism of action. The growth of these BCAs in the plant could notably increase the number of mechanisms of action that might influence the inhibition. As has been demonstrated in this study, the main mechanism of action associated to biocontrol could be related to the metabolites already



present in the bioformulation. After application, these metabolites might be fixed on the surface and exert a direct inhibition against the pathogen or even induce systemic resistance to the plant (Cawoy et al., 2014).

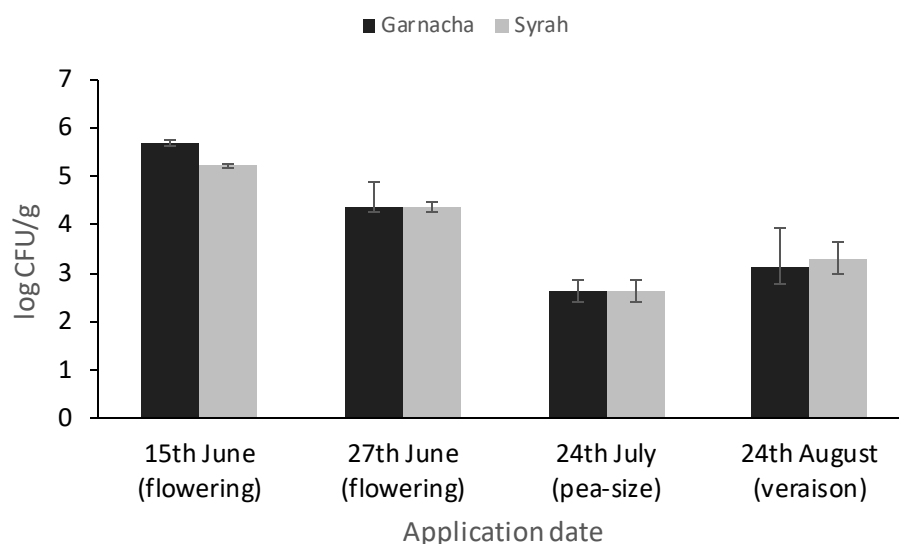
The incidence and severity of the disease in Garnacha after the 4 applications with the bioformulate are shown in Figure 8. The control samples showed an incidence of 40 %, while in the bunches treated with the bioformulate this was reduced up to 20 %. The percentage of the disease reduction was 50 % in Garnacha. Similar results were observed in the severity of infection index where the control showed a percentage of inhibition of 17 % while 9 % was observed in the vineyards treated with BUZ-14. The severity in the conventional plot was 10 %, practically the same as that obtained when using the bioformulate.

Unfortunately, the Syrah variety was seriously infected by oidium, so *Botrytis* infection was hardly observed in this plot. This variety was not treated with any fungicide, unlike the Garnacha. Normally, it is recommended to apply biocontrol products in combination with other pesticides in order to extend their spectrum of action. BCAs are usually fungal-cultivar-specific so it is unlikely that a single BCA will be effective against many pathogens and in several cultivars at the same time. To date, studies of BCAs by numerous authors have focussed on one or two diseases and in the same cultivar (Calvo-Garrido et al., 2019; Gotor-Vila et al., 2017c; Gujjarro et al., 2019). The range of action of the antagonist is quite low, so the combination with other chemicals is really mandatory nowadays. In our study, we have corroborated the importance of this combination. Garnacha was treated with anti-oidium chemicals and no traces of the disease were observed. Currently, the aim of biocontrol products should be to reduce the number of treatments and doses of pesticides usually used in the field. Knowledge about the interaction between BCAs, pathogens and cultivars is necessary in order to optimise the biotreatments and therefore to reduce the use of pesticides to a minimum. Hence, the combination of different BCAs with wide and diverse mechanisms of action could one day lead to zero residues in the field. However, biocontrol is not the only solution. It could be combined with other eco-friendly alternatives such as plant extracts, volatile organic compounds or organic substances having the same objective: to enlarge the number of mechanisms of action. Few studies have been conducted into combining various BCAs, although Gotor-Vila et al. (2017a) in collaboration with Gujjarro's lab studied the efficacy

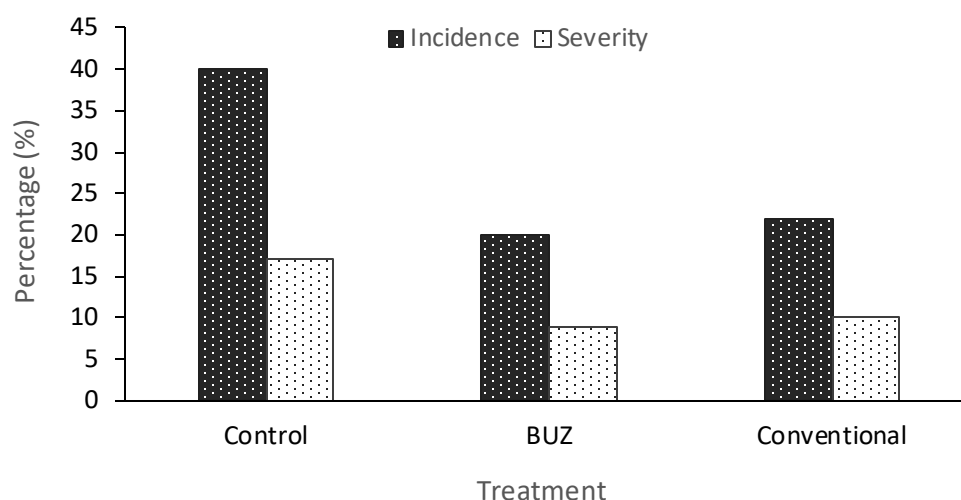
of several treatments having *B. amyloliquefaciens* CPA-8 as the main active substance. In one of the treatments, CPA-8 was applied together to a strain of *Penicillium frequentans*, but no improvement in the efficacy was observed in the field against *Monilinia* spp. in stone fruits. These results do not mean that the hypothesis of combinations of BCAs must be discarded, simply that this symbiosis or sum of mechanisms should be very well optimised in the laboratory prior to field trials.

Our study corresponds only to one field campaign, which is evidently not enough to validate the results obtained. The climatology strongly influences fungal diseases, so at least 3 years are normally required to validate this kind of treatment. Weather is not the only variable to take into account. The location of plots, varieties and soil nutrients are also very important. Calvo-Garrido et al. (2019) tested a strain of *Bacillus ginsengihumi* in the field against *B. cinerea* for 3 years. The conclusions were very unclear due to the variability amongst the campaigns because of the weather conditions. This BCA was also unable to grow in the vegetable matrix, but it survived during the entire campaign. Gotor-Vila et al. (2017a) also found large variability in the results with stone fruits when testing *B. amyloliquefaciens* CPA-8 against *Monilinia* spp. due to the meteorological conditions but also due to the pathogen inoculum pressure. Depending on the initial inoculum in the field, the efficacy of the BCA and also the pesticides was insignificant (> 50 %). CPA-8 reduced brown rot in the orchards by almost 50% during two campaigns (2014-2015). To the best of our knowledge, no references to BCAs growing in field cultivars have been reported. The extreme conditions (temperature, RH, rainfall, UV...) create an environment where only survival seems to be an option (Gotor-Vila et al., 2017a). Other BCAs different from the *Bacillus* genus, i.e. yeasts such as *Candida sake* CPA-1, even reduced their population once applied in the vineyard, which significantly decreases the mechanisms of action to fight against fungal diseases.

We are well aware of the importance of repeatability in field or postharvest trials, so we consider this assay as a first step towards further research with this strain in this cultivar. Future field tests will be carried out in the same cultivar and in new ones in order to validate the formulate as a possible commercial product.



**Figure 7.** Viability of BUZ-14 in the vineyard (Garnacha and Syrah) during the 2018 campaign in Cariñena (Spain). Data represents the average of three random samples obtained from several bunches collected in the field. Vertical bars indicate the standard deviation.



**Figure 8.** Incidence and severity of grey rot in vineyards (Garnacha) after biocontrol treatments with the antagonist *B. amyloliquefaciens* BUZ-14. Data represent the average of a hundred bunches collected in the field just before the harvest.

### 3.6 Postharvest application in nectarines

Figure 9 shows the results corresponding to the incidence and severity of brown rot in stored nectarines. No significant differences were detected during the storage at cool temperatures between the control and the fruit treated with BUZ-14. After 7 d of cool storage and 6 d of shelf-life, the incidence was reduced from 41 to 35 % (1:5) and at

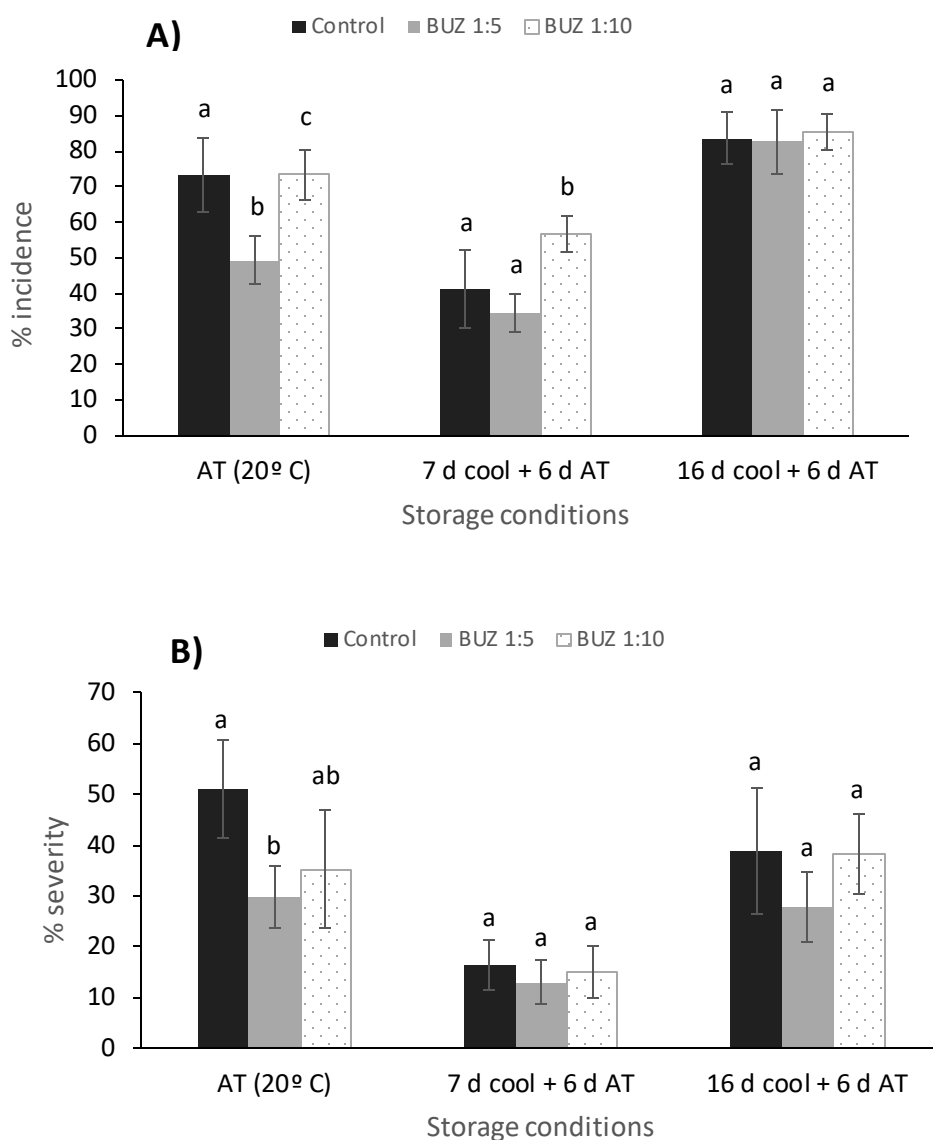
16 days the results did not differ from the control treatment. However, at ambient temperature (20 °C), BUZ-14 was able to reduce significantly the incidence of *Monilinia* spp. from 73 % (control) to 49 % (1:5). Similar results were obtained in terms of severity, since significant differences with the control were only observed at ambient temperature and at a concentration of 1:5, reducing the severity of the disease up to 43 %.

The study of the viability on the nectarine surface showed that BUZ-14 was unable to grow on this fruit but was able to survive. Therefore, the production of metabolites in the plant or even the competition for nutrients have been discarded as possible mechanisms of action. In contrast to the study conducted by Calvo et al. (2019) with peaches, where the inoculation of BUZ-14 was made in wounds and its capacity of proliferation was demonstrated, in the present case several modes of action cannot be taken into account. The significant differences observed at ambient temperature might be due to the metabolites already remaining in the formulate, as Calvo et al. (2019) reported for *P. expansum* in apples. Only the formulate 1:5 showed significant differences, so it might be that 1:10 was an insufficient concentration of antifungal metabolites to reduce the disease. However, in nectarines stored at cool temperatures the pattern was different. No significant differences were observed with 1:5 concentrations, and the main reason might be the physiological state of the fruit. The longer the fruit is in storage, the more its fungal susceptibility increases since the pathogenic resistance system becomes weaker. It might be that longer periods of storage disfavour the efficacy of metabolites due to the higher susceptibility of the fruit to fungal diseases.

Calvo et al. (2017) studied the growth curve of BUZ-14 in wounded peaches, firstly stored at cool temperatures and followed by a shelf-life at ambient temperature (20 °C). They observed that as the BCA grew in the wound at ambient temperature, the storage at cool temperatures did not influence the antifungal activity of BUZ-14. The non-growth in the fruit significantly decreased the possible number of modes of action to face the fungal diseases. However, *Monilinia* spp. is a latent pathogen which remains inside the fruit without expression from the initial infection. Therefore, it does not infect the fruit through wounds, hindering thereby the activity of the BCA. This kind of postharvest treatment might be more effective if there are some wounds where the pathogen can colonize and also the BCA can grow due to the easier access to the nutrients. The prevention of brown rot could be more successful by treating from initial phenological

states in the field and following a proper application protocol.

However, as previously discussed, the cultivar is a crucial factor so more fruits should be tested in order to find the best treatment method and the best varieties for its application.



**Figure 9.** Incidence (A) and severity (B) of brown rot in nectarines treated in postharvest with BUZ-14 large-scale bioformulates diluted 1:5, 1:10 and without treatment (control). Different letters above the columns indicate statistical difference between treatments at  $P < 0.05$  and vertical bars are the standard deviation.

## 4. Conclusions

This study concerns the development of biocontrol low-cost bioformulates for use against several rots in both pre- and postharvest. The MM culture medium has been demonstrated to be a suitable formulation since it satisfies all the necessary requirements for industrial-scaling. The liquid formulate provides enough antifungal metabolites to suppress some postharvest rots such as *Monilinia* spp., *B. cinerea* or *Penicillium* spp. and it is also stable over one year of storage at cool temperatures. The field trials have shown that the large-scale of the bioformulate of *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in this medium was able to reduce, during one campaign, the incidence and severity of *B. cinerea* infection in Garnacha plots by up to 50 %. More field trials will be necessary in order to validate this bioformulation in the field given the low variability of these treatments in this assay. The postharvest tests on nectarines have demonstrated that BUZ-14 is able to reduce the incidence and severity of brown rot from 73 % to 49 % and from 51 % to 30 %, respectively, when the fruit is stored at ambient temperature. No growth was observed on the surface, suggesting that either the application method or the fruit are not suitable for the use of BUZ-14 as a BCA. However, this study could serve as an initial step towards the future development of new formulates and validation of the current product already demonstrated as a possible suitable bioformulate.

## Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain through funds awarded for the Project RTC-2015-4121-2 and also by the Aragon Government for the Project LMP130\_18. Funding from the Diputación General de Aragón and Fondo Social Europeo is also acknowledged (grant T07\_17R). H. Calvo is the beneficiary of a pre-doctoral grant C195/2015 from the Aragón Regional Government (Spain).

## References

- Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I., 2007. Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology* 93, 436–442. <https://doi.org/10.1094/phyto.2003.93.4.436>
- Ahimou, F., Jacques, P., Deleu, M., 2000. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 749–754. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00295-7)
- Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., Thonart, P., 2001. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91–93, 551–561. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:551>
- Calvo-Garrido, C., Roudet, J., Aveline, N., Davidou, L., Dupin, S., Fermaud, M., 2019. Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus*

- ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00105>
- Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., Venturini, M.E., 2017. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiol.* 63, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.004>
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D., Venturini, M.E., 2019. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. *Food Microbiol.* 82, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.010>
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommès, J., Ongena, M., 2014. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 87–100. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>
- Code of Practice for Using Plant Protection Products, 2011
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés, E., Viñas, I., 2001. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 367–371. <https://doi.org/10.1007/s002530100666>
- da Silva, M.A.F., de Moura, Karina Elaine, de Moura, Kamila Ellen, Salomão, D., Patrício, F.R.A., 2018. Compatibility of *Trichoderma* isolates with pesticides used in lettuce crop. *Summa Phytopathol.* 44, 137–142. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/176873>
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol. Technol.* 52, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- Elmer, P.A.G., Reglinski, T., 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathol.* 55, 155–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01348.x>
- Fernando, P.M., Flavio, H.V. de M., Marc, O., Laurent, F., Paulo, E. de S., Jorge, T. de S., 2016. Effect of temperature, pH and substrate composition on production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* 629. *African J. Microbiol. Res.* 10, 1506–1512. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8222>
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Casals, C., Torres, R., De Cal, A., Guijarro, B., Usall, J., 2017a. Biological control of brown rot in stone fruit using *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 under field conditions. *Crop Prot.* 102, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.08.010>
- Gotor-Vila, A., Usall, J., Torres, R., Abadias, M., Teixidó, N., 2017b. Formulation of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using different approaches: liquid, freeze-drying and fluid-bed spray-drying. *BioControl* 62, 545–555. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9802-3>
- Gotor-Vila, A., Usall, J., Torres, R., Ramos, M.C., Teixidó, N., 2017c. Environmental stress responses of the *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8-formulated products on nectarines and peaches. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 225, 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.015>
- Guijarro, B., Larena, I., Casals, C., Teixidó, N., Melgarejo, P., Cal, A. De, 2019. Compatibility interactions between the biocontrol agent *Penicillium frequentans* Pf909 and other existing strategies to brown rot control. *Biol. Control* 129, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.11.011>
- Hsieh, F.C., Lin, T.C., Meng, M., Kao, S.S., 2008. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr. Microbiol.* 56, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9003-x>
- Kasfi, K., Taheri, P., Jafarpour, B., Tarighi, S., 2018. Identification of epiphytic yeasts and bacteria with potential for biocontrol of grey mold disease on table grapes caused by *Botrytis cinerea*. *Spanish J. Agric. Res.* 16, e1002. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-11378>
- Larena, I., Torres, R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., Bellini, A., Mandrin, J.F., Lichou, J., De Eribe, X.O., Usall, J., 2005. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biol. Control* 32, 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.10.010>
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M., 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74, 1047–1051. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90002-V](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90002-V)
- Medeot, D.B., Bertorello-Cuenca, M., Liaudat, J.P., Alvarez, F., Flores-Cáceres, M.L., Jofré, E., 2017. Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture media. *Biol. Control* 115, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.10.002>
- Navarta LG, Calvo J, Calvente V, Benuzzi D, Sanz M.I., 2011. Freezing and freeze-drying of the bacterium *Rahnella aquatilis* BNM 0523: study of protecting agents, rehydration media and

- freezing temperatures. *Lett Appl Microbiol* 53: 565–571.
- Ohara, H., Hiyama, K., Yoshida, T., 1992. Non-competitive product inhibition in lactic acid fermentation from glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 773–776. <https://doi.org/10.1007/BF00172192>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L., Thonart, P., 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9, 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Pryor, S.W., Gibson, D.M., Hay, A.G., Gossett, J.M., Walker, L.P., 2007. Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during the solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 63–79. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0036-1>
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Reis, F.A.S.L., Sérvulo, E.F.C., De França, F.P., 2004. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 115, 899–912. <https://doi.org/10.1385/abab:115:1-3:0899>
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A., 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 430–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- Singh, A., Rautela, R., Cameotra, S., 2014. Substrate dependent *in vitro* antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2. *Microb. Cell Fact.* 13, 67. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-67>
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., 1995. Media for industrial fermentations. In: Principles of fermentation technology. Pergamon Press, Oxford, pp. 93–121.
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., Jacques, P., Thonart, P., Vater, J., 1999. Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3 [published erratum appears in *Chem Biol* 1999 May;6(5):R156]. *Chem Biol* 6, 31–41.
- Teixidó, N, Torres R, Abadias M, Usall J., 2011 Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. In: Lacroix, C., (Ed.), Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, pp. 364–402
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., Sampedro, I., 2018. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT8661 against *Botrytis cinerea*. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P., 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1151–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Villarino, M., Egüen, B., Lamarca, N., Segarra, J., Usall, J., Melgarejo, P., De Cal, A., 2013. Occurrence of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* after introduction of *M. fructicola* in peach orchards in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 137, 835–845. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0292-6>
- Yáñez-Mendizábal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C., Teixidó, N., 2011. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. *Biocontrol Sci. Technol.* 21, 409–426. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Teixidó, N., 2012. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biol. Control* 60, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>
- Zabriskie, D.W., Armiger, W.B., Phillips, D.H., Albano, P.A., 1980. Traders' guide to fermentation medium formulation. Traders Protein, Memphis.



## 5 DISCUSIÓN GENERAL

Esta Tesis Doctoral ha centrado su investigación en el desarrollo de un bioformulado con la cepa antagonista *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 como agente de biocontrol. La cepa ha demostrado una elevada actividad antifúngica frente a numerosos patógenos fúngicos postcosecha como *Monilinia fructicola*, *M. laxa*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *P. expansum* o *Botrytis cinerea* en condiciones de laboratorio e *in vivo*. La formulación fue escalada en medio líquido para posteriormente ser utilizada durante una campaña en viñedos para luchar contra la podredumbre gris y en postcosecha en nectarinas para prevenir la podredumbre marrón.

La principal razón para llevar a cabo estudios basados en el biocontrol es la búsqueda de alternativas sostenibles que puedan sustituir o combinarse con el uso de pesticidas químicos de síntesis. Su impacto en el medio ambiente y en la salud humana está haciendo que la conciencia social gane fuerza y obligue a las Administraciones a tomar medidas urgentes frente a este tipo de compuestos químicos. Sin embargo, este cambio es complejo, tanto por la necesidad de concienciación de los agricultores como por la dificultad de comercialización de los productos de biocontrol debido al dilatado tiempo y elevado coste económico de los registros. Esto supone que sean numerosas las cepas que han demostrado buenos resultados *in planta* pero que nunca han llegado a desarrollarse a nivel industrial (Droby et al., 2016; Usall et al., 2016). Los agentes de biocontrol tienen mejor capacidad de regular el entorno físico y actuar directamente sobre un objetivo concreto en comparación con los pesticidas químicos. Aun así, y a pesar de las numerosas ventajas citadas durante esta Tesis Doctoral, el éxito de estos agentes está sujeto a una serie de agentes externos, sobre todo en el campo, como climatología, tipo de suelo, cultivo, variedad, dispersión de químicos no deseables, microbiota propia de la planta... limitando así su efectividad como estrategia de control de enfermedades (Droby et al., 2009).

A continuación, se van a discutir distintos puntos clave sobre el desarrollo de agentes de biocontrol, y más concretamente, los pasos que se han seguido para poder llevar a cabo la elaboración de la presente Tesis Doctoral mediante cepas del género *Bacillus*.

## 5.1 Caracterización de *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 como agente de biocontrol

### 5.1.1 Aislamiento e identificación

En el desarrollo de productos comerciales a base de microorganismos antagonistas, el primer paso es identificar y evaluar las posibilidades del agente para poder ser desarrollado a nivel industrial. Una de las principales razones que explican la falta de éxito en el control biológico está relacionado con la legislación. Al igual que ocurre con los pesticidas químicos, estos agentes también son considerados sustancias activas, por lo que deben estar reguladas según las guías que siguen las sustancias químicas (Alabouvette y Cordier, 2011). En Europa, la inclusión de productos de protección de plantas (PPPs) en el mercado está regulado por el Reglamento (EC) 1107/2009, incluyendo la aprobación de químicos, extractos de plantas o microorganismos. Concretamente, el Reglamento (UE) 283/2013 de la Comisión establece los requisitos sobre datos aplicables a las sustancias activas, incluyendo los microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y virus.

Esta Tesis Doctoral se ha centrado principalmente en desarrollar el antagonista bacteriano *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14, aunque otras como *B. amyloliquefaciens* I3 o I5 también han sido evaluadas frente a algunas enfermedades postcosecha. BUZ-14 fue aislada de melocotones en la Universidad de Zaragoza en el año 2014, y desde entonces se ha continuado estudiando sus condiciones como posible agente de biocontrol. Calvo et al. (2019) (Capítulo 2) realizaron una identificación molecular a través de los genes 16S y *gyrB* y la elaboración de los árboles filogenéticos correspondientes permitió identificarla como *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. Los árboles filogenéticos mostraron además que las especies más cercanas eran *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 y *B. methylotrophicus* Y37. Sin embargo, los estudios llevados a cabo por Dunlap et al. (2016) concluyen que *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* y *B. methylotrophicus* son la misma especie y deberían denominarse ambas como *B. velezensis*. Sin embargo, a lo largo de toda la Tesis BUZ-14 ha sido nombrada como *amyloliquefaciens* ya que estos cambios fueron investigados tras su comienzo. Las nuevas investigaciones referentes a este agente deberán incluir un cambio en la designación de la especie.

Todos los expertos están de acuerdo en la importancia de una correcta identificación del microorganismo, y aunque existe un debate abierto sobre cuál debe ser el nivel de identificación, los científicos coinciden en que se debe llegar hasta el nivel de cepa mediante técnicas moleculares lo más sensibles posibles. Esta justificación viene dada porque muchas especies de microorganismos incluyen tanto cepas patógenas como beneficiosas. La elaboración de árboles filogenéticos permite situar las cepas seleccionadas más o menos alejadas de especies o géneros bacterianos que pudieran ser patógenos para el ser humano. Un claro ejemplo ocurrió en el año 2006, cuando Cordier et al. (2007) compararon el gen 18S rDNA de varias cepas de *Trichoderma* para evaluar su actividad como posibles agentes de biocontrol. Los resultados mostraron que una de las cepas se encontraba en el mismo ramaje que algunas cepas de la especie *T. longibrachiatum*, especie conocida por ser patógena para el ser humano por lo que los autores decidieron, con buen criterio, excluirla de sus investigaciones.

### **5.1.2 Propiedades biológicas**

Los mecanismos de acción que los agentes de biocontrol ejercen frente a las diversas enfermedades que afectan a las plantas son numerosos y diversos. Sin embargo, uno de los más reconocidos, y que tienen en común muchos ABCs, es la producción de metabolitos activos (antibiosis). La actividad de estos metabolitos es generalmente elevada y su naturaleza muy diversa por lo que, aunque su estudio resulta muy interesante desde un punto de vista comercial, no debemos ignorar que también podrían tener un efecto negativo (tóxico) en el medio ambiente y en el ser humano.

Por ello, la evaluación del riesgo de estos agentes de biocontrol se ha convertido en un escollo para su desarrollo ya que son temporal y económicamente costosos, lo que deriva en unos complejos y tardíos sistemas de registro. El riesgo debe ser determinado cepa por cepa, ya que cada microorganismo tiene un comportamiento diferente en el medio ambiente y hay que hacer estudios de sensibilización, toxicidad aguda, patogenicidad, infectividad y genotoxicidad (Alabouvette y Cordier, 2011).

La legislación remarca la necesidad de identificar y purificar los metabolitos producidos por las cepas. Pero... ¿es preciso identificar todos los metabolitos que producen? En algunos casos la variedad de metabolitos generados es enorme e incluso algunos todavía no se han conseguido aislar e identificar. Además, un mismo ABC es

capaz de producir distintos metabolitos dependiendo del organismo diana y el ambiente en el que se encuentre (Alabouvette y Cordier, 2011). La actividad del G<sup>o</sup> *Bacillus* se basa generalmente en la producción de metabolitos antimicrobianos, y en la mayoría de los casos se habla de cientos de sustancias generadas, por lo que la evaluación de todas ellas es prácticamente imposible. Por ello, lo ideal es centrarse en aquellas responsables de la inhibición del patógeno objetivo. Calvo et al. (2019) identificaron las principales sustancias antifúngicas que la cepa *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 era capaz de generar (Capítulo 2) siendo la iturina, la fengicina y la surfactina las principales sustancias antifúngicas detectadas en el sobrenadante de esta cepa. Otros estudios científicos también han identificado estos metabolitos como los principales responsables de las inhibiciones de fitopatógenos fúngicos, destacando la acción de la iturina A, bacilomicina D y fengicina. Sin embargo, no son siempre las mismas sustancias las responsables de la actividad. Por ejemplo, Chen et al., (2016) demostraron que sólo la isoforma C-14 de iturina A producida por *B. amyloliquefaciens* PG12 era capaz de inhibir *Botryosphaeria dothidea* en la manzana y Yáñez-Mendizábal et al. (2012) concluyeron que era la fengicina el lipopéptido capaz de controlar *Monilinia* spp. en melocotón. También Liu et al., (2011) identificaron la fengicina como sustancia activa, aunque en combinación con la bacilomicina D. Esta gran diferencia de actividad entre sustancias producidas por iguales especies del G<sup>o</sup> *Bacillus* subraya la necesidad de estudiar la actividad antifúngica de cada nueva cepa que se quiera comercializar ya que aunque iturinas y fengicinas sean las sustancias más activas, estas no tienen por qué las responsables frente a todos los patógenos. Creemos que en este punto además juegan un papel fundamental tanto las isoformas como la concentración de metabolito producida. BUZ-14 ha demostrado ser una gran productora de iturina A (Capítulo 2), lo que sumado a las bajas CMI de *Monilinia* spp. en melocotón o de *P. expansum* en manzana permite controlar ambas enfermedades *in vivo*.

Estas sustancias no han sido evaluadas individualmente en términos de toxicidad humana ni ambiental, pero son producidas por microorganismos considerados no patógenos. Además, existen otras sustancias como policétidos, bacteriocinas o sideróforos (Chen et al., 2009; Scholz et al., 2011) así como Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) que también pueden contribuir a la acción antimicrobiana (Chen et al., 2008; Gotor-Vila et al., 2017). En el tercer capítulo de esta Tesis Doctoral se ha evaluado

la actividad antifúngica del volatoloma generado por *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 y se han identificado y evaluado los metabolitos gaseosos (COVs) producidos frente a varias enfermedades postcosecha ocasionadas por mohos fitopatógenos en cítricos, frutas de pepita y frutas de hueso.

Hay estudios que demuestran cómo el 10 % del genoma de la especie *B. amyloliquefaciens* está dedicado a producir metabolitos (Ongena et al., 2008). La manera más rápida y eficaz de saber los metabolitos producidos es la identificación de los genes que los expresan en forma de proteínas. La secuenciación masiva es actualmente una de los mayores avances moleculares de la última década, con la que se puede evitar la casi imposible tarea de aislar y purificar todos los compuestos producidos por los ABCs. Además, en relación con la sección anterior, esta técnica puede ayudar a identificar posibles genes relacionados con la producción de sustancias tóxicas, como la cereulida en el caso de *B. cereus* (Granum y Lund, 1997), única especie del género *Bacillus* capaz de producir toxoinfecciones alimentarias.

### 5.1.3 Condiciones ecofisiológicas

La actividad de los agentes microbianos de biocontrol está altamente influenciada por factores abióticos como temperatura, pH, actividad de agua o radiación ultravioleta. En el primer capítulo de esta Tesis, se estudiaron los intervalos de temperatura y de pH a los cuales BUZ-14 era capaz de multiplicarse. Estos factores son considerados los más relevantes para poder identificar el nicho medioambiental en el cual el ABC podría ejercer su actividad antagonista (Costa et al., 2002; Teixidó et al., 1998). Como se verá más adelante, el crecimiento del ABC en la matriz vegetal diversifica de manera significativa su acción sobre el fitopatógeno, con lo que conocer sus condiciones de supervivencia y crecimiento es crucial para un posterior éxito en la aplicación.

Las temperaturas disgenésicas son de los factores externos que mayor estrés ocasionan a un microorganismo. Las temperaturas mínima y máxima a la cual un ABC puede crecer o sobrevivir determinan las futuras condiciones en las que podrá ser aplicado y la capacidad para ser formulado (atomización, liofilización, líquido...). La adaptación del ABC a altas temperaturas es esencial ya que le proporciona cierta ventaja una vez es aplicado en campo o para llevar a cabo las formulaciones deshidratadas (Sui et al., 2015). Por otro lado, la tolerancia a temperaturas de refrigeración también es interesante desde

un punto de vista de la conservación postcosecha ya que los productos hortofrutícolas frescos son mantenidos bajo refrigeración durante el almacenamiento y el transporte, previos a su comercialización. Asegurarse de que el ABC está viable durante esos periodos o que incluso sea capaz de crecer evitaría que la actividad del antagonista se viera afectada (Calvo et al., 2017). El segundo factor crucial es el pH ya que cada producto hortofrutícola posee un pH diferente en función de su composición nutricional, lo cual también puede influir sobre el desarrollo del agente en el fruto. También el uso de fertilizantes en agricultura que aportan nitrógeno o fósforo puede influir de una manera significativa en el crecimiento o modo de acción del ABC una vez aplicado en el campo (Daryaei et al., 2016).

En el primer y segundo capítulos de este trabajo, se demostró cómo BUZ-14 tenía un rango de temperatura óptimo de mesofilia entre 30 y 37 °C, y aunque toleraba temperaturas de refrigeración, no era capaz de multiplicarse. Tampoco era capaz de hacerlo a pHs por debajo de 4,5, lo cual podría ser un factor limitante para su desarrollo en algunos frutos. También se observó cómo BUZ-14 era capaz de controlar la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. en melocotones almacenados en refrigeración y posteriormente a temperatura ambiente. Durante el periodo de refrigeración, BUZ-14 mantuvo su población, incluso redujo 1 u. log., aunque se multiplicó hasta concentraciones de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> tras 4 días de almacenamiento a 20 °C. Tras los diferentes frutos testados (melocotón, cereza, nectarinas, manzanas, uvas, mandarinas y naranjas) se ha determinado que es en el melocotón en el único fruto en el que BUZ-14 es capaz de crecer, y por tanto, producir suficientes metabolitos *in planta* como para inhibir el crecimiento de *Monilinia* spp. (Capítulo 2).

Además de enfrentarse a *M. fructicola* y *M. laxa* en melocotón, BUZ-14 fue también testado frente a otros fitopatógenos como *P. italicum* y *P. digitatum* en naranjas y mandarinas, *P. expansum* en manzanas o *B. cinerea* en uvas de mesa en tratamiento curativo (el patógeno y el ABC se inoculan en el mismo momento). El antagonista solo fue capaz de reducir la incidencia de *Monilinia* spp., aunque también la severidad de *B. cinerea* en uvas. Sin embargo, cuando el tratamiento se realizó de manera preventiva en los cítricos (primero se inocula el ABC y tras 24 horas de almacenamiento a temperatura ambiente se inocula el patógeno) los resultados fueron sorprendentes, ya que no hubo infección fúngica. Arrebola et al. (2010) también lo observaron con una cepa de *B.*

*amyloliquefaciens* PPCB004 frente a *P. crustotum* y *Colletotrichum gloeosporoides*, donde el tratamiento preventivo redujo significativamente la incidencia del primer patógeno y el curativo lo hizo en el segundo. Estos ejemplos dejan claro la importancia de estudiar cada patógeno y cultivo por separado dado que la acción antagonista puede ser muy variable en función de cada uno de estos factores.

Factores como la temperatura o el pH no solo son importantes para el desarrollo del ABC y la posible producción de metabolitos una vez aplicados, si no también para su producción *in vitro* como bioformulado. Otros factores tenidos en cuenta en esta Tesis han sido la importancia del tiempo de incubación en la producción de metabolitos y la concentración celular necesaria para ser eficaz (Capítulo 1). Además del medio de cultivo en el que ha crecido el ABC, el tiempo es un factor fundamental para maximizar la producción de lipopéptidos. Para ello, BUZ-14 se incubó a 30 °C durante 24, 48, 72 y 96 h en el medio de referencia 863 y con un pH neutro de 7. De cara a optimizar las condiciones ideales, tras cada tiempo de incubación se obtuvieron los cuatro sobrenadantes a los que se les hicieron test *in vitro* a diferentes concentraciones (1:1, 1:4 y 1:10) y se observó cómo eran necesarias al menos 96 h de incubación para inhibir todos los patógenos fúngicos testados, además de ser el tiempo óptimo para obtener las mayores concentraciones de lipopéptidos (Capítulo 2). Este hecho tiene gran relevancia, ya que uno de los modos de acción posibles y que fue propuesto en el segundo capítulo, es la maximización de la producción de los metabolitos activos en el bioformulado para que al ser aplicados junto con las células microbianas ejercer una actividad antifúngica curativa en el producto desde el primer momento.

#### **5.1.4 Modo de acción**

Los microorganismos antagonistas, como organismos vivos, pueden ejercer diversos modos de acción que dependerán de factores como la propia cepa, el huésped y el patógeno, generando así una interacción microbiana muy compleja entre tres organismos. A veces, los mecanismos de acción pueden actuar simultáneamente y, por tanto, es difícil elucidar cuál de todos es el más decisivo (Di Francesco et al., 2016). Como ya se ha comentado anteriormente, la iturina A fue el metabolito más importante en la inhibición de *Monilinia* spp. en melocotón y de otros mohos fitopatógenos *in vitro*

(Capítulo 2), pero eso no significa que sea la única sustancia o que toda la actividad sea debida a la antibiosis.

En el tercer capítulo también se estudió la actividad antifúngica del volatoloma y de los COVs, metabolitos gaseosos con actividad antifúngica demostrada (Arrebola et al., 2010; Gotor-Vila et al., 2017), producidos por BUZ-14. Tanto *in vitro* como *in vivo* el volatoloma de BUZ-14 mostró una actividad inhibitoria notable y sustancias volátiles como el diacetilo, benzaldehído, alcohol isoamílico o 2-heptanona mostraron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) *in vitro* notablemente bajas frente a los fitopatógenos *M. fructicola*, *M. laxa*, *B. cinerea*, *P. italicum*, *P. digitatum* y *P. expansum*. También en frutas como uvas de mesa estos compuestos fueron capaces de controlar la podredumbre gris causada por *B. cinerea*, o el alcohol isoamílico en albaricoques para inactivar *M. laxa*. Aun así, es difícil saber si alguno de estos compuestos por sí solo es el responsable de la inhibición causada por el volatoloma completo de BUZ-14. Es posible que exista un efecto sinérgico o coadyuvante entre varios compuestos y no ser necesariamente uno concreto el responsable. La técnica utilizada en este estudio permite evaluar únicamente los COVs, ya que el microorganismo no entra en contacto con el alimento y por tanto otros metabolitos difusibles como lipopéptidos o policétidos estarían descartados en la posible inhibición.

En el caso del melocotón donde se ha demostrado que BUZ-14 es capaz de crecer y producir cantidades significativas de iturina. A tampoco podemos descartar que genere además volátiles orgánicos, o que los propios volátiles ya generados en el bioformulado previo a la aplicación ejerzan cierta actividad en los frutos. Aun así, creemos que, aunque otros mecanismos como competición o inducción de resistencias pueden participar en la actividad antifúngica, es la iturina A el principal metabolito responsable de la inhibición de *Monilinia* spp. en el melocotón, tal y como se ha demostrado en el Capítulo 2.

La producción de metabolitos *in planta* puede acarrear más problemas que si los metabolitos son añadidos directamente al ambiente con el formulado. La legislación deja claro que no puede haber residuos de metabolitos en el producto, al igual que con los pesticidas de origen químico. Sin embargo, al producirlos directamente y continuamente en el fruto, establecer la concentración y el tipo de sustancia producida es complicado. Nosotros hemos estudiado la producción de una sola sustancia, pero sabiendo el gran



número de metabolitos que estas cepas son capaces de generar, el registro puede ser muy complejo, a pesar de que la cantidad de otros metabolitos producidos pueda ser extremadamente baja. En el capítulo 2 se cuantificaron 1.6-1.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  de iturina A en la pulpa del melocotón, pero al no estar estas sustancias incluidas en el Reglamento de Límites Máximos de Residuos (Reglamento (CE) 396/2005), no queda claro si podría ser aceptado comercialmente. En el cuarto capítulo se dio un caso diferente ya que la inoculación superficial en nectarina no permitió que BUZ-14 se desarrollara, ya fuera por el tipo de inoculación (en el melocotón se realizó en la pulpa mediante pinchazo), la disponibilidad de nutrientes (azúcares, ácidos, vitaminas...) o por el tipo de epidermis de una y otra fruta. Nuevos estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han demostrado la capacidad de BUZ-14 para desarrollarse en el melocotón tras la inmersión del fruto en el bioformulado líquido. En este caso se realizaron microheridas previo al tratamiento, simulando las que pudiesen producirse en una manipulación postcosecha, para permitir la colonización del antagonista en el interior. Sin embargo, al igual que ocurrió en la nectarina, no fue capaz de multiplicarse en la superficie intacta del fruto. Es probable que el agente necesite de los nutrientes que se encuentran en la pulpa para poder crecer y generar así las sustancias antifúngicas, además de colonizar la herida. Aun así, el que no haya desarrollo del ABC en el fruto no significa que otros mecanismos no permitan el éxito. Los metabolitos activos podrían ser añadidos con los tratamientos, ya que como se discutirá en la próxima sección, la elección de un buen medio de crecimiento puede hacer que estén presentes en elevadas cantidades en el bioformulado. Esto haría que el ABC no tuviera que ser tan específico para el cultivo seleccionado y evitar así un cribado demasiado exhaustivo.

Por otro lado, uno de los modos de acción más estudiados recientemente es la inducción de resistencias (Kawagoe et al., 2015; Mhlongo et al., 2018), y aunque este mecanismo no ha sido evaluado en esta Tesis Doctoral, será objeto de futuras investigaciones especialmente en la aplicación en cultivos. Los metabolitos producidos por los ABCs son capaces de fomentar las resistencias de las plantas generando así sus propias proteínas de resistencias a patógenos (RP). Este modo de acción indirecto es complicado de demostrar, ya que podría ser un conjunto de mecanismos los que generaran esa actividad antifúngica (combinación de modos de acción). De hecho, esta acción conjunta entre mecanismos directos e indirectos es una de las hipótesis con mayor interés

científico actual (Farace et al., 2015; Köhl et al., 2019; Pieterse et al., 2014). Algunas cepas del G<sup>o</sup> *Bacillus* son reconocidas como ABCs efectivos no solo por su producción de antibióticos y COVs, sino también por ayudar en el desarrollo de las plantas mediante una mejora del aprovechamiento y solubilización de los nutrientes o produciendo hormonas de crecimiento o sideróforos, estando involucrados en la formación de biopelículas o en la inducción de resistencias anteriormente nombrada (Raza et al., 2016; Spadaro y Droby, 2016).

También la exclusión competitiva o competición es un mecanismo a tener en cuenta dentro del control biológico. Es la consecuencia del requerimiento de los mismos macro y micronutrientes (vitaminas, azúcares, minerales) o del mismo espacio entre dos o más microorganismos. La mayoría de los mohos alterantes postcosecha son parásitos de heridas o traumatismos, por lo que la habilidad del ABC por colonizar los nichos y aumentar su población es una gran estrategia para el control de dichos biodeterioros (Di Francesco et al., 2016). Entre los nutrientes, el hierro es uno de los microelementos esenciales para el desarrollo fúngico. Muchas especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* generan sideróforos, sustancias capaces de secuestrar el hierro y evitar la germinación, crecimiento y virulencia del patógeno (Di Francesco et al., 2016; Spadaro and Droby, 2016). La cantidad de sideróforos producidos por un ABC depende de la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Por tanto, al igual que ocurre con otros metabolitos, los sideróforos pueden variar en función del ambiente en el que se encuentre el microorganismo (Alexander y Zuberer, 1991). Aunque esta estrategia no se ha tenido en cuenta en esta Tesis, será desarrollada más adelante por nuestro grupo de investigación. Actualmente se está llevando a cabo una nueva Tesis Doctoral en la que se profundizará en los modos de acción de BUZ-14 frente a *Monilinia* spp., enfermedad frente a la que creemos este antagonista tiene la mayor actividad. Entre los modos de acción que se estudiarán la inducción de resistencias en planta, producción de enzimas líticas, generación de sideróforos o la formación de biofilms, estrechamente relacionado con la exclusión competitiva.

## 5.2 Producción y formulación de *B. amyloliquefaciens* BUZ-14

### 5.2.1 Producción microbiana en medios de bajo coste

La producción del ABC es un paso fundamental para poder desarrollar un producto de biocontrol comercial exitoso. El objetivo de la producción es conseguir la mayor concentración, ya sea celular o de metabolitos activos, en el menor tiempo posible (Nunes, 2012). Sin embargo, el mayor factor limitante durante este proceso es el elevado coste de los ingredientes a utilizar. Por ello, muchas investigaciones se han basado en buscar fuentes de nitrógeno y carbono baratas basadas en desperdicios de la agricultura o subproductos de la industria agroalimentaria (Nunes et al., 2012; Yáñez-Mendizábal et al., 2012)

En el Capítulo 4 de la presente Tesis se han testado numerosos ingredientes baratos que pudieran sustituir a medios ricos habitualmente utilizados en el laboratorio como TSB, (Tryptone Soy Broth,) BHI (Brain Heart Infusion Broth), 863 o MOLP (Medium Optimum for Lipopeptide Production). El trabajo se centró principalmente en la combinación de ingredientes y concentraciones entre harinas, almidón, melazas, extractos de carne o malta, vinaza (obtenida de bodegas de Cariñena, Zaragoza) y sales inorgánicas. Aunque los subproductos son muy baratos, pueden tener inconvenientes como la poca estandarización y purificación, pudiendo contener impurezas que deban ser eliminadas durante la preparación del medio. También se puede dar poca reproducibilidad en los resultados debido a la escasa homogeneidad y variación de la composición en función de la temporada y el origen (Costa et al., 2001; Stambury et al., 1995; Teixidó et al., 2011).

En este trabajo, la vinaza no resultó beneficiosa para la cepa antagonista ya que no permitió su multiplicación celular. Podría ser debido al escaso aporte de nutrientes beneficiosos o algún compuesto que ejerciera una acción inhibitoria. Sin embargo, el resto de nutrientes como harina de soja, almidón de maíz, triptona o extractos de carne, entre otros, sí que permitieron su crecimiento en los otros medios hasta concentraciones máximas de  $10^8 - 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. El uso de minerales como elementos traza en la mayoría de los medios ha sido referenciado como un factor importante en la producción de metabolitos para numerosas especies de *Bacillus* (Cooper et al., 1981), sobre todo el Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (Abdel-Mawgoud et al., 2008). Por ello, también han sido incluidos

en los medios de bajo coste. La búsqueda de estos nutrientes es esencial para desarrollar industrialmente los formulados, sin embargo, otros aspectos como la aireación, la velocidad de agitación, la temperatura o el pH de los medios son de vital importancia. Como se verificó durante la caracterización de la cepa BUZ-14, las temperaturas óptimas fueron entre 30 y 37 °C, y un pH neutro, por lo que se eligió una temperatura mesófila de 30 °C (temperaturas más altas significan un mayor gasto durante la producción) y un pH en el medio entre 6,5 y 7, ajustado mediante NaCl o HCl.

Nosotros hemos testado una gran cantidad de ingredientes y en diversas concentraciones, aunque en la Tesis solo han sido incluidos algunos más relevantes. En nuestra opinión, es uno de los puntos más críticos en los que hay que incidir para que los productos de biocontrol puedan ser comercializables ofreciendo la mayor eficacia posible. Uno de los problemas que se encuentran es la escasa oferta industrial para su desarrollo. Sólo algunas empresas cuentan con capacidad para elaborar formulados de este tipo, sobre todo deshidratados, y habitualmente las instalaciones son utilizadas para elaborar sus propias marcas. La falta de infraestructuras para el desarrollo de estos formulados es una gran limitación en la producción y por tanto en su comercialización.

### **5.2.2 Producción de endosporos**

BUZ-14 es una cepa capaz de generar formas de resistencia o endosporos una vez se ha alcanzado la fase de muerte celular (Capítulo 1), característica propia del G<sup>o</sup> *Bacillus*. Estos esporos son realmente resistentes y estables, lo que significa que se mantienen viables durante largos periodos de tiempo de exposición a condiciones adversas (Nagorska et al., 2007). Esto hace que el G<sup>o</sup> *Bacillus* se considere ideal para el desarrollo de productos de biocontrol desde un punto de vista biotecnológico, además de mantener su viabilidad durante la aplicación en los cultivos. Tal y como describió Errington (2003), la esporulación depende en gran medida de la disponibilidad de nutrientes durante la fase estacionaria. Recientemente, Posada-Urbe et al. (2015) demostraron que elementos minerales como calcio, manganeso, magnesio, hierro y zinc en concentraciones adecuadas son esenciales para la formación de endosporos, puesto que se encuentran presentes en las capas de los esporos. En el Capítulo 1 se puede observar cómo la concentración de endosporos aumentó desde 10<sup>4</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, tras 24 horas de incubación, hasta 10<sup>8</sup> esporos mL<sup>-1</sup> en la fase de latencia, tras 96 h de incubación.

Esto significa que, tras este tiempo, prácticamente todas las células vegetativas han sido reemplazadas en el medio por sus formas de resistencia, las cuales volverán a germinar cuando se recuperen las condiciones ideales.

La presencia de endosporos (alta termoresistencia) permite que se desarrollen formulaciones deshidratadas donde se necesitan altas temperaturas como la atomización (90-100 °C), aunque nuevas técnicas como el lecho fluido también están siendo aplicadas ya que las temperaturas requeridas son menores (entre 40-45 °C) (Gotor-Vila et al., 2017a). Esta técnica, al igual que la liofilización, pueden ser utilizadas con ABCs que no produzcan endosporos, como bacterias Gram negativas y levaduras.

### **5.2.3 Influencia del medio en la producción de metabolitos antifúngicos**

Como se ha explicado anteriormente, la producción del ABC va a depender en gran medida del medio de cultivo y por tanto de los ingredientes utilizados. Sin embargo, esta producción no solo tiene por qué consistir en la multiplicación celular, sino también en la generación de metabolitos antifúngicos. En función del modo de acción empleado por el ABC frente a un patógeno y en un cultivo concreto, la manera de producirlo puede ser diferente. La producción de metabolitos antes de ser aplicado el formulado permite que el ABC no requiera de unas características tan adaptadas al ambiente ni que tenga que multiplicarse en la matriz vegetal, pero para ello hay que optimizar la producción y equilibrar el coste de los ingredientes con la cantidad de metabolitos producidos.

En este trabajo se han identificado y cuantificado los principales metabolitos antifúngicos generados por BUZ-14, incluyendo los lipopéptidos y los volátiles, en los medios de cultivo testados con el objetivo de seleccionar el más adecuado. Los medios M2 y M3 (Capítulo 4) mostraron una baja capacidad para la producción de fengicina e iturina A, lo cual lo aleja de ser un medio prometedor dado que la iturina A demostró ser la sustancia responsable de las inhibiciones fúngicas. Es probable que a estos medios les falte alguna fuente nutricional esencial para la producción de este metabolito, como extracto de levadura o triptona, además de minerales relevantes como zinc o hierro. Sin embargo, es complicado achacar la producción de iturina A a algunos ingredientes concretos.

Por el contrario, en estos dos medios la producción de surfactina fue la más elevada (5.000-5.550  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Esta sustancia se ha asociado recientemente con la

colonización y formación de biofilms por parte de cepas de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Se caracteriza además por reducir la tensión superficial (Mousivand et al., 2012; Ongena y Jacques, 2008; Zerouh et al., 2014), lo cual puede favorecer el antagonismo frente a los fitopatógenos de origen fúngico. En cualquier caso, estos medios no se utilizarán dada la escasa producción de iturina A, aunque seguirán usándose en futuros estudios para evaluar la capacidad de formar biofilms y colonización en diferentes cultivos. Los medios de bajo coste que mostraron mayor concentración de iturina A fueron el MOLP modificado y SG (Capítulo 4), siendo los más prometedores para continuar con su posterior formulación y escalado.

Por otro lado, los COVs también demostraron una capacidad antifúngica muy variable dependiendo del medio en el que había crecido el ABC. En el Capítulo 3, los estudios *in vitro* demostraron que el volatoloma de BUZ-14, I3 e I5 producidos en medio MOLP tiene mayor actividad que los producidos en el medio 863 frente a los mohos alterantes utilizados durante toda la Tesis (*Monilinia* spp., *Penicillium* spp. y *B. cinerea*). Esto puede ser debido a los distintos compuestos (variable cualitativa) que se hayan podido formar o porque las concentraciones hayan sido superiores (variable cuantitativa). Los estudios *in vivo* se continuaron con el medio MOLPA, donde el volatoloma obtenido de BUZ-14 consiguió reducir la incidencia y severidad de *Monilinia* spp. en albaricoque en un 50 %, al igual que hizo el de I3 con *B. cinerea* en uvas de mesa.

Los lipopéptidos y los volátiles han mostrado resultados diferentes tanto en producción como en actividad dependiendo del medio de cultivo utilizado y, como ya se ha explicado anteriormente, del tiempo de incubación. Por lo tanto, no todos los medios permiten el máximo desarrollo de todos los modos de acción del ABC. La selección de los ingredientes a utilizar antes de la formulación es esencial, y tiene que maximizar el mecanismo de acción principal del microorganismo para que la efectividad sea la más elevada posible.

En el caso concreto de nuestro estudio, habría algunos ingredientes específicos cuya presencia debería ser indispensable para que BUZ-14 produzca iturina A, como son minerales tales como zinc y hierro, o fuentes elevadas de nitrógeno como triptona o extracto de levadura. También fuentes de carbono como la sacarosa pueden ser crucial para su producción. Sin embargo, parece ser que harinas o melazas favorecen en mayor

medida la producción de surfactinas, importantes para la producción de biofilms, pero una limitación en la producción industrial debido a la generación de espumas que hacen complicado su escalado, sumado a la dificultad de esterilización del producto.

#### **5.2.4 Bioformulación líquida y deshidratada**

Una vez conocidas las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa antagonista desde un punto de vista tanto tecnológico como económico, el siguiente paso consistió en desarrollar el formulado para su posterior aplicación en pre- o postcosecha. La formulación incluye conocer previamente las interacciones entre el ABC, el patógeno y el cultivo donde se va a aplicar para poder optimizar la formulación en base al modo de acción. Por tanto, en el caso de la antibiosis, será de vital importancia conocer los compuestos activos que serán responsables de la actividad antimicrobiana del antagonista (Hynes y Boyetchko, 2006).

Los formulados están normalmente compuestos por los ingredientes activos, ya sean células o esporos; los portadores de las sustancias activas que mantienen su estabilidad y facilitan su aplicación; y los protectores o adyuvantes que las protejan de condiciones adversas como altas temperaturas, deshidratación o radiación ultravioleta y que además ayudan en la dispersión del producto en el ambiente (Hynes y Boyetchko, 2006).

Como se ha explicado anteriormente, en el caso de BUZ-14 es la iturina A el metabolito responsable de la inhibición de *Monilinia* spp. en melocotones, además de otros mohos de interés en postcosecha (Capítulo 2). Por ello, el medio seleccionado en el capítulo 4 fue el MM, dado que en el mismo la producción de iturinas era la más elevada. Sin embargo, y a pesar de que estos metabolitos parecen ser los principales responsables, otros posibles mecanismos pueden actuar de forma simbiótica, como los volátiles, la formación de biofilms o la inducción de resistencias (aunque no todos se hayan demostrado experimentalmente en esta Tesis). Por ello, la inclusión de las células en el formulado sigue siendo un requisito. También es importante desde un punto de vista comercial, ya que la venta de productos de biocontrol que contengan exclusivamente metabolitos obliga a ser comercializados como productos fitosanitarios. Sin embargo, al contener células microbianas consideradas promotoras del crecimiento vegetal, pueden ser comercializados como fortificantes, evitando así grandes inconvenientes durante los

registros. Actualmente, solo algunas multinacionales como por ejemplo Bayer Crop Science o Syngenta tienen los recursos económicos suficientes para poder registrar agentes de biocontrol como productos fitosanitarios. De nuevo, se recalca la importancia de las Administraciones Públicas para tomar medidas en facilitar la legislación vigente referente a los registros de este tipo de productos.

En esta Tesis se han llevado a cabo tres tipos de formulados diferentes con la cepa *B. amyloliquefaciens* BUZ-14: un formulado líquido y dos deshidratados, uno liofilizado y otro desecado (Capítulo 4).

Las capacidades y medios para desarrollar los formulados deshidratados a nivel industrial eran muy limitados, por lo que se decidió realizar un formulado líquido escalado industrialmente con el que poder realizar las aplicaciones y además formular los deshidratados a partir del líquido. Los formulados deshidratados se produjeron a nivel de laboratorio con el objetivo de estudiar su viabilidad y capacidad antifúngica para poder escalarlo en futuras investigaciones.

El formulado líquido sólo estaba compuesto de la materia celular y los metabolitos producidos durante la fermentación; no contenía ni portadores ni adyuvantes. El formulado desecado tampoco contenía estas sustancias, ya que la temperatura de deshidratación fue lo suficientemente baja como para no causar daños a las células (30 °C). Por otro lado, el cultivo que posteriormente iba a ser liofilizado contenía 10 % de leche desnatada para protegerlo durante el proceso de liofilización.

En el cuarto capítulo se muestra como los formulados fueron capaces de mantener la viabilidad y la eficacia del ABC durante un año de almacenamiento (límite máximo de esta Tesis Doctoral). La excepción fue el formulado líquido almacenado a temperatura ambiente, el cual perdió la pureza del cultivo debido a contaminaciones microbianas externas. Esta contaminación se produjo probablemente al abrir el recipiente donde se encontraba el formulado. La logística utilizada no fue la más adecuada ya que algunos contenedores tuvieron que abrirse para desarrollar los formulados deshidratados y para estudiar la propia viabilidad del producto. Los contenedores guardados en frío, por el contrario, mantuvieron la pureza hasta el final del estudio (1 año), al igual que los deshidratados a temperatura ambiente. Una buena logística de almacenamiento que permita tener los formulados a temperatura ambiente sin la necesidad de ser abiertos



evitaría contaminaciones cruzadas y por tanto mejoraría la vida útil del producto. De este modo, se ahorrarían costes debidos a la temperatura de refrigeración y no sería necesario desarrollar formulados deshidratados cuyo coste también es superior al líquido. Sin embargo, nosotros pensamos que a pesar de los costes que supone el almacenamiento en frío, pueden ser asumidos por los agricultores y asegurar así la viabilidad y estabilidad del producto. La inversión en mantener el formulado en condiciones adecuadas puede ser más rentable que tener que comprar nuevos productos debido al deterioro del formulado.

Durante este estudio se concluyó que el medio seleccionado y las condiciones de producción fueron un éxito para poder desarrollar los formulados líquidos y ser aplicados posteriormente tanto en pre- como en postcosecha.

### **5.3 Aplicación en campo y en postcosecha del agente de biocontrol BUZ-14**

#### **5.3.1 Compatibilidad con pesticidas**

Estudiar la compatibilidad del ABC con los pesticidas habitualmente utilizados en el cultivo es indispensable para saber si el antagonista puede ser mezclado con químicos para aumentar su espectro de acción. El control biológico todavía no ha sido suficientemente estudiado como para poder aplicar agentes microbianos por sí solos. Lo ideal es comenzar a disminuir las dosis y la cantidad de pesticidas mezclándolos con sustancias que no comprometan la salud humana ni la contaminación ambiental. En nuestro estudio para determinar la actividad de nuestro agente frente a *B. cinerea*, agente causal de la podredumbre gris en viñedos (Capítulo 4), comprobamos como BUZ-14 podía combinarse con la mayoría de los fungicidas que tenían su principal acción frente a *Uncinula necator*, agente causal del oídio, de manera que se ejerciera un efecto simbiótico entre ambos productos, tratando de evitar la enfermedad causada por ambos fitopatógenos. De hecho, los resultados obtenidos en la parcela de Syrah, que no fue tratada con ningún pesticida, tuvieron que ser descartados ya que la incidencia de oídio fue demasiado elevada. Por el contrario, en la parcela de Garnacha, donde sí se aplicaron fungicidas específicos para oídio, la incidencia fue insignificante. Este ejemplo demuestra la importancia de conocer los objetivos diana de tu agente de biocontrol y su actividad

para poder combinarla con otras alternativas (ya sean químicas, biológicas o físicas) para controlar el mayor número de enfermedades.

### 5.3.2 Aplicación y estrategia de control

Como ya se ha explicado anteriormente, la formulación juega un papel determinante en la eficacia final del producto de biocontrol. En esta Tesis se han elaborado formulaciones líquidas y deshidratadas, pero para la aplicación final solo se ha utilizado la líquida ya que fue la única que se pudo desarrollar a nivel industrial.

Una de las principales limitaciones de los ABCs es el estrecho espectro de acción que normalmente poseen. Los agricultores destacan que el éxito o actividad que puedan tener se reduce a un huésped y patógeno específico, pero esta limitación es todavía más crítica en el caso de los ABCs en postcosecha debido al pequeño mercado potencial (Usall et al., 2016). En esta Tesis se ha estudiado la capacidad de biocontrol de BUZ-14 frente a numerosas enfermedades y en diversas frutas (Capítulo 1), demostrando su alta eficacia antifúngica frente a mohos como *Penicillium* spp. en cítricos o *Monilinia* spp. en fruta de hueso. Sin embargo, la aplicación mediante formulado solo se llevó a cabo en viñedos frente a *B. cinerea* y en nectarinas postcosecha frente a *M. fructicola* y *M. laxa*.

Durante las aplicaciones, la bacteria debe sobrevivir y establecerse en la superficie de los frutos a pesar del ambiente extremo en el caso de la precosecha, pero también la refrigeración durante el almacenamiento y distribución en la postcosecha pueden condicionar su supervivencia y colonización (Teixidó et al., 2006). Sin embargo, la adaptación del ABC a estos ambientes y su comportamiento una vez aplicado han recibido una menor importancia por parte de la comunidad científica que el modo de acción frente al patógeno (Lahlali et al., 2008; Norris et al., 2002).

La capacidad de BUZ-14 para tolerar diversas condiciones ambientales en pre y postcosecha ha sido demostrada a lo largo de esta Tesis. Establecer las poblaciones bacterianas en la superficie de la planta (colonización) a testar es una fase crítica en el control de enfermedades y conseguir poblaciones antagonistas fijadas, aunque sea en concentraciones mínimas, es crucial para asegurar la competición con los patógenos (Cañamas et al., 2008; Ippolito y Nigro, 2000). Sin embargo, la superficie de cada fruto es diferente, y la fijación puede variar significativamente. En este trabajo la mayoría de las inoculaciones han sido realizadas mediante herida en el interior del fruto, pero la

inoculación mediante spray en los viñedos o la inmersión de las nectarinas en el formulado demostró como BUZ-14 era capaz de fijarse y colonizar una superficie tan lisa como es el caso de estos dos frutos sin la adición de adyuvantes, mostrando recuentos iniciales altos ( $10^5$ - $10^6$  UFC  $g^{-1}$ ) que perduran en el tiempo. Sin embargo, en ninguno de los dos casos BUZ-14 fue capaz de multiplicarse, probablemente debido a la falta de nutrientes si no es capaz de penetrar a capas más internas. Por tanto, podemos concluir en este caso que, incluso a pesar de las condiciones más extremas en el campo (las lluvias del año 2018 no fueron muy intensas), la no adición de portadores o adyuvantes mantuvo la viabilidad del agente.

En el desarrollo de ABCs en postcosecha, otro de los principales problemas es la incapacidad para controlar infecciones previamente establecidas, como es el caso de las infecciones latentes. Por lo tanto, la aplicación en precosecha, especialmente en los momentos de mayor probabilidad de infección como la floración, es vital para poder asegurar un control de las infecciones en postcosecha (Ippolito y Nigro, 2000; Moretto et al., 2014). De hecho, Spadaro et al. (2014) ya distinguieron dos maneras de aplicar los ABCs en el campo para conseguir esa protección en fases posteriores; una de ellas consistía en aplicar el agente justo antes de la cosecha para que las posibles heridas ocasionadas fueran colonizadas por el antagonista antes de ser infectado por el patógeno; y la otra consistía en aplicar el agente durante todo el desarrollo del fruto, de manera que las infecciones latentes originadas incluso antes de la formación de botones florales pudieran ser reducidas. El primer tipo de aplicación no ha sido realizada con BUZ-14 en esta Tesis, pero dados los buenos resultados obtenidos frente a *Monilinia* spp. en fruta de hueso, actualmente se están realizando aplicaciones en campo y su seguimiento en postcosecha para observar las mejoras en la eficacia ya que *Monilinia* spp. también es un moho latente que debe ser combatido durante todas las fases desde la producción hasta la comercialización.

## Referencias

Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.H., 2008. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. Appl. Biochem. Biotechnol. 150, 305–325. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8155-x>

- Alabouvette, C., Cordier, C., 2011. Risks of microbial biocontrol agents and regulation: Are they in balance? In: Ehlers, R. U., (Ed.), Regulation of Biological Control Agents. Springer Science-Business Media BV, Kiel, Germany, pp. 157-173.
- Alexander, D.B., Zuberer, D.A., 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 12, 39–45. <https://doi.org/10.1007/BF00369386>
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., Korsten, L., 2010. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Prot.* 29, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.08.001>
- Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., Venturini, M.E., 2017. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiol.* 63, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.004>
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D., Venturini, M.E., 2019. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. *Food Microbiol.* 82, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.010>
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Anguera, M., Teixidó, N., 2008. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Part II. Effectiveness of different cell formulations. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.12.005>
- Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., Yu, Z., 2008. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnol. Lett.* 30, 919–923. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9626-9>
- Chen, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., Wang, Q., 2016. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biol. Technol.* 115, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>
- Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., Borriss, R., 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol.* 140, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.015>
- Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J.B., Kosaric, N., 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 408–412.
- Cordier, C., Edel-Hermann, V., Martin-Laurent, F., Blal, B., Steinberg, C., Alabouvette, C., 2007. SCAR-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *J. Microbiol. Methods* 68, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.06.006>
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés, E., Viñas, I., 2001. Production of the biocontrol

- agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 367–371. <https://doi.org/10.1007/s002530100666>
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Delgado, J., Viñas, I., 2002. Water activity, temperature, and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Can. J. Microbiol.* 48, 1082–1088. <https://doi.org/10.1139/w03-001>
- Daryaei, A., Jones, E.E., Glare, T.R., Falloon, R.E., 2016. PH and water activity in culture media affect biological control activity of *Trichoderma atroviride* against *Rhizoctonia solani*. *Biol. Control* 92, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.001>
- Di Francesco, A., Martini, C., Mari, M., 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? *Eur. J. Plant Pathol.* 145, 711–717. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0867-0>
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol. Technol.* 52, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., Jijakli, M.H., 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biol. Technol.* 122, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>
- Dunlap, C.A., Kim, S.J., Kwon, S.W., Rooney, A.P., 2016. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylophilicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenom. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1212–1217. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>
- Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 117–126. <https://doi.org/10.1038/nrmicro750>
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clément, C., Barka, E.A., Jacquard, C., Dorey, S., 2015. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Mol. Plant Pathol.* 16, 177–187. <https://doi.org/10.1111/mpp.12170>
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., Mari, M., 2017a. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiol.* 64, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>
- Gotor-Vila, A., Usall, J., Torres, R., Ramos, M.C., Teixidó, N., 2017b. Environmental stress responses of the *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8-formulated products on nectarines and peaches. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 225, 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.015>
- Granum, P., Lund, T., 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*. 157, 223–228.
- Hynes, R.K., Boyetchko, S.M., 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biol. Biochem.* 38, 845–849.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.07.003>

- Ippolito, A., Nigro, F., 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Prot.* 19, 715–723. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00095-8)
- Kawagoe, Y., Shiraishi, S., Kondo, H., Yamamoto, S., Aoki, Y., Suzuki, S., 2015. Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in *Arabidopsis* plants by activating SA and JA signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 1015–1020. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.143>
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J., 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front. Plant Sci.* 10, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Lahlali, R., Massart, S., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H., 2008. A Box-Behnken design for predicting the combined effects of relative humidity and temperature on antagonistic yeast population density at the surface of apples. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.053>
- Liu, J., Zhou, T., He, D., Li, X.Z., Wu, H., Liu, W., Gao, X., 2011. Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 20, 43–52. <https://doi.org/10.1159/000323501>
- Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Madala, N.E., Labuschagne, N., Dubery, I.A., 2018. The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Front. Plant Sci.* 9, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00112>
- Moretto, C., Cervantes, A.L.L., Batista Filho, A., Kupper, K.C., 2014. Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 165, 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.019>
- Mousivand, M., Jouzani, G.S., Monazah, M., Kowsari, M., 2012. Characterization and antagonistic potential of some native biofilm-forming and surfactant-producing *Bacillus subtilis* strains against six pathotypes of *Rhizoctonia solani*. *J. Plant Pathol.* 94, 171–180.
- Nagórska, K., Bikowski, M., Obuchowski, M., 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochim. Pol.* 54, 495–508.
- Norris, R., Memmott, J., Lovell, D., 2002. The effect of rainfall on the survivorship of a biocontrol agent. *J. Appl. Ecol.* 39, 26–34.
- Nunes, C.A., 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur. J. Plant Pathol.* 133, 181–196. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9919-7>
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M.,

- Bakker, P.A.H.M., 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Posada-Urbe, L.F., Romero-Tabarez, M., Villegas-Escobar, V., 2015. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 1879–1888. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1428-1>
- Raza, W., Wei, Z., Ling, N., Huang, Q., Shen, Q., 2016. Effect of organic fertilizers prepared from organic waste materials on the production of antibacterial volatile organic compounds by two biocontrol *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *J. Biotechnol.* 227, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.014>
- Scholz, R., Molohon, K.J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A.L., Süßmuth, R.D., Mitchell, D.A., Borriss, R., 2011. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 193, 215–224. <https://doi.org/10.1128/JB.00784-10>
- Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2014. Discovery, development and technology transfer of biocontrol agents for postharvest disease control. II International Symposium on Discovery and Development of Innovative Strategies for Postharvest Disease Management 1053, 23-36.
- Spadaro, D., Droby, S., 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* 47, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. J., 1995. Media for industrial fermentations. In P. F. Stanbury, A. Whitaker, & S. J. Hall (Eds.), *Principles of fermentation technology* (2nd ed., pp. 93–121). Oxford: Perjamon Press.
- Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, J., 2015. Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2968–2975. <https://doi.org/10.1128/AEM.04203-14>
- Teixidó, N., Vinas, I., Usall, J., Sanchis, V., Magan, N., 1998. Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* to water, temperature and pH stress. *J. Appl. Microbiol.* 84, 192–200. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00320.x>
- Teixidó, N., Cañamás, T.P., Abadías, M., Usall, J., Solsona, C., Casals, C., Viñas, I., 2006. Improving low water activity and desiccation tolerance of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 by osmotic treatments. *J. Appl. Microbiol.* 101, 927–937. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02948.x>
- Teixidó, N., Torres, R., Abadías, M., Usall, J., 2011. Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. In: Lacroix, C., (Ed.), *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 364-402.
- Usall, J., Torres, R., Teixidó, N., 2016. Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative? *Curr. Opin. Food Sci.* 11, 51–55.

<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.002>

Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Teixidó, N., 2012. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biol. Control* 60, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>

Yáñez-Mendizábal, Viviana, Zeriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., Pérez-García, A., Teixidó, N., 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 609–619. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9905-0>

Zeriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., Romero, D., 2014. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environ. Microbiol.* 16, 2196–2211. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12271>



## 6 CONCLUSIONES

### Primera

*Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 ha demostrado ser un excelente microorganismo antagonista de mohos fitopatógenos como *Penicillium* spp. en cítricos y manzanas, *Botrytis cinerea* en uvas o *Monilinia* spp. en frutas de hueso. Los tratamientos preventivos obtuvieron una mayor actividad en cítricos y en manzanas mientras que los curativos fueron suficientes para controlar la podredumbre marrón en frutas de hueso. Además, su tolerancia al frío podría permitir aplicarlo sobre los frutos durante su almacenamiento y distribución.

### Segunda

BUZ-14 produce cantidades significativas de los lipopéptidos antifúngicos fengicina, surfactina e iturina A, siendo esta última sustancia la principal implicada en la actividad antifúngica. Pequeñas concentraciones de iturina A son suficientes para controlar *Monilinia* spp. en melocotones y *Penicillium expansum* en manzanas. Sin embargo, BUZ-14 sólo es capaz de multiplicarse y producir dicha sustancia *in situ* en el melocotón por lo que otros modos de acción como inducción de resistencias, competición por espacio y/o nutrientes o posibles sinergias con otros compuestos producidos podrían estar implicados en la acción antagonista.

### Tercera

La máxima actividad de esta cepa se obtiene tras 96 horas de incubación, tiempo que coincide con la mayor concentración de lipopéptidos en el sobrenadante. Este hecho tiene gran relevancia, ya que la maximización de la producción de metabolitos activos en el bioformulado ha sido un aspecto clave en su producción ya que permite ejercer una actividad antifúngica curativa desde el primer momento de la aplicación.

### Cuarta

El volatoloma generado por BUZ-14 también ha demostrado tener una elevada actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo*, sobre todo frente a *M. fructicola* y *M. laxa*, tanto

en cultivo como en fruto. Entre los volátiles producidos, los de mayor actividad fueron el diacetilo, el benzaldehído y el alcohol isoamílico. Los tres compuestos controlaron *B. cinerea* en uva de mesa sin producir fitotoxicidad, pero solo el alcohol isoamílico lo hizo en albaricoque frente a *M. laxa*. La utilización de estos compuestos por separado o el volatoloma conjunto como parte de envases activos durante la postcosecha de frutas podría minimizar la aparición de podredumbres en estos productos.

### **Quinta**

La formulación de los medios de cultivo influye significativamente en la producción de compuestos activos. Es esencial la búsqueda de ingredientes baratos que permitan un escalado industrial pero que sirvan a su vez para una óptima multiplicación del antagonista y para maximizar la generación de sustancias antimicrobianas. En nuestro caso, el medio MM, cuya composición se basa en fuentes de nitrógeno como extracto de levadura o triptona, y fuentes de carbono como diferentes azúcares, además de sales inorgánicas, ha demostrado ser un cultivo ideal para el desarrollo celular de BUZ-14 y la producción de compuestos antifúngicos, permitiendo así el escalado industrial de nuestra cepa.

### **Sexta**

La producción de endosporos por parte de BUZ-14 también ha permitido desarrollar formulados deshidratados, y aunque el escalado industrial fue llevado a cabo exclusivamente con el formulado líquido, se ha demostrado cómo esta cepa podría ser utilizada para futuros formulados atomizados o granulados. Los formulados deshidratados (desecados y liofilizados) demostraron mantener su estabilidad y eficacia durante un año de almacenamiento a temperatura ambiente mientras que el formulado líquido sólo fue estable en refrigeración.

### **Séptima**

BUZ-14 es compatible con la mayoría de los pesticidas utilizados en viñedos, excepto con Armicarb® y Karathane Star® (cuyas sustancias activas son carbonato de hidrógeno de potasio y meptildinocap, respectivamente). Este hecho es de vital importancia ya que nos permitiría el uso combinado del agente de biocontrol con pesticidas, lo que ayudaría a disminuir notablemente el uso y las dosis de químicos.

### **Octava**

El bioformulado líquido en dosis de 600 L/Ha en viñedos de variedad Garnacha y Syrah, aplicado cuatro veces a lo largo de la campaña 2018-2019 en el inicio y en plena floración, en baya tamaño guisante y en el envero, redujo la incidencia y severidad de *B. cinerea* en los frutos vendimiados hasta en un 50 %. Los recuentos de BUZ-14 en la filofera de la vid se mantuvieron estables desde la primera aplicación demostrando la supervivencia del agente en las condiciones edafoclimáticas de los viñedos. Sin embargo, es necesario corroborar los resultados con nuevas campañas que verifiquen la eficacia del formulado.

### **Novena**

Las nectarinas tratadas con el bioformulado líquido en postcosecha ( $10^9$  UFC/mL y diluido 1/5) mediante inmersión, mostraron una reducción del 50 % en la incidencia de podredumbre marrón tras 6 días de incubación a 20 °C. Sin embargo, en los frutos almacenados en frío no se observaron estas reducciones significativas de la enfermedad.

### **Décima**

El control biológico necesita ser apoyado por la legislación para poder comercializar mayor cantidad de productos estables y eficaces frente a las principales enfermedades fitopatológicas existentes. Los registros deben ser más fácilmente obtenibles para que pequeñas y medianas empresas puedan desarrollar sus productos, siempre que aseguren su buen funcionamiento.

### **Undécima**

La combinación del biocontrol con otras estrategias, ya sean agronómicas o biotecnológicas, deben ser actualmente utilizadas para ampliar el espectro de acción. El número de enfermedades y plagas en los cultivos es considerable mientras que los agentes de biocontrol poseen rangos de acción pequeños y normalmente son específicos de cultivos y patógenos. Su combinación, incluso con pesticidas, podría mejorar la sanidad del cultivo sin tener que desarrollar un producto altamente selectivo.

## AGRADECIMIENTOS

Estar escribiendo esta página ahora significa mucho más que estar escribiendo una nueva sección dentro de las muchas que se incluyen en esta Tesis Doctoral. Significa que esto llega a su fin, o al menos la parte escrita, después de prácticamente 5 años de trabajo en la facultad de Veterinaria, donde he vivido grandes momentos con compañeros y amigos. En esta Tesis han participado muchas personas, de una manera tanto directa como indirecta, y por ello me gustaría que aparecieran en este un último capítulo referenciados como se merecen. Tras todos estos años, voy a intentar que todas esas personas se sientan una pequeña parte de esta Tesis que tanto esfuerzo, desesperación, alegría, superación y aprendizaje han supuesto para mí. ¡¡Comenzamos!!

En primer lugar, porque sin duda alguna sin ellas esto no habría sido posible, toda la gente de mi laboratorio. Entre ellas incluyo compañeros/as de trabajo, tanto personas doctorandas como profesores y profesoras, las cuales podría considerar amigas después de tantos años mano a mano. Entre los doctorandos más veteranos, me gustaría agradecer a Guille, Pedro, Diego, Sofía, Leire, y cómo no, a nuestra queridísima técnico Tere, que gracias a ella nosotros hemos podido dedicarnos a otras cosas que no fueran la gestión del laboratorio y las facturas, trabajo que lleva mucho tiempo y si no, que se lo digan a Ana P!!! Entre las más actuales y jovenzanas, sí Gustavo, a ti también te incluyo entre ellas, aunque al final no pudieras continuar, seguro que en algún momento de tu vida retomas esa Tesis que apenas te va a dar dolor de cabeza. El mismo dolor de cabeza que me daban tus cubatas en la casa del loco. ¡Vaya garrafón! A los que más tiempo han compartido conmigo en el laboratorio, Ana Pilar (alias Ana P), Silvia y como no, la otra figura masculina del grupo, Gimi. Con ellas he pasado la mayor parte del tiempo, entre comidas arriesgadas (de momento seguimos vivos), cafés, pipetas, placas de Petri, granadas (de comer), pero sobre todo entre risas. Sin esas risas la Tesis se habría llevado de manera diferente, está claro. Aunque a veces fueran demasiado intensas, ejem ejem. Ana Ferrer, Marisa, Cristina, Eva, Sara, profesoras que sin duda también han estado ahí viendo mis avances y mis quejas, y como no, Ocha, nuestra coordinadora del grupo la cual todavía no ha conseguido hacerme llorar. Veremos qué pasa en la defensa... También quiero agradecerle a Esther su apoyo moral y positivismo que tantas veces me ha transmitido. Esencial en muchas ocasiones.

Un párrafo aparte les quiero dedicar a mis directores de Tesis, Domingo y Uge, personas que me acogieron entre ellas desde el primer momento y que me han visto “madurar” desde que comencé esta aventura con ellas. Me lo han puesto todo fácil. Uge ha sido mi oráculo en esto, me parece una tarea muy complicada la que hacen personas como ella, muchas actividades y pocos recursos. Te agradezco en el alma tu tiempo invertido en mí, incluso cuando ni siquiera lo tenías. Con Domingo comenzó todo, cuando tenía que ayudar a Pedro con las trufas hasta las tantas de la mañana y Domingo nos daba su apoyo, eso sí, desde la puerta, siempre le costó ponerse la bata. Para mí también ha sido un gran apoyo, siempre dispuesto a ayudarme y animarme. Así que muchas gracias por ello, a veces se viven momentos complicados.

Todas las personas de higiene, departamento en el que he pasado la mayoría de mis días investigando, tanto en la biblioteca como en el laboratorio. Todas ellas, enumeradas desde que entré a ese pasillo por primera vez, Domingo de nuevo, Juanjo, Agustín, Marta y Susana L., Consuelo, Antonio, Susana B., Regina, Pilar, Carmina, Javier (que bien llevas la jubilación), y Nieves, nuestra querida técnico, que siempre nos ha ayudado tanto a todas. Todas ellas me han ayudado a que esta Tesis sea una realidad ahora mismo. Así que solo puedo daros las gracias por vuestro apoyo. Pero también a mis queridas doctorandas higiénicas, Miriam, Laura Noemí, Cris, Paula, Patri. Cuántas conversaciones sobre ropa, moda, chicos, cotilleos, me habré comido. Pero también cuánto me habéis tenido que aguantar con mis quejas, así que muchas gracias por ello, todo ha ayudado a la redacción de esta Tesis y a no volverme loco.

Evidentemente, no me puedo dejar a la gente de tecno. Aunque el lado oscuro pueda absorber todo el edificio con la ayuda de la fuerza, sin sus doctorandos, las plazoletas, champanadas, patrones, cervezas porque sí, no habría sido lo mismo. Tengo que destacar a Dani, increíble persona que junto con Gimi me han amenizado las duras tardes de trabajo en la facultad y hasta nos hemos ido de BBQ!! Virginia, Elisa, Carlota, Juanma, todas ellas en mayor o menor medida han sido parte de esto.

Como no, dentro de la facultad y que tantas fiestas me ha permitido perpetrar, toda la gente del BAR, esa pedazo de asociación que nunca morirá. Por muchos veteranos que nos vayamos, siempre cogerán el relevo los novatos. Esos novatos a los que golpearemos, putearemos y placaremos, pero que siempre acabaran demostrando como todo novato

termina en veterano. Las plazoletas, el posturas, jamonadas, veteranos, todos los eventos y fiestas que hacen de esta asociación la mejor de la facultad sin duda alguna, y que nos ha mantenido y nos mantendrá unidos durante todos los años que nos quedan por delante. ¡¡¡Gracias a todos chavales y mucho rugby!!!!

Otra asociación a la que no puedo dejar de nombrar es ISF. Un grupo de gente maravillosa al cual me uní una vez comenzada esta aventura doctoral. Me han enseñado cómo las acciones individuales pueden ayudar a conservar y mejorar tanto el planeta como a la sociedad. Es un gusto reunirme con ellas, ya sea para tomar “unas” cervezas en nuestro guetto, planificar, cosmiqear, montañear... Todas las actividades con vosotras son un gusto, y todo ello contribuye a mi estado de ánimo y felicidad, por ello esta Tesis también tiene vuestra parte de culpa. ¡¡¡Seguimos!!!

Mi estancia en Burdeos fue corta, pero intensa. Gente increíble como Giovanni, Loris, Souzic (vaya nombre, me costó aprenderlo), Arthur, Adrian o David. Buenos vinos y mucho surf, aparte de mucha investigación, por supuesto. También mi tutor Marc y el técnico que todo lo sabía, Jean, gracias a todos por hacerme la estancia más amena y agradable.

Pedrito.... Ay Pedrito.... En que jaleo me has metido. Todo esto comenzó contigo. Para mí la investigación no era una salida a la que optar cuando empecé CTA. Tus trufas y tus cervezas hicieron que siguiera este camino. Realmente, no sé si agradecerte o culparte. La gente que no se dedique a esto no lo entiende, pero el desgaste mental que conlleva es enorme. Es un trabajo que me encanta, por ello debo agradecerte que me lo enseñaras. Y también debo agradecerte todas las tardes de cervezas y vermouths que nos hemos pegado, sobre todo al principio, yo te siembro unas placas y yo te invito a comer. ¿Buen trato no? Simplemente decirte que gracias por todo, aunque sea un mundo difícil, tiene su encanto. Así que espero podamos volver a trabajar algún día juntos, y si no, siempre nos quedarán tus viñedos.

En la sombra, pero no por ello menos importantes, mi familia. Mi padre, mi madre, mi hermana. Las tres han aguantado mis “chapas” científicas, mis penas, mis quejas. Muchas veces he podido ser desagradable, los altibajos han sido importantes. Pero siempre han estado ahí. Así que, aunque no sepáis muy bien que he hecho durante estos años de Tesis, en la defensa veréis como todo ese tiempo ha sido bien invertido.

Seguro me dejo a gente, han sido muchos años, pero cualquier persona que haya intervenido, aunque sea mínima en este trabajo, también va para ellas. Técnicas de la planta piloto, cafetería (que haría yo sin Manolo y Nati las tardes de plazoleta), gente del badiolario, producción animal, secretaría (gracias por las gestiones Inma), Presen (gran veterana y jubilada, ¡¡por fin!!). En fin, muchas personas involucradas en esto y es imposible nombrar a todas.

**Gracias a todas y cada una de ellas. ¡¡¡Os espero en la defensa!!!!**

