



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Potencial de una nueva cepa de Bacillus (BUZ14) como agente de
biocontrol frente a mohos fitopatógenos en postcosecha

Autor/es

JULIO SÁNCHEZ ESPARZA

Director/es

Dra. ROSA ORIA ALMUDÍ
Dra. M^a EUGENIA VENTURINI CRESPO

Facultad de Veterinaria

2014-2015

0. DATOS DEL ALUMNO	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Producción española de frutas y hortalizas	
2.2. Importancia económica del sector hortofrutícola	
2.3. Pérdidas post- cosecha	
2.4. Métodos de control de las podredumbres	
2.5. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> como agente de biocontrol	
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAL Y MÉTODOS	15
4.1. Material biológico	
4.1.1. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa BUZ 14	
4.1.2. Especies fúngicas	
4.1.3. Fruta	
4.2. Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i>	
4.2.1. Obtención de inoculos microbianos	
4.2.2. Obtención de soluciones antifúngicas	
4.2.3. Procedimiento de inoculación	
4.2.4. Lectura e interpretación de resultados	
4.3. Determinación de la actividad antifúngica <i>in vivo</i>	
4.3.1. Obtención de inoculos microbianos	
4.3.2. Obtención de soluciones antifúngicas	
4.3.3. Procedimiento de inoculación	
4.3.4. Lectura e interpretación de resultados	
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1. Determinación del potencial antifúngico <i>in vitro</i> de la cepa <i>B. amyloliquefaciens</i> BUZ 14	
5.2. Determinación del potencial antifúngico <i>in vivo</i> de la cepa <i>B. amyloliquefaciens</i> BUZ 14	
6. CONCLUSIONES	35
7. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE	37
8. EVALUACIÓN Y SUGERENCIAS DE MEJORA	37
9. BIBLIOGRAFIA	38

0. DATOS DEL ALUMNO:

Apellidos, y Nombre: SÁNCHEZ ESPARZA, JULIO

DNI: 73006795-B

Dirección: C/ MONASTERIO DE SIRESA 29, escalera Izquierda 1º B

Teléfono móvil: 650128997

Correo electrónico: juliosan_esparza@hotmail.com

1. RESUMEN

El potencial como agente de biocontrol de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ 14 fue testado frente a 6 mohos fitopatógenos (*Monilinia laxa*, *M. fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, y *P. italicum*). Primero, se realizaron estudios *in vitro* para determinar la capacidad antifúngica de tratamientos con células vegetativas, endosporos y sobrenadantes libres de células obtenidos a distintos tiempos de incubación. En los estudios *in vivo* se inocularon diferentes especies fúngicas en uva, cereza, manzana y naranja y se determinó la eficacia de distintas soluciones (células, endosporos XXX y sobrenadantes sin diluir y diluidos 1:10).

Los ensayos de inhibición *in vitro* han demostrado que la cepa BUZ 14 posee una elevada actividad antifúngica frente a todos los mohos fitopatógenos testados siendo las especies más sensibles *M. fructicola*, *M. laxa* y *B. cinerea*. La mayor actividad antifúngica de los tratamientos con células vegetativas de la cepa BUZ 14 se detectó en la especie *M. laxa* siendo las más resistentes *P. italicum* y *P. expansum*. En general, los endosporos de la cepa BUZ14 presentaron su máxima actividad antifúngica en las soluciones obtenidas tras 96 horas de incubación siendo las especies más sensibles *M. laxa* y *B. cinerea* y las más resistentes las pertenecientes al género *Penicillium*. La acción antifúngica de los sobrenadantes aumenta con el tiempo de incubación y con la concentración. Así, podemos establecer que tras 72 horas de incubación ya se consigue la máxima inhibición y que ésta es total, incluso en la disolución 1:10, para las especies *M. fructicola*, *M. laxa*, *B. cinerea* y *P. expansum* y muy elevada (>80%) para *P. italicum* y *P. digitatum*.

Sin embargo, esta efectividad no se trasladó a los ensayos *in vivo*, donde las podredumbres en naranja causadas por *P. digitatum*, y en manzana por *P. expansum*, no se vieron reducidas por ningún tratamiento. Los mejores resultados se obtuvieron para el sobrenadante sin diluir que redujo la severidad de la lesión por *B. cinerea* en uva y la incidencia de ambas especies de *Monilinia* en cereza.

ABSTRACT

Biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain BUZ 14 was tested against 6 post-harvest pathogens (*Monilinia laxa*, *M. fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum* and *P. italicum*). First, *in vitro* studies was carried out to stablish the antifungal efficacy of cells, endospores and cell free supernatants obtained at different times of

incubation. *In vivo* activity against these pathogens was tested by treating fruits (grapes, cherries, apples and oranges) with cells, endospores and supernatants (undiluted and dilution 1:10) obtained after 72, 96 and 120 hours.

In vitro tests have shown that BUZ 14 strain has a high antifungal activity against all the fungal species tested being the most sensitive *M. fructicola*, *M. laxa* and *B. cinerea*. The highest antifungal activity of cells of BUZ14 was detected in *M. laxa* being *P. italicum* and *P. expansum* the most resistant species. In general, the major antifungal activity of endospores of BUZ14 strain was detected in the solutions obtained after 96 hours of incubation, being the most sensitive species *M. laxa* and *B. cinerea* and the more resistant the ones belonging to the genus *Penicillium*. The antifungal activity of the supernatants increases with incubation time and concentration. Thus, we can establish that after 72 hours of incubation the maximum inhibition is achieved. This inhibition is total, even at 1:10 dilution, for the species *M. fructicola*, *M. laxa*, *B. cinerea* and *P. expansum* and very high (> 80%) for *P. italicum* and *P. digitatum*.

However, the high *in vitro* activity was not totally confirmed *in vivo* since no inhibitory effect was achieved in the rots caused by *Penicillium* species. The best *in vivo* results were obtained with the undiluted supernatant, which reduced the severity of grey rot by *B. cinerea* in grapes and no growth of *Monilinia* species in treated cherries was detected.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Producción española de frutas y hortalizas

Actualmente la producción española de **frutas y hortalizas** representa el 41% de la producción **vegetal** y el 24% de la producción de la rama agraria total, lo que la convierte en una parte importante del conjunto del sector agrario. Concretamente, las **frutas de hueso** suponen el 16 % del total de frutas, y el 5% del total de frutas y hortalizas (MAGRAMA, 2008-2013).

La producción en España de frutas, hortalizas y patata asciende a 26,8 millones de toneladas, de los cuales el 52,2% del volumen total son aportados por el grupo de las hortalizas, en particular por cultivos como los de tomate, pimiento, lechuga y melón. Le siguen en importancia los cítricos, que suponen un 23,2% en volumen, destacando las naranjas y pequeños cítricos, que concentran más del 80% de la producción y valor de este grupo. Los frutales no cítricos suponen el 11,3% de la producción hortofrutícola, destacando en los frutos dulces, el grupo de los frutales de hueso con el 60% de la producción, donde destaca el grupo de los melocotoneros, seguidos por los frutales de pepita con el 40% de la producción (Figura 2.1.).

La producción de frutas en España incluye un gran número de especies de hueso y pepita, siendo las más representativas el albaricoque, la ciruela, la cereza, el melocotón, la manzana y la pera. La producción global de estas especies se aproxima en el trienio 2006-08 a una media de 3 millones de toneladas, siendo el melocotón la principal fruta producida (en torno al 45%). seguida del nectarino con un 30,4 %, y a mucha mayor distancia están el ciruelo con un 13,1 % y el albaricoquero con un 4,9 %. A nivel territorial, en el caso del albaricoquero Murcia continua siendo la más importante al acumular cerca del 70 % del total de la producción nacional; en melocotonero Cataluña, **Aragón** y Murcia acaparan algo más del 70 % de la misma; en nectarino Cataluña, Aragón y Andalucía agrupan algo más del 70 % del total; y en ciruelo Extremadura y Andalucía suponen el 70 %.

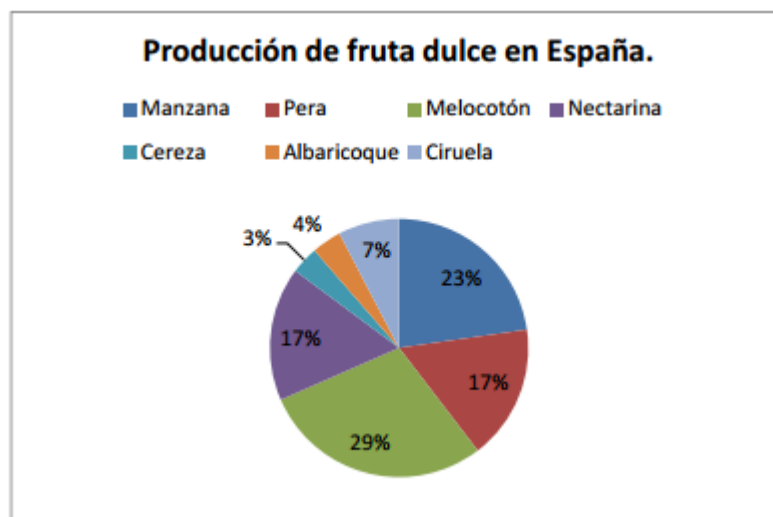


Figura 2.1. Distribución en porcentaje de las principales frutas producidas en España entre 2008 y 2012; Fuente: MAGRAMA.

La superficie dedicada al cultivo de los frutales de hueso en España ha disminuido ligeramente a lo largo de la última década (a excepción del nectarino), aunque en el año 2011 había experimentado un incremento del 1,3 % con respecto al ejercicio anterior. Se mantiene la tradicional orientación al cultivo del melocotonero que representa el 35,7 % del total de la superficie de frutales de hueso, seguido del nectarino que ocupa el 21,5 % de la superficie y, a más distancia, se sitúan el albaricoquero (13,2 %) y el ciruelo (12 %) (Figura 2.2.).

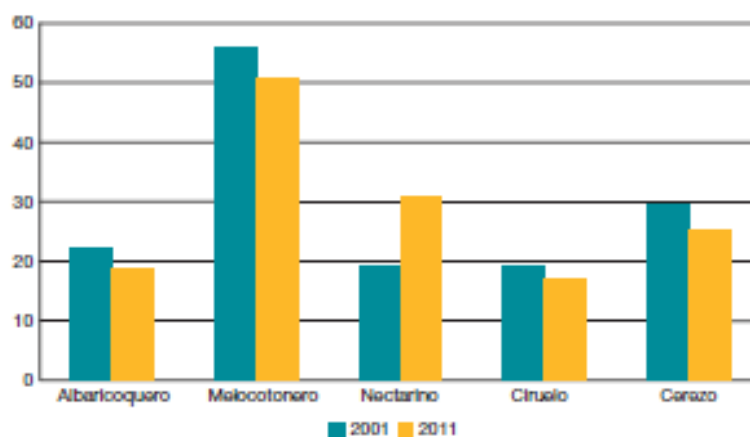


Figura 2.2. Evolución de la superficie de frutales de hueso cultivada en España por especies. En miles de hectáreas.

El desglose por CCAA y tipo de cultivo pone de manifiesto diferentes niveles de concentración y especialización: en albaricoque Murcia y Valencia continúan siendo las

regiones más importantes acumulando entre las dos más del 70 % de la superficie nacional; en melocotonero Cataluña, Aragón y Murcia representan más del 70 % del total; en nectarina Cataluña, Aragón, Extremadura y Andalucía suponen más del 78 % de la superficie; y en ciruelo Extremadura, Andalucía, Valencia y Murcia agrupan más del 76 %. Los cítricos destacan en la Comunidad Valenciana, en la cual se encuentra el 58,6% de la superficie de cultivo, seguida de Andalucía, Murcia y Cataluña, concentrándose en el conjunto de estas cuatro comunidades el 99,7% de la superficie total.

Existe una amplia distribución de frutales a lo largo del panorama español. Dentro de las comunidades autónomas, **Aragón** representa la quinta parte de la superficie total nacional española de fruta, y es el principal productor nacional de cereza (96,6 billones de kilos en 2012) y el segundo de melocotón (737,5 miles de kilogramos en 2012) y manzana (481,2 miles de kilogramos en 2012) (Instituto Nacional de Estadística). El sector del frutal junto al de las hortalizas, ocupan una posición importante en la Producción Final Agraria (PFA) aragonesa. Los sectores de hortalizas y frutas ocupan el 3,2% de la superficie total de Aragón y el 10% de la del regadío. Dichas superficies producen el 28% de la producción final agrícola aragonesa.

2.2. Importancia económica del sector hortofrutícola

El hortofrutícola es un sector orientado claramente a la exportación, que supone en muchos productos hasta el 50% de la producción, como es el caso de los cítricos, melocotón, tomate, lechuga y pimiento. En el ámbito de la exportación, la perspectiva es positiva, puesto que España sigue manteniendo su liderazgo como primer exportador mundial en frutas de hueso, superando a los países del contexto mediterráneo que vienen siendo tradicionales exportadores de estos productos. Los volúmenes de ventas en los mercados internacionales se sitúan en torno a las 800.000 toneladas en los últimos años. Dicha cifra continua siendo bastante superior al volumen comercializado por otros países, como Italia y Chile, que son el segundo y el tercer exportador mundial con aproximadamente 400.000 y 200.000 toneladas, respectivamente. Además, hay que mencionar el incremento de la participación española en el contexto mundial durante las dos últimas décadas, donde se ha pasado de un 17 % en la década de los noventa a aproximadamente un 30 % en la actualidad. Por tipos de frutas, es de destacar el incremento (más de un 250 %) experimentado en la exportación de melocotones y nectarinas, acentuando su tradicional liderazgo en las ventas internacionales de estas frutas, en detrimento de otros exportadores tradicionales como Italia o Estados

Unidos. En el caso de las ciruelas, España también ocupa una posición de liderazgo y ha continuado aumentando su volumen exportador durante la última década. Este predominio español en el mercado mundial se mantiene a pesar de que han ido surgiendo nuevos exportadores como China, Sudáfrica, Serbia y Turquía. En el caso de los albaricoques, aunque España ocupa el segundo lugar a nivel mundial se ha producido un relativo descenso en sus exportaciones, al mismo tiempo que en el ámbito exportador internacional han ido apareciendo otros países con una relevancia creciente como Turquía, Italia y Uzbequistán (Figura 2.3.).

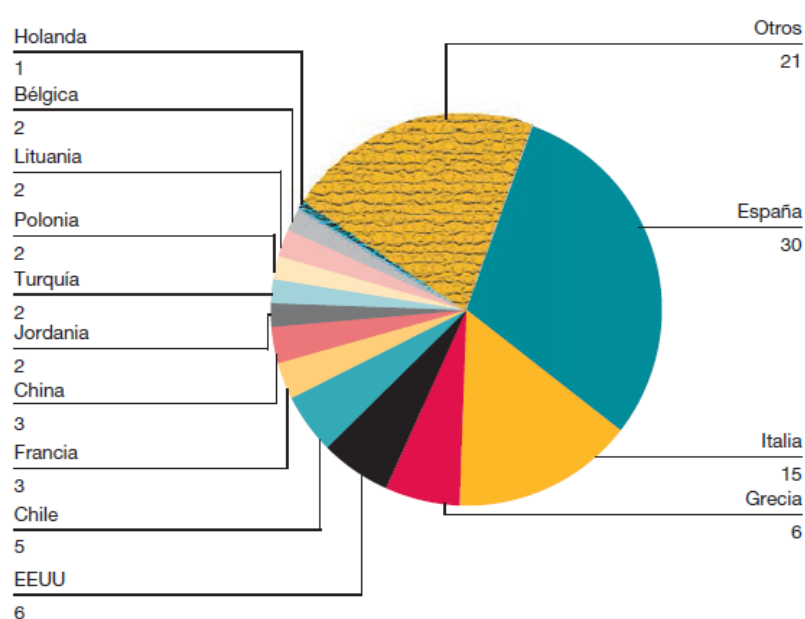


Figura 2.3. Principales exportadores mundiales de fruta de hueso (en porcentaje), (Galdeano et al. 2012)

2.3. Pérdidas post-cosecha

En 2013, el 85% de los destinatarios de la fruta de hueso española fueron países de la Unión Europea pero, pese a su cercanía geográfica, de las más de 900.000 toneladas de fruta de hueso que España exporta al año, un importante porcentaje se pierde en los procesos de almacenaje y transporte por el proceso de deterioro natural del producto. Se hace necesario, por tanto, encontrar nuevas técnicas que protejan la fruta durante su proceso de comercialización.

“El uso de sustancias activas de origen natural que maximicen la protección de la fruta - apunta Miguel Vela, director del Departamento de Calidad de FEPEX (Federación Española

de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas)- contribuirá de forma muy positiva al desarrollo de nuestra capacidad exportadora, abriendo mercados más lejanos. Estamos comenzando a exportar a Sudáfrica y negociando con China y Japón y, para poder llegar a estos mercados, necesitamos asegurarnos de que la fruta llega en perfecto estado”.

Tradicionalmente, la mayor parte del proceso de protección de la fruta de hueso se realiza antes de su recolección. Una vez efectuada ésta, el riesgo de enfermedades latentes sigue existiendo.

Por su parte, Josep Lluís Trilla, director comercial de Actel Grup, una de las compañías con mayor volumen de exportación de fruta de hueso de España, considera que “ser capaces de proteger la fruta tras su recolección nos permite ser más eficientes, mientras que el hecho de utilizar mucho menos producto contribuye al respeto al medioambiente, ya que los pocos residuos que quedan en la fruta desaparecen en días, accediendo así también a los mercados más exigentes a este respecto”

Además de las importantes pérdidas económicas, las podredumbres suponen una pérdida de confianza de distribuidores y clientes. Las alteraciones post-cosecha 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 o podredumbre del tejido aparece claramente diferente del resto del tejido no afectado, con cambios en su color o/y en su textura. En la mayor parte de los casos, el tejido infectado está constituido por una zona delimitada, conocida como lesión, que se extiende radialmente a partir del punto de la infección, de una forma y manera característica que depende de las interacciones entre la fruta hospedadora y el patógeno invasor. En algunos casos, las lesiones no tienen más de 1-2 cm de diámetro, mientras que en otras ocasiones es la fruta entera la que resulta uniformemente infectada. La lesión puede aparecer sólo como una alteración del tejido de la fruta, o puede estar recubierta por micelio fúngico, estructura del patógeno portadora de esporas o por las propias esporas. Es importante tener en cuenta que el tiempo necesario para que se desarrolle una lesión es muy variable para los distintos patógenos.

Desde el momento de la recolección, las frutas comienzan a madurar, proceso fisiológico deseable para alcanzar las condiciones organolépticas y nutritivas óptimas para el consumo;

este proceso de maduración favorece el desarrollo de las podredumbres fúngicas al modificarse las barreras, los azúcares y ácidos, y la cantidad de los fenoles. La reducción de la dureza del fruto facilita la acción metabólica de los enzimas liberados por las células hifales. El incremento de azúcares sencillos supone un aumento de nutrientes disponibles para el desarrollo fúngico. Además, los compuestos fenólicos que pueden intervenir en la resistencia a las alteraciones por su acción antimicrobiana disminuyen conforme avanza la maduración.

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.

Los mohos, las levaduras y las bacterias, están naturalmente presentes en la superficie de las frutas después de la 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. El propágulo fúngico que se transmite más fácilmente en las plantaciones es la espora. 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 ya que inactivan las barreras físicas como la cutícula cérea, las capas celulares subyacentes y el tejido cortical que está a continuación. Aun así, hay mohos capaces de penetrar en la fruta incluso cuando no hay ninguna herida 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 y 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 verse expuesta a mohos tras la separación de los frutos de la rama. En estos casos, la infección fúngica del pedúnculo se produce tras la recolección. 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 y 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, está en las cámaras de conservación.

Las frutas de hueso son muy sensibles a las alteraciones fúngicas, pero se puede establecer el siguiente orden de susceptibilidad decreciente: cerezas, nectarinas, melocotones, ciruelas y albaricoques (Eckert y Ogawa, 1988). Las alteraciones más frecuentes en las frutas de hueso aparecen resumidas en la Tabla 2.1.

Podredumbre	Moho responsable
Azul	<i>Penicillium expansum</i>
Gris	<i>Botrytis cinerea</i>
Marrón	<i>Monilinia fructicola</i> , <i>M. laxa</i>
Por <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria</i> spp.
Por <i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>

Tabla 2.1. Podredumbres más comunes en frutas de hueso y agente causal

La podredumbre más habitual en frutas de hueso es la podredumbre marrón causada por especies del género *Monilinia*. El agente causal infecta las flores y permanece en estado latente hasta que la fruta alcanza su madurez en el árbol, momento en el que la podredumbre se expande (Northover y Cerkauskas, 1994), dejando al fruto con aspecto momificado. Las podredumbres marrones de los frutos de hueso causadas por *Monilinia fructicola* y *Monilinia laxa* pueden infectar la fruta en crecimiento justo después de la caída del pétalo (Figura 2.4)

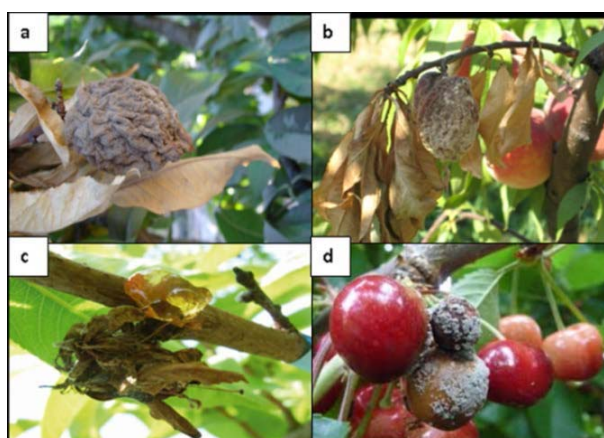


Figura 2.4. Frutas momificadas (a y b); gomosis del chancro (c), y cerezas afectadas por *Monilinia* spp.

Botrytis cinerea es el agente causal de la podredumbre gris, típica de fresas y uva. *B. cinerea*, causa lesiones visibles tras seis semanas a temperaturas ambiente, e incluso a temperaturas cercanas a 0 °C (Figura 2.5.). 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.



Figura 2.5. *Botrytis cinerea* en fresa (izquierda) y formación de nidos por infección con *Botrytis cinerea* en pera (derecha).

Penicillium expansum es el principal agente etiológico de la podredumbre azul en manzanas y peras, mientras que *P. italicum* y *P. digitatum* causan la podredumbre azul y verde, respectivamente, en los cítricos (Figura 2.6.).

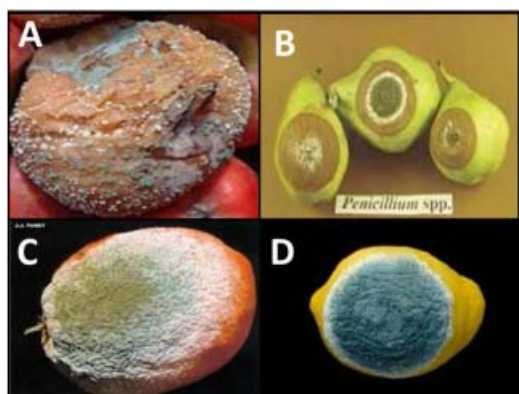


Figura 2.6. Podredumbre azul por *P. expansum* en manzana (A) y pera (B); podredumbre verde por *P. digitatum* en naranja (C) y podredumbre azul por *P. italicum* en limón (D)

Rhizopus stolonifer es el responsable de la podredumbre por *Rhizopus* también conocida como pudrición blanda (Figura 2.7.). Su presencia en la tierra hace que una mala limpieza en la recepción, derive en una multiplicación y contaminación en post-cosecha (Torres, 2013). Este hongo es muy versátil y puede crecer y desarrollarse en una amplia gama de temperaturas y humedades relativas, lo que sumado a su rápida velocidad de crecimiento le permite colonizar la superficie de los productos agrícolas rápidamente (Velázquez-del Valle, 2008).



Figura 2.7. *Rizhopus stolonifer* en nectarina (izquierda), tomate (centro) y fresa (derecha).

2.4. Métodos de control de las podredumbres

El método más utilizado a lo largo de los últimos años para combatir las podredumbres ha sido el uso de fungicidas de síntesis pero actualmente sus inconvenientes y limitaciones están aumentando. Las leyes cada vez son más restrictivas, y la concienciación social debido a problemas toxicológicos que afectan tanto a personas como al medio ambiente van en aumento. Debido a ello, muchas de las investigaciones que se están llevando a cabo buscan alternativas a estos tratamientos. Muchos países han reducido la tolerancia de residuos de plaguicidas ejerciendo presión a los productores de frutas para que intenten evitar su aplicación, lo que deriva en un interés de las empresas de plaguicidas por enfocar su producción hacia el biocontrol. El control biológico (o biocontrol) consiste en la utilización de uno o varios microorganismos (principalmente levaduras y ocasionalmente bacterias) capaces de reducir el inóculo o la actividad de un patógeno microbiano (Baker, 1987).

Hay numerosas especies de levaduras y de bacterias capaces de inhibir el crecimiento de los mohos (Wilson y Wisniewski, 1989). Estos agentes de biocontrol pueden frenar el desarrollo de las podredumbres post-cosecha colonizando las vías de infección, compitiendo con los patógenos por los nutrientes, secretando compuestos con actividad antifúngica, por parasitismo directo del patógeno o induciendo respuestas de resistencia en el hospedador (Droby y Chalutz, 1994).

Los agentes para la lucha biológica pueden aplicarse en el campo antes de la recolección. Esta práctica es particularmente efectiva ya que las levaduras o las bacterias protegerían a las frutas en el periodo de máximo riesgo de heridas y lesiones físicas, momento que corresponde a la recolección y transporte de la fruta. Para este tratamiento pre-recolección sólo sirven las especies de levaduras y bacterias que sean capaces de sobrevivir en la superficie de la fruta durante un tiempo prolongado, aunque haga calor o haya sequía. Sin

embargo, diversos experimentos realizados en manzanas y peras (Benbow y Sugar, 1999) han demostrado que la lucha biológica en tratamientos pre-recolección es menos efectiva que en post-cosecha. Parece ser que los agentes biológicos tienen menos posibilidades de penetrar y colonizar la herida cuando se aplican antes de que se haya producido que después.

Se ha comprobado que muchas de las bacterias y algunos hongos que han sido estudiados por su potencial como agentes de biocontrol, producen compuestos con actividad similar a los antibióticos (Pusey y Wilson 1984). Aunque algunas bacterias sean capaces de producir antibióticos *in vitro*, puede que no tengan esa actividad en los puntos de infección de las frutas (Droby y Chalutz, 1994). El principal problema de los agentes de biocontrol que producen antibióticos es que su uso puede resultar nocivo para el consumo humano y puede dar lugar al desarrollo de cepas resistentes de patógenos. Es por esto que dichos agentes deben someterse a numerosos estudios de toxigenicidad, que se caracterizan por una prolongada duración en el tiempo y un coste elevado; además, queda por demostrar su efectividad en condiciones reales.

2.5. Bacillus amyloliquefaciens como agente de biocontrol

Algunas cepas de *Bacillus* spp. tienen la capacidad de producir antibióticos, enzimas que degradan las paredes celulares de las células hifales y volátiles antifúngicos que las convierte *a priori* en excelentes agentes de biocontrol frente a un amplio rango de patógenos de las plantas. Estas características junto con una baja toxicidad, alta biodegradabilidad y compatibilidad con el medio ambiente en comparación con los pesticidas químicos, hacen que tengan un gran potencial como agentes de biocontrol (Kim y Chung, 2004).

Bajo condiciones de post-cosecha, *B. subtilis* fue la primera especie bacteriana descrita como agente de biocontrol de la podredumbre marrón del melocotón causada por *M. fructicola* (Pusey y Wilson 1984). Estos trabajos incluso brindaron una base para los principios del control biológico microbiano usados en las siguientes dos décadas. Actualmente, algunas cepas de *B. subtilis* y su estrechamente relacionada *B. amyloliquefaciens* están siendo estudiadas y testadas en aplicaciones de post-cosecha de fruta en ensayos piloto y a nivel comercial (Casals et al., 2010).

De entre las cepas de *Bacillus* capaces de producir antibióticos, *B. amyloliquefaciens*, segrega lipopéptidos surfactantes como surfactina, iturina A, fengicina (S. Mudgal et al; 2013) y valinomicina. Las surfactinas no son fungitóxicas por ellas mismas pero muestran

actividad antifúngica en sinergismo con la iturina A. La familia de las iturinas (principalmente A y C, bacillomicina D, F, L y LC y micosubtilina) tienen actividad antifúngica e inhibitoria del crecimiento de un amplio rango de fitopatógenos (Romero et al., 2007). Por otro lado, las fengicinas (principalmente A y B) son menos conocidas que los dos anteriores, pero mantienen una actividad fungitóxica fuerte, especialmente contra los hongos filamentosos (Romero et al., 2007). La valinomicina es un antibiótico secretado también por otras especies de *Bacillus* (Mudgal et al., 2013) capaces de incorporar cationes alcalinos y transportarlos a través de las membranas celulares alterando la permeabilidad de las membranas celulares fúngicas y bacterianas.

3. OBJETIVOS

La aparición de podredumbres durante la fase de comercialización de los productos hortofrutícolas ocasiona enormes pérdidas económicas a las que además, se une la pérdida de confianza por parte distribuidores y clientes.

Tradicionalmente, el control de las podredumbres se realiza mediante el empleo de fungicidas de síntesis. Sin embargo, el uso de los fungicidas sintéticos presenta una serie de inconvenientes o limitaciones; de tipo legal con una normativa cada vez más estricta y severa, de tipo social debido a los problemas toxicológicos tanto para el ser humano como para el medio ambiente, y de tipo biológico, por la aparición frecuente de resistencias entre los mohos alterantes a los fungicidas habituales. Estos inconvenientes conducen a la drástica reducción o incluso la eliminación de estos antimicrobianos de síntesis en un futuro no muy lejano. Sin embargo, su eliminación está supeditada a la aparición de otros métodos de control igual de eficaces, pero más naturales, menos dañinos para el medio ambiente y para el consumidor y, por supuesto, asumibles desde un punto de vista económico. Entre estos métodos destaca el control biológico definido como “la utilización de uno o varios microorganismos (principalmente levaduras y ocasionalmente bacterias) capaces de reducir el inóculo o la actividad de un patógeno microbiano”.

En estudios previos realizados por el grupo de Investigación “Alimentos de Origen Vegetal”, se ha determinado la capacidad de ciertas cepas del género *Bacillus* como potenciales agentes de biocontrol frente a diversos mohos fitopatógenos. El **objetivo general** de este estudio es **determinar la actividad antifúngica de una de estas cepas, *Bacillus amyloliquefaciens***

BUZ 14, frente a los principales mohos fitopatógenos en la post-cosecha de frutas. Este objetivo general se divide en dos objetivos parciales:

1. Determinar la **actividad antifúngica *in vitro*** de células, endosporos y sobrenadantes obtenidos a distintos tiempos durante el cultivo de la cepa BUZ 14 sobre 6 mohos fitopatógenos (*Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* y *Botrytis cinerea*)
2. Seleccionar los tratamientos más efectivos en función de los resultados obtenidos en el primer objetivo parcial, y establecer su **actividad antifúngica *in vivo*** mediante inoculaciones experimentales en la fruta huésped más habitual para cada una de las especies fúngicas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

4.1.1. Microorganismo de biocontrol: *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BUZ 14

La cepa BUZ14 fue aislada durante un análisis microbiológico rutinario de melocotones. En las placas de recuento general se detectaron unas colonias que presentaban un gran halo de inhibición frente a los mohos presentes. Debido a dicha actividad antifúngica, se aislaron dichas colonias en agar TSA (Oxoid LTD; Basingstoke, Hampshire, England), y se enviaron a la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo; Valencia) para una identificación molecular por amplificación directa por PCR del gen del 16S rRNA. El resultado del análisis indicó una semejanza del 100% con *Bacillus amyloliquefaciens* cepa FZB42. Una vez aislada e identificada, se traspasó a un criovial y se almacenó a -80°C. Esta cepa será denominada en este trabajo como BUZ 14.

4.1.2. Especies fúngicas:

Las especies fúngicas empleadas en este trabajo y su procedencia se detallan a continuación:

- *Penicillium expansum* (CECT 20140) procedente de manzanas.
- *Penicillium digitatum*: aislado por el Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal a partir de mandarinas afectadas de podredumbre.
- *Penicillium italicum*: aislado por el Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal a partir de mandarinas afectadas de podredumbre.
- *Botrytis cinerea*: suministrado por el CITA (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria).

- *Monilinia fructicola* ATCC (American Type Culture Collection) 44557 suministrada por LGC Standards, aislada de nectarina en California (EEUU).
- *Monilinia laxa*: aislada de nectarinas afectadas de podredumbre por el Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal de la Universidad de Zaragoza, e identificada como *M. laxa* por el departamento de Biología Molecular del Parque Científico Tecnológico “Aula Dei”.

Todas las cepas fúngicas se sembraron en tubos inclinados con agar Patata Dextrosa (PDA, Oxoid LTD; Basingstoke, Hampshire, England) y fueron conservadas a 4 °C hasta su uso.

4.1.3. Frutas

Las frutas empleadas en esta investigación, manzana, cereza, uva y naranja, se adquirieron en mercados locales.

4.2. Determinación de la actividad antifúngica *in vitro*

Para determinar la capacidad de la cepa BUZ14 para inhibir el crecimiento de *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum*, se realizaron diferentes pruebas con células vegetativas, endosporos, y sobrenadante libre de células.

4.2.1. Obtención de los inóculos microbianos

La **cepa BUZ14** fue incubada en 50 mL de caldo 863 (10 g/L peptona; 10 g/L extracto de levadura; 20 g/L glucosa) en matraces de 250 mL durante 24, 72, 96 y 120 horas a 30 °C en agitación orbital.

En cada placa de PDA que contenía las **cepas fúngicas** crecidas se añadieron 9 mL de agua de peptona 0,1 % respectivamente, con un 0,05% de Tween 80; posteriormente se raspó la superficie con asa de siembra estéril para separar el micelio y las esporas de su superficie. A continuación el líquido era filtrado a través de 2 capas de gasa estéril. El número de esporas por mL se realizó por recuento microscópico directo depositando 10 µL de la suspensión en una superficie de 1 cm² delimitado en un porta excavado y contando el número de esporas presentes en 20 campos. En todos los casos se ajustó la suspensión para obtener una concentración aproximada de 10⁵ esporas/mL.

4.2.2. Obtención de las soluciones antifúngicas

Las distintas soluciones antifúngicas se obtuvieron según los procedimientos que se detallan a continuación:

- Células vegetativas+endosporos+sobrenadante

- A partir del Erlenmeyer incubado 24 h/30°C, se sembró por agotamiento el microorganismo en agar TSA. Después se volvió a incubar 24h/30°C, siendo los ensayos *in vitro* posteriores realizados a partir de estos inóculos bacterianos.

- Endosporos

- Los contenidos de los Erlenmeyer correspondientes a 72, 96 y 120 h de incubación (10^7 endosporos/mL) se repartieron en tubos de centrifuga Falcon de 50 ml, conteniendo 25 mL de suspensión cada uno.
- Centrifugación de los tubos (4000 rpm, 11 minutos y 10°C).
- Separación del sobrenadante y el pellet. Éste último se resuspendió con 25 mL de agua de peptona tamponada. El sobrenadante se reservó para su mezcla con agar como se detalla a continuación.
- Tratamiento en baño a 80°C durante 12 minutos.

- Sobrenadantes:

- Los sobrenadantes obtenidos a las 24, 72, 96 y 120 h de incubación se mezclaron con agar PDA en proporciones volumen/volumen de 1:1, 1:4 y 1:10 (sobrenadante:agar).
- Las mezclas se esterilizaron a 121 °C/15 minutos.

4.2.3. Procedimiento de inoculación

Una vez obtenidas las soluciones antifúngicas se procedió a su inoculación en placas de Petri con agar PDA. Para ello se siguieron los siguientes procedimientos:

- Células vegetativas+endosporos+sobrenadante:

- Con un asa de siembra se depositaron tres inóculos del agente de biocontrol a 3 cm del centro de la placa de Petri.
- Se inocularon las esporas de las especies de *Penicillium* y de *B. cinerea* mediante siembra por picadura en el centro de la placa. Para *M. laxa* y *M. fructicola* se depositó un botón fúngico de 5x5 mm en el centro de la placa, obtenidos con la ayuda de bisturí y pinzas estériles de placas de agar PDA previamente incubadas durante 10 días/25°C.

- Endosporos:

- Se realizaron tres pocillos de 6x6 mm, equidistantes entre sí y a 3 cm del centro de la placa mediante bisturí estéril.
- Se depositaron en cada pocillo 30 µl de la suspensión de endosporos (10^7 end/mL)
- Se inocularon las esporas de las especies de *Penicillium* y de *B. cinerea* mediante siembra por picadura en el centro de la placa. Para *M. laxa* y *M. fructicola* se depositó el botón fúngico en el centro de la placa.

- Sobrenadantes:

- Las mezclas de sobrenadante y agar se vertieron en placas de petri y se dejaron solidificar.
- *B. cinerea*, *P. expansum*, *P. digitatum* y *P. italicum* se inocularon mediante triple pinchazo a partir de la solución de esporas. Para *Monilinia fructicola* y *Monilinia laxa* se realizó una siembra con botón en el centro de la placa.

4.2.4. Lectura e interpretación de los resultados

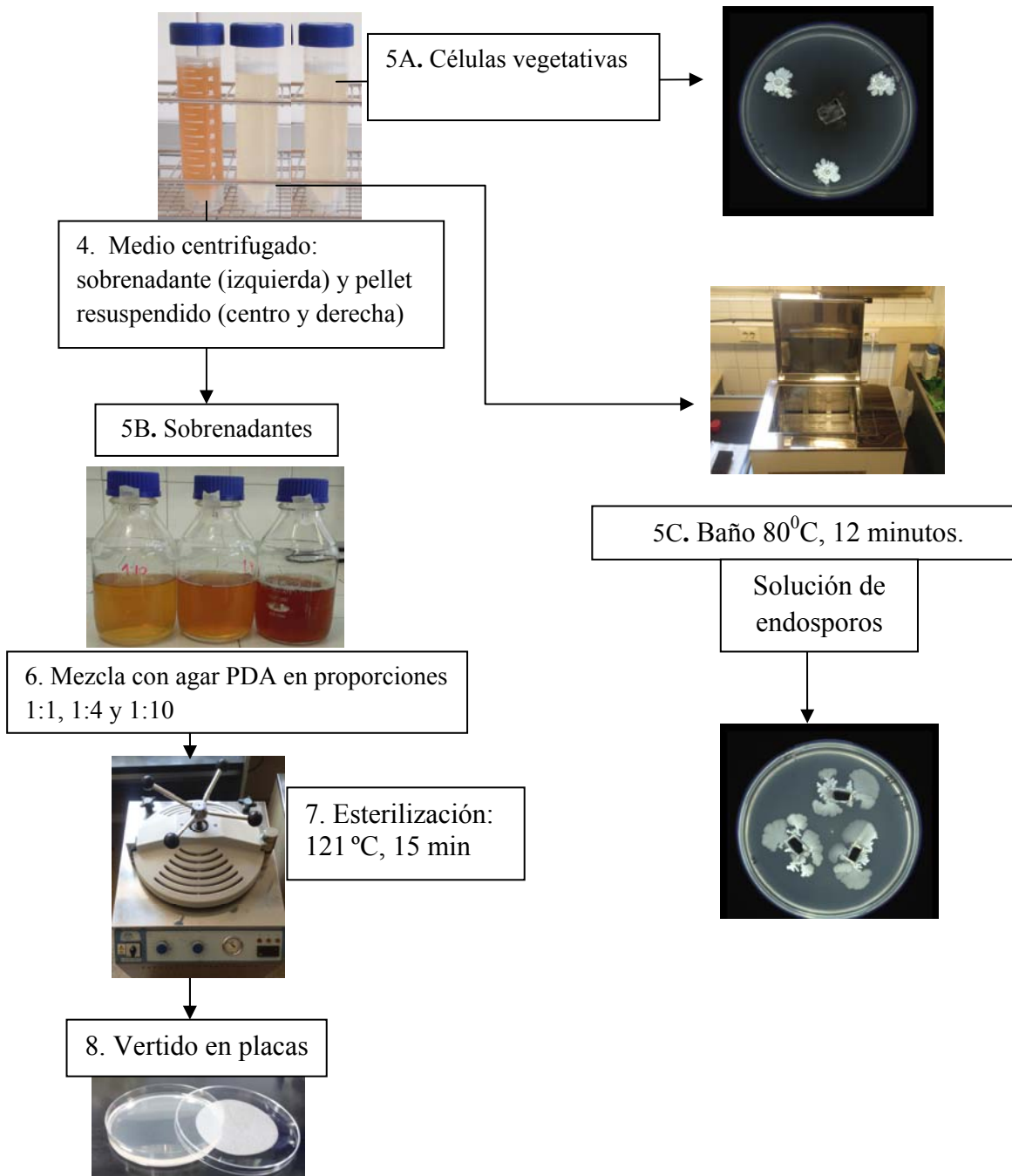
Todas las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días, alta H.R. y oscuridad. Todos los ensayos se realizaron con 5 réplicas y una muestras control, que consistieron en placas de PDA con siembras de los respectivos mohos sin inóculo de BUZ 14, incubadas a 25 °C durante 3 o 5 días, dependiendo del crecimiento micelar que presente la especie fúngica a estudio.

El resultado se obtuvo comparando el diámetro de crecimiento fúngico en las placas control con el obtenido en las placas con los distintos tratamientos y se expresó como porcentaje de reducción del crecimiento fúngico respecto al control.

En el **Esquema 4.2.** se resume el procedimiento seguido para la obtención de las soluciones de células vegetativas + endosporos+ sobrenadante, endosporos y sobrenadantes libres de células.



1. BUZ 14 en caldo 863	2. Tubos Falcon con caldo cultivo	3. Centrifugación 4000 rpm, 11 minutos a 10 ⁰ C
------------------------	-----------------------------------	--



Esquema 4.2. Procedimiento de obtención de las soluciones del agente de biocontrol.

4.3. Determinación de la actividad antifúngica *in vivo*

4.3.1. Obtención de los inóculos microbianos

Los inóculos microbianos se obtuvieron según se detalla en el apartado 4.2.1.

4.3.2. Obtención de las soluciones antifúngicas

En estos ensayos sólo se prepararon soluciones antifúngicas a partir de las 72 horas de incubación. Las soluciones antifúngicas de células vegetativas+endosporos+sobrenadante se consiguieron traspasando 1 mL de la solución incubada a 30 °C/24h a 9 mL de agua de peptona 0,1 % (10^8 UFC/mL), y los endosporos según se detalla en el apartado 4.2.2. Para los ensayos con sobrenadante, se utilizó una parte sin diluir y otra en proporción 1:10, conseguida mediante la adición de 0,9 ml de agua de peptona a 0,1 ml de sobrenadante.

4.3.3. Procedimiento de inoculación

Todas las frutas empleadas en el presente estudio (cereza, manzana, naranja y uva), se conservaron a 4°C hasta su uso. Para cada estudio, se utilizaron 10 frutos, que fueron colocados en recipientes alveolados previamente desinfectados. Para proceder con la inoculación, practicamos incisiones de 2-3 mm x 0,5 cm de profundidad en diferentes zonas del fruto dependiendo de su tamaño (**Imagen 4.4.**). Una vez perforada la epidermis, se inocularon 10 µl de las soluciones de esporas fúngicas en cada herida. Las especies fúngicas inoculadas en cada fruto se detallan en la **Tabla 4.1.**

Fruta	Nº heridas por fruto	Especie fúngica
Cereza	1	<i>M. fructicola</i>
	1	<i>M. laxa</i>
Uva	1	<i>B. cinerea</i>
Naranja	2	<i>P. digitatum</i>
	2	<i>P. italicum</i>
Manzana	2	<i>P. expansum</i>

Tabla 4.1. Frutas empleadas, número de incisiones realizadas por fruto y especies fúngicas inoculadas.

Los frutos se almacenaron durante 3 horas a temperatura ambiente para favorecer la absorción de la solución de esporas fúngicas. Transcurrido este tiempo, inoculamos 10 µl de las diferentes soluciones de *B. amyloliquefaciens* BUZ 14 en cada herida. En todos los casos se dispuso un lote control únicamente inoculado con el patógeno fúngico.



Figura 4.4. Imagen de las incisiones realizadas en: 1-Uva, 2-Cereza, 3-Naranja, 4-Manzana.

4.3.4. Lectura e interpretación de los resultados

Los frutos inoculados y tratados fueron incubados a 25 °C durante 5 días con elevada H.R. Transcurrido este tiempo se procedió a determinar el porcentaje de frutos infectados y el diámetro de la lesión comparando ambos resultados con el obtenido en el lote control. En algunas frutas como la cereza y la uva donde la determinación del diámetro de la lesión es complicado debido a su pequeño tamaño se estableció una escala de severidad correspondiendo el grado 0 al fruto sin infección, grado 1 a frutos con un 25 % de su superficie afectada de podredumbre, el grado 2 al 50%, el grado 3 al 75% y el grado 4 cuando toda la fruta estaba afectada.



Figura 4.5. Escala de severidad para la podredumbre gris por *B. cinerea* en uva (grado 1: frutos con un 25 % de su superficie afectada de podredumbre, grado 2: frutos con un 50 % de su superficie afectada de podredumbre, grado 3: frutos con un 75 % de su superficie afectada de podredumbre y grado 4: toda la superficie afectada de podredumbre).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación del potencial antifúngico *in vitro* de la cepa *B. amyloliquefaciens* BUZ 14

Para determinar la capacidad antifúngica de la cepa BUZ 14, se plantearon diferentes ensayos *in vitro* frente a seis mohos fitopatógenos. Aunque existen diversos métodos de calcular el grado de inhibición, el presente ensayo compara el crecimiento del moho en una placa control sin presencia del *Bacillus*, con otras placas en las que se inocula tras diferentes tiempos de incubación, soluciones de células vegetativas + endosporos + sobrenadantes, únicamente endosporos ó solamente sus metabolitos recogidos en el sobrenadante. La actividad de las células vegetativas se testó a partir de cultivos de 24 horas, mientras que los endosporos y los sobrenadantes se recogieron tras 72, 96 y 120 horas.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada especie fúngica.

***Monilinia fruticola*:**

En la Tabla 5.1. se recogen los resultados para la especie fúngica *M. fruticola*. En la placa control el crecimiento micelial ocupó toda su superficie (83x83 mm) (figura 5.1). La sensibilidad de esta especie frente a la solución de células vegetativas fue elevada con un 66% de inhibición del crecimiento fúngico. En el caso de los endosporos la inhibición fue muy similar detectándose una ligera mayor acción antifúngica en la solución obtenida tras 72 horas de cultivo. En el caso del sobrenadante, la proporción 1:1, independientemente del tiempo de incubación, inhibe totalmente el crecimiento de *M. fruticola*. Las proporciones 1:4 y 1:10, a las 24 horas, presentaron una inhibición del 78 y 76%, respectivamente. A tiempos de incubación mayores la inhibición causada por los metabolitos del sobrenadante fue total. En la figura 5.1. se presentan algunas imágenes de los halos de inhibición obtenidos en este ensayo.

Tabla 5.1.: Porcentajes de inhibición *in vitro* del crecimiento de *M. fruticola* mediante la cepa BUZ 14.

Solución antifúngica		Tiempo de incubación (horas)			
		24	72	96	120
Células vegetativas		66,6±0,7	-	-	-
Endosporos		-	66,4±2,2	60±3,9	57±1,2
Sobrenadante	Proporción 1:1	100	100	100	100
	Proporción 1:4	78,5±1,7	100	100	100
	Proporción 1:10	76±2,5	100	100	100

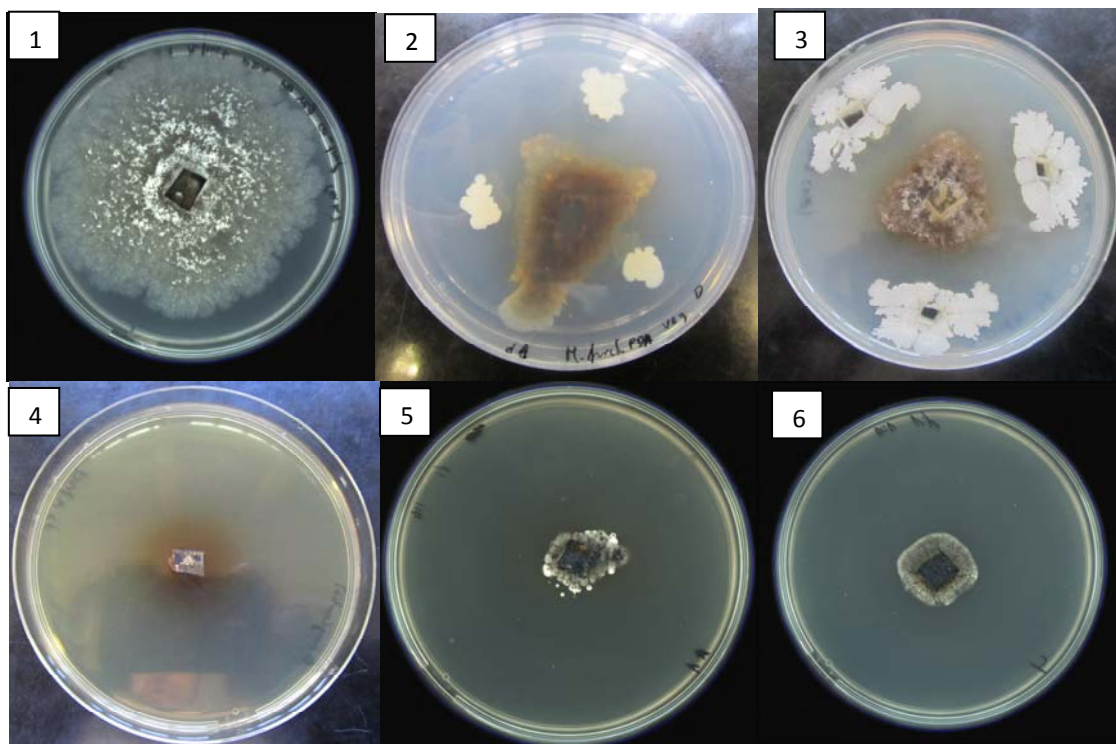


Figura 5.1.: Inhibición del crecimiento de *M. fructicola* en agar PDA mediante la cepa BUZ14: 1- Control; 2- Células vegetativas; 3- Endosporos tras 96 horas; 4- 5-6-Sobrenadantes obtenidos tras 24 horas (proporciones de izquierda a derecha: 1:1, 1:4, 1:10).

Monilinia laxa:

En la Tabla 5.2. se recogen los resultados para la especie fúngica *M. laxa*. Al igual que en la especie anterior, en la placa control el crecimiento miceliar ocupó toda su superficie (83x83 mm) (figura 5.2). En base a dicho control, se apreció que la inhibición de las células vegetativas+ endosporos + sobrenadante fue del 73%. Para los endosporos obtenidos de los cultivos de 72 h la inhibición fue del 81%, aumentando a en torno al 90% en las soluciones de endosporos de cultivos posteriores. La inhibición que presentaron los sobrenadantes fue total, incluso para los extractos obtenidos tras 24 h de incubación, con la única excepción de la proporción 1:10. Observando los datos obtenidos en este ensayo, parece ser que *M. laxa* es ligeramente más sensible que *M. fructicola* a la acción antifúngica de la cepa BUZ 14.

Tabla 5.2.: Porcentajes de inhibición *in vitro* del crecimiento de *M. laxa*, mediante la cepa BUZ 14.

Solución antifúngica		Tiempo de incubación (horas)			
		24	72	96	120
Células vegetativas		73±4,2	-	-	-
Endosporos		-	81,5±2,1	89,6±1,2	88,2±0,9
Sobrenadante	Proporción 1:1	100	100	100	100
	Proporción 1:4	100	100	100	100
	Proporción 1:10	45,5±6,7	100	100	100

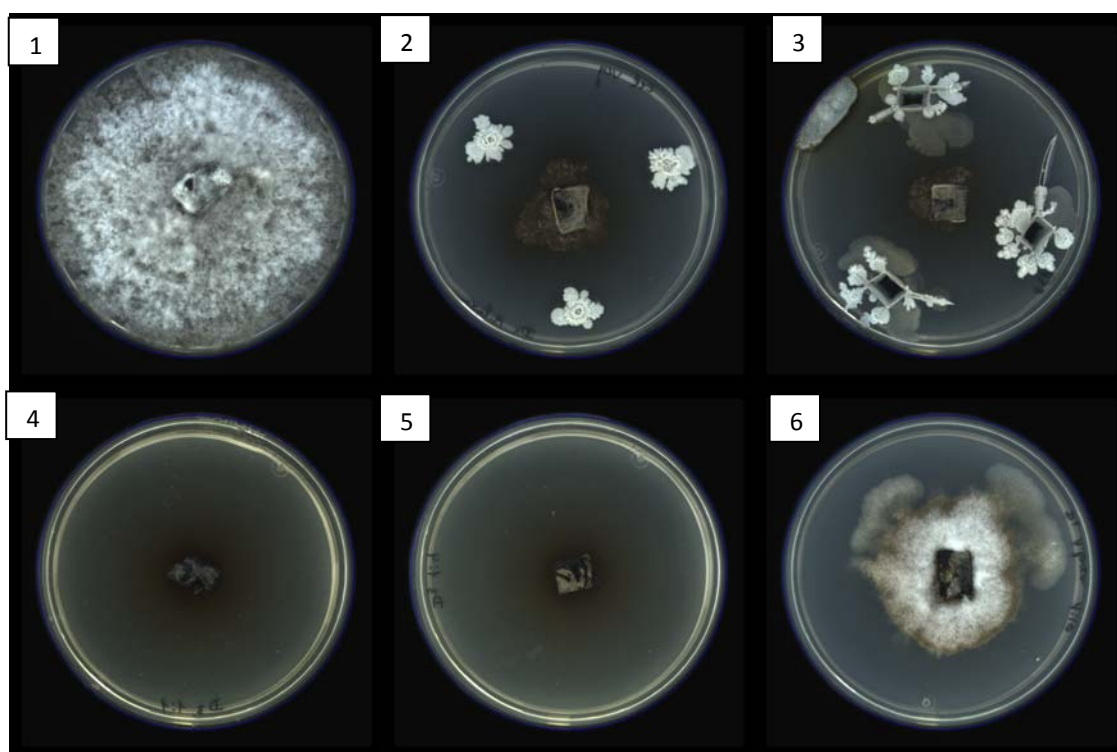


Figura 5.2.: Inhibición del crecimiento de *M. laxa* en agar PDA mediante la cepa BUZ14: 1- Control; 2- Células vegetativas; 3- Endosporos tras 72 horas; 4-5-6-Sobrenadantes en proporciones (de izquierda a derecha: 1:1(72 horas), 1:4(72 horas), 1:10(24 horas)).

B. cinerea:

La sensibilidad de *B. cinerea* a la cepa BUZ14 aumentó significativamente conforme avanzó el tiempo de incubación (Tabla 5.3), reduciéndose significativamente su crecimiento micelial que en la placa control ocupó toda la superficie (83x83 mm). La inhibición del crecimiento fúngico fue del 52% en las primeras 24 horas de cultivo para la solución de células vegetativas + endosporos + sobrenadante, mientras que los endosporos obtenidos tras 72 horas de cultivo obtuvieron una inhibición del 65% aumentando a más del 90% a partir del cuarto día de

ensayo. La proporción 1:1 de sobrenadante presentó una inhibición total incluso en los extractos obtenidos tras 24 h de incubación de la cepa BUZ 14. Al mismo tiempo pero a menores concentraciones, la inhibición causada por los sobrenadantes se redujo al 60 y 50 % para las proporciones 1:4 y 1:10 respectivamente (Figura 5.3). Sin embargo, los sobrenadantes obtenidos de cultivos de 72 horas en adelante mostraron una inhibición total independientemente de la concentración. A la vista de estos resultados podemos afirmar que *B. cinerea* presentó una elevada sensibilidad a los endosporos y sobrenadantes de la cepa BUZ14 obtenidos a partir del cuarto día de incubación.

Tabla 5.3.: Porcentajes de inhibición *in vitro* del crecimiento de *B. cinerea*, mediante la cepa BUZ 14.

Solución antifúngica		Tiempo de incubación (horas)			
		24	72	96	120
Células vegetativas		52±10,9	-	-	-
Endosporos		-	65±7,2	97±3,4	92±4,7
Sobrenadante	Proporción 1:1	100	100	100	100
	Proporción 1:4	62±6,1	100	100	100
	Proporción 1:10	50±6,1	100	100	100

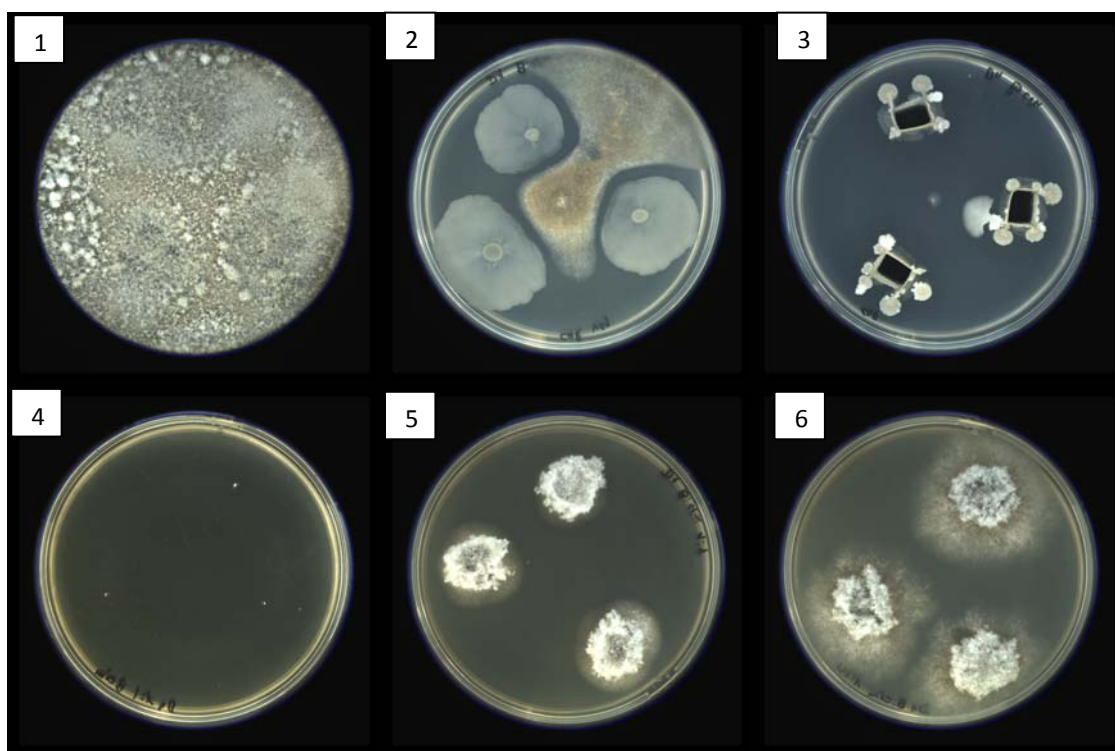


Figura 5.3.: Inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en agar PDA mediante la cepa BUZ14: 1- Control; 2- Células vegetativas; 3- Endosporos tras 96 horas; 4-5- 6-Sobrenadantes obtenidos tras 24 horas (proporciones de izquierda a derecha: 1:1, 1:4, 1:10).

Penicillium expansum:

Las colonias de *Penicillium expansum* en las placas control alcanzaron un diámetro de 26 cm (figura 5.4). Como podemos apreciar en la Tabla 5.4., la inhibición obtenida mediante la solución de células vegetativas y la de endosporos fue similar durante todos los tiempos de incubación, en torno al 60 %, con un aumento puntual de la inhibición, al 79%, en el tratamiento con los endosporos obtenidos tras 96 h.

Tabla 5.4.: Porcentajes de inhibición *in vitro* del crecimiento de *P. expansum*, mediante la cepa BUZ 14.

Soluciones antifúngicas		Tiempo de incubación (horas)			
		24	72	96	120
Células vegetativas		56,8±6,3	-	-	-
Endosporos		-	59,5±1,3	79,2±2	51,6±1,7
Sobrenadante	Proporción 1:1	32,1±0,8	100	100	100
	Proporción 1:4	8,7±0,8	100	100	100
	Proporción 1:10	1,3±0,5	100	100	100

Normalmente, el halo de inhibición se manifiesta por la ausencia de micelio alrededor del antagonista (Figura 5.4., 2) pero además de dicha inhibición de micelio, en el caso de *P. expansum*, se apreciaron unas líneas difusas de precipitación en el interior del halo de inhibición (Figura 5.4., 3). Ait- Kaki et al. (2014) obtuvieron halos de inhibición de *B. amyloliquefaciens* FZB42 frente a *B. cinerea* similares a los obtenidos en este estudio, entre 20-22 mm de diámetro, mediante la técnica de inoculación por picadura, observando también dichos precipitados. Presumiblemente, se trata de los lipopéptidos antimicrobianos precipitados en el agar. Para esta especie el efecto de los metabolitos del primer día de incubación fue muy inferior al resto de los días posteriores de ensayo. Así, la proporción 1.1 obtiene sólo una inhibición del 32%, 8,7% para la proporción 1:4 y 1,3% para la 1.10. Sin embargo, a partir del tercer día de incubación, la inhibición fue total en cualquiera de las proporciones lo que se puede observar claramente en la figura 4.4., 4 y 5.

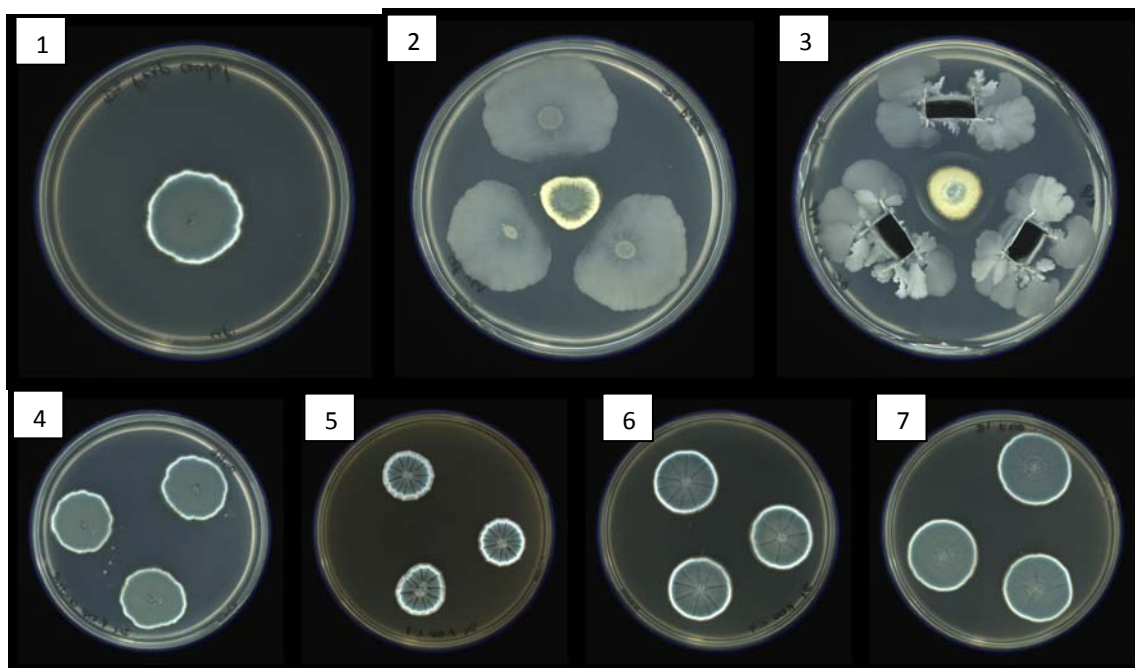


Figura 5.4.: Inhibición del crecimiento de *P. expansum* en agar PDA mediante la cepa BUZ14: 1- Control para células vegetativas y endosporos; 2- Células vegetativas; 3- Endosporos tras 96 horas; 4-Control para sobrenadante; 5-6-7-Sobrenadantes obtenidos tras 24 horas (proporciones de izquierda a derecha: 1:1, 1:4, 1:10).

Penicillium italicum:

Si observamos los datos obtenidos para esta especie (Tabla 5.5.), *P. italicum* fue uno de los mohos más resistentes a la acción antifúngica de *B. amyloliquefaciens*. En este caso las colonias en las placas control ocuparon el 33% de la superficie del agar (21 mm de diámetro). Tanto las células vegetativas como los endosporos obtenidos tras 72 h de cultivo no superaron el 40 % de inhibición y la solución de endosporos de 96 y 120 h no superó el 70%. En el caso de los sobrenadantes las proporciones 1:1y 1:4 presentaron una inhibición casi total (en torno al 80 %) a las 24 h y total a partir de las 96 horas. La proporción 1:10 sin embargo, en las primeras 24 horas apenas tuvo efecto sobre *P. italicum* y aunque a partir de las 72 horas de ensayo la proporción 1:10 aumentó significativamente su poder antifúngico, hasta alcanzar una inhibición de más del 80%, no consiguió inhibir totalmente a esta especie fúngica. En la figura 5.5. podemos observar claramente el efecto de la dilución de sobrenadante sobre el desarrollo miceliar.

Tabla 5.5.: Porcentajes de inhibición *in vitro* del crecimiento de *P. italicum*, mediante la cepa BUZ 14.

Solución antifúngica		Tiempo de incubación (horas)			
		24	72	96	120
Células vegetativas		39,3±7,5	-	-	-
Endosporos		-	36,3±1,2	68,5±1,2	63,8±2.8
Sobrenadante	Proporción 1:1	84,8±7,6	96,6±0,8	100	100
	Proporción 1:4	79,7±10,2	88,4±1,9	100	100
	Proporción 1:10	2,8±2,4	84,3±1,4	81,7±0,8	92,9±1,6

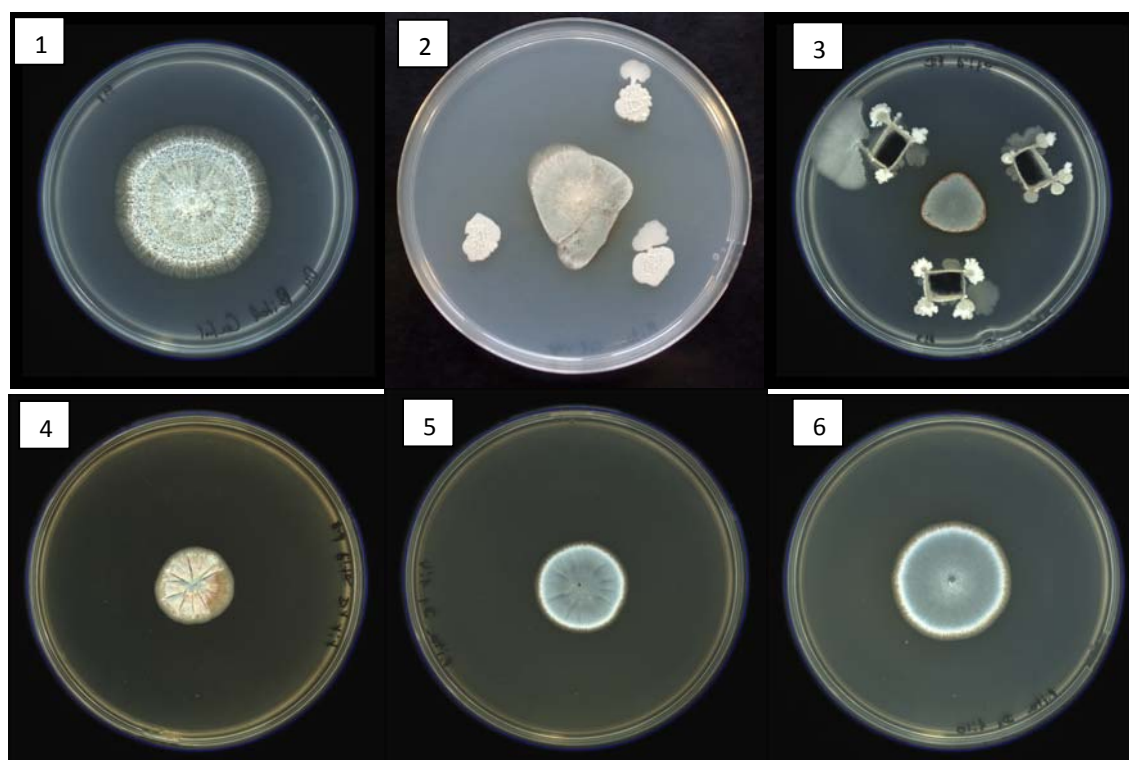


Figura 5.5.: Inhibición del crecimiento de *P. italicum* en agar PDA mediante la cepa BUZ14: 1- Control; 2- Células vegetativas; 3- Endosporos tras 72 horas; 4-5-6-Sobrenadantes obtenidos tras 24 horas (proporciones de izquierda a derecha: 1:1, 1:4, 1:10).

Penicillium digitatum:

Para esta especie las placas control presentaron un diámetro colonial de 20 mm. La inhibición de las células vegetativas se situó en torno al 50 % (tabla 5.6). En el caso de los endosporos la inhibición aumentó significativamente con el paso de los días de incubación, siendo total a las 72 horas y en adelante. Por otro lado, la sensibilidad de *P. digitatum* a los metabolitos tras 24 horas de incubación fue elevada con una inhibición en torno al 75%, siendo toda la inhibición a

partir de las 72 horas (tabla 5.6). La figura 5.6. recoge los resultados más significativos del presente ensayo

Tabla 5.6.: Porcentajes de inhibición *in vitro* del crecimiento de *P. digitatum*, mediante la cepa BUZ 14.

Solución antifúngica		Tiempo de incubación (horas)			
		24	72	96	120
Células vegetativas		54,5±2,5	-	-	-
Endosporos		-	76,5±1,8	81,9±0,7	80,9±4,4
Sobrenadante	Proporción 1:1	77,4±6,6	100±0	100±0	100±0
	Proporción 1:4	73,2±7,7	100±0	100±0	100±0
	Proporción 1:10	70,9±8,4	92,4±0,8	100±0	100±0

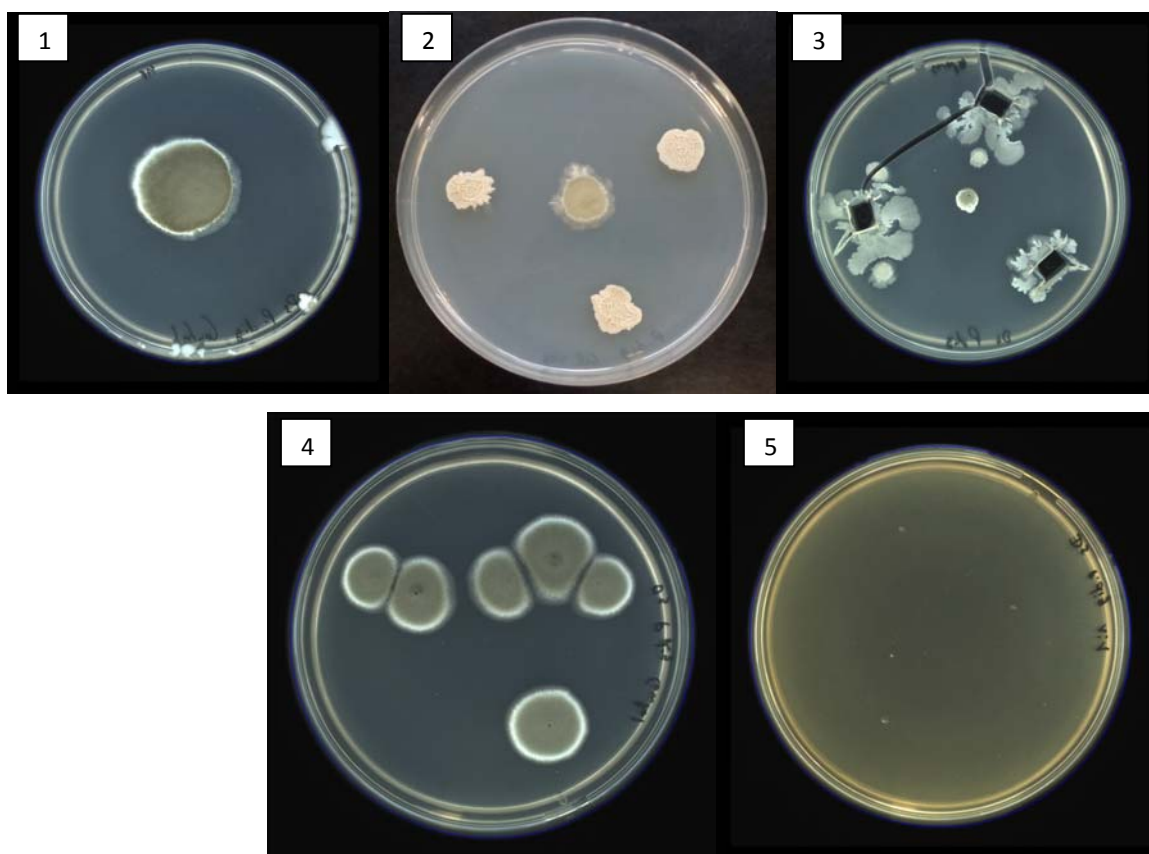


Figura 5.6.: Inhibición del crecimiento de *P. digitatum* en agar PDA mediante la cepa BUZ14: 1- Control para células vegetativas y endosporos; 2- Células vegetativas; 3- Endosporos tras 96 horas; 4-Control para sobrenadante; 5- Sobrenadante obtenido tras 120 horas en proporción 1:1.

Resumiendo los resultados de los ensayos *in vitro* podemos decir que las soluciones de **células vegetativas + endosporos + sobrenadantes** de BUZ 14 obtenidas tras 24 horas de cultivo inhibieron el crecimiento fúngico entre un 39 y un 73%, siendo la especie *M. laxa* la más sensible con una inhibición del 73%, seguida de *M. fructicola* con un 66%. *B. cinerea* y las especies de *Penicillium* mostraron mayor resistencia con una inhibición del 54 %, siendo *P. italicum* la más resistente con un 39%.

La máxima inhibición de los endosporos se presentó en las soluciones obtenidas tras 96 horas de incubación. Soluciones obtenidas tras 72 horas presentaron una inhibición significativamente menor y tras 120 horas se detectó una ligera disminución en el poder antifúngico. Para *M. fructicola* y *M. laxa*, la inhibición fue de un 60 y un 80 %, respectivamente. En el caso de *B. cinerea* aumentó de un 60 a un 92% con el tiempo de incubación. *P. digitatum* presentó la mayor sensibilidad de las especies de *Penicillium* con un 80% de inhibición. En *P. expansum* se detectó la mayor inhibición (~80%) con las soluciones obtenidas a las 96 h, mientras que para *P. italicum* la inhibición no superó el 70% siendo la especie más resistente de las testadas.

El sobrenadante es el tratamiento que mayor poder antifúngico presentó para todas las especies analizadas. Para los sobrenadantes las proporciones 1:1 y 1:4 obtenidas a partir de las 96 horas consiguieron una inhibición total o casi total independientemente de la proporción y/o especie fúngica testada. En el caso de la dilución 1:10 obtenida tras 24 horas de incubación la inhibición varía entre especies siendo muy baja para *P. expansum* (1,3%) y *P. italicum* (2,8%), media (~50%) para *M. laxa* y *B. cinerea* y mayor del 70 % para *M. fructicola* y *P. digitatum*. Las soluciones obtenidas a tiempos de incubación mayores presentaron una inhibición total en todas las especies excepto en *P. digitatum* donde se situó en torno al 80-90%.

Comparando nuestros resultados con otros estudios recientes de biocontrol (Yañez et al., 2011), donde la metodología y las especies fúngicas testadas fueron similares aunque se empleó otro agente de biocontrol (*Bacillus subtilis*), coincidimos en que las especies de *Penicillium* han sido las más resistentes a la acción antifúngica de *B. amyloliquefaciens* BUZ14, y que las especies más sensibles frente a células, endosporos y sobrenadantes libres de células, son las del género *Monilinia*.

5.2. Determinación del potencial antifúngico *in vivo* de la cepa *B. amyloliquefaciens* BUZ 14

En este ensayo se determinó la eficacia de los tratamientos con células vegetativas, endosporos y con sobrenadantes libres de células diluidos 1:10 y sin diluir, obtenidos a las 72, 96 y 120 h de incubación de *B. amyloliquefaciens* BUZ 14.

M. fructicola y *M. laxa* en cereza:

En este ensayo no se pudo establecer la actividad de las células vegetativas ni de los endosporos ya que las frutas inoculadas con estas soluciones sufrieron un proceso de fermentación que imposibilitó la lectura de los resultados. Tras el análisis microbiológico de los frutos se observó que esta alteración había sido producida por el crecimiento de la cepa BUZ14 al haber sido sometida a unas condiciones de temperatura idónea para su crecimiento (~30 °C). En el caso de los sobrenadantes (Figura 5.9) se observó que la inhibición de *M. laxa* mediante la inoculación de sobrenadante sin diluir es total a partir de las 72 horas, y con la proporción 1:10 aumenta del 40% al 100% tras 120 horas de incubación. En el caso de *M. fructicola* el tratamiento con sobrenadante sin diluir presenta un 60% de inhibición tras 72 horas que llega a un 100% con los extractos obtenidos tras 5 días. Para el sobrenadante diluido 1:10 no se detectó inhibición significativa en ninguno de los tiempos de incubación.



Figura 5.9. Cerezas inoculadas con *M. fructicola* (izquierda) y *M. laxa* (derecha), y tratadas con el sobrenadante sin diluir, y con células+endosporos+sobrenadante (abajo) de la cepa BUZ 14 tras 72 h de incubación.

Botritis cinerea en uva:

La acción de los tratamientos con las diferentes soluciones de BUZ 14 se calculó a partir del grado de infección de las uvas. Se pudo observar como todos los frutos fueron infectados, en mayor o menor proporción, siendo indiferente el tratamiento de biocontrol aplicado. Tampoco hubo una diferencia significativa en la severidad de la podredumbre en función de los tratamientos, excepto con el antibiótico sin diluir, donde el número de frutos infectados fue

muy similar pero ninguno de ellos superó el 50 % de infección. Además, se observó una disminución de la severidad en todos los tratamientos tras 120 horas de incubación del agente, ya que ninguno de los frutos superó el 50 % de severidad. El efecto de estas soluciones antifúngicas se puede apreciar en la figura 5.10.

Tabla 5.7. Severidad de la lesión por *B. cinerea* en uvas inoculadas y tratadas con distintas soluciones de la cepa BUZ14.

Solución antifúngica		Tiempo de incubación (horas)		
		72	96	120
		Severidad (0/25/50/75/100) ¹	Severidad (0/25/50/75/100)	Severidad (0/25/50/75/100)
Células vegetativas		0/33/42/25/0	0/67/33/0/0	0/75/25/0/0
Endosporos		0/25/58/17/0	0/33/41/25/0	0/58/42/0/0
Sobrenadante	Sin diluir	0/83/17/0/0	0/75/25/0/0	0/83/17/0/0
	Proporción 1:10	0/42/33/25/0	0/33/50/17/0	0/75/25/0/0

¹ Grado de severidad: grado 1: frutos con un 25 % de su superficie afectada de podredumbre, grado 2: frutos con un 50 % de su superficie afectada de podredumbre, grado 3: frutos con un 75 % de su superficie afectada de podredumbre y grado 4: toda la superficie afectada de podredumbre.

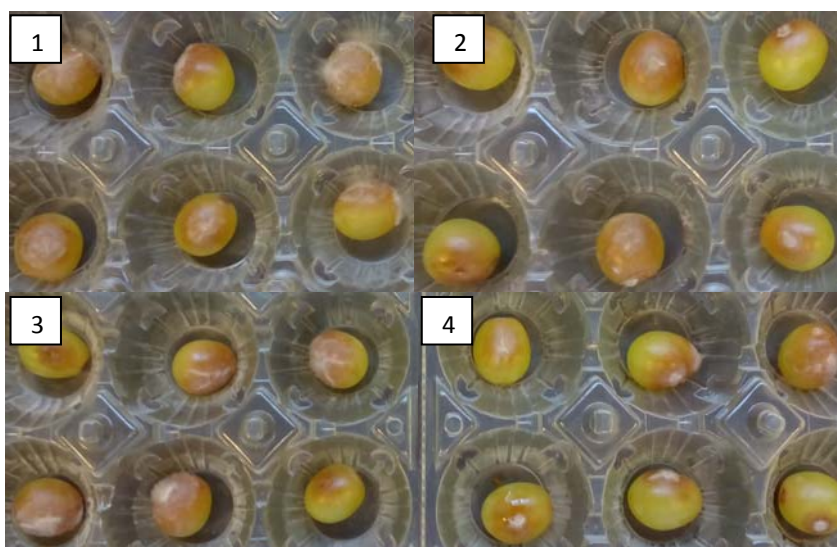


Figura 5.10.: Uvas inoculadas con *B. cinerea* y tratadas con distintas soluciones antifúngicas de la cepa BUZ14 en el cuarto día de incubación a 25 °C. Control (1), Tratamiento con Células vegetativas+ Endosporos+ Sobrenadante (2), endosporos (3), y antibióticos sin diluir (4).

Penicillium digitatum y *Penicillium italicum* en naranja:

En el caso de las naranjas, la herida se realizó en el flavedo hasta llegar al pericarpo donde se llevo a cabo la inoculación tanto de las especies fitopatógenas como de las soluciones

antifúngicas. Como se aprecia en la figura 5.11., ninguno de los tratamientos con las soluciones antifúngicas afectó al crecimiento de *P. digitatum*.

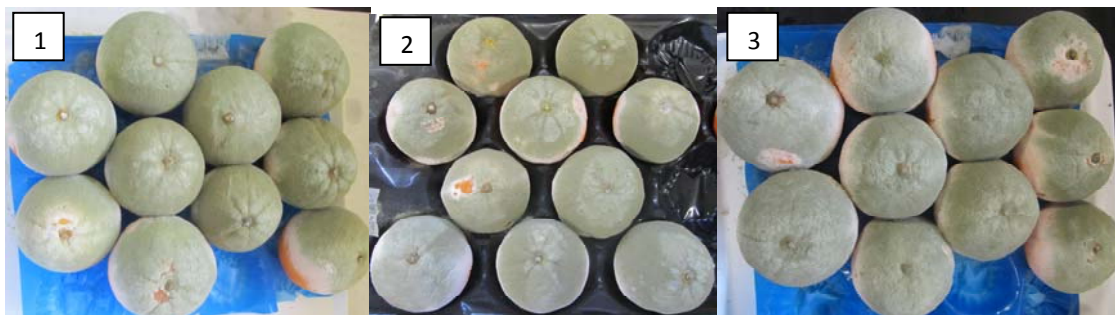


Figura 4.11. Naranjas inoculadas con *P. digitatum* y con la cepa BUZ14 tras 5 días de incubación: 1- Control; 2- Sobrenadante sin diluir; 3- Endosporos.

En el ensayo con *P. italicum*, se obtuvo una reducción de la severidad mediante la solución de sobrenadante sin diluir obtenida tras 120 horas (Figura 5. 12.) pero no fue significativa.



Figura 4.12. Naranjas inoculadas con *P. italicum* y con la cepa BUZ14 tras 5 días de incubación: Control (derecha) y sobrenadante sin diluir (izquierda).

Penicillium expansum en manzana:

Los resultados obtenidos en este ensayo se basan en comparar el diámetro medio del desarrollo micelial en las frutas con tratamiento antifúngico frente a frutos control. Como podemos observar en la tabla 5.8., no existe variación entre el diámetro de crecimiento fúngico en los controles y en el de los frutos tratados, independientemente de la solución antifúngica aplicada.

Tabla 5.8. Diámetro medio del crecimiento de *P. expansum* en manzana en frutos control y frutos tratados con distintas soluciones de la cepa BUZ14.

Solución antifúngica	Control	Endosporos	Vegetativas+ Endosporos+ Sobrenadante	Células vegetativas	Sobrenadante sin diluir	Sobrenadante 1:10
Media $\pm$ SD	22,0 $\pm$ 1,8	21,7 $\pm$ 1,5	20,9 $\pm$ 3,1	21,9 $\pm$ 3,2	21,1 $\pm$ 0,9	21,7 $\pm$ 1,2

6. CONCLUSIONES

Primera

La mayor actividad antifúngica de los tratamientos con células vegetativas de la cepa BUZ 14 se detectó en la especie *M. laxa* siendo las más resistentes *P. italicum* y *P. expansum*.

Segunda

En general, los endosporos de la cepa BUZ14 presentaron su máxima actividad antifúngica en las soluciones obtenidas tras 96 horas de incubación siendo las especies más sensibles *M. laxa* y *B. cinerea* y las más resistentes las pertenecientes al género *Penicillium*.

Tercera

La acción antifúngica de los sobrenadantes aumenta con el tiempo de incubación y con la concentración. Así, podemos establecer que tras 72 horas de incubación ya se consigue la máxima inhibición y que ésta es total, incluso en la disolución 1:10, para las especies *M. fructicola*, *M. laxa*, *B. cinerea* y *P. expansum* y muy elevada (>80%) para *P. italicum* y *P. digitatum*.

Cuarta

Los ensayos de inhibición *in vitro* han demostrado que la cepa BUZ 14 posee una elevada actividad antifúngica frente a todos los mohos fitopatógenos testados siendo las especies más sensibles *M. fructicola*, *M. laxa* y *B. cinerea*.

Quinta

La elevada actividad antifúngica *in vitro* de la cepa BUZ 14 únicamente se ha confirmado *in vivo* para las especies *M. laxa*, *M. fructicola* en cerezas y para *B. cinerea* en uva siendo el tratamiento más efectivo la solución de sobrenadante sin diluirla.

CONCLUSSIONS

First

The highest antifungal activity of cells of BUZ14 was detected in *M. laxa* being *P. italicum* and *P. expansum* the most resistant species.

Second

In general, the major antifungal activity of endospores of BUZ14 strain was detected in the solutions obtained after 96 hours of incubation, being the most sensitive species *M. laxa* and *B. cinerea* and the more resistant the ones belonging to the genus *Penicillium*.

Tercera

The antifungal activity of the supernatants increases with incubation time and concentration. Thus, we can establish that after 72 hours of incubation the maximum inhibition is achieved. This inhibition is total, even at 1:10 dilution, for the species *M. fructicola*, *M. laxa*, *B. cinerea* and *P. expansum* and very high (> 80%) for *P. italicum* and *P. digitatum*.

Cuarta

In vitro tests have shown that BUZ 14 strain has a high antifungal activity against all the fungal species tested being the most sensitive *M. fructicola*, *M. laxa* and *B. cinerea* .

Quinta

The high antifungal activity *in vitro* of BUZ 14 strain has only been confirmed *in vivo* for the species *M. laxa* and *M. fructicola* in cherries and for *B. cinerea* in grapes, being the most effective treatment the supernatant undiluted.

7. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

Los proyectos a largo plazo tienen la característica de incitar a la anticipación al que en ellos se sumerge, una buena planificación permite adelantarse a los contratiempos que siempre surgen en el desarrollo de un experimento.

Este proyecto me ha aportado una visión a largo plazo más organizada, me ha enseñado a planificarme mucho mejor, a ser previsor aunque nunca sea suficiente, ya que los factores que componen el éxito de un ensayo científico son numerosos y para mi, infinitos. He mejorado mi faceta de escritor a la hora de interrelacionar conceptos, he aprendido a citar correctamente los trabajos científicos, a leerlos en el contexto de la investigación, con el objetivo de exprimirlos al máximo para asimilar pautas. He mejorado la comprensión del inglés científico relacionando cada párrafo de los artículos con los de mi proyecto, dándoles contexto y facilitando su comprensión.

Aun habiendo trabajado con muchos compañeros y compañeras durante el transcurso del grado, durante la realización del experimental aprendí a coordinarme con un investigador a nivel de planificación de trabajo, complementación y confianza, ya que los aciertos y los fallos son compartidos.

Por último, el aporte que ha mejorado de forma más gradual, ha sido la capacidad de manejar diferentes materias y obligaciones al mismo tiempo, todas de muy diferente índole, ya que durante la realización del experimental coincidieron clases, prácticas, y sus correspondientes trabajos que nada tenían que ver con los mohos ni la fruta.

8. EVALUACIÓN Y SUGERENCIAS DE MEJORA

El Trabajo de Final de Grado permite demostrar las capacidades adquiridas a lo largo de la titulación, con una demostración de organización y compromiso, llevadas al máximo nivel. En mi opinión, la carga docente requerida por este proyecto ha sido mayor a la establecida en la guía docente, cierto es que el tipo de proyecto requiere mucho tiempo de obtención de resultados, transcribirlos e interpretarlos; ya no digamos la escritura del presente documento, para el que mi preparación recibida en la carrera ha sido algo insuficiente, ya que la lectura de

documentos científicos en inglés ha sido una de las mayor lagunas encontradas a la hora de enfrentar el TFG.

Por parte de los tutores, el interés mostrado en los avances del experimental ha sido inmejorable; de cara a la redacción, el aporte de documentos, además de los buscados por mi mismo, me ha servido de gran ayuda debido al conocimiento que poseen sobre la materia.

9. BIBLIOGRAFIA

- Ait-Kaki, A., Kacem-Chaouche, N., & Ongena, M. (2014). *In vitro* and *in vivo* characterization of plant growth promoting *Bacillus* strains isolated from extreme environments of eastern Algeria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172: 1735-1746.
- Baker K. F. (1987). Evaluating concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25: 67-85
- 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
- Benbow, J., & Sugar, D. (1999). Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Disease*, 83: 839-844
- Casals, C., Teixidó, N., Viñas, I., & Silvera, E. (2010). Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *European Journal of Plant Pathology*, 128: 51-63.
- De Cal, M., Larena, I., & Melgarejo, P. (2007). Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 1271-1277
- 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. *Biological Control*, 65: 312-321
- Droby S, & Chalutz E. (1994). Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. Wilson C L, Wisniewski M E. *Biological Control of Postharvest Diseases — Theory and Practice*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 63-75.
- Eckert, J., & Ogawa, J. (1988). The chemical control of postharvest diseases: deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. *Annual Review of Phytopathology*. 26: 433-469.
- EFSA. European Food Safety Authority Journal (2014);12(5):3665. Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition.
- Juárez-Becerra, G.P., Sosa-Morales, M.E., & López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 4-2 (2010): 14-23.
- Kim, P., & Chung, K. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters*, 234: 177-183
- Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. Superficie y producción de frutas y hortalizas en España en los años 2008-2012. Consultado en: <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/tablawebspffhhtcm7-318715.pdf>; <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/frutas-y-hortalizas/#para0>.
- 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:EN-518. [149 pp.].
- Northover, J., & Cerkauskas, R. (1994). Detection and significance of symptomless latent infections of *Monilinia fructicola* in plums. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16: 30-36
- Pusey, P.L. & Wilson, C.L. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, 68: 753-756.
- Romero, D., de Vicente, A., & Olmos, J. (2007). Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 969-976.

- Scholz, R., Molohon, K., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A.L., Roderich D., Mitchell, D.A. & Borriss, R. (2010). Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*, 193:215.
- Torres, R. (2013). Nuevas estrategias para el control y la detección de podridos en pera. XII Jornada Tècnica de Postcollita, Lleida, dijous 9 de maig de 2013
- Velázquez-del Valle, M.G., Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Guerra-Sánchez, M.G. & Amora-Lazcano, E. 2008. Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos Agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:49-55.
- Wilson, C.L. & Wisniewski, M.E. (1994). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. Theory and Practice. CRC Press, Boca Ratón, Florida, U.S.A.
- 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 Science and Technology*, 21:4,409-426