

1. RESUMEN/ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Producción española e importancia económica de frutas y hortalizas	4
2.2. Pérdidas post-cosecha	5
2.3. Métodos de control de las podredumbres	9
2.4. Proceso de selección de un agente de biocontrol	11
2.5. <i>Bacillus</i> como agente de biocontrol	13
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1. Material biológico	17
4.1.1. Microorganismo de biocontrol: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa BUZ-14	
4.1.2. Frutas	
4.1.3. Especies fúngicas	
4.2. Crecimiento in vitro de la cepa <i>B. amyloliquefaciens</i> BUZ-14	18
4.2.1. Influencia de la temperatura en el crecimiento de la cepa BUZ-14	
4.2.2. Influencia del pH en el crecimiento de la cepa BUZ-14	
4.2.3. Supervivencia y actividad antifúngica de <i>B. amyloliquefaciens</i> BUZ-14 en fruta almacenada en refrigeración y a temperatura ambiente	
4.3. Crecimiento de la cepa BUZ-14 en presencia de pesticidas comúnmente empleados en el cultivo	20
4.4. Crecimiento de la cepa BUZ-14 en medios alternativos de bajo coste	21
4.4.1. Formulación de los medios alternativos de bajo coste	
4.4.2. Curvas de crecimiento	
4.4.3. Actividad antifúngica de la cepa BUZ-14 tras el crecimiento en medios de bajo coste	
4.4.3.1. Obtención de las suspensiones de células vegetativas, endosporos y sobrenadante libre de células	
4.4.3.2. Determinación de la actividad antifúngica	
4.4.3.3. Lectura e interpretación de los resultados	
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1. Crecimiento in vitro de <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BUZ-14	26
5.1.1. Influencia de la temperatura	
5.1.2. Influencia del pH	
5.2. Supervivencia de <i>B. amyloliquefaciens</i> BUZ-14 en fruta almacenada en refrigeración y a temperatura ambiente	28
5.3. Crecimiento de la cepa BUZ-14 frente a pesticidas usados en precosecha	30
5.4. Crecimiento de la cepa BUZ-14 en medios alternativos de bajo coste	31
5.4.1. Medios alternativos de bajo coste	
5.4.2. Selección de medios para la producción del agente de biocontrol <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BUZ-14.	
5.4.3. Actividad antifúngica de la cepa BUZ-14 tras el crecimiento en medios de bajo coste	
6. CONCLUSIONES	38
7. BIBLIOGRAFIA	39
8. AGRADECIMIENTOS	44

1. RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la capacidad de la bacteria antagonista *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 como posible agente de biocontrol frente a *Monilinia laxa*, *M. fructicola* y *Botrytis cinerea*, tres mohos causantes de numerosas pérdidas económicas en la postcosecha de frutas. Para ello, se ha caracterizado su crecimiento *in vitro* a diferentes temperaturas (37, 30, 20, 10 y 4 °C) y pHs (3, 4,5, 5 y 7) e *in vivo* en melocotones conservados 1 °C para establecer su idoneidad de cara a una posible aplicación en conservación post-cosecha. También, se evaluó su compatibilidad *in vitro* con pesticidas habitualmente usados en el cultivo, estableciendo las concentraciones que permiten su crecimiento. Finalmente, se elaboraron medios de bajo coste con ingredientes ricos en nitrógeno y carbono como harinas y azúcares y se estudió su influencia en el crecimiento de esta cepa y en su actividad antifúngica.

BUZ-14 ha demostrado tener una gran capacidad de crecimiento y supervivencia en medios y condiciones muy similares a las de comercialización de las frutas. La mesofilia y la neutralidad se confirmaron como condiciones óptimas de crecimiento (10^9 UFC/mL), aunque pHs bajos y temperaturas de refrigeración permitieron su supervivencia e incluso mantuvieron su actividad antifúngica frente a *M. fructicola* en melocotón. La mayoría de los pesticidas testados a las dosis de referencia permitieron el crecimiento de la cepa, aunque en otros como Armicarb o Karathane Star se tuvo que reducir la concentración 10 y 20 veces respectivamente hasta conseguir su crecimiento. Los medios de bajo coste demostraron carencias en su formulación, ya que solo en tres de los seis medios testados hubo crecimiento tras 24 h de incubación (10^9 UFC/mL). Además, ninguno de ellos posibilitó que nuestra cepa alcanzase la actividad antifúngica que posee cuando se cultiva en el medio 863 (control) por lo que se deberá continuar con la búsqueda de un medio de crecimiento viable económicamente que a la vez mantenga su potencial como agente de biocontrol.

ABSTRACT

In this work the biocontrol antifungal potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain BUZ-14 against three phytopathogenic molds, *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* and *M. fructicola*, responsible of economical loses in the postharvest of fruit, has been studied. Therefore, the characterization of *in vitro* growth of strain BUZ-14 was carried out at different temperatures (37, 30, 20, 10 y 4 °C) and pHs (3, 4,5, 5 y 7), and *in vivo* at 1°C on peach, to determine its suitability for a postharvest application. Moreover, interaction between chemical pesticides used on crops, and BUZ-14 strain was tested defining those concentrations that allow its *in vitro* growth. Finally, using low cost media based on nitrogen and carbon sources as flours and carbohydrates, both growth and antifungal activity of the strain was evaluated.

The ability of BUZ-14 to grow and survive *in vitro* at very similar conditions to those employed in the postharvest storage of vegetables was demonstrated. Although a neutral pH and mesophilia conditions were the optimal growing conditions (obtaining 10⁹ CFU/mL), a low pH and refrigeration temperatures also allow its survival and maintain its antifungal activity against *M. fructicola* inoculated in peaches. Many of the chemical pesticides tested allow BUZ-14 growth at their reference doses but with some of them, like Armicab and Karathane Star, a reduction of 10 and 20 times, respectively, was necessary. Only three of the six alternative low cost media tested supported BUZ-14 growth after 24 h incubation (obtaining 10⁹ CFU/mL). However none of them reached the antifungal activity demonstrated in the 863 cultures (control). Thus, improvement of an affordable media formulation that allows both growth and antifungal activity must be studied.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Producción española e importancia económica de frutas y hortalizas

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. Los frutales no cítricos ocupan el 11,3% de la producción hortofrutícola; concretamente, las **frutas de hueso** suponen el 16 % del total de frutas (MAGAMA, 2008-2013), que representan el 60% de la producción de los frutos dulces, 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 uva alcanza los 6,5 millones de toneladas anuales (MAGAMA 2006), representando un alto porcentaje ya no en volumen de producto si no en valor económico debido a la revalorización que sufre esta materia prima gracias a la vinificación; tanto es así, que el 94,9% de la uva se destina a mostos y vinificación, el 5% a consumo en fresco y aproximadamente el 0,1% a uvas pasas (MAGAMA 2007).

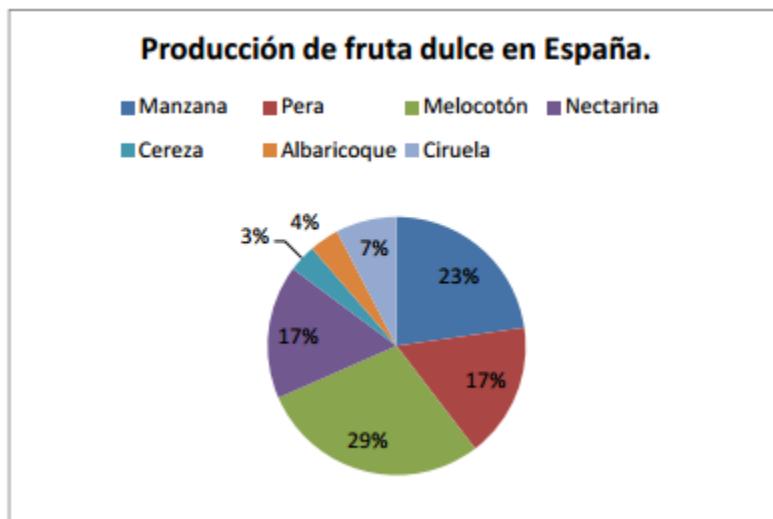


Figura 2.1: Distribución en porcentaje de las principales frutas producidas en España entre 2008 y 2012;
Fuente: MAGRAMA.

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 Tm., 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 continúa 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 %. La vid en Aragón, con 41.811 hectáreas en 2008, ocupa el 3,5 % de la superficie cultivada y genera el 4,5 % del valor de la producción agrícola con 44,66 millones de € en 2009; como en todos los casos, al transformar las materias primas agrarias se añade nuevo valor económico a la producción, y las uvas aragonesas lo multiplican por 2,8 al convertirse en vino (Gobierno de Aragón, 2009).

2.2. Pérdidas post-cosecha

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. La uva es un fruto no climatérico por lo que su actividad fisiológica es relativamente baja (Peynaud y Ribereau-Gayon, 1971), a pesar de ello es susceptible a la perdida de agua y a la pudrición durante el manejo postcosecha (Nelson, 1985). A pesar de ello, las pérdidas por podredumbres causadas en los viñedos alcanzan un 15-40% de las cosechas en función de las condiciones climáticas, estimándose los costes económicos en más de 15 mil millones de euros al año, es decir, se pierde el 25% de la facturación potencial debido a este problema. Se hace necesario, por tanto, encontrar nuevas técnicas que protejan la fruta durante su proceso de cultivo y 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 se realiza antes de su recolección, lo que no limita el riesgo de enfermedades latentes. Las alteraciones patológicas post-cosecha, 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 y/o 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 la lesión es uniforme en la totalidad del fruto. 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 fértiles 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.

La podredumbre más habitual en frutos de hueso es la podredumbre marrón ocasionada principalmente por las especies *Monilinia fructicola* y *M. laxa*. Se trata, en concreto, de una infección de las flores que 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 (Figura 2.2.).

Tabla 2.1: Podredumbres más comunes en frutas de hueso

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

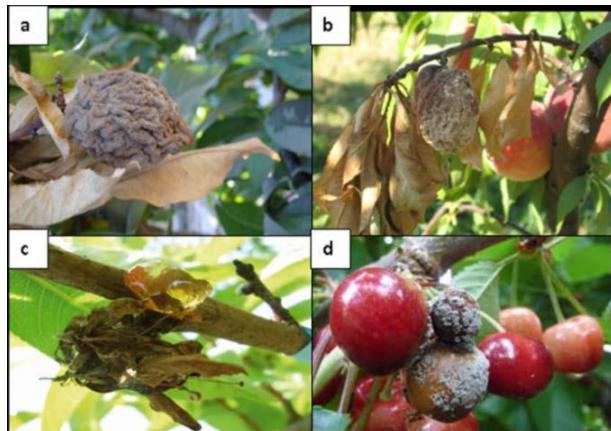


Figura 2.2: Frutas momificadas (a y b); gomosis del chancre (c), y cerezas afectadas por *Monilinia spp.*

En manzanas y peras, un moho bastante agresivo es *Botrytis cinerea* (Figura 2.3.), causante de la podredumbre gris y también típico de fresas y uva donde resulta la principal causa de las pérdidas post-cosecha. Uno de los principales problemas que acarrea una contaminación con *B. cinerea* es su capacidad para causar lesiones visibles tras seis semanas a temperaturas de almacenamiento, e incluso a temperaturas por debajo de 0 °C (Terry, 2009).



Figura 2.3: *Botrytis cinerea* en fresa (izquierda) y formación de nidos por infección con *Botrytis cinerea* en pera (derecha).

2.3. Métodos de control de las podredumbres

Los productores de frutas recurren a diferentes métodos para contrarrestar la presencia y acción de los patógenos fúngicos. El método más utilizado a lo largo de los últimos años para combatir las podredumbres ha sido el uso en campo de fungicidas de síntesis. El abuso de estos productos ha derivado en resistencias de microorganismos fitopatógenos generando cepas inmunes a ciertos tratamientos precosecha, causando severos impactos en el medio ambiente, y la consiguiente alarma entre consumidores y organismos públicos (Wisniewski y Wilson, 1992).

En postcosecha el empleo de estos fungicidas está limitado a ciertos productos de larga conservación como manzanas y peras. Los tratamientos postcosecha con fungicidas, sin embargo, no funcionan en enfermedades latentes con origen en precosecha, como la podredumbre marrón (*Monilinia spp.*) o la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), a no ser que el producto penetre en el fruto para ejercer una acción local (Demoz y Korsten, 2006), por lo que se han de buscar otros métodos de control para estas alteraciones.

El desarrollo de alternativas al tratamiento de enfermedades post-cosecha se ha de enfocar desde el punto de vista de un escenario complejo donde intervienen las leyes medioambientales, el gran número de patologías y las condiciones en las que se producen, la industria y los consumidores, y la viabilidad comercial del producto o productos sustituyentes. Algunas de las alternativas son el empleo de recubrimientos comestibles con propiedades antifúngicas, cuyo ejemplo más destacado es el quitosano, la radiación ultravioleta, tratamientos térmicos suaves, ozono gas y agua ozonizada, aceites esenciales y extractos vegetales (Usall, 2016; Wisniewski 2016), así como el uso de microorganismos, estrategia estudiada desde hace tres décadas (Tronsmo y Dennis, 1977). 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). Algunos microorganismos con capacidad antifúngica han sido aislados de ambientes con alta concentración salina (salsa de soja, escabeche, etc.), por lo que se plantearon aditivos ricos en sales como complemento a los protocolos de biocontrol (principalmente CaCl_2 y NaHCO_3). Inicialmente se defendía el uso de grandes concentraciones de estos microorganismos para contrarrestar el crecimiento de mohos fitopatógenos, siendo un procedimiento agresivo y que pretendía eliminar el riesgo actuando una sola vez de

manera drástica. Con el tiempo, la tendencia se ha dirigido hacia teorías más efectivas que las de una sola acción aislada (Leistner, 2000), estableciendo múltiples barreras donde se parte de aplicar menos inóculo para más adelante combinarlo con diferentes tratamientos como componentes naturales y agentes físicos (Wisniewski, 2016).

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, como se aplican los citados fungicidas de síntesis. Esta práctica sería 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 el tratamiento con agentes de biocontrol en precosecha, sólo sirven las especies de levaduras y bacterias que sean capaces de sobrevivir en la superficie de la fruta durante un tiempo prolongado, y en condiciones ambientales de elevadas temperaturas y baja humedad. 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 aplica 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 prologada duración en el tiempo y un coste elevado; además, queda por demostrar su efectividad en condiciones reales. Así, de entre diversas

alternativas, el control biológico se presenta como uno de los medios más racionales y sostenibles para contrarrestar la aparición y desarrollo de podredumbres.

2.4. Proceso de selección de un agente de biocontrol

La identificación, desarrollo y comercialización de un producto de biocontrol es un proceso largo y costoso. Wilson y Wisniewski (1989) describieron los criterios para el antagonista ideal (Tabla 2.2) y señalaron que se necesitaba una consideración especial para identificar antagonistas potenciales ya que, en el caso de los agentes de biocontrol en postcosecha, su uso se realizaría de manera directa sobre los alimentos. En este sentido, también señalaron que el potencial de las levaduras como agentes de biocontrol postcosecha merece una atención especial. De hecho, los productos basados en levaduras parecen tener mejor aceptación a nivel comercial debido a la inevitable conexión con los productos fermentados como el pan y la cerveza, y con patogenia para los basados en bacterias (Wisniewski, 2016). La mayoría de los agentes de biocontrol postcosecha que han sido reportados en la literatura científica y/o han sido desarrollados como productos comerciales, se basan en levaduras. A pesar de ello, uno de los primeros productos utilizados como agente de biocontrol está basado en una bacteria, *Pseudomonas syringae* (Janisiewicz y Jeffers, 1997), y numerosas cepas del género *Bacillus* se estudian debido a su elevada producción de metabolitos antibióticos.

Entre los factores más relevantes para el desarrollo y comercialización exitosa de un producto de biocontrol destacan: (1) la bioseguridad del antagonista elegido, (2) su potencial antifúngico, (3) sus requisitos de crecimiento y vida útil, (4) su rango de actividad (instalaciones y patógenos, condiciones de baja humedad, exposición a radiación ultravioleta, y elevada temperatura) y (5) su facilidad de uso. Si alguno de estos factores, después de su estudio, no es aclarado correctamente, el desarrollo del producto comercial no se llevará a cabo a pesar de la eficacia del microorganismo antagonista (Dorby, 2009).

Tabla 2.2: Características de un antagonista post-cosecha ideal para su desarrollo comercial.

1. Genéticamente estable
2. Efectivo a baja concentración
3. No posee requerimientos nutricionales exigentes
4. Capacidad para sobrevivir condiciones ambientales adversas
5. Eficaces contra una amplia gama de agentes patógenos en diferentes productos
6. Tiene facilidad de crecer en medios de cultivo económicos
7. Permite almacenar el preparado activo durante un tiempo prolongado
8. Fácil de aplicar
9. Resistente a los productos químicos utilizados en el entorno post-cosecha
10. No perjudicial para la salud humana
11. Compatible con procedimientos de procesamiento comercial (escalado)

Varios de los productos de biocontrol registrados actualmente han sido desarrollados conjuntamente por investigadores y empresas comerciales, y a pesar de un correcto desarrollo, el potencial como elemento comercial completo depende también de su aceptación y condiciones de utilización (Droby, 2016). La baja tasa de éxito de los productos de biocontrol en post-cosecha se ha atribuido a factores tales como la baja efectividad en condiciones comerciales, lejos de la alcanzada por los fungicidas químicos, en torno al 98-100%. Este nivel es rara vez alcanzado con productos de control biológico cuando se utilizan como un tratamiento independiente fuera de la teoría de múltiples barreras. La necesidad de una vida útil razonable y de una eficacia constante, requiere de la estabilización de la viabilidad celular, que puede conseguirse mediante la disponibilidad del producto en estado líquido (requiere refrigeración), mediante liofilización del cultivo con el obligado uso de sustancias crioprotectoras durante la preparación, o a través del deshidratado por aire caliente. Los dos últimos tipos de formulaciones pueden almacenarse entonces a temperatura ambiente (Droby, 2016).

La producción a gran escala de agentes de biocontrol es un paso esencial para su uso comercial (Droby, 2009). Un factor clave a considerar es el desarrollo de un medio de cultivo económico que permita la obtención de grandes cantidades de un agente microbiano a un precio bajo manteniendo su eficacia. Los componentes de un medio de bajo coste deben aportar los requerimientos básicos para la producción de biomasa y metabolitos, proporcionando un suministro adecuado de energía para el mantenimiento de la biosíntesis y desarrollo celular, además de actuar como base para adaptar la

producción a nivel industrial (Stanbury, 1995). Para este tipo de formulaciones se suelen utilizar productos comerciales o subproductos provenientes de las industrias agroalimentarias, que además de baratos, deben ser de fácil acceso y disponibilidad.

Los microorganismos necesitan agua, carbono, nitrógeno, minerales, y si son aerobios, como es nuestro caso, oxígeno para la producción de su biomasa y como fuente de energía para la síntesis y mantenimiento celular. Las principales ventajas que presenta el uso de subproductos son: el bajo coste, la alta disponibilidad y el beneficio medioambiental al ser productos reciclados que se incorporan nuevamente a la cadena alimenticia. Sin embargo, algunos inconvenientes son la composición química variable en comparación con la definida de los puros, que implica poca homogeneidad en el medio de cultivo; y la posible presencia de productos tóxicos o metabolitos que pueden afectar al crecimiento del microorganismo (Yáñez-Mendizábal, 2012).

2.5. El género *Bacillus* como agente de biocontrol

Existe numerosa bibliografía sobre el potencial como agentes de biocontrol de ciertas bacterias de la rizosfera que estimulan el crecimiento de la planta actuando como defensa a diversas enfermedades. Entre estas bacterias, el género *Bacillus* aparece como uno de los más efectivos, concretamente las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* (Pusey, 1989; Hao, 2011; Yáñez-Mendizábal, 2010; Calvo, 2017), frente a diversos mohos fitopatógenos infectivos desde el desarrollo de los vegetales en campo, por lo que su uso como biopesticida está muy extendido. Tanto es así, que la mitad de los productos comerciales actuales para el biocontrol basado en bacterias tienen como base dicho género bacteriano, como son: Subtilex® (*B. subtilis* MBI 600; desarrollado por BASF) registrado en EE. UU. por la EPA (Environmental Protection Agency), Serenade® Max (*B. subtilis* QST 713; AgraQuest Inc., California, USA and BASF, Ludwigshafen, Germany)

Algunas cepas de *Bacillus* spp. tienen la capacidad de producir antibióticos y enzimas, que degradan las paredes celulares de las células hifales, y volátiles antifúngicos lo que las convierte a priori en excelentes agentes de biocontrol frente a un amplio rango de fitopatógenos (Sharma, 2009). Estas características, junto con una baja toxicidad, alta biodegadabilidad, 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). En las condiciones de postcosecha,

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 otras estrechamente relacionadas como *B. amyloliquefaciens*, están siendo estudiadas y testadas en aplicaciones de post-cosecha de fruta en ensayos piloto y a nivel comercial (Casals, 2010; Yáñez-Mendizábal, 2010).

El método de acción de estas bacterias radica en diferentes puntos, como la competición por nutrientes tanto en tejido vegetal como en el suelo del cultivo, y la producción de metabolitos. El sistema de producción de metabolitos con capacidad antifúngica y antibióticos es el más estudiado por la acción limitante en el desarrollo de la invasión fúngica en los tejidos de la planta hospedadora. De entre las cepas de *Bacillus* capaces de producir antibióticos, *B. amyloliquefaciens*, segregó lipopéptidos surfactantes como surfactina, iturina A, fengicina (Mudgal, 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, 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, 2007). La valinomicina es un antibiótico secretado también por otras especies de *Bacillus* (Mudgal, 2013) capaz de incorporar cationes alcalinos y transportarlos a través de las membranas celulares alterando la permeabilidad de las membranas celulares fúngicas y bacterianas.

3. OBJETIVOS

Los ensayos desarrollados en este Trabajo Fin de Máster se enmarcan dentro de una de las líneas del grupo de investigación consolidado “Alimentos de Origen Vegetal” cuyos objetivos son la optimización de las condiciones de comercialización y conservación y el desarrollo de nuevas técnicas de descontaminación de los productos vegetales. Dentro de esta línea de trabajo es donde se enmarca el proyecto “*Biocontrol de patógenos en campo: desarrollo de sistemas de detección precoz y herramientas de lucha integrada*” concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad dentro del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad y con una duración de 3 años y medio, hasta diciembre de 2018.

Uno de los objetivos de este proyecto es desarrollar un formulado comercial basado en *Bacillus amyloliquefaciens* que integrado en las técnicas de cultivo de la vid nos permita disminuir la incidencia de la podredumbre gris por *B. cinerea*. La cepa de *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 que se empleará en este trabajo fue aislada de la superficie de melocotones y su actividad antifúngica ya ha sido establecida frente a diversos patógenos post-cosecha (Calvo et al., 2017). Sin embargo, y como se ha comentado en la introducción, el éxito de un producto comercial no está solo garantizado por una alta eficacia antifúngica del agente de biocontrol si no que viene determinado también por otros factores relacionados con su supervivencia y crecimiento en variadas condiciones ambientales o con su producción a escala industrial.

Así, en este trabajo se han establecido los siguientes objetivos parciales, todos ellos encaminados a determinar la idoneidad de la cepa BUZ-14 como agente de biocontrol:

- Caracterizar su **crecimiento a distintas temperaturas, pHs y en presencia de distintos fungicidas de síntesis.**

El crecimiento en un rango de temperaturas y pHs amplio y la tolerancia a los fungicidas son requisitos deseables para el éxito de un agente de biocontrol que va a ser empleado en la precosecha y en la post-cosecha de los productos hortofrutícolas. Las curvas de crecimiento se realizarán a distintas temperaturas (4, 10, 20, 30 y 37 °C) y pHs (3, 4, 4,5, 5 y 7). La sensibilidad de esta cepa a los principales fungicidas de síntesis se estudiará mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias

estableciéndose también las curvas de crecimiento a las dosis habitualmente empleadas en la precosecha y post-cosecha de los productos hortofrutícolas.

- Determinar la **supervivencia del microorganismo y su actividad antifúngica en frutas** conservadas en refrigeración.

Este factor es un paso previo y necesario para determinar la viabilidad de nuestro agente de biocontrol en una aplicación post-cosecha donde las condiciones de conservación suelen oscilar entre 1-4 °C.

- Establecer su **crecimiento y actividad antifúngica en medios de cultivo de bajo coste.**

Para la producción a escala industrial de los agentes de biocontrol es preciso encontrar un medio de cultivo que a la vez que permita el crecimiento de la cepa y mantenga su actividad antifúngica sea económicamente viable. Entre las fuentes de carbono y nitrógeno se evaluarán melazas, harinas de soja y maíz, vinazas y almidones; además de algunos sulfatos de magnesio y manganeso o cloruro de potasio, favorecedores de la producción de metabolitos. Se determinarán las curvas de crecimiento a distintas concentraciones y combinaciones de estos ingredientes y se verificará el mantenimiento de la actividad antifúngica *in vitro* de esta cepa frente a *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* y *M. laxa*.

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 placas de agar triptona soja (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.

Para preparar la suspensión bacteriana inicial un cultivo de 24 h en agar TSA se transfirió a 7 mL de caldo triptona soja (TSB, Oxoid) que se incubó a 30 °C durante 24 h. Esta suspensión inicial se ajustó a 40 ± 5 % de transmitancia a 700 nm con un espectofotómetro lo que corresponde a 2×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) por mL.

4.1.2. Frutas

Las frutas empleadas en esta investigación, melocotón cv Calante, se adquirieron en mercados locales.

4.1.3. Especies fúngicas y preparación de las suspensiones de esporas

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

- *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 Centro de Protección Vegetal del CITA.

Las cepas se cultivaron en agar patata dextrosa (PDA, Oxoid) suplementado con 1 % acetona en el caso de *M. fructicola* y *M. laxa* para inducir la producción de conidias (Pascual, 1990). Los inóculos fúngicos de *B. cinerea* consistieron en suspensiones acuosas de conidias preparadas a partir de cultivos en agar PDA incubados 7 días a 25 °C. *M. fructicola* y *M. laxa* fueron, sin embargo, cultivadas en melocotones o nectarinas para obtener una elevada producción de conidios. Las conidias fueron separadas del agar o de la fruta raspando la superficie con un asa de siembra estéril y arrastrando con agua destilada estéril. A continuación, esta suspensión se filtró por 4 capas de gasa para separar el micelio y se ajustó a 10^5 conidia (UFC)/mL en el caso de *B. cinerea* y a 10^4 UFC/mL para *Monilinia* spp.

4.2. Crecimiento *in vitro* de la cepa *B. amyloliquefaciens* BUZ-14

4.2.1 Influencia de la temperatura en el crecimiento de la cepa BUZ-14

El objetivo de este primer ensayo fue determinar las curvas de crecimiento de nuestro agente de biocontrol a distintas temperaturas, incluyendo aquellas que se suelen emplear en la conservación y comercialización de frutas (4, 10 y 20 °C) comparándolas con 30 y 37 °C, temperaturas de mesofilia y en principio las ideales para el crecimiento de esta cepa. El crecimiento de la cepa BUZ-14 se llevó a cabo en 50 mL de un medio de referencia utilizado por otros autores como Yáñez-Mendizábal, 2010, el medio 863 (10 g/L peptona bacteriológica (B&D and Co, Le Pont de Claix, Francia); 10 g/L extracto de levadura (Scharlau, Barcelona, España); 20 g/L glucosa (Panreac, Barcelona, España)), inoculado con 50 µL de una suspensión bacteriana con 10^8 UFC/mL, dando lugar a una población microbiana inicial de 4,3 log UFC/mL. Los matraces se incubaron a 4, 10, 20, 30 y 37 °C en agitación orbital a 150 rpm. Las curvas de crecimiento se determinaron mediante el muestreo de cultivos bacterianos cada 2 h de 0 a 24 h, y a 36, 48, 72, 96 y 120 h. y posterior siembra en placas de agar TSA mediante siembra en superficie. Una vez inoculadas, las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h para después proceder al recuento. Se dispusieron 3 matraces por tiempo y temperatura. El ensayo se repitió en tres ocasiones separadas.

4.2.2. Influencia del pH en el crecimiento de la cepa BUZ-14

Cada microorganismo posee un rango de pH dentro del cual es posible su crecimiento. Para comprobar la viabilidad celular de la cepa BUZ-14 a distintos pHs se prepararon medios de cultivo 863 con un pH inicial de 7, usado como control, y con pH ajustado a valores de 3, 4, 4,5, y 5, con un pH metro y ácido cítrico como regulador (Merck, Barcelona, España). Los medios fueron inoculados de igual manera que en el punto 4.2.1, e incubados durante 168 h a 30 °C en agitación orbital a 150 rpm, realizando recuentos bacterianos a los tiempos de 10, 24, 48 y 168 h, en agar NYDA (caldo nutritivo 8g/L, extracto de levadura 5g/L, dextrosa 10g/L, agar 20g/L) usado en trabajos de otros autores (Yáñez-Mendizábal 2010), tras una incubación a 30 °C durante 24 h. Se dispusieron 3 matraces por tiempo y temperatura. El ensayo se repitió en tres ocasiones separadas.

4.2.3. Supervivencia y actividad antifúngica de *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 en fruta almacenada en refrigeración y a temperatura ambiente

El objetivo de este ensayo fue determinar la supervivencia y la actividad antifúngica frente a la podredumbre marrón de nuestra cepa BUZ-14 en las condiciones de conservación de la fruta en post-cosecha, paso previo y necesario para determinar la viabilidad de nuestro agente de biocontrol en una aplicación real.

Los melocotones de la variedad Calante se inocularon con las suspensiones fúngicas y la cepa BUZ-14 realizando dos pequeñas heridas en caras opuestas sobre la superficie del mismo con ayuda de una punta de pipeta estéril (3 x 3 mm). Inicialmente, cada herida se inoculó con 10 µL de una suspensión de *M. fructicola* o *M. laxa* (10^4 conidia/mL) para que, dispuestas a temperatura ambiente (20 °C), se favoreciera la absorción de las conidias. Tras ello, se procedió al tratamiento paliativo mediante la adición de 10 µL (10^7 CFU/mL) de la suspensión bacteriana en cada herida antes infectada.

Un lote de melocotones se almacenó a 1 °C durante 10 días seguido de un periodo de 3 días a 20 °C. Otro lote se dispuso a 20 °C durante 4 días. Los recuentos bacterianos se realizaron el día inicial y tras 5 y 10 días de incubación a 1 °C y diariamente durante el periodo a temperatura ambiente. En el segundo lote, los recuentos se realizaron diariamente durante los 4 días de incubación. Para el recuento, la porción de fruta donde se había inoculado el agente se separó con pinzas y bisturí estériles y se colocó en bolsas

de Stomacher con agua de peptona 0,1 %. La mezcla se llevó a un Stomacher (Sewrad Laboratory, London, England) durante 120 s a 260 rpm. La suspensión resultante se diluyó y se sembró en placas de TSA, con un posterior recuento tras incubación a 30 °C durante 24 h. Para los recuentos se utilizaron tres réplicas (tres melocotones por día y temperatura ensayada con dos heridas por melocotón) y los resultados se expresaron en UFC/herida. El experimento fue repetido en 3 ocasiones separadas.

4.3. Crecimiento de la cepa BUZ-14 en presencia de pesticidas comúnmente empleados en el cultivo

El uso de pesticidas en precosecha está destinado a eliminar organismos como mohos, bacterias fitopatógenas, parásitos, ácaros e insectos. El objetivo de este ensayo fue determinar la concentración de fungicida a la que nuestra cepa BUZ-14 podría ver inhibido su crecimiento y así establecer cuando sería viable su empleo en los cultivos en una posible aplicación precosecha.

Los pesticidas utilizados se clasificaron según el organismo contra el que actúan (fungicida, insecticidas o acaricidas). El nombre comercial, principio/s activo/s y la dosis recomendada se recogen en la Tabla 4.1. Para determinar la interacción de la cepa BUZ-14 con los pesticidas, se estableció la concentración de estas sustancias que permite su crecimiento mediante la técnica del agar enriquecido, a partir de una concentración de referencia (dosis recomendada por el fabricante).

Para ello, distintas cantidades de fungicida se mezclaron con agar extracto de levadura y dextrosa. Tras ello, la cepa BUZ-14 se sembró por agotamiento a partir de 50 mL de un caldo de cultivo 863 incubado a 30 °C, 150 rpm durante 24 h. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h.

Tabla 4.1. Pesticidas utilizados durante el estudio, incluyendo tipo, nombre comercial, principio activo y dosis recomendada.

TIPO	NOMBRE COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO	DOSIS RECOMENDADA (g ó mL/100 mL)
Fungicidas	Arius	QUINOXIFEN 25%	0,02-0,03
	Armicarb (S)*	CARBONATO DE HIDRÓGENO DE POTASIO 85%	0,7
	Collis	BOSCALIDA 20% + KRESOXIM-METIL 10%	0,04
	Droxicuper-50 (S)*	HIDRÓXIDO CÚPRICO 50%	0,2-0,4
	Dynali	DIFENOCONAZOL 6% + CIFLUFENAMIDA 3%	0,05-0,06
	Flint (S)	TRIFLOXISTORBIN 50%	0,0125-0,015
	Karathane Star	MEPTILDINOCAP 35%	0,03-0,06
	Luna Experience	FLUOPIRAM 20% + TEBUCONAZOL 20%	0,026
	Systhane	MICLOBUTANIL 24%	0,02-0,04
	Vivando	METRAFENONA 50%	0,01-0,02
Azufre Polvo	Cepsul Especial (S)*	AZUFRE 98,5%	4,1
Insecticidas	Audace	DELTAMETRIN 2,5%	0,04
	Closar LE	CLORPIRIFOS 48%	0,18
	Runner	METOXIFENOCIDA 24%	0,04
Acaricidas	Apache	ABAMECTINA 1,8%	0,075

*(S): pesticidas en formato sólido.

4.4. Crecimiento de la cepa BUZ-14 en medios alternativos de bajo coste

La selección de un agente de biocontrol requiere que éste sea capaz de crecer convenientemente y mantener su capacidad como antagonista, tras su cultivo en medios que permitan su producción a nivel industrial y a bajo coste.

4.4.1. Formulación de los medios alternativos de bajo coste

En función de las características nutricionales típicas de los cultivos bacterianos, se diseñaron medios alternativos de bajo coste que permitieran un elevado crecimiento de nuestra cepa BUZ-14. Se plantearon diferentes combinaciones de ingredientes que aportaran macro y micronutrientes al medio, basándonos en proporciones similares a las utilizadas por otros autores (Yáñez-Mendizábal, 2012). Dichas proporciones se recogen en la Figura 4.1.

M1		M2		M3	
Ingredientes	Concentración gr/L	Ingredientes	Concentración gr/L	Ingredientes	Concentración gr/L
Vinaza	50%	Harina de soja	15	Harina de soja	15
Sacarosa	10	Melaza	10	Almidón de maíz	35
K ₂ POH ₄ ·2H ₂ O	1,3	Almidón	10	Extracto de malta	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	CaCO ₃	1	K ₂ POH ₄ ·2H ₂ O	1,3
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,08			MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
				MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,08
				CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,08

M4		M5		M6	
Ingredientes	Concentración gr/L	Ingredientes	Concentración gr/L	Ingredientes	Concentración gr/L
Vinaza	50%	Vinaza	50%	Extracto de carne	3
Melaza	20	Melaza	10	Peptona bacteriológica	5
K ₂ POH ₄ ·2H ₂ O	1,3	Sacarosa	10	KCl	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	Harina de maíz	15	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,08	Agua	50%	Ca(NO ₃) ₂	1ml
Aqua	50%			MnCl ₂	1ml
				SO ₄ Fe-H ₂ O	1ml

Figura 4.1.: Proporciones de los ingredientes, en g/L o en mL/L, de cada uno de los medios. Los porcentajes hacen referencia a un volumen final de 1 L independientemente del aporte del resto de ingredientes.

Como fuente de carbono se utilizaron melazas, harina de maíz, sacarosa y extracto de malta. Como fuente de nitrógeno, se usaron extracto de carne, peptona bacteriológica y harina de soja integral, todos ellos adquiridos en supermercados locales, excepto la peptona, obtenida de la casa comercial DIFCO.

Existen medios enriquecidos con micronutrientes a bajas concentraciones (Pretorius, 2015), que favorecen el desarrollo de diferentes cepas de *Bacillus*. En la preparación de nuestros medios, los micronutrientes añadidos en formato sólido fueron fosfato de potasio (K₂POH₄), sulfato de magnesio (MgSO₄), sulfato de manganeso (MnSO₄), carbonato de calcio (CaCO₃), cloruro cálcico (CaCl₂), cloruro de potasio (KCl) (Panreac, Barcelona, España). Para la elaboración del medio 6, algunos de los micronutrientes debían añadirse en formato líquido, por lo que se realizaron respectivas diluciones de 1M para el nitrato de calcio (Ca (NO₃)₂), 0,1M para el cloruro de manganeso (MnCl₂) y 0,001M para el sulfato de hierro (FeSO₄) (VWR PROLABO, Geldenaaksebaan, Bélgica). Una vez preparadas, se añadió 1 mL de cada dilución al matraz correspondiente al medio 6.

Con el propósito de incluir en los medios de bajo coste algún elemento que abarate su producción, además de para contribuir al aprovechamiento de subproductos derivados de la industria alimentaria, se incluyó en la formulación un subproducto derivado de la vinificación, las vinazas, que fue proporcionado por Bodegas San Valero (Cariñena, España). Este subproducto se obtiene de los restos sólidos depositados tras la fermentación al separar el vino de los hollejos (restos de pepitas, pellejos) y es rico en materia orgánica y utilizado en alimentación animal, recuperación de suelos, obtención de energía y como medio de cultivo tras suplementación con urea y sacarosa (García y Rojas, 2006).

Las proporciones de ingredientes indicadas en la Figura 4.1., se ajustaron a un volumen de 100 mL y se dispusieron en matraces de 250 mL. Una vez elaborados, se ajustó el pH con una solución 10 N de hidróxido sódico (Panreac, Barcelona, España), hasta alcanzar valores de 7-7,2. El medio 6 no necesitó ajuste de pH, ya que tras su preparación presentó este valor. Tras el ajuste de pH, fueron autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

4.4.2. Curvas de crecimiento

Cada matraz se inoculó con 100 µL de una suspensión de *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 incubada en 50 mL de medio 863 durante 24 h en agitación orbital a 150 r.p.m., con una población microbiana de 9,1 log UFC/mL. Una vez inoculados, los medios alternativos se incubaron a 30 °C durante 72 horas en agitación orbital a 150 rpm. Para determinar el desarrollo celular de cada medio, se realizarán recuentos bacterianos a las 0, 16, 18, 20, 22 y 24, 48 y 72 horas, mediante diluciones seriadas y posterior siembra en superficie en placas de TSA. El crecimiento en cada uno de los medios se comparó con un control, en medio 863, incubado en las mismas condiciones.

4.4.3. Actividad antifúngica de la cepa BUZ-14 tras el crecimiento en medios de bajo coste

Para determinar la capacidad de la cepa BUZ-14 para inhibir el crecimiento de *B. cinerea*, *M. fructicola* y *M. laxa* tras su crecimiento en medios alternativos, se realizaron diferentes ensayos con células vegetativas, endosporos y sobrenadante libre de células. Los ensayos de inhibición realizados durante el estudio con diferentes medios de bajo coste se resumen en la Figura 4.2 al final de este epígrafe.

4.4.3.1. Obtención de las suspensiones de células vegetativas, endosporos y sobrenadante libre de células

Tras el análisis de los resultados del capítulo anterior, la cepa BUZ-14 fue inoculada en 100 mL de los medios que habían permitido un mayor crecimiento bacteriano (M2, M3 y M6), dispuestos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Tras su inoculación, se incubaron durante 24, 48 y 72 horas a 30°C en agitación orbital. El medio control (medio 863) se incubó en las mismas condiciones.

En cada tiempo de incubación, 50 mL del contenido de cada Erlenmeyer se separó en dos tubos Falcon y se centrifugó durante 15 min a 9000 g y 10°C (Beckman Coulter™). Tras separar el sobrenadante, se resuspendió el sedimento obtenido con 30 mL de agua de peptona estéril al 0,1%. De esta solución, se separaron dos alícuotas de 15 mL en dos tubos Falcon también estériles; uno de los tubos se reservó para el estudio con células vegetativas, mientras que el otro tubo se sometió a un tratamiento térmico a 80 °C durante 12 min para eliminar las células vegetativas y obtener así una suspensión con solamente de endosporos. El sobrenadante reservado se autoclavó a 121°C durante 15 min.

4.4.3.2. Determinación de la actividad antifúngica

Una vez obtenidas las distintas soluciones (células vegetativas, endosporos y sobrenadantes) se procedió a la determinación de su actividad frente a *B. cinerea*, *M. fructicola* y *M. laxa*.

Células vegetativas:

B. cinerea se inoculó mediante pinchazo en el centro de las placas de PDA a partir de una solución de esporas (10^5 esporas/mL). Para *M. fructicola* y *M. laxa* el inóculo fúngico consistió en un botón (6 x 6 mm) de crecimiento fúngico en agar PDA extraído con bisturí y pinzas estériles que se depositó también en el centro de la placa. A partir de la solución con células vegetativas, ajustada a 10^8 CFU/mL, se tomó con un asa de siembra una gota de la solución bacteriana, que se depositó sobre el agar en 3 puntos equidistantes y a 2 cm del centro de la placa.

Endosporos:

Se realizaron tres pocillos de 6 x 6 mm, equidistantes entre sí y a 2 cm del centro de la placa, mediante bisturí estéril. Se depositaron en cada pocillo 30 μ L de la suspensión de endosporos. Al igual que en el caso anterior se inocularon las esporas de *B. cinerea* mediante siembra por picadura en el centro de la placa y para *M. laxa* y *M. fructicola* se depositó el botón fúngico también en el centro de la placa.

Sobrenadantes:

Se realizaron tres pocillos de 6x6 mm, equidistantes entre sí y a 2 cm del centro de la placa, mediante bisturí estéril. En cada pocillo se depositó una alícuota de 30 μ L de los sobrenadantes estériles. Al igual que en el caso anterior se inocularon las esporas de *B. cinerea* mediante siembra por picadura en el centro de la placa y para *M. laxa* y *M. fructicola* se depositó el botón fúngico también en el centro de la placa.

4.4.3.3. 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 muestra control, que consistieron en placas de PDA con siembras de los respectivos mohos sin inoculo de BUZ-14, incubadas a 25 °C durante 5 días. 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.

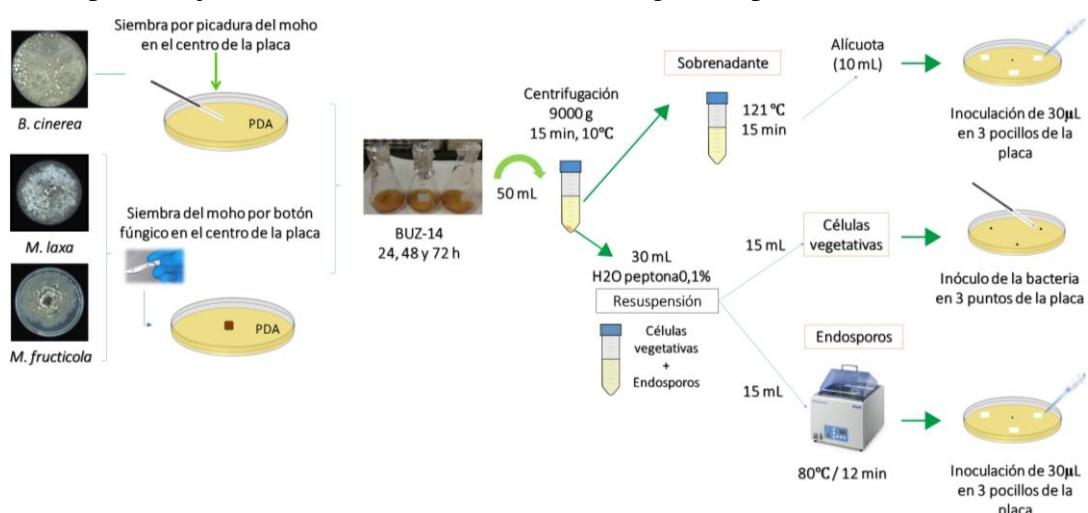


Figura 4.2.: Esquema de los ensayos de inhibición realizados durante el estudio con diferentes medios de bajo coste. En la figura se representa el medio 863 utilizado como control.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Crecimiento *in vitro* de *B. amyloliquefaciens* cepa BUZ-14: influencia de la temperatura y el pH del medio

La caracterización del crecimiento de la cepa BUZ-14 a diferentes temperaturas y valores de pH, es necesaria para determinar su viabilidad en las condiciones intrínsecamente ácidas del fruto y a las temperaturas empleadas durante el almacenamiento en post-cosecha, la distribución y posterior comercialización.

5.1.1 Influencia de la temperatura

Las curvas de crecimiento a temperaturas de refrigeración de 4 y 10 °C muestran que ambas no promueven el crecimiento de la cepa BUZ-14 (Figura 5.1), ya que los recuentos indican un decrecimiento de 0,8 unidades logarítmicas (u. log) entre la concentración inicial y la final. A 20 °C, el crecimiento del *Bacillus* presenta una fase exponencial de 48 h, alcanzando un máximo similar al obtenido en la temperatura de referencia (30 °C) de 9,2 log UFC/mL. Estos datos indican que existe supervivencia y viabilidad celular a temperaturas inferiores a la óptima, aunque su crecimiento se produzca de manera mucho más lenta. A 37 °C presentó una fase exponencial con un gran desarrollo celular que se estabilizó a las 10 h, momento a partir del cual el cultivo celular reduce la velocidad de crecimiento hasta alcanzar un máximo de 9,1 log UFC/mL a las 20 h. El momento de máxima concentración microbiana a 30°C, se produjo a las 18 h, presentando un recuento cercano a 9,3 log UFC/mL (Figura 5.1), la máxima obtenida para cualquier temperatura de incubación. Durante la fase de meseta la población microbiana se mantiene constante en todas las temperaturas hasta el final del estudio, lo que parece indicar una supervivencia elevada en largos períodos de tiempo en condiciones de nutrientes no renovados y elevada carga microbiana.

5.1.2 Influencia del pH

Cada microorganismo posee un rango de pH dentro del cual es posible su crecimiento y la mayoría de las bacterias no pueden desarrollarse a pHs inferiores a 4,5-5 (Tortora, 2007). Como demostraron Jacques, (1999), el pH óptimo para el crecimiento de distintas cepas de *Bacillus subtilis* es de 7.

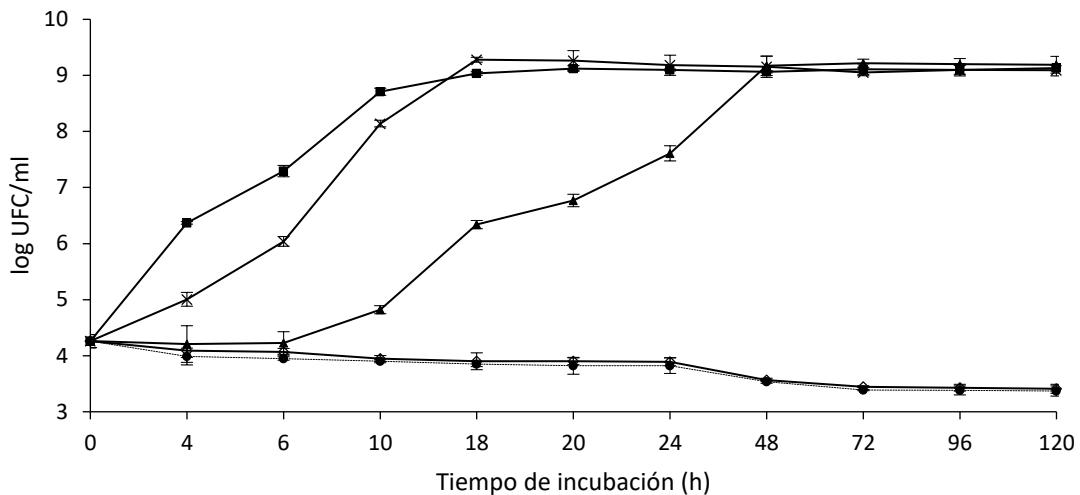


Figura 5.1: Curvas de crecimiento de la cepa BUZ-14 en medio 863 a temperaturas de 4 °C (●), 10 °C (◊), 20 °C (▲), 30 °C (×) y 37 °C (■), durante 120 horas.

La concentración inicial de BUZ-14 para este ensayo fue de 4,8 log UFC/mL. El crecimiento a pH 7, usado como control, muestra un aumento de la población de 4,8 a 9,0 log UFC/mL en las primeras 24 h, mientras que a pH 5 la concentración máxima fue la misma tras 48 h de incubación, después de una fase de latencia de 24 h (Figura 5.2). Tanto a pH 5 como a pH control, existe una clara supervivencia y vialidad celular. A valores de pH más bajos (3, 4, y 4,5), los recuentos disminuyeron en torno a 2 u. log en tan sólo 12 h de incubación, tiempo a partir del cual se produjo una estabilización del desarrollo celular resultando en una reducción de la concentración celular de 1 u. log, alcanzando recuentos tras 168 h de 2,4 log UFC/mL, 2,1 log UFC/mL y 2 log UFC/mL para valores de pH de 3, 4 y 4,5 respectivamente.

En nuestro caso es evidente que un pH inferior a 5 tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de BUZ-14, disminuyendo las poblaciones iniciales en casi 3 unidades logarítmicas a pesar de la supervivencia celular.

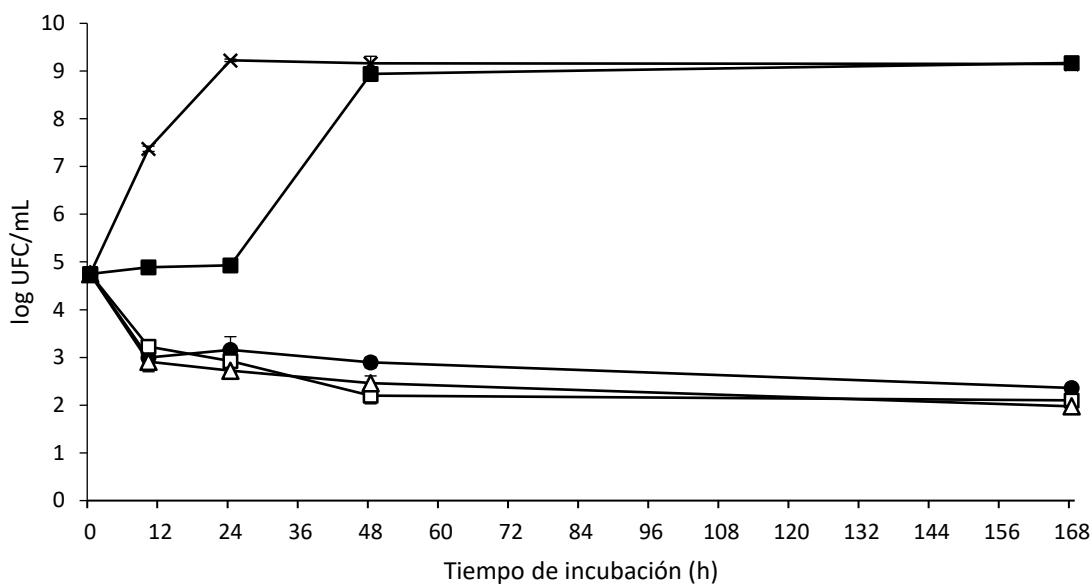


Figura 5.2: Crecimiento in vitro de la cepa BUZ-14 en medio 863 a 30 °C y valores de pH 3 (●), 4 (□), 4,5 (△), 5 (■) y 7 (×), durante 168 horas.

5.2. Supervivencia de *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 en fruta almacenada en refrigeración y a temperatura ambiente

Dado que las frutas a la hora de ser comercializadas suelen estar almacenadas en refrigeración (1-10 °C), el agente de biocontrol debe ser capaz de crecer en este rango de temperaturas o, al menos, no disminuir significativamente su número de células viables. De este modo, se estableció la capacidad de BUZ-14 de crecer en frutas conservadas a bajas temperaturas (1 °C) y compararlo con un almacenamiento a temperatura ambiente.

Las poblaciones bacterianas en melocotones (pH 5,1) a 20 °C se caracterizaron por tener una fase de latencia de 24 horas, seguida de un incremento constante de las células desde 5,1 log UFC/herida hasta 8,2 log UFC/herida tras 48 h y en adelante (Figura 5.3) lo que indica una buena supervivencia y crecimiento en estos frutos.

Tras 10 días de incubación a 1 °C y 80% HR, la población disminuyó desde 5,1 hasta 4,5 log UFC/herida. Cuando los frutos se dispusieron a temperatura ambiente, las células recuperaron el crecimiento hasta alcanzar 6,5 log UFC/herida tras 72 h de incubación (Figura 5.3). Comparado con la concentración inicial (5,1 log UFC/herida),

las poblaciones disminuyeron 0,7 u. log tras 10 días a 10 °C. Estos datos coinciden con los obtenidos *in vitro* anteriormente a 4°C, donde el decrecimiento fue de 0,8 u. log.

Los melocotones inoculados con *Monilinia* spp. pero no con el agente de biocontrol mostraron una incidencia de podredumbre marrón del 100%. Sin embargo, en ninguno de los melocotones inoculados con BUZ-14 y *Monilinia* spp. se detectaron signos de podredumbre, lo que confirma que BUZ-14 mantiene su actividad antifúngica tras un almacenamiento en refrigeración, y que las concentraciones alcanzadas a la salida de la conservación en frío y tras 3 días a temperatura ambiente son suficientes para frenar el crecimiento de este patógeno.

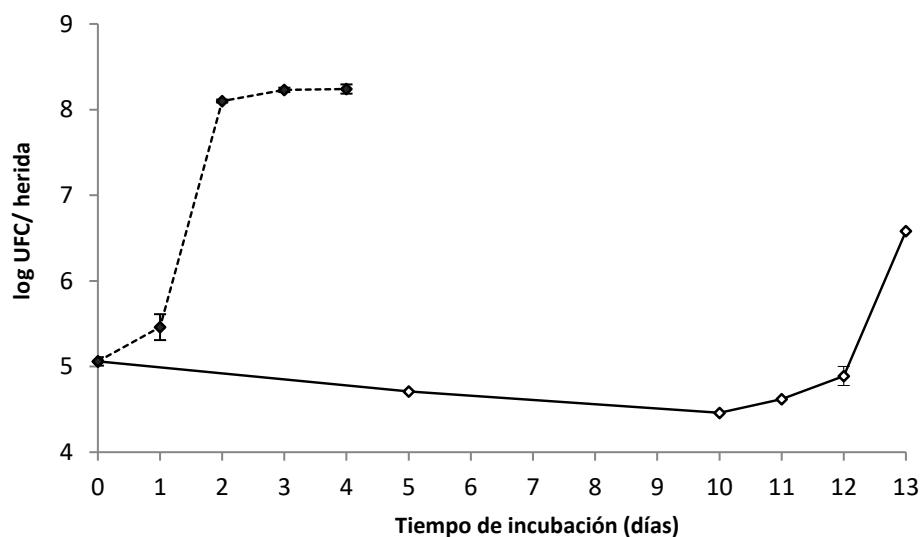


Figura 5.3: Crecimiento de *B. amyloliquefaciens* en melocotón durante 4 días a temperatura ambiente (20 °C) (♦) y 10 días a 4 °C más 3 días a 20 °C (◊).

5.3. Crecimiento de la cepa BUZ-14 en presencia de pesticidas

Aunque poco estudiado, el uso de pesticidas químicos en combinación con agentes de biocontrol puede resultar interesante de cara a la teoría de múltiples barreras como lucha frente a la acción de diferentes mohos fitopatógenos en precosecha. Así, en vista de una posible aplicación conjunta, se determinó, a qué concentración diversos pesticidas permiten el crecimiento de la cepa BUZ-14.

Los resultados recogidos en la Tabla 5.1 indican que, en más de la mitad de los casos, existe crecimiento bacteriano tanto a las dosis recomendadas para uso en

precosecha como al doble de la misma. Así, los productos Arius, Dynali, Flint, Vivando, Cepsul Especial, Audace, Runner y Apache no interferirían con el crecimiento de nuestra cepa. En el caso de otros pesticidas, para alcanzar la concentración máxima que permitiese el crecimiento tuvimos que diluir el producto desde la dosis de referencia. Así, el producto Collis permite el crecimiento cuando la dosis de referencia se diluye a la mitad, Luna Experience y Systhane cuando diluimos 4 veces y cuando lo hacemos 8 para el producto Closar. Otros productos como Armicarb, Droxicuper-50 y Karathane Star precisaron ser diluidos 10 e incluso 20 veces, concentraciones del 90% e incluso del 95% inferiores a las de referencia de uso en campo, para permitir el crecimiento de la cepa BUZ-14. De aquellos que presentan menor concentración máxima que permite el crecimiento de nuestra bacteria, la mayoría corresponden al grupo de los fungicidas, y poseen métodos de acción que afectan a estructuras celulares o mecanismos comunes entre los microorganismos. Así, Droxicuper 50 está diseñado para tener acción bactericida, y se define como “fungicida-bactericida polivalente” según el fabricante; por otro lado, el producto Armicab posee un método de acción triple colapsando esporas y deshidratando hifas, además de bloquear procesos enzimáticos (destrucción de hidrolasas). El método de acción de Karathane Star actúa directamente en la cadena de electrones y alterando los procesos de obtención de ATP.

Tabla 5.1: Nombre comercial, concentración mínima inhibitoria en g o mL de producto/mL de diluyente matriz, y dilución realizada a partir de la dosis de referencia de los pesticidas.

PESTICIDAS COMERCIALES	Concentración inhibitoria (g-mL/100 mL)	DILUCIÓN DE LA DOSIS REFERENCIA
Arius	0,025 (mL)	x2
Dynali	0,055 (mL)	x2
Flint	0,0137 (g)	x2
Vivando	0,0154 (mL)	x2
Cepsul Especial	4,1 (g)	x2
Audace	0,04 (mL)	x2
Runner	0,04 (mL)	x2
Apache	0,075 (mL)	x2
Collis	0,04 (mL)	/2
Luna Experience	0,026 (mL)	/4
Systhane	0,03 (mL)	/4
Closar LE	0,18 (mL)	/8
Armicarb	0,7 (g)	/10
Droxicuper-50	0,03 (g)	/10
Karathane Star	0,045(mL)	/20

5.4. Crecimiento de la cepa BUZ-14 en medios alternativos de bajo coste

5.4.1. Medios alternativos de bajo coste

Con el objetivo de determinar el crecimiento de *B. amyloliquefaciens* cepa BUZ-14 en medios alternativos de bajo coste, se comparó el crecimiento en diferentes medios formulados con melaza, sacarosa, extracto de malta, harina de maíz y de soja, peptona y extracto de levadura, con el obtenido en el medio de laboratorio 863. Los resultados de la Figura 5.4 muestran que, a pesar de ajustar el pH a niveles óptimos de 7, los medios con vinaza (Medios 1, 4 y 5) anulan el crecimiento bacteriano, mientras que las curvas en los medios libres de este subproducto vinícola (Medios 2, 3 y 6) presentan un crecimiento similar al observado en el medio control.

Entre los medios con vinaza, podemos observar unos recuentos finales tras 24 h de incubación ligeramente mayores en el medio 1 ($M_1=5,7 \log \text{UFC/mL}$) que en los medios 4 ($M_4=3,7 \log \text{UFC/mL}$) y 5 ($M_5=3,8 \log \text{UFC/mL}$). La diferencia entre M_1 (con sacarosa como fuente de hidratos de carbono) y los otros dos medios, es la presencia de melaza en M_4 y M_5 , que parece poseer un cierto efecto inhibitorio del desarrollo bacteriano a partir de cierta concentración (10 g/L). Además, M_1 posee micronutrientes que favorecen el desarrollo celular que en el caso de M_4 no surgieron efecto probablemente debido al efecto inhibitorio de las melazas. Este efecto no es tan notable en M_5 ya que la concentración de melazas era menor. Otro factor común entre estos medios es la falta de un ingrediente como fuente de nitrógeno. Únicamente M_5 posee un ingrediente, harina de maíz, cuyo aporte no fue suficiente para aumentar el crecimiento bacteriano. Como demuestran Yáñez-Mendizábal, (2012), la presencia de melazas a partir de cierta concentración limita el crecimiento del género *Bacillus* incluso en presencia de fuentes de nitrógeno. Sin embargo, este ingrediente a bajas concentraciones y en combinación con harina de soja permite crecimientos elevados (9 log UFC/mL), hecho observado en el medio M2.

Todos los medios libres de vinazas permitieron un notable crecimiento alcanzando elevadas concentraciones bacterianas, siendo el medio M2 aquel que, presentando melazas entre sus ingredientes y careciendo de micronutrientes, posee los recuentos más bajos (8,8 log UFC/mL). Los medios libres de melazas y con micronutrientes presentan,

tras 24 h de incubación, los mayores recuentos ($M3=9,3 \log \text{UFC/mL}$ y $M6=9,5 \log \text{UFC/mL}$), siendo M6 el que mayor población bacteriana presentó incluso superando ligeramente al medio control.

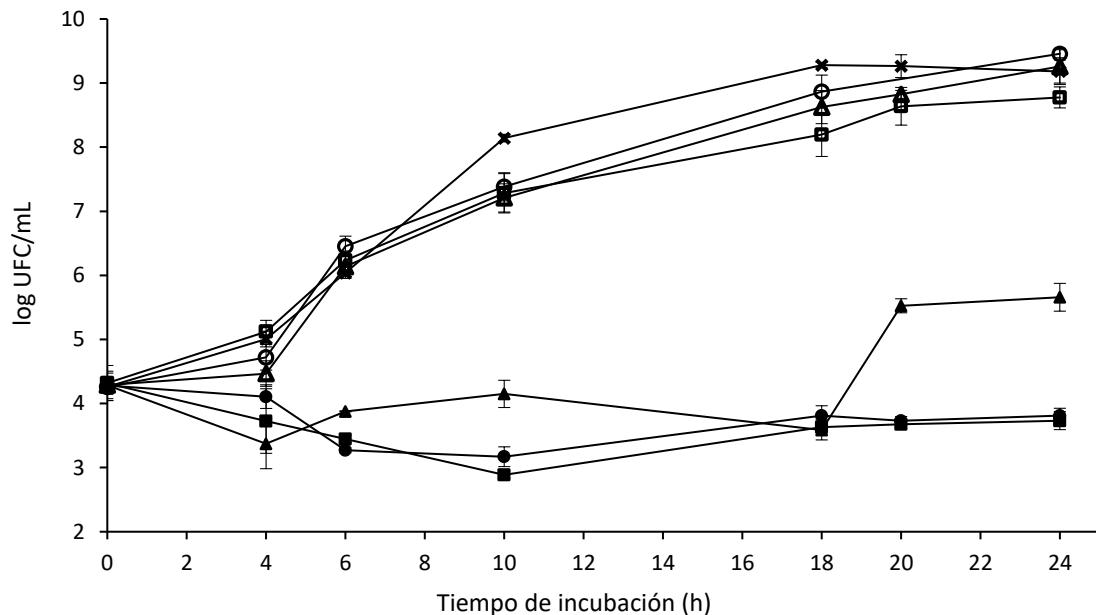


Figura 5.4: Crecimiento de la cepa BUZ-14, a 30 °C en medios alternativos: Medio 1 (▲), Medio 2 (□), Medio 3 (Δ), Medio 4 (■), Medio 5 (●), Medio 6 (○), y control: 863 (×), durante 24 horas. Los marcadores oscuros muestran los medios sin adición de vinaza.

5.4.3. Actividad antifúngica de la cepa BUZ-14 tras el crecimiento en medios de bajo coste

Tras esta primera aproximación se seleccionaron los medios M2, M3 y M6 para continuar el estudio del crecimiento de nuestra cepa y el mantenimiento de su actividad antifúngica.

En los medios M2, con harina de soja y melaza a baja concentración, M3 con micronutrientes y harina de soja, y M6 con numerosas fuentes de nitrógeno y micronutrientes, se realizaron estudios de crecimiento celular durante 96 h, para un posterior estudio de los mecanismos de acción desarrollados en los medios seleccionados.

Como podemos observar en la Figura 5.5, las concentraciones máximas de *B. amyloliquefaciens* tras 24 horas fueron muy similares entre sí y respecto al medio control, siendo M2 el que menores recuentos presentó con un máximo de 8,8 log UFC/mL. En M3, la máxima concentración se obtuvo a las 20 h, ofreciendo un

recuento máximo de 9,2 log UFC/mL a las 24 h. El máximo desarrollo celular, con una concentración de 9,4 log UFC/mL tras 24 h de incubación, corresponde a M6. El medio control presenta su tasa máxima a las 20 h con 9,3 log UFC/mL. Una vez alcanzada la fase de meseta, los tres medios alternativos sufren una ligera reducción en sus recuentos en las siguientes 72 horas de estudio, quedando una concentración final a las 96 h de 8,4 log UFC/mL para M2, 9 log UFC/mL para el M3, y 8,9 log UFC/mL para el M6. Sin embargo, en el medio de referencia los recuentos se mantienen constantes en 9,1 log UFC/mL. A pesar de esta reducción, las concentraciones finales de los medios alternativos permanecen próximas a la de referencia con una unidad logarítmica como máxima diferencia. Basándonos en los resultados obtenidos, podemos afirmar que estos medios favorecen el desarrollo del *Bacillus*, así como la supervivencia celular a lo largo de varios días de incubación en condiciones óptimas.

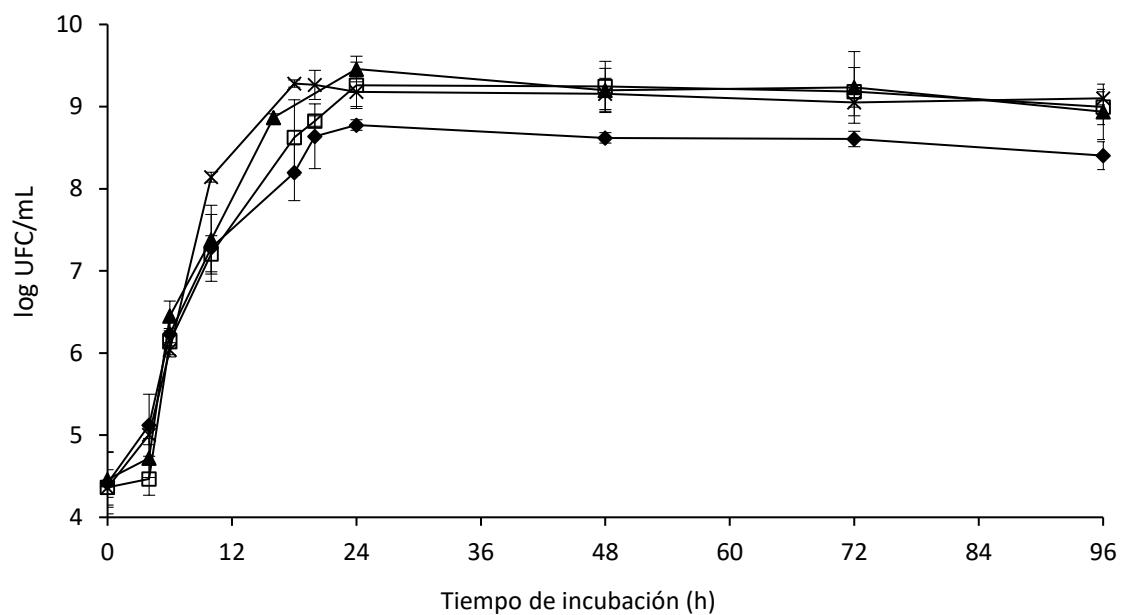


Figura 5.5: Crecimiento de la cepa BUZ-14, a 30 °C en medios alternativos: Medio 2 (♦), Medio 3 (□), Medio 6 (▲), y control: 863 (×), durante 96 horas.

En base a la elevada población microbiana que se alcanza en los medios alternativos M2, M3 y M6 durante tiempos de incubación prolongados, y sumado al interés en la utilización de medios de bajo coste, la cepa BUZ-14 debe someterse a estudios complementarios tras crecer en estos medios para asegurar su viabilidad como agente de biocontrol. Para ello, se realizaron estudios de actividad antifúngica de células vegetativas, endosporos y sobrenadantes libres de células, incubados en cada uno de los

medios alternativos M2, M3, M6 y caldo control 863, durante 72 h a 30 °C y agitación orbital a 150 rpm, frente a *B. cinerea*, *M. laxa* y *M. fructicola*.

Como podemos observar en la Figura 5.6 (A, B y C), la acción antifúngica de las células vegetativas frente a todos los mohos se reduce con el tiempo de incubación, salvo para el medio 2, que, sin presentar inhibiciones a las 24 h, mostró la mayor inhibición de entre todos los medios a las 72 h frente a *B. cinerea* y *M. fructicola*, con reducciones del crecimiento del 30 y el 28 % respectivamente. Aunque también disminuyó con el tiempo de incubación, la actividad de las células vegetativas incubadas en el caldo control fue superior, en todos los casos, a la de cualquier otro medio. Estos resultados pueden deberse a la destrucción de las células vegetativas a lo largo del tiempo de incubación, ya que la falta de nutrientes, produce la muerte celular dejando lugar a las formas de resistencia características del género *Bacillus*, los endosporos (Monteiro, 2005).

La formación de endosporos y su posterior viabilidad es una de las características a destacar de un agente de biocontrol como muestra de su capacidad para soportar condiciones ambientales extremas. En el caso de *B. cinerea*, la acción antifúngica de los endosporos es mayor a las 24 h horas de incubación para M3 y M6 con un 26% y un 14% de inhibición respectivamente (Figura 5.6 A), mientras que en M2 no se observa reducción del crecimiento respecto al control. A las 72 h, los tres medios presentan un 13% de inhibición, inferior al 65% que obtenemos del medio control. Frente a *M. laxa*, la actividad de los endosporos es mayor en las últimas horas de incubación. El medio 863 presentó la máxima inhibición a las 72 h con un 81%, seguido de M2 con un 27% al mismo tiempo de incubación. Este incremento de la actividad con el tiempo también ocurre en M3 y M6, con inhibiciones del 0 y 8% respectivamente a las 24 h, alcanzando niveles de inhibición en torno al 20% en ambos medios a las 72 h, tanto para *M. laxa* como para *M. fructicola* (Figura 5.6 B y C). El medio M2 es, de entre los medios alternativos, el que mayor inhibición presenta frente a *M. fructicola* con un 28% a las 72 h, duplicando su acción desde las 24h. Al igual que en M2, los medios M3 y M6 duplican su capacidad de inhibición a las 72 h alcanzando niveles del 20 y 17% respectivamente. Este incremento de la actividad de esporulación se observa en el medio de referencia, que presenta inhibiciones de casi cuatro veces más a 72 h que a 24 h, alcanzando un 70 % de inhibición fúngica. Estos resultados pueden confirmar la mayor capacidad de esporulación de la cepa BUZ-14 al incrementar el tiempo de incubación,

explicando así las mayores inhibiciones observadas a las 72 h, sobretodo en el medio 863 (Monteiro, 2005).

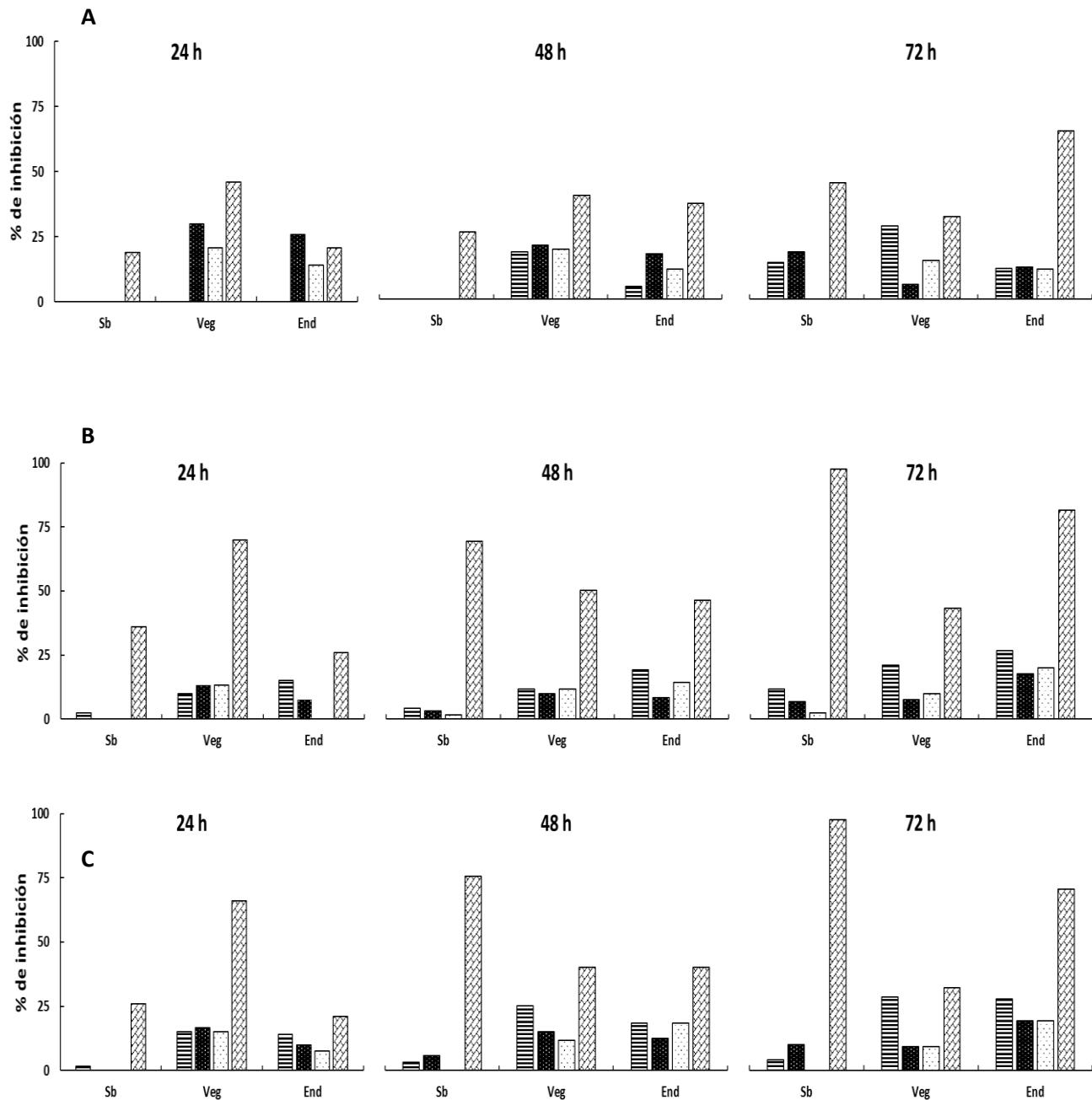


Figura 5.6: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* (A), *M. laxa* (B) y *M. fructicola* (C), frente sobrenadantes libres de células (Sb), células vegetativas (Veg) y endosporos (End), de *B. amyloliquefaciens* tras 72 h de incubación in vitro en los medios alternativos M2 (█), M3 (▨), M6 (□), y medio control 863 (▨).

Uno de los mecanismos de acción de *B. amyloliquefaciens* se debe a la generación de metabolitos secundarios (Chen, 2009; Arguelles-Arias, 2009; Chowdhury, 2015) que se excretan al medio. A pesar de ello, en este estudio, se ha observado como el sobrenadante de M6 no presentó inhibición frente a ningún moho a ninguno de los tiempos de incubación. Las reducciones conseguidas por los metabolitos de M3 a las 72 h frente a *B. cinerea* fueron del 18%, e inferiores al 10% frente a *M. laxa* y *M. fructicola*. Las reducciones máximas que presentan los metabolitos del medio M2 las encontramos frente a *B. cinerea* (14%), seguidas de una reducción del desarrollo fúngico del 12% frente a *M. laxa*, y casi nulas frente a *M. fructicola* (4%).

En ninguno de los medios alternativos se observa una actividad antifúngica similar al medio control. Sin embargo, Yáñez-Mendizabal, 2012 si que observaron efectos antifúngicos tras utilizar medios de bajo coste similares a los del presente estudio, con algunas variaciones de concentración y mezclas en la formulación. Por ello, podemos afirmar que los medios alternativos testados, con una complejidad mayor en sus formulados que el 863, no permitieron que nuestra cepa mostrase su actividad antifúngica máxima. Se debe seguir trabajando en la optimización de estos medios para conseguir no solo un crecimiento bacteriano óptimo, sino además mantener su actividad como agente de biocontrol.

6. CONCLUSIONES

- 1- Los ensayos *in vitro* demuestran la gran capacidad de la cepa BUZ-14 para crecer a temperaturas de 30 y 37 °C alcanzando su máximo crecimiento en tan solo 16 h de incubación. Además, se confirma su supervivencia durante periodos de incubación de 120 horas a temperaturas de refrigeración (desde 4 hasta 10 °C). Los pHs más próximos a la neutralidad favorecen su crecimiento, aunque por debajo de 5 hasta incluso 3 permiten su supervivencia.
- 2- La cepa BUZ-14 es capaz de sobrevivir en melocotones a temperaturas de refrigeración manteniendo su actividad antifúngica frente a *Monilinia* spp. Esto hace que ni la temperatura ni el pH sean un factor limitante de cara al uso como agente de biocontrol en la post-cosecha de frutas.
- 3- En su gran mayoría, los pesticidas químicos permiten el desarrollo celular de la cepa BUZ-14 incluso a dosis superiores a las de referencia. Sin embargo, aquellos pertenecientes a los antifúngicos, requieren de concentraciones inferiores a las de referencia para que puedan ser combinados con este agente de biocontrol.
- 4- Los medios alternativos que incluyen vinaza en su formulación no permiten el crecimiento de la cepa BUZ-14, incluso en presencia de fosfatos y carbonatos, potenciadores del crecimiento de *Bacillus* spp. Los medios con melaza que no poseen una fuente rica en nitrógeno no muestran crecimiento bacteriano. Por otro lado, fuentes de nitrógeno como harina de soja, extractos de carne o peptonas, combinadas con algunos micronutrientes e incluso con melazas a baja concentración, son la mejor combinación para su desarrollo celular.
- 5- La actividad antifúngica de BUZ-14 en los medios alternativos frente a las especies fúngicas ensayadas, *M. fructicola*, *M. laxa* y *B. cinerea*, fue mucho menor que la detectada en el medio de referencia 863 por lo que estos medios no podrían ser empleados para la producción del agente de biocontrol a escala industrial.

7. BIBLIOGRAFIA

- 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. *Microbial Cell Factories*, 8, pp. 63.
- 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.
- Baker, K. F., 1987. Evaluating concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25, pp. 67-85.
- Benbow, J., Sugar, D., 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Disease*, 83, pp. 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, pp. 51-63.
- Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Borrius, R., 2009. More than anticipated production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology*, 16, pp. 14-24.
- 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, pp. 63-75.
- Droby S., Wisniewski M. E., Macarisinb D., Wilson C. L., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biology and Technology*, 52, pp. 137-145.
- Droby S., Wisniewski M. E., Teixidó N., Spadaro D., M. Haissam Jijakli, 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, pp. 22-29.

- Eckert, J., Ogawa, J., 1988. The chemical control of postharvest diseases: deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. Annual Review of Phytopathology, 26, pp. 433-469.
- Feliziani, E., Smilanick, J.L., Lichter, A., Ippolito, A., 2016. Disinfecting agents to controlling fruit and vegetable diseases after harvest. Postharvest Biology and Technology, 122, pp. 53-69.
- García, O., C. Rojas, C., 2006. Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de Acuerdo con su Modo de Acción en los Suelos. Técnicaña, 17, pp. 3-13.
- Gobierno de Aragón, Servicio de planificación y análisis, Departamento de Agricultura y Alimentación, 2009. Consultado en:
http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/docs/Areas/Estadisticas_agrarias/Estudios/sector-vitivinicola2.pdf
- 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 Biology and Technology, 59, pp. 316-323.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Paw, E., Thonart, P., 1999. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. Applied Biochemistry and Bioengineering, 77, pp. 223-233.
- Janisiewicz, W., Jeffers, S., 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. Crop Protection, 16, pp. 629-633.
- Johnson, K.B., Smith, T.J., Temple, T.N., Gutierrez, E., Elkins, R.B., Castagnoli, S.P., 2016. Integration of acibenzolar-S-methyl with antibiotics for protection of pear and apple from fire blight caused by *Erwinia amylovora*. Crop Protection, 88, pp. 149-154.
- Kim, P., Chung, K., 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. FEMS Microbiology Letters, 234, pp. 177-183.
- Leistner, I., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. International Journal of Food Microbiology, 55, pp. 181-186.

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/produccionesagricolas/tablawebspffhtcm7-318715.pdf>; <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/produccionesagricolas/frutas-y-hortalizas/#para0>.

Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente: Resumen nacional del rendimiento, producción y destino de la uva. Consultado en: http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2007/AE_2007_16_02.pdf
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*. Biotechnology Progress, 21, pp. 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: EN-518, pp. 149.

Nelson, K.E., 1985. Harvesting and handling California table grapes for market. University of California Division. Agriculture and Natural Resources, Bulletin. 1913.

Northover, J., Cerkauskas, R., 1994. Detection and significance of symptomless latent infections of *Monilinia fructicola* in plums. Canadian Journal of Plant Pathology, 16, pp. 30-36.

Pascual, S., De Cal, A., Melgarejo, P., 1990. Induction of conidia production by *Monilinia laxa* on agar media by acetone. Phytopathology, 80, pp. 494-496.

Peynaud, E., Ribereau-Gauyot, P., 1976. The Grape. The biochemistry of fruit and their products. Academic Press, pp.172-206.

Pretorius D., van Rooyen J., Clarke, K.G., 2015. Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. New Biotechnology, 32, Number 2.

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

Pusey, P., 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. Pesticide Science, 27, pp. 133-140.

- 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, pp. 969-976.
- Santos, M., Diánez, F., de Cara, M., Tello, J.C., 2008. Possibilities of the use of vinasses in the control of fungi phytopathogens. *Bioresource Technology*, 99, Issue 18, pp. 9040-9043.
- Sharma, R.R., Dinesh Singh, D., Singh, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50, pp. 205-221
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., 1995. Media for Industrial Fermentations. In: *Principles of Fermentation Technology* (Second Edition), pp. 93-122.
- Terry, L.A., Crisosto, C. H., Forney, C.F., 2009. Modified and controlled atmospheres for the storage, transportation, and packaging of horticultural commodities. *Small Fruit and Berries*, pp. 363-396.
- Tesfagiorgis, B., Korsten, L., 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control*, 37, pp. 68-74
- Tortora G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2007. *Mycrobiology*, an introducction. IX edición, pp. 931.
- Tronsmo, A., Dennis, C., 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journey of Plant Pathology*, 83, pp. 449-455.
- Usalla, J., Ippolitob, A., Sisquellaa, M., Neric F., 2016. Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 122, 30-40.
- Vela, M., Wilson, C.L., Pusey, P.L., 1985. Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Disease*, 69, pp. 375-378.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M. E., 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*, 27, pp. 425-41.
- Wisniewski, E. M., Wilson, C. L., 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience*, 27, pp. 94-98.

Wisniewskia, M., Drobyb, S., Norellia, J., Liuc, J., Schenad, L., 2016. Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. Postharvest Biology and Technology, 122, pp. 3-10.

Yáñez-Mendizábal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Solsona, C., Teixidó, N., 2010. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. Biological Control, 21, pp. 409-426.

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. Biological Control, 60, pp. 280-289.

AGRADECIMIENTOS

A Domingo por abrirme la puerta a este mundillo, a Uge por su infinita paciencia, a Rosa Oria por empezar todo tiempo atrás, a Gimi por la compañía en las tardes duras, a Pedrito por existir, y a Hector, por todo, amigo.

Gracias por ayudarme a seguir hacia delante, enseñándome.

A mis padres, por llevarme tan lejos como quiera.

A mis amigos, porque la vida no es solo de uno si no de quien nos elige.