



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

INDICE

0. RESUMEN	1
0. ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Importancia de la producción de frutas en España y pérdidas postcosecha	3
1.2. Alternativas a los pesticidas.....	5
1.3. El género <i>Bacillus</i> como agente de biocontrol	10
1.4. <i>B. amyloliquefaciens</i> como nueva fuente de compuestos antifúngicos	12
1.4.1 Los lipopéptidos	12
1.4.2. Otras sustancias	14
2. OBJETIVOS Y DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1. Microorganismos utilizados.....	18
3.2. Medios de cultivo.....	18
3.3. Curvas de crecimiento en los distintos medios de cultivo y en fruta.....	19
3.4. Extracción, cuantificación e identificación de lipopéptidos	20
3.5. Actividad antifúngica de la fracción lipopeptídica	23
3.5.1 Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	23
3.5.2. Actividad antifúngica <i>in vivo</i>	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. Evaluación del crecimiento microbiano de BUZ-14 en los distintos medios de cultivo y en fruta	25
4.2. Identificación y cuantificación de lipopéptidos	27
4.2.1 <i>In vitro</i>	27
4.2.2 <i>In vivo</i>	31
4.3. Estudio antifúngico	32
4.3.1. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> mediante difusión en agar	32
4.3.2 Capa fina (TLC) y bioautografía	34
4.3.3. Actividad antifúngica <i>in vivo</i>	36
5. CONCLUSIONES.....	37
6. BIBLIOGRAFÍA	39

0. RESUMEN

El control biológico se ha revelado como una alternativa prometedora a los fungicidas de síntesis química para el control de enfermedades postcosecha. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar el crecimiento y la actividad antifúngica de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 en medios de cultivo de bajo coste (M2 y M3) formulados a partir de ingredientes (harina de soja o melazas) alternativos a las fuentes habituales de C y N de los medios de referencia 863, MOLP y Landy (glucosa, sacarosa, peptonas y extractos de levadura). Se han identificado y cuantificado las principales familias de lipopéptidos producidas por BUZ-14 (iturinas, fengicinas y surfactinas) y se ha evaluado su poder antifúngico frente a *Monilinia fructicola* y *Botrytis cinerea* tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* en cereza, uva, y melocotón. La cepa BUZ-14 ha sido capaz de crecer en todos los medios estudiados *in vitro*, sin embargo, la producción de lipopéptidos y actividad antifúngica mostrada en los medios M2 y M3 ha sido significativamente baja en comparación con las de los otros medios. La iturina A ha sido identificada como la principal responsable de la inhibición de *M. fructicola* y *B. cinerea* en los ensayos *in vitro*, aunque su baja concentración en los medios M2 (353,57 ppm) y M3 (205,51) en comparación con 863 (960,53) o MOLP (1.547,57) mostraron el limitado poder antifúngico de la cepa crecida en estos medios. En los ensayos *in vivo*, BUZ-14 solo fue capaz de crecer y producir lipopéptidos en los melocotones, frutos con un pH mayor (pH>4,8), logrando controlar la podredumbre marrón causada por *M. fructicola* a pesar de las bajas concentraciones de metabolitos (iturina A 28,98 ppm, fengicina 86.65 y surfactina 800,52). Aun así, el mecanismo de acción de esta cepa en frutos no ha quedado demostrada y serán necesarias más investigaciones para determinar la existencia de sinergias con otros metabolitos.

0. ABSTRACT

The biological control is being a promising alternative to pesticides to control postharvest diseases. Therefore, the objective of this work has been to study the antifungal activity and growth of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 in low-cost culture media (M2 and M3) formulated with alternative ingredients (such as soy flour or molasses) to usual C and N sources from the reference media 863, MOLP and Landy (glucose, sucrose, peptone or yeast extract). The main families of lipopeptides produced by BUZ-14 have been identified and quantified (iturin A, fengycines and surfactins) as well as their antifungal activity against *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea* both *in vitro* and *in vivo* (cherries, grapes and peaches). The strain BUZ-14 has been able to grow *in vitro* in all the culture media studied. However, the production of lipopeptides and antifungal activity shown in M2 and M3 media has been significantly low in comparison to that in reference media. Iturin A has been identified as the responsible of *M. fructicola* and *B. cinerea* inhibition *in vitro*, although its low concentration in M2 (353.57 ppm) and M3 (205.51) in comparison to 863 (960.53) or MOLP (1547.57) showed the limited antifungal activity of the strain grown in these alternative culture media. In the *in vivo* trials, BUZ-14 was only able to grow and to produce lipopeptides in peaches, fruits with higher pH (>4.8), achieving the control of the brown rot caused by *M. fructicola* despite the low lipopeptides concentration obtained (iturin A 28.98 ppm, fengycin 86.65 ppm and surfactin 800.52 ppm). Even so, the mechanism of action of this strain has not been demonstrated *in vivo*, so more studies would be needed to determine the existence of synergies with other metabolites.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de la producción de frutas en España y pérdidas postcosecha

La producción española de frutas y hortalizas se sitúa en torno a los 24,2 millones de toneladas (media 2008 – 2012) (Figura 1) de las que el 54% corresponde a hortalizas, el 24% a cítricos, el 11% a frutales no cítricos, el 9% a patata y el 2% a frutos de cáscara (MAGRAMA, 2013). El valor de la producción hortofrutícola supone 13.200 millones de euros (MAPAMA, 2016), lo que le sitúa como el sector más importante en el conjunto del sector agrario.

La superficie dedicada en España al cultivo de frutas y hortalizas es de unas 1.571.000 hectáreas (media 2008-2010), de las cuáles 650.000 hectáreas son de frutos de cáscara. De las restantes 921.000 hectáreas, el 38% corresponde a hortalizas, el 34% a cítricos y el 28% a frutales no cítricos. La evolución general de las superficies es a la baja en hortalizas y patata y a la estabilidad en frutas y frutos de cáscara (MAGRAMA, 2013).

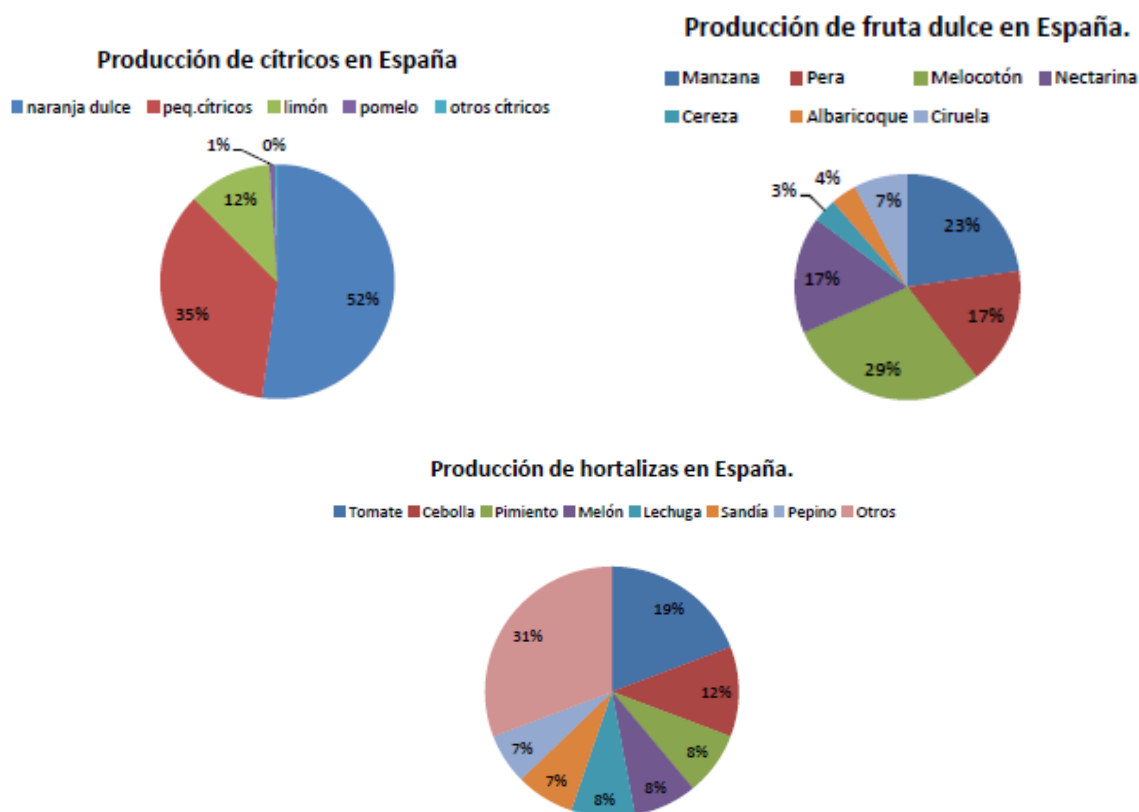


Figura 1. Producción media de cítricos, fruta dulce y hortalizas en España (2008-2012) (MAGRAMA)

España es el primer exportador de frutas y hortalizas de la Unión Europea y uno de los tres primeros exportadores mundiales junto con China y EE.UU. El 50% de la producción

se destina a la exportación, siendo además el primer subsector dentro del conjunto de las exportaciones del sector agroalimentario (MAPAMA, 2016). En 2014, las exportaciones se elevaron a 13,1 millones de toneladas, cifra récord hasta la fecha.

Los principales productos que España exporta al exterior son las hortalizas de invernadero (tomate, pimiento y pepino fundamentalmente), los cítricos, el melocotón y la nectarina. El 92% de las exportaciones tienen como destino el mercado de la Unión Europea (Alemania, Francia, Reino Unido y Países Bajos principalmente), si bien en el año 2014 se exportaron frutas y hortalizas a 39 países diferentes. Como se puede ver, se trata de un subsector de primer orden dentro del sistema agrario y de vital importancia para la economía española. Por ello, es crucial para los productores minimizar las pérdidas postcosecha en frutas y hortalizas.

Según un estudio encargado por la FAO al “Swedish Institute for Food and Biotechnology (SIK)” en 2012, tras la cosecha de éstas se pierde entre un 30% y un 40% de la producción mundial (Figura 2). Estas pérdidas pueden ser producidas por agentes bióticos (hongos, bacterias, virus, insectos), por un manejo inadecuado del vegetal que provoque cambios en el metabolismo de los tejidos, o debidas a daños mecánicos, daños por frío, etc. Los patógenos postcosecha son fundamentalmente mohos, siendo los más habituales *Aspergillus*, *Penicillium* spp, *Monilinia* spp, *Alternaria* spp, *Fusarium* spp, *Botrytis cinerea*, etc.

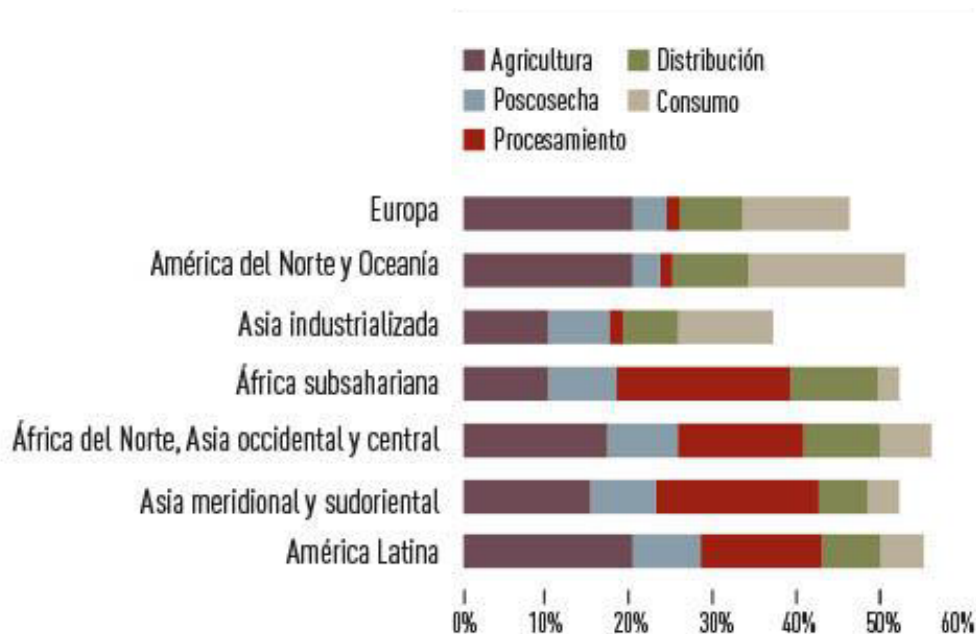


Figura 2. Pérdidas de frutas y hortalizas en el mundo (FAO, 2012)

Aunque desde hace décadas se están mejorando los sistemas para minimizar estas pérdidas, todavía se puede hacer mucho más en este campo. El desarrollo de pesticidas y fungicidas de síntesis química y de tecnologías de almacenamiento mejoradas (fundamentadas sobre todo en un buen mantenimiento de la cadena de frío y en el uso de atmósferas modificadas) en los últimos 50 años ha conseguido reducir el crecimiento de patógenos, ampliando la vida útil de la fruta después de la cosecha. Sin embargo, el uso de fungicidas post-cosecha se ha ido reduciendo por varios motivos: desarrollo de resistencias de los patógenos a muchos fungicidas usados habitualmente, falta de fungicidas de reemplazo o la conciencia social de que los pesticidas son dañinos para la salud y el medio ambiente. Este hecho, en gran medida contrastado por numerosos estudios, ha provocado que se legisle en este sentido y, por ello, se restrinja el empleo de estos productos. Así, el nuevo Reglamento (UE) 2015/408 ya propone una lista de sustitución de sustancias químicas actualmente usadas en la agricultura tradicional y por tanto se hace necesario el desarrollo de métodos alternativos que sean capaces de luchar contra las enfermedades post-cosecha con, al menos, la misma efectividad.

1.2. Alternativas a los pesticidas

Como alternativas a los pesticidas, podemos encontrar diversos métodos de control que podemos clasificar en físicos, químicos y biológicos (biocontrol).

Métodos físicos

La aplicación de agua o mezclas hidroalcohólicas a temperaturas moderadas (45-50 °C) hace posible la inhibición del crecimiento fúngico de géneros como *Monilinia* o *Rhizopus* en melocotones o nectarinas (Margosan *et al.*, 1997). El calentamiento por radiofrecuencia también se ha mostrado efectivo en el control de la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. en melocotón (Casals *et al.*, 2010), aunque dicha efectividad depende del tamaño del fruto tratado y puede mejorar con la inmersión en agua a 20 °C (Sisquella *et al.*, 2013). La aplicación de microondas también ha sido estudiada observándose una inhibición de *M. fructicola* en melocotones tratados con 20 kW durante 60 s, sin afectar a los parámetros de calidad (firmeza, acidez, sólidos solubles...), principal problema con el que se suelen encontrar estas técnicas (Sisquella *et al.*, 2014). El tratamiento con bajas presiones (0-100 kPa) durante cortos periodos de tiempo (2-24 h) en cámaras de almacenamiento se ha mostrado efectivo contra *R. stolonifer* y *B.*

cinerea en cerezas, fresas y uvas (Oro *et al.*, 2014), al igual que el tratamiento con presiones ligeramente superiores a la atmosférica (152 kPa) durante periodos cortos (4-24 h) ha reducido la incidencia de las enfermedades post-cosecha en cerezas y uvas durante su almacenamiento (Romanazzi y Murolo, 2008). Desde hace unos 40 años también se viene estudiando el potencial de la radiación UV-C en dosis subletales (Luckey, 1982), para inhibir el crecimiento fúngico y la senescencia en post-cosecha de productos hortofrutícolas (Yang *et al.*, 2014). La utilización de atmósferas controladas (CA) en las cámaras frigoríficas de almacenamiento es otra alternativa que puede ayudar a reducir la incidencia de las infecciones post-cosecha, pero se necesitan concentraciones inferiores al 1% de O₂ para que se inhiba el crecimiento fúngico (Shellie *et al.*, 2001).

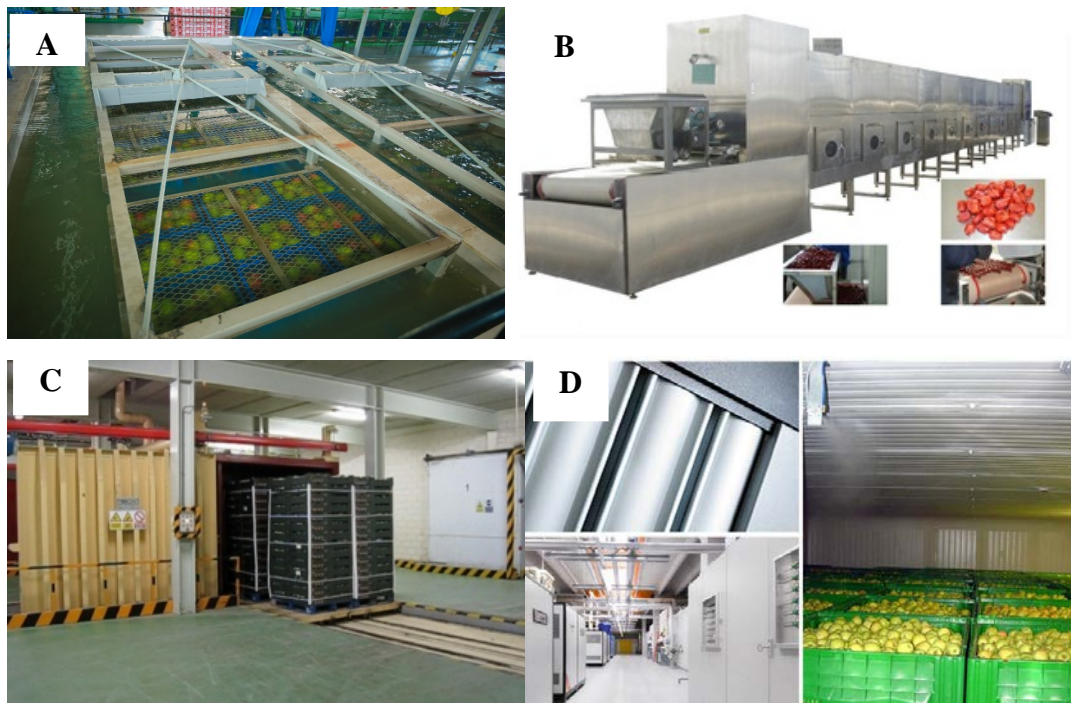


Figura 3. Métodos físicos de control postcosecha: control hidrotérmico (A), microondas (B), bajas presiones (C) y atmósferas controladas (D).

Métodos químicos

La búsqueda de compuestos químicos de origen natural que sustituyan a los de origen sintético, cada vez más rechazados por la sociedad, ha llevado a estudiar los aceites esenciales como agentes antimicrobianos. Estos aceites son metabolitos secundarios, mezclas de componentes (terpenos, terpenoides, aldehídos y alcoholes) mayoritariamente volátiles (Laird y Phillips, 2012) producidos en pequeñas cantidades por muchas especies de plantas como mecanismo químico de defensa frente a microorganismos e insectos

fitopatógenos. Se les denomina aceites porque los componentes responsables de la actividad antimicrobiana se encuentran habitualmente en la fase orgánica tras su extracción. En 2005, la FDA declaró un porcentaje considerable de estos compuestos GRAS (Generally Recognized As Safe), por lo que su estudio cobró especial importancia (Espina *et al.*, 2011).

En una primera generación de estudios, se utilizaban los extractos vegetales sin separar sus componentes. Sin embargo, gracias a técnicas cromatográficas, se han conseguido identificar los componentes que tienen actividad antimicrobiana. Entre las fuentes de obtención de los aceites esenciales se encuentran cítricos (aceites de naranja, limón y mandarina) (Espina *et al.*, 2011); hierbas como ajedrea (*Satureja montana*), menta (*Mentha villosa*), orégano (*Origanum vulgare*) o tomillo (*Thymus vulgaris*) y especias como la canela o el orégano. Los componentes de estos aceites con mayor actividad antimicrobiana pertenecen a la familia de los fenoles, destacando entre ellos el timol, el carvacrol (en tomillo y orégano) y el eugenol (clavo). También son de importancia los aldehídos como el citral (cítricos) o el cinamaldehído (canela). Caccioni y Guizzardi (1994) consiguieron inhibiciones de *B. cinerea*, *M. laxa*, *M. piriformis*, *P. digitatum*, *P. expansum* y *R. stolonifer* en post-cosecha con diferentes aceites esenciales, mostrándose el carvacrol como el compuesto con más actividad a una concentración de 125 ppm.

Sin embargo, a pesar de los años de estudio de este tipo de compuestos, las aplicaciones finales todavía no han alcanzado un óptimo de eficacia frente a infecciones fúngicas en frutas y hortalizas. Su producción a gran escala y la complejidad de extracción de estos compuestos hacen que su uso todavía no esté ampliamente distribuido, aunque se espera que en unos años sea una alternativa natural a los químicos.

Control biológico

El control biológico puede definirse como el descenso del inóculo de un patógeno microbiano o la remisión de la enfermedad causada por el mismo mediante el uso de uno o más microorganismos (normalmente, levaduras, bacterias y mohos) (Baker *et al.*, 1987). En los últimos 30 años, el control biológico se ha convertido en una estrategia efectiva para combatir el decaimiento post-cosecha en frutas. Así lo demuestran numerosas investigaciones realizadas en este campo tanto por equipos científicos multidisciplinares como por empresas del sector agroalimentario y multinacionales del sector químico que se dedican a producir compuestos fitosanitarios (Droby *et al.*, 2016). Esta alternativa parece que está cobrando cada vez más importancia entre las empresas químicas y

farmacéuticas, y ya hay productos registrados como fitosanitarios que se pueden consultar en el MAPAMA. Además, muchos productos se venden como biofortificantes y bioestimulantes ya que la legislación todavía no admite ciertas cepas microbianas para su uso como fitosanitarios.

Muchas especies de bacterias son capaces de inhibir el crecimiento fúngico. Por ejemplo, distintas cepas de *Bacillus subtilis* son antagonistas de la podredumbre marrón en frutos como el melocotón, el albaricoque, la nectarina, la ciruela o la cereza o de la podredumbre agria de los cítricos (Wilson y Wisniewski, 1994). Su mecanismo como agentes de biocontrol puede deberse a la colonización de las vías de infección, para, a continuación, competir por los nutrientes que de otra manera alimentarían al patógeno, la secreción de compuestos con actividad antifúngica, el parasitismo directo del patógeno o la inducción de respuestas de resistencia en el organismo hospedador (fruto) (Chalutz y Droby, 1998). También son excelentes agentes de control biológico las levaduras, debido a que poseen una elevada adaptabilidad a condiciones ambientales adversas (sobreviven en un amplio rango de temperaturas o de humedad relativa, bajos niveles de oxígeno, fluctuaciones de pH o a la radiación UV) y a las características presentes en las heridas de las frutas en los que se aplican habitualmente (elevadas concentraciones de azúcares, elevada presión osmótica o bajo pH). Además, son capaces de crecer rápidamente en medios de cultivo baratos, no producen esporas que pudieran ser alérgenos o micotoxinas y sus requisitos nutricionales son muy básicos (Droby *et al.*, 2016).

Cuando se afrontan investigaciones para desarrollar nuevos productos de biocontrol, hay que tener siempre en cuenta los posibles obstáculos que puedan encontrar en su futura comercialización. En especial, ya que se trata de productos que se aplicarán sobre alimentos, se debe vigilar su posible toxicidad para el ser humano y/o los animales.

Las características deseables en un agente de biocontrol aplicado a enfermedades post-cosecha (Wilson y Wisniewski, 1989) se muestran a continuación:

- a) genéticamente estable;
- b) eficaz a bajas concentraciones;
- c) no exigente en sus requerimientos de nutrientes;
- d) capaz de sobrevivir bien en condiciones ambientales adversas (incluidos los entornos de almacenamiento);
- e) eficaz contra una amplia gama de patógenos en una variedad de frutas y vegetales;
- f) susceptible de crecimiento en un medio barato en fermentadores;
- g) su presentación comercial debe ser tal que pueda almacenarse y dispensarse fácilmente;

- h) no debe producir metabolitos secundarios nocivos para el hombre o los animales;
- i) resistente a los pesticidas;
- j) compatible con otros productos químicos y resistente a la manipulación durante su transporte y almacenamiento
- k) no patógeno contra el hospedador sobre el que es aplicado

Entre los productos comerciales de primera generación, se registraron y comercializaron: *Candida oleophila* (Aspire, Ecogen, Langhorne, PA, EE.UU.), *Cryptococcus albidus* (YieldPlus®, Lallemy, Montreal, Canadá), *Candida sake* (Candifruit®, IRTA, Lleida, España) y *Pseudomonas syringae* Van Hall (BioSave®, JET Harvest, Longwood, FL, EE.UU.) (Figura 4). Aspire®, Yieldplus® y Candifruit® se dejaron de comercializar por su baja rentabilidad económica. Biosave®, sin embargo, se sigue utilizando en EE.UU. *Bacillus subtilis* (Avogreen®, Universidad de Pretoria, Pretoria, Sudáfrica) se utilizó por primera vez de forma comercial para el control de las manchas de la *Cercospora* en el aguacate pero no siempre con resultados satisfactorios, por lo que tampoco tuvo el éxito esperado (Demoz y Korsten, 2006). Más recientemente, se aprobó el registro de *C. oleophila*, (Nexy®, Leasafre, Lille, Francia) en la UE (2013) (Massart *et al.*, 2015). Se ha probado su potencial antimicrobiano contra patógenos post-cosecha en frutas de pepita, cítricos y plátanos (Lahlali *et al.*, 2011). Otros ejemplos son *Aureobasidium pullulans* (BoniProtect, Bio-Ferm, Tulln, Austria) para fruta de pepita (Lima *et al.*, 2015), *Pantoea agglomerans* CPA-2, (Pantovital, Domca, Granada, España) para pepita y cítricos (Cañamás *et al.*, 2008) aunque todavía no se ha comercializado o *Metschnikowia fructicola* (Shemer®, Bayer, Leverkusen, Alemania) registrado en Israel para su uso en múltiples productos hortofrutícolas (albaricoque, melocotón, cítricos, uva, fresa, pimiento y batata).



Figura 4. Algunos productos de biocontrol de primera generación que se han comercializado: Aspire® (A), Candifruit® (B) y Biosave® (C)

1.3. El género *Bacillus* como agente de biocontrol

Muchas especies de rizobacterias pertenecientes al género *Bacillus* se han venido estudiando en las últimas décadas por su capacidad de producir una amplia gama de moléculas potencialmente inhibitorias de agentes fitopatógenos (Emmert y Hyelsman, 1999). Estas especies de bacterias desarrollan esporos con gran resistencia a la desecación, característica fundamental para desarrollar un biopesticida estable por atomización o técnicas que implican altas temperaturas. Además, la baja toxicidad y biodegradabilidad de este tipo de sustancias junto con la no generación de resistencias ayudan a que se hayan considerado una gran alternativa dentro del biocontrol (Kim y Chung, 2004).

Una de las primeras especies de *Bacillus* que se estudió como agente de biocontrol fue *B. thuringiensis* (Figura 5), capaz de producir una serie de endotoxinas tóxicas para distintas especies de insectos causantes de plagas, entre los que se encuentran dípteros, coleópteros, himenópteros y lepidópteros (Broderick *et al.*, 2006). También Prabakaran y Hoti (2008) demostraron que, gracias a la atomización, se podían formular preparados de endosporas de esta especie resistentes a altas temperaturas.

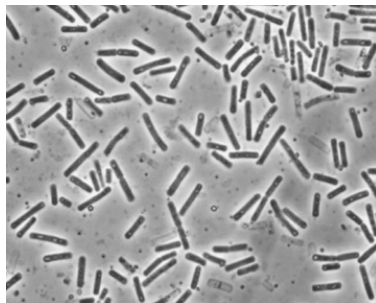


Figura 5. *Bacillus thuringiensis* visto a microscopio (x 1000)

Sin embargo, una de las especies más utilizadas y estudiadas en los últimos 5 años ha sido *B. subtilis*, ya que dedica entre un 4-5% de su genoma a sintetizar sustancias con capacidad antibiótica (Stein, 2005), entre las que destacan los lipopéptidos cíclicos (LPs), compuestos de las familias de las iturinas, surfactinas y fengicinas con aplicaciones en biotecnología y biofarmacia. La producción de iturina A parece que se circunscribe a las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* (Bonmatin *et al.*, 2003), sin embargo, tanto surfactinas como fengicinas se han aislado en éstas y en otras especies del género *Bacillus*. Existen numerosos estudios que demuestran cómo estas sustancias no sólo actúan como antagonistas de los fitopatógenos, sino cómo también estimulan la

resistencia del hospedador (Ongena y Jacques, 2008). Las surfactinas no son antifúngicas por sí mismas, pero sí lo son en sinergismo con la iturina A o fengicina. La familia de las iturinas (principalmente A y C, bacilomicina D, F, L y micosubtilina) tienen actividad antifúngica frente a un amplio rango de fitopatógenos. Las fengicinas (principalmente A y B) poseen una fuerte actividad fungitóxica, especialmente contra los hongos filamentosos (Romero *et al.*, 2007)

Las cepas de *B. amyloliquefaciens* (Figura 6) están estrechamente relacionadas con las de *B. subtilis*, como se puede colegir de algunos estudios que comparan cepas de ambas especies, como *B. amyloliquefaciens* FZB42 y *B. subtilis* 168 (Koumoutsi *et al.*, 2004). *B. amyloliquefaciens* dedica el 8,5% de su genoma a la producción de compuestos con actividad antifúngica: lipopéptidos entre los que destacan iturinas (Hsieh *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2002) fengicinas (Lin *et al.*, 1999; Ongena *et al.*, 2007) y surfactinas (Ahimou *et al.*, 2000; Hsieh *et al.*, 2004) o policétidos (macrolactina o bacilomicina entre otros) (Chen *et al.*, 2009).

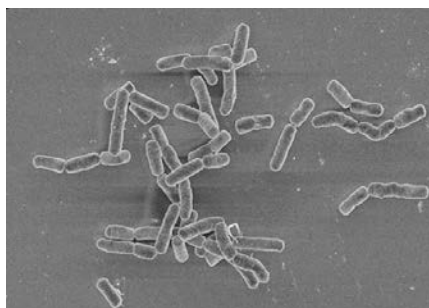


Figura 6. *Bacillus amyloliquefaciens* visto a microscopio (x 1500)

Curiosamente, *B. amyloliquefaciens* no es una especie registrada como sustancia activa de producto fitosanitario alguno en la base de datos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA), cuando sí aparecen registrados productos que contienen cepas de *B. subtilis* y *B. thuringiensis*. Sin embargo, la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) de EE.UU. ha registrado Taegro® (*B. amyloliquefaciens* FZB24), fabricado por Novozymes (Copenhague, Dinamarca) y Syngenta (Basilea, Suiza) (Lecomte *et al.*, 2016), como producto fitosanitario para frutas, cucurbitáceas y ornamentales. La EFSA ha evaluado recientemente el riesgo de este mismo producto como fungicida contra el mildiú lanoso, el tizón tardío y el moho gris. Tras un análisis exhaustivo de estudios realizados en los últimos diez años, se llega a la conclusión de que la cepa en sí no presenta riesgo para la salud en humanos pero no hay datos suficientes para asegurar que todos los metabolitos secundarios producidos por

dicha cepa se mantengan en niveles que no supongan riesgo para el consumidor tras su aplicación en las plantas. Tampoco hay datos suficientes que aseguren que la bacteria no persista en niveles mayores de los deseables en suelo o agua, tras su aplicación repetida durante años (EFSA, 2016). Por otro lado, *B. amyloliquefaciens* sí que se usa como producto bioestimulante y biofortificante, permitiendo aumentar la productividad y protección frente a plagas de distintos cultivos. A modo de ejemplo, la aplicación de las cepas FZB24 o FZB42 permitió elevar la producción de tomates en sistemas abiertos entre un 8-9% (Gül *et al.*, 2008). Actualmente, ABiTEP – Biotech for Agriculture y Ecology comercializa RhizoVital® 42, producto que contiene esporas de la cepa FZB42 de *B. amyloliquefaciens* como fortificante y bioestimulante de la producción de cultivos. También comercializa FZB24®, cepa FZB24 del mismo bacilo, con los mismos fines y estimulando la capacidad de autodefensa de la planta. Otras empresas como Bioera S.L. (comercializa Bioradis® como promotor del crecimiento de cultivos) o Trichodex (Bioclean® o Bioresist® como bioprotectores) no especifican qué microorganismos utilizan en sus preparados, pero es esperable que en alguno de ellos sean cepas de la especie *Bacillus* por su gran aptitud como se ha explicado anteriormente.

1.4. *B. amyloliquefaciens* como nueva fuente de compuestos antifúngicos

Las cepas de *B. amyloliquefaciens* son capaces de producir una serie de sustancias con un amplio rango de actividad antimicrobiana. Se ha demostrado que estos compuestos, que se agrupan en familias tales como lipopéptidos cíclicos, policétidos o volátiles orgánicos, poseen una baja toxicidad y alta biodegradabilidad, lo que los coloca como una alternativa plausible y real a los pesticidas de síntesis química contra enfermedades como la podredumbre marrón que afecta a las frutas de hueso (Calvo *et al.*, 2017).

1.4.1 Los lipopéptidos

Los lipopéptidos de todas las especies del género *Bacillus* se sintetizan gracias a las enzimas péptido sintetasa no ribosómicas (NRPS), megaenzimas que producen una gran heterogeneidad de estas moléculas en cuanto al tipo y secuencia de residuos de aminoácidos, la naturaleza de la ciclación de los péptidos y la naturaleza, longitud y ramificación de la cadena de ácidos grasos que las forman. Entre estos compuestos se encuentra la familia de las surfactinas. La estructura común de las surfactinas (Figura 7) consiste en un anillo de lactona compuesto por siete aminoácidos (ácido L-aspartico, L-

leucina, ácido glutámico, L-leucina, L-valina y dos D-leucinas), y una cadena hidrofóbica correspondiente a un β -hidroxiácido graso de 13 a 15 átomos de carbono de longitud que le permite penetrar las membranas celulares. Los residuos de ácido glutámico y ácido aspártico en las posiciones 1 y 5 respectivamente, confieren cierta polaridad a la estructura. En el lado opuesto, el residuo de valina en la posición 4 se extiende hacia abajo frente al ácido graso, dando como resultado una molécula mayoritariamente hidrófoba (Grau *et al.*, 1999). Son poderosos biosurfactantes con excepcionales propiedades emulsionantes y espumosas. Debido a su naturaleza anfifílica, las surfactinas también pueden asociarse fácilmente y anclarse firmemente en capas de lípidos y, por lo tanto, pueden interferir con la integridad de la membrana biológica en función de la concentración. Se ha comprobado que con relaciones molares surfactante/lípido mayores a 0,1, las membranas biológicas se ven afectadas irreversiblemente. Hay que destacar que la presencia de colesterol en la capa de fosfolípidos de la membrana biológica atenúa el efecto desestabilizador de las surfactinas. Este hecho podría explicar por qué las surfactinas poseen poder hemolítico, antiviral o antibacteriano y, sin embargo, no muestran una fungitoxicidad relevante (Carrillo *et al.*, 2003).

Otra familia importante de compuestos es la de las iturinas, entre las que destacan estas siete variantes: iturina A y C, bacilomicina D, F, L y LC y micosubtilina. Se trata de nuevo de compuestos con un anillo principal formado por siete aminoácidos unido a un β -aminoácido graso con una longitud de 14 a 17 átomos de carbono (Figura 7). Aunque también son fuertemente hemolíticas, la actividad biológica de las iturinas es diferente a la de las surfactinas: muestran una fuerte acción antifúngica *in vitro* contra un amplio espectro de levaduras y mohos, su poder antibacteriano es limitado y no presentan actividad antiviral (Ongena y Jacques, 2008). La fungitoxicidad de las iturinas se debe principalmente a las propiedades de permeabilización de las membranas que poseen estas sustancias (Deleu *et al.*, 1999).

La tercera familia de lipopéptidos la forman las fengicinas A y B, también llamadas plipastatinas. Estas moléculas son lipodecapéptidos (Figura 7), cuya estructura también está formada por un anillo interno de lactona y un β -hidroxiácido graso de 14 a 18 átomos de carbono. Las fengicinas son menos hemolíticas que las iturinas y las surfactinas, pero poseen una fuerte actividad fungitóxica, específicamente contra mohos. Aunque su mecanismo de acción no es tan conocido, se sabe que pueden interactuar con las capas lipídicas para, en función de la dosis administrada, permeabilizar las membranas celulares de dichos mohos. Por otro lado, numerosos estudios constatan que estos compuestos

actúan de forma sinérgica: surfactinas e iturinas, surfactinas y fengicinas e iturinas y fengicinas (Ongena y Jacques, 2008).

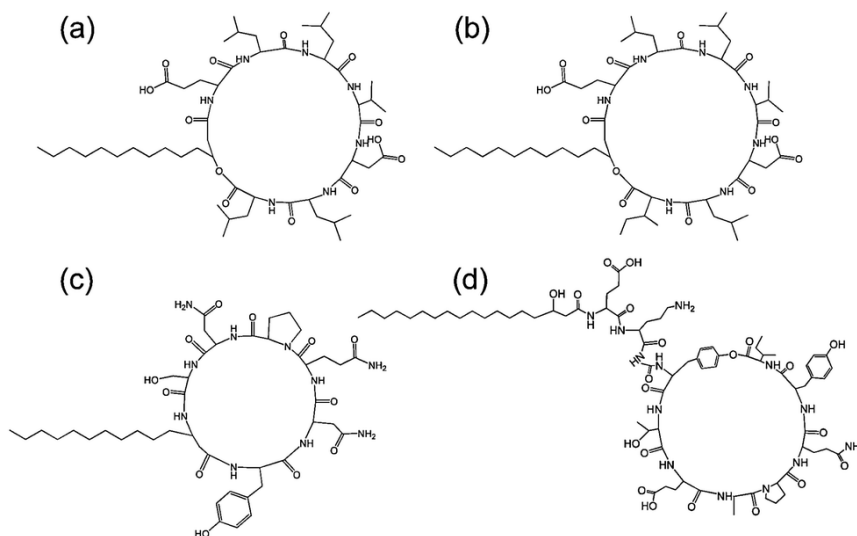


Figura 7. Estructura de algunos lipopéptidos producidos por *B. subtilis*: surfactina (a), liquenisina A (b), iturina A (c) y fengicina/plipastatina A (d). (Hamley, 2015)

1.4.2. Otras sustancias

Aunque los lipopéptidos son los compuestos más estudiados y que mayor actividad antimicrobiana han demostrado hasta ahora, hay otros metabolitos que se han estudiado o que incluso se siguen estudiando en la actualidad. La valinomicina es un péptido macrocíclico cuyas propiedades como transportador selectivo de iones K^+ facilita el movimiento de éstos a través de las membranas lipídicas (Rose y Jenkins, 2007) y actúa frente a bacterias y hongos (Mudgal *et al.*, 2013). También los sideróforos quelantes del hierro como la bacilibactina (Figura 8), una lactona trimérica cíclica, son sustancias con actividad antifúngica. En ambientes en los que la biodisponibilidad de este elemento es baja, al atrapar ese hierro, los sideróforos impiden que los hongos fitopatógenos dispongan de él (Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

Por otro lado, una parte muy importante de sustancias antimicrobianas se encuentra dentro de la familia de los policétidos, como la difcidina, la macrolactina, bacillaene y la zwittermicina. La difcidina es un éster fosfato de un anillo de lactona poliinsaturado de 22 miembros con poder antibiótico de amplio espectro que inhibe la síntesis de proteínas. En concreto, se ha mostrado efectiva contra *Erwinia amylovora*, causante del fuego bacteriano en manzanas, peras y otras rosáceas. La macrolactina, cuya estructura consiste en un anillo de lactona de 24 miembros, y bacillaene, constituida por una cadena abierta

de aminoácidos poliénica e inhibidor de proteínas en células procariotas, son agentes antimicrobianos contra patógenos humanos, aunque todavía no se ha demostrado su utilidad como agentes de biocontrol (Arguelles-Arias *et al.*, 2009). La zwittermicina-A es un policétido derivado de la serina tras sucesivas adiciones de aminomalonato, malonato e hidroximalonatos, hidrosoluble, con propiedades antibióticas (Rogers y Molinski, 2007) frente a bacterias y hongos (Mudgal *et al.*, 2013).

Además, algunos dipéptidos como la bacilisina y clorotetaína han demostrado también propiedades inhibitorias. La bacilisina (Figura 8) está formada por L-alanina (N-terminal) y L-anticapsina (C-terminal) (Walker y Abraham, 1970). Su acción antibiótica radica en la anticapsina, pues es capaz de actuar sobre las células receptoras bloqueando la glucosamina sintetasa, enzima esencial en la síntesis de la pared celular (Kenig y Abraham, 1976). La bacilisina, al igual que la difcidina, se ha demostrado efectiva como agente de biocontrol frente a *Erwinia amylovora*, causante de la enfermedad del fuego bacteriano.

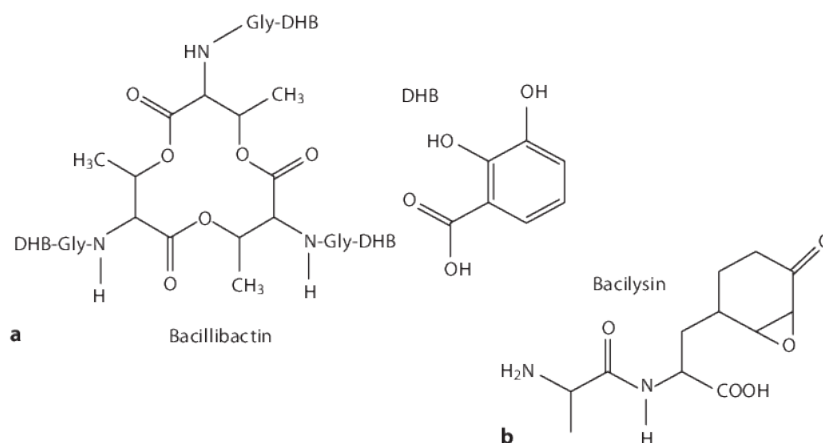


Figura 8. Estructuras de los metabolitos secundarios bacilibactina (a) y bacilisina (b) producidos por la cepa *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Chen *et al.*, 2009)

2. OBJETIVOS Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

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 nos permita disminuir la incidencia de la podredumbre gris por *B. cinerea*. Paralelamente a estos ensayos frente a *B. cinerea* se está también testando la actividad frente a *Monilinia fructicola*, principal agente causante de la podredumbre marrón en frutos de hueso. La cepa de *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 que se ha empleado 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 sino 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, el **objetivo general** de este trabajo es establecer el **crecimiento y la actividad antifúngica de la cepa BUZ14 tras su cultivo en medios 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 y almidones; además de algunos sulfatos de magnesio y manganeso o cloruro de potasio, favorecedores de la producción de metabolitos. Por ello, se han determinado las curvas de crecimiento a distintas concentraciones y combinaciones de estos ingredientes y se ha verificado el mantenimiento de la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de esta cepa frente a *B. cinerea* y *M. fructicola*. Este mantenimiento de la actividad antifúngica está

determinado en gran parte por la capacidad de la cepa para producir lipopéptidos, los metabolitos secundarios que parecen ser los principales responsables de su efecto inhibidor.

Para ello, se realizó el recuento bacteriano a distintos tiempos de incubación y en los distintos medios de cultivo. Posteriormente, en todos estos tiempos y medios se procedió a la extracción, cuantificación e identificación de los lipopéptidos producidos.

Finalmente, se realizó un ensayo *in vivo* donde se testó la cepa BUZ14 crecida en los distintos medios de cultivo en cereza, uva y melocotón. Se estudió el crecimiento de la bacteria en esas matrices alimentarias y se comprobó su eficacia antifúngica además de identificar y cuantificar los lipopéptidos producidos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos utilizados

Cepas bacterianas

Bacillus amyloliquefaciens BUZ-14 fue aislado de melocotones por el grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal de la Facultad de Veterinaria, Zaragoza, España, y secuenciado mediante PCR (Calvo *et al.*, 2017). Las soluciones bacterianas se obtuvieron mediante inoculación del criovial en medio nutritivo BHI (Brain Heart Infusion) durante 24 h (precultivo).

Mohos fitopatógenos

Todas las cepas fúngicas utilizadas en este estudio se obtuvieron de la colección del Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza (Zaragoza, España): *Botrytis cinerea* VG 1, *Monilinia fructicola* VG 104. Se incubaron en placas de Petri de agar de patata y dextrosa (PDA) (Oxoid Ltd; Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y tubos con caldo de patata y dextrosa (PDB). Las soluciones de esporas se obtuvieron mediante incubación del criovial en medio PDB (caldo patata dextrosa) (Oxoid) durante 10 días a 25 °C. La solución fue filtrada con gasa estéril para eliminar el micelio y traspasada a un tubo de ensayo. Se realizó un recuento directo a microscopio y se ajustaron a 10^4 conidios mL⁻¹ mediante dilución seriada.

3.2. Medios de cultivo

Los medios 863 (tabla 1), M2 y M3 (tablas 2 y 3), MOLP y Landy (tablas 4 y 5) se prepararon en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Los medios de laboratorio (863, MOLP y Landy) se eligieron como medios control ya que habían sido estudiados anteriormente por otros investigadores con buenos resultados. Sin embargo, se quiso hacer una comparación entre ellos para poder elegir en un futuro el más adecuado. En función de estos medios, se formularon dos nuevos medios con ingredientes más baratos y que aportaran carbono y nitrógeno como fuente de nutrientes del microorganismo, como melazas y almidones en el primer caso o harinas en el segundo. También se incluyeron ciertos minerales similares al medio MOLP para estudiar su influencia en la producción de estos antibióticos.

Tabla 1. Composición del medio de referencia 863

Componentes	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
Peptona	10
Dextrosa	20

Tabla 2. Composición del medio de bajo coste M2

Componentes	Concentración (g/L)
Harina de soja	15
Melaza	10
Almidón (sacarosa)	10
CaCO ₃	1

Tabla 3. Composición del medio de bajo coste M3

Componentes	Concentración (g/L)
Harina de soja	15
Almidón de maíz (sacarosa)	35
Extracto de malta	2
K ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1,3
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,08
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0,08

Tabla 4. Composición del caldo Landy óptimo para producción de lipopéptidos

Componentes	Concentración (g/L)
Glucosa	20
Glutamato	5
MgSO ₄	0,5
KCl	0,5
KH ₂ PO ₄	1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,15 mg/L
MnSO ₄	5 mg/L
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,16 mg/L

Tabla 5. Composición del medio MOLP (Medium Optimum Lipopeptides Production)

Componentes	Concentración (g/L)	Componentes	Concentración (mg/L)
Peptona de caseína	30	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,001
Sacarosa	20	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,005
Extracto de levadura	7	NaMoO ₄	0,004
KH ₂ PO ₄	1,9	KCl	0,002
MgSO ₄	0,45	MnSO ₄ · H ₂ O	3,6
Ácido cítrico	0,01	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,14
		H ₃ BO ₃	0,05

3.3. Curvas de crecimiento en los distintos medios de cultivo y en fruta

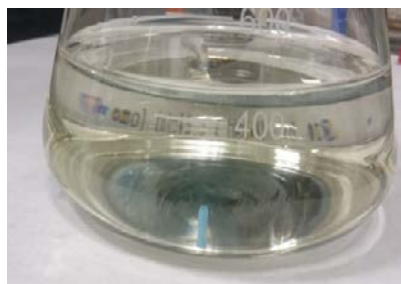
Para comprobar que los medios seleccionados eran los adecuados para el desarrollo de la cepa y por consiguiente la posible producción de metabolitos, se realizaron curvas de crecimiento. Para ello, se tomaron 100 mL de cada medio, a los que se inocularon 100 µL del precultivo que contenía 10⁹ UFC mL⁻¹ de la cepa BUZ-14 y se cultivó a 30 °C en agitación orbital durante 24, 48, 72 y 96 h. A los tiempos citados se determinó la

concentración bacteriana mediante dilución decimal y siembra en placas con agar triptona soja (TSA, Merck, Darmstadt, Alemania).

En los frutos se realizó un recuento microbiológico para comprobar el desarrollo de BUZ-14. Para ello, se realizó una herida en el caso de la uva y cereza o dos heridas (una en cada lado del fruto) para el melocotón mediante una punta estéril de micropipeta de 10-100 μL . En cada herida se inocularon 10 μL de una suspensión de BUZ-14 (10^8 UFC mL^{-1}). Los frutos se incubaron durante 5 días a 20 °C y se realizó el recuento a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. La toma de muestra se realizó con ayuda de un bisturí, con el que se separó una porción de unos 2,5 cm^2 alrededor de la herida en caso del melocotón. En el caso de las frutas pequeñas (cerezas y uvas) se tomó el fruto entero. Posteriormente se diluyó la muestra en agua de peptona 0,1 % y se llevó a un Stomacher 400 Circulator (Seward Laboratory, London, Engly). Cada muestra se trituró durante 2 minutos a 260 rpm. A partir de las diluciones correspondientes, se sembró en TSA para un posterior recuento tras 24 horas de incubación a 30 °C. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

3.4. Extracción, cuantificación e identificación de lipopéptidos

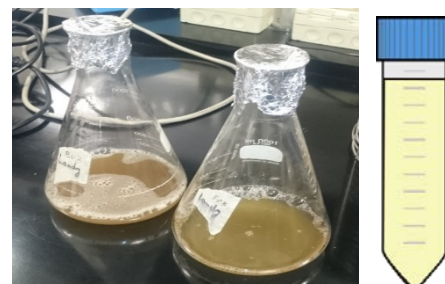
Para la **extracción** de los lipopéptidos *in vitro*, 100 mL correspondientes a cada medio de cultivo y a cada tiempo de incubación se distribuyeron en dos tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm a 15 °C (Megafuge Heraeus 1.0R, Thermo Fisher, UK). Después se separaron los sobrenadantes por decantación y se autoclavaron 15 min a 121 °C. Tras enfriarse (temperatura ambiente), se añadió n-butanol (en proporción 1:4 v/v) y se dividió en 2 tubos Falcon de 50 mL. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm a 15 °C. Se separó la fase superior (butanólica) y el resto fue desechado. De cada fracción butanólica que contenía los lipopéptidos extraídos, se obtuvieron entre 8-10 mL los cuales se llevaron a evaporación a vacío en rotavapor (Laborota 4000 Heidolph; Schwabach, Alemania) ($T^a=50$ °C, 90 rpm). Finalmente, el residuo se disolvió en agua Mili-Q en proporción 1:2 en relación al volumen obtenido previamente de fase butanólica. Si la disolución obtenida tenía turbidez, se filtraba a través de filtros de poliamida (CHROMAFIL® Xtra PA-20/25) de 0,20 μm de tamaño de poro. En la figura 9 se detalla el procedimiento seguido para la extracción de los lipopéptidos.



1. Criovial con cepa BUZ-14 inoculado en medio de cultivo



2. Cultivo a 30°C en los distintos medios en agitación orbital durante 24, 48, 72 y 96 h y traspaso a tubos Falcon.



3. Se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min (15 °C). Se recupera el sobrenadante.



4. El sobrenadante se autoclava durante 15 min a 121 °C. Se añade (T ambiente) n-butanol (1:4 v/v). Se vuelve a centrifugar durante 10 min a 4000 rpm (15 °C) y se recupera la fase superior (butanólica).



5. Los extractos butanólicos se evaporan a vacío en rotavapor (T=50 °C, 90 rpm). El residuo (lipopéptidos) se redissuelve en agua mili-Q en proporción (1:2) respecto al volumen obtenido.



6. Si presentan turbidez, se filtran mediante filtros de poliamida (0,20 µm)

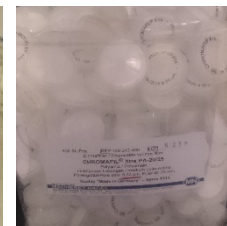


Figura 9. Esquema para la extracción de lipopéptidos en los medios 863, M2, M3, Landy y MOLP con n-butanol.

Para la extracción de los lipopéptidos procedentes de los frutos, la muestra correspondiente a la primera dilución realizada durante el recuento microbiológico se trasvasó a frascos estériles para la posterior extracción explicada anteriormente con n-butanol y su correspondiente identificación y cuantificación.

La **identificación y cuantificación** se llevó a cabo tanto en los distintos medios de cultivo y a los distintos tiempos de incubación como en las frutas de los ensayos realizados *in vivo*. Los patrones de iturina A (pureza ≥ 95 %, CAS es 52229-90-0), fengicina (≥ 90 %, CAS 102577-03-7) y surfactina (≥ 98 %, CAS 24730-31-2) comprados a Sigma Aldrich fueron inyectados en el equipo de cromatografía HPLC (Agilent-HP 110 Series) con

detector DAD acoplado (Agilent 1200 Series) (figura 10). Para elaborar la curva de calibración se utilizaron disoluciones de los patrones que contenían 20, 100, 400, 1000 y 1400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada compuesto. En todos los casos, las disoluciones se inyectaron en el cromatógrafo por triplicado y el proceso de extracción se llevó a cabo en tres días distintos. Después se inyectaron las muestras para identificar los lipopéptidos producidos por la cepa bacteriana y se compararon los tiempos de retención. Una vez identificados, se realizó una cuantificación de las distintas sustancias mediante la integración de los picos obtenidos en el HPLC y elaboración de las correspondientes curvas patrón. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

-Columna: Col. Lichrospher RP18, 5 μm 250x4mm.

-Gradiente:

- A: 100% acetonitrilo (0,1% ácido fórmico)
- B: 100% agua mili Q (0,1% ácido fórmico)
- Flujo: 1 mL min^{-1} y los gradientes de la fase móvil se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de la fase móvil para la identificación de lipopéptidos por HPLC

Tiempo (min)	%A	%B
0	35	65
8	35	65
10	40	60
25	40	60
30	80	20
45	80	20
50	100	0
60	35	65



Figura 10: HPLC-DAD Agilent-HP 110 Series utilizado para la identificación y cuantificación de lipopéptidos.

3.5. Actividad antifúngica de la fracción lipopeptídica

3.5.1 Actividad antifúngica *in vitro*

3.5.1.1. Método de difusión en agar

Para cada moho (*B. cinerea* y *M. fructicola*), cada tiempo (24, 48, 72 y 96 h) y cada medio ensayado (863, MOLP, M2, M3 y Landy) se realizaron tres pocillos en una placa de Petri con agar PDA a tres puntos equidistantes del centro de la misma mediante un sacabocados previamente esterilizado. En cada pocillo se depositaron 10 μ L de la fracción de lipopéptidos correspondiente. Mediante un asa de siembra por picadura, se inoculó el moho en el centro de la placa y se evaluaron los crecimientos tras cultivarlos durante 6 días a 25 °C. Para ello se midieron los radios de los halos de inhibición (mm), tomando como centro el punto de aplicación de los extractos lipopeptídicos.

3.5.1.2. Capa fina (TLC) y bioautografía

-Preparación de la cubeta cromatográfica: en campana se abrió la cubeta y se dispuso papel de filtro en las paredes para conseguir una mejor atmósfera tras la adición de la fase móvil (cloroformo/metanol/agua en proporción 65:24:4 v/v). Se cerró la cubeta y se esperó unos minutos, hasta que la atmósfera interior se saturó en vapor de fase móvil.

-Preparación de las capas finas (placas cromatográficas): se utilizaron capas finas de 5×10 cm (Sigma Aldrich). Mediante un lápiz y una regla, se marcó una línea a 1,5 cm del borde inferior de cada placa. En el lado menor de la placa se dejó un margen de 0,5 cm a cada lado y, sobre la línea, se marcaron los puntos en los que se inyectaron las muestras (extractos de lipopéptidos, ver punto 3.4), dejando un espacio de 1 cm aproximadamente entre marca y marca, de tal forma que se inyectaron 4 muestras (máximo) por placa. Con una jeringa limpia de 1 mL de capacidad, se inyectaron (gota a gota) 10 μ L de cada muestra, no aplicando la siguiente gota hasta que la anterior se había absorbido. Entre muestra y muestra, se lavó la jeringa en metanol y se secó. También se esperó a que se secaran las muestras inyectadas en las placas cromatográficas antes de introducirlas en la cubeta.

Se esperó a que el frente del eluyente avanzara por cada placa cromatográfica hasta 1 cm antes de llegar al límite superior de la placa (unos 20 min aproximadamente). Se sacaron las placas, se marcó la línea de cada frente con lápiz y se dejaron secar. Se visualizaron en cámara UV a 254 nm, se marcaron las manchas y se calcularon los R_f como

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la mancha (cm)}}{\text{distancia recorrida por el frente (cm)}}$$

-Bioautografías

Se siguió el procedimiento descrito en Chen *et al.* (2016). Cada porción de capa fina que contenía una muestra distinta, se colocó en una placa de Petri (90 x 90 mm) y se cubrió con agar PDA al que se había inoculado *M. fructicola* y *B. cinerea* ($1-3 \times 10^5$ conidios mL^{-1}). Las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días y se midió el Rf de la fracción de sustancias inhibidoras del crecimiento fúngico.

3.5.2. Actividad antifúngica *in vivo*

El procedimiento de inoculación en herida ha sido realizado como se ha explicado anteriormente en el epígrafe 3.3. En cada herida se inocularon 10 μL de una suspensión de BUZ-14 (10^8 UFC mL^{-1}) y por otro lado se dispuso otro lote incluyendo 10 μL de una suspensión fúngica (10^4 UFC mL^{-1}) del moho patógeno de cada fruto. Este último lote se dispuso para comprobar si el patógeno influía positiva o negativamente en la producción de estos metabolitos y para poder realizar además un estudio de incidencia de la infección. Los frutos se incubaron durante 5 días a 20 °C. Se utilizaron 5 frutos por tratamiento y el experimento se realizó 3 veces. Los resultados se expresaron en función del número de frutos infectados tras el almacenamiento (incidencia).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación del crecimiento microbiano de BUZ-14 en los distintos medios de cultivo y en fruta

La cepa BUZ-14 alcanzó su máximo recuento (9×10^9 UFC mL⁻¹) a las 24 horas en los medios 863, M2 y prácticamente en MOLP. Sin embargo, en M3 este crecimiento máximo se retrasó hasta las 48 horas, y en el medio Landy entre las 72 y 96 horas. En este último medio no se observó apenas crecimiento hasta pasadas 48 horas.

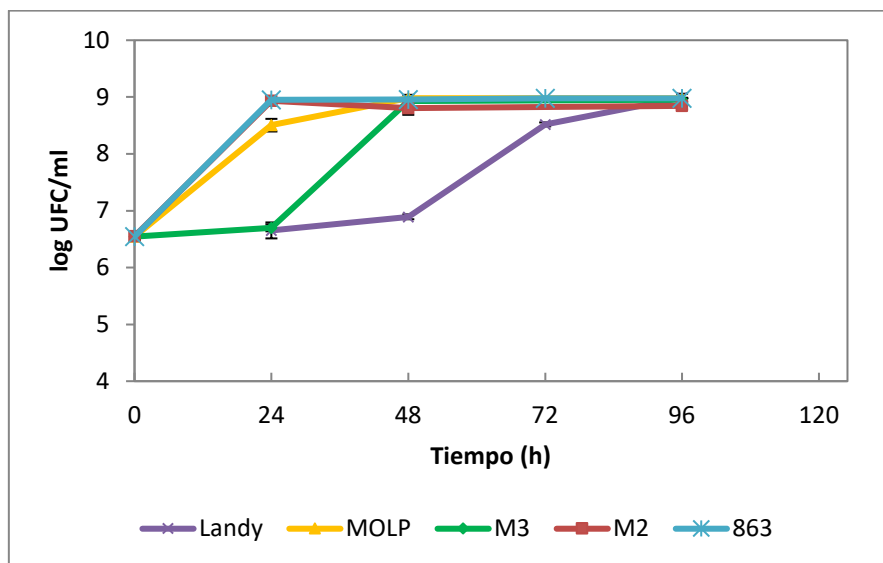


Figura 11. Crecimiento de la cepa BUZ-14 en los medios de referencia, Landy, MOLP y 863, y en los medios de bajo coste, M2 y M3, a 30 °C con agitación orbital

En estudios realizados por Yanez-Mendizabal *et al.* (2012) sobre *Bacillus subtilis* CPA-8 se obtuvieron mejores crecimientos con el medio MOLP que con el 863. En este caso, obtuvieron resultados comparables a los obtenidos con MOLP, con medios de bajo coste compuestos de melaza (10 g/L) y peptona (20 g/L) o melaza (10 g/L) y harina de soja (40 g/L). Esto puede ser indicativo de la necesidad de que la ratio C:N sea del orden de 1 o inferior para que las especies del género *Bacillus* crezcan mejor, lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio. El retraso en el crecimiento del medio Landy podría ser debido a la falta de ingredientes que aporten nitrógeno y que le permitan un buen desarrollo celular. Hay que señalar que no todos los autores utilizan los mismos ingredientes y concentraciones que se han utilizado en este estudio (Akpa *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2016). El medio Landy ha sido ampliamente modificado durante los últimos años para conseguir reducir los costes derivados de su elaboración, por lo que en este caso se decidió no incluir algunos ingredientes como la peptona u otros minerales para comprobar

su influencia en el desarrollo de BUZ14 y la producción de metabolitos. Por otro lado, los medios M2 y M3 han sido inventados en este estudio en base a otras publicaciones como Yanez-Mendizábal *et al.* (2012), donde usaban melazas y harinas a diferentes concentraciones para comprobar la actividad antifúngica en medios baratos. Parece ser que M2 es más adecuado para el desarrollo de BUZ, quizás el extracto de malta o los minerales usados en concentraciones demasiado altas como el MnSO_4 o incluso la mezcla entre ellos no sea la más adecuada para su proliferación.

En la Figura 12 se puede observar cómo BUZ14 sólo fue capaz de multiplicarse en el melocotón a partir de 24 horas de incubación a 20 °C. En la uva y la cereza se mantuvieron los recuentos iniciales hasta 96 h de incubación. EL bajo pH de la cereza y la uva (< 4,5) es un factor limitante para el crecimiento de algunas cepas bacterianas. Sin embargo, en este caso, el pH del melocotón (5,1) fue suficiente para permitir su desarrollo. No todas las variedades o momentos de cosecha mantienen las mismas propiedades intrínsecas de los productos, lo que indica conocer bien sus características antes de realizar este tipo de estudios. Calvo *et al.* (2017) vieron cómo esta cepa era incapaz de multiplicarse a pHs inferiores a 5, y que por tanto su actividad antifúngica se veía limitada por este factor en la mayoría de los frutos usados excepto en aquellos con pHs más elevados como el melocotón.

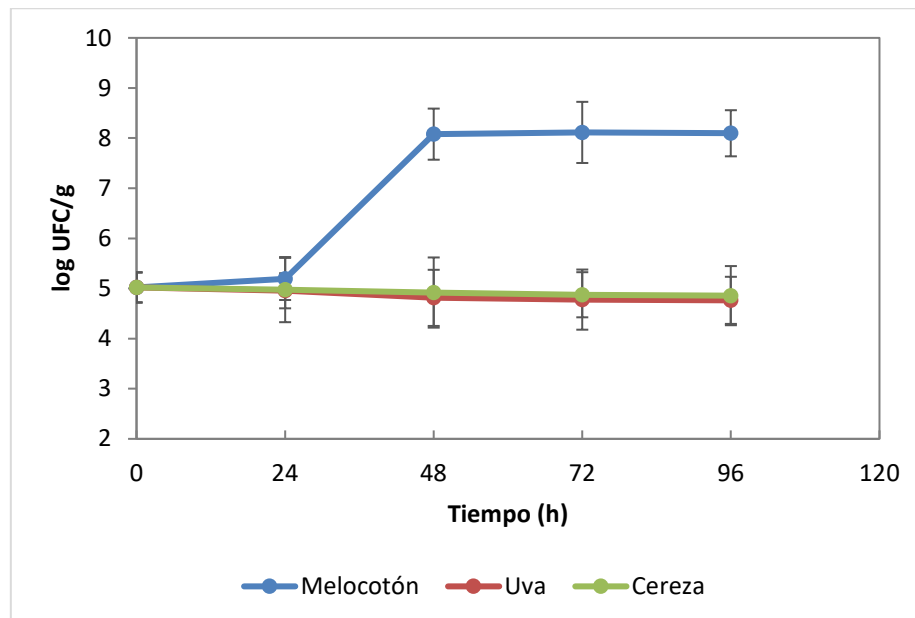


Figura 12. Crecimiento de la cepa BUZ-14 en melocotón, uva y cereza almacenados a 20 °C y 80 % H.R. durante 5 días.

4.2. Identificación y cuantificación de lipopéptidos

4.2.1 *In vitro*

En un primer paso se realizó la **identificación** de iturina A, fengicina y surfactina (fracción lipopeptídica) en los diferentes medios de cultivo. Para ello se compararon los tiempos de retención de los patrones inyectados en el HPLC (tabla 7) con los tiempos obtenidos de las muestras lipopeptídicas. En la figura 12 se puede observar el cromatograma correspondiente a una muestra de BUZ14 tras una incubación en medio 863 durante 96 h donde se detectan las 3 familias lipopeptídicas.

Tabla 7. Tiempos de retención (min) de los patrones de iturina A, fengicina y surfactina.

Familia de lipopéptidos	Tiempos de retención (min)										
Iturina A	13,57	16,26	16,85								
Fengicinas	14,03	14,26	14,62	15,73	15,91	16,29	16,63	17,27	17,44	17,74	17,98
Surfactinas	35,94	37,04	39,13	39,93	41,90						

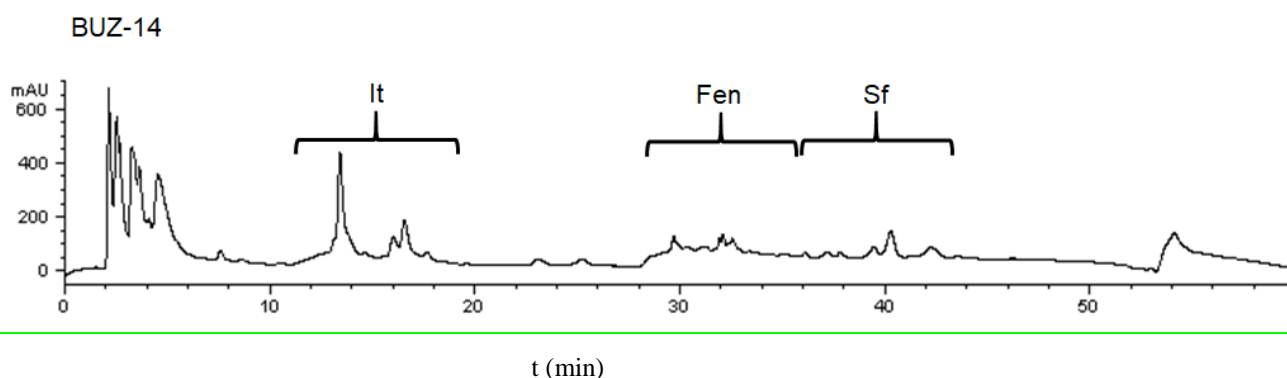


Figura 13. Identificación de lipopéptidos a 214 nm mediante HPLC tras 96 horas de incubación en medio 863 de la cepa BUZ-14. Iturina A (It), fengicinas (Fen) y surfactinas (Sf).

En las figuras 13, 14 y 15 se pueden observar los resultados correspondientes a la **cuantificación** de iturina A, fengicinas y surfactinas, respectivamente, para los distintos medios de cultivo ensayados.

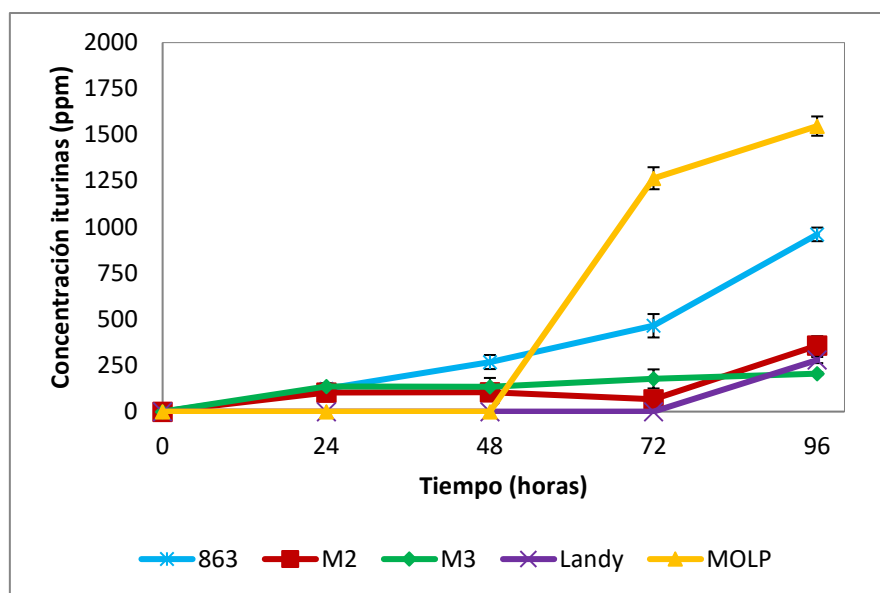


Figura 14. Concentración de iturina A obtenida en la fracción lipopeptídica producida por BUZ-14 tras 24, 48, 72 y 96 horas de incubación en los medios de referencia, Landy, MOLP y 863, y en los medios de bajo coste, M2 y M3

Como se puede observar en la figura 14, la concentración de iturina A aumenta en función del tiempo en todos los medios estudiados, pero mientras en los medios M2, M3 y Landy este aumento es muy pequeño, incluso transcurridas 96 horas (357,57, 205,51 y 279,40 ppm, respectivamente), en los medios 863 y MOLP sí hay un aumento muy significativo entre las 48 y las 96 horas de incubación (de 268,61 a 960,53 ppm en el caso del medio 863 y de 0 a 1.547,57 ppm en el caso del MOLP). Si analizamos la composición de estos dos medios en comparación con el resto de los analizados, vemos que tanto 863 como MOLP contienen peptona y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, que en el caso de M2 y M3 son sustituidas por harina de soja. En el caso de MOLP, donde hemos observado las concentraciones más elevadas de iturina A, la concentración de peptona es el triple que en 863, lo que podría indicar que este componente influye de manera bastante significativa en la producción de este metabolito. Sin embargo, las sales empleadas también podrían ser una razón a la alta concentración de iturina A conseguida. Es importante señalar que a pesar de la alta concentración de peptona (lo cual conlleva precios más elevados), la sustitución de la glucosa/dextrosa por sacarosa (componente mucho más barato) disminuye de manera considerable el precio de este medio. Sería interesante conseguir un medio de bajo coste similar a MOLP ya que la iturina A se ha revelado como compuesto principal responsable de la inhibición directa de *M. fructicola*

y *B. cinerea* en este estudio (ver punto 4.3.2) y de otros mohos patógenos estudiados por otros autores (Arrebola *et al.*, 2010).

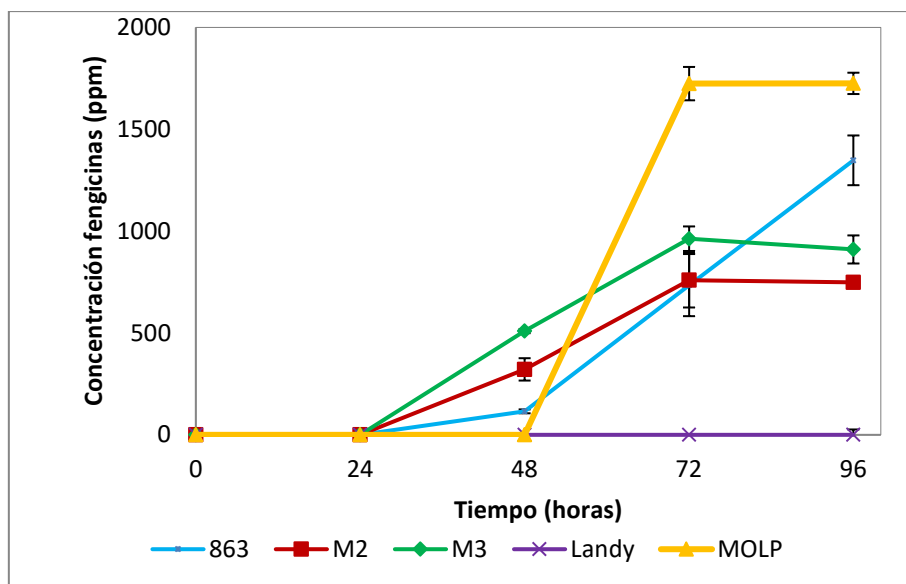


Figura 15. Concentración de fengicina obtenida en la fracción lipopeptídica producida por BUZ-14 tras 24, 48, 72 y 96 horas de incubación en los medios de referencia, Landy, MOLP y 863, y en los medios de bajo coste, M2 y M3

La concentración máxima de fengicinas (figura 15) se alcanza en los medios M2, M3 y MOLP tras 72 horas de incubación (758,93, 962,84 y 1.724,17 ppm, respectivamente) mientras que en 863 lo hace a las 96 horas (1.347,61 ppm). En el medio Landy no se detectó ningún pico correspondiente a esta familia, por lo que no pudo ser cuantificado. Aunque en el resto de los medios se producen concentraciones significativas de fengicinas, es el medio MOLP el que proporciona las más elevadas. La falta de peptonas o extracto de levadura en este medio que le aporten nitrógeno o incluso algunas vitaminas podría estar directamente relacionado con la producción de esta familia de sustancias. Sin embargo, los resultados obtenidos en las bioautografías (punto 4.3.2) muestran que la familia con el mayor efecto antifúngico es la iturina A, aunque las fengicinas ya han demostrado que por sí solas pueden tener efectos antifúngicos (Yanez-Mendizabal *et al.*, 2012) e incluso habría que tener presente los efectos sinérgicos producidos entre las propias iturinas y las fengicinas (Koumoutsis *et al.*, 2004), o entre las surfactinas y las fengicinas (Ongena *et al.*, 2007).

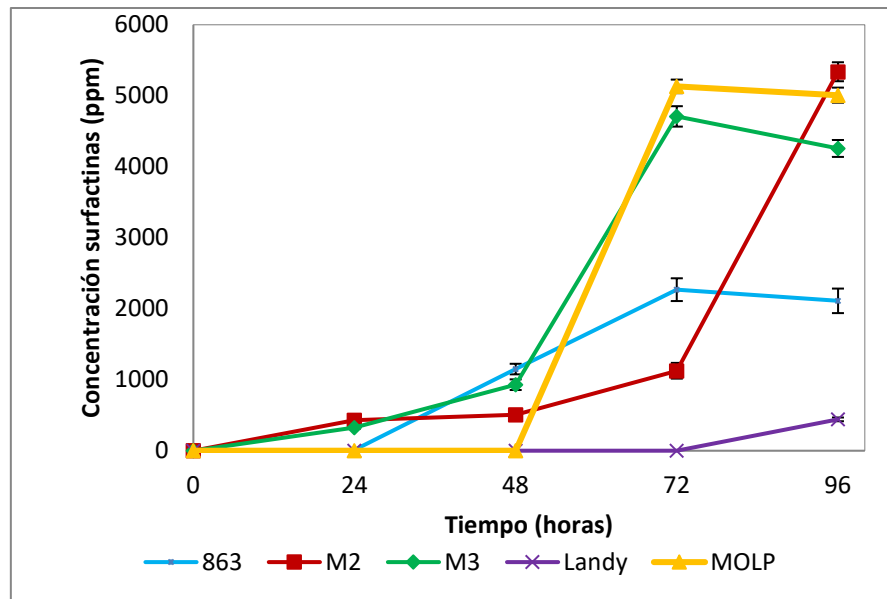


Figura 16. Concentración de surfactinas obtenidas en la fracción lipopeptídica producida por BUZ-14 tras 24, 48, 72 y 96 horas de incubación en los medios de referencia, Landy, MOLP y 863, y en los medios de bajo coste, M2 y M3

Como se aprecia en la figura 16, la producción de surfactinas es significativamente elevada en los medios M2, M3 y MOLP tras 96 h de incubación. La gran capacidad de M2 y M3 para la producción de surfactinas podría ser de gran utilidad para aislar elevadas cantidades de surfactina mediante producciones a gran escala y ser estudiada para posibles aplicaciones en la industria farmacéutica o biomédica ya que son numerosos los estudios que le han atribuido propiedades hemolíticas, antivirales o antibacterianas aunque parecen no tener actividad fungitóxica por sí solas (Ongena y Jacques, 2008).

Los medios MOLP y 863 son los que mejor permiten que nuestra cepa produzca todas las familias de lipopéptidos y en mayor cantidad. El cultivo de BUZ-14 en dichos medios no sólo produce su rápido crecimiento sino que permite la producción de elevadas concentraciones de iturina A y de otras familias de lipopéptidos como fengicinas y surfactinas que pueden ejercer efectos sinérgicos. Medeot *et al.* (2017) también demostraron que la cepa de *B. amyloliquefaciens* MEP₂₁₈ era capaz de crecer y producir lipopéptidos en medios que contenían glucosa como fuente de carbono, aunque en este estudio se ha demostrado que la sacarosa junto con alguna fuente de nitrógeno más barata como triptona o subproductos de la industria agroalimentaria podrían formar parte de un medio de cultivo barato que se pudiera escalar a un nivel más industrial. Por otro lado, los medios de bajo coste M2 y M3 producen elevadas concentraciones de surfactinas y

concentraciones apreciables de fengicinas, pero no de iturina A. Habría que profundizar en su reformulación para elevar la producción de iturina A si se quiere conseguir mayor poder antifúngico o emplearlos para la producción de surfactinas, sustancias que por sí solas también tienen interés, como se ha comentado anteriormente.

Finalmente, el medio Landy parece ser el menos interesante de todos los ensayados, lo cual difiere con otros estudios como Akpa *et al.* (2001) o Yaseen *et al.* (2017), donde ha sido utilizado como medio productor de lipopéptidos. Sin embargo, como se ha visto en el punto 4.1, la falta de nitrógeno no permitió su desarrollo hasta pasadas 48 h, por lo que la producción de metabolitos ha podido verse muy retrasada o incluso verse anulada por la falta de este tipo de nutrientes.

4.2.2 *In vivo*

Tras los resultados prometedores obtenidos *in vitro*, se comprobó si esta alta producción de metabolitos también tenía lugar en los productos donde finalmente los agentes de biocontrol van a ser aplicados. El recuento microbiológico realizado demostró que BUZ14 no era capaz de crecer en la uva y la cereza, probablemente debido a su bajo pH (<4,5) (Calvo *et al.*, 2017). Sin embargo, en el melocotón, con un pH cercano a 5, alcanzó valores de 10^8 UFC g⁻¹ tras 96 horas de incubación, cabiendo entonces la posibilidad de que se sintetizaran metabolitos antifúngicos. Como se puede observar en la Tabla 8, la concentración de iturina A, fengicinas y surfactinas obtenidas en el melocotón fue de 20,25 105,56 y 995,43 ppm respectivamente en frutos donde no se había inoculado el patógeno fúngico y de 28,98, 86,65 y 800,52 ppm en aquellos con ambos microorganismos inoculados. Como se puede observar, no hubo diferencias claras entre ambos ensayos por lo que la producción de metabolitos no parece verse afectada por la presencia del patógeno fúngico.

En estudios realizados en manzanas con la cepa *Bacillus subtilis* GA1, Touré *et al.* (2004) obtuvieron cantidades muy inferiores a las aquí obtenidas: <70 ng/g de iturina A, 1,5 µg/g de fengicinas y no detectaron surfactinas, concluyendo que la producción de metabolitos en este tipo de matrices alimentarias es muy pequeña pero que aun así se mantiene la actividad antifúngica.

Tabla 8. Concentraciones (ppm) de iturina A, fengicinas y surfactinas obtenidas tras la inoculación de BUZ-14 en melocotón (herida sin patógeno) y tras la inoculación de BUZ-14 y *M. fructicola* (herida con patógeno) y almacenamiento a 20 °C durante 5 días. Los datos corresponden a la media de 5 réplicas y llevado a cabo por triplicado.

MELOCOTÓN	Iturina A (ppm)	Fengicinas (ppm)	Surfactinas (ppm)
Heridas sin patógeno fúngico (<i>M. fructicola</i>)	20,25 ± 5,45	105,56 ± 48,53	995,43 ± 270,12
Herida con patógeno fúngico (<i>M. fructicola</i>)	28,98 ± 10,63	86,65 ± 32,58	800,52 ± 180,47

4.3. Estudio antifúngico

4.3.1. Actividad antifúngica *in vitro* mediante difusión en agar

La actividad antifúngica de los lipopéptidos obtenidos tras el cultivo de BUZ-14 en distintos medios (M863, M2, M3, MOLP y Landy) y a distintos tiempos (24, 48, 72 y 96 horas) se evaluó frente a 2 especies de mohos (*B. cinerea* y *M. fructicola*), mediante el método de difusión en agar.

Los resultados de la Tabla 9 muestran cómo la fracción lipopeptídica producida por BUZ-14 cultivada en los medios M2 y M3 no produce inhibición de los mohos patógenos en ninguno de los tiempos ensayados. En el medio Landy, sólo se producen lipopéptidos capaces de producir cierta inhibición frente a *B. cinerea* tras 96 horas. Podemos observar que los lipopéptidos producidos en los medios 863 y MOLP poseen mayor efecto inhibitorio. En concreto, la actividad antifúngica se observa a partir de las 48 h cuando el medio de crecimiento utilizado es el 863, aunque a partir de ahí los radios de inhibición aumentan muy lentamente (frente a *B. cinerea*) o bien llegan a reducirse (frente a *M. fructicola*). La inhibición ejercida por los lipopéptidos producidos por la cepa BUZ-14 cuando el medio de crecimiento utilizado fue el MOLP se produjo en ambos casos a partir de las 72 h. En el caso de *B. cinerea* se observó una gran actividad antifúngica a partir de ese momento, sin diferencias estadísticamente significativas entre las 72 y las 96 horas aunque sí se observaron en el caso de *M. fructicola*. Además, en las figuras 17 y 18 se pueden observar los ensayos de difusión en agar correspondientes a los lipopéptidos extraídos de BUZ-14 tras 96 h de incubación en los diferentes medios de cultivo.

Tabla 9. Radios de los halos de inhibición (mm) de la fracción lipopeptídica extraída de *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 contra *B. cinerea* y *M. fructicola*. Los valores numéricos son la media de tres réplicas \pm DE (desviación estándar). Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en tiempos mientras que letras mayúsculas diferentes indican significancia entre medios. ANOVA de una vía mediante test de Tukey ($P < 0,05$).

Moho	Tiempo (h)	M 863	MOLP	Landy	M2/M3
<i>B. cinerea</i>	24	0.00 \pm 0.00a,A	0.00 \pm 0.00a,A	0.00 \pm 0.00a,A	0.00 \pm 0.00a,A
	48	7.61 \pm 0.78b,A	0.00 \pm 0.00a,B	0.00 \pm 0.00a,B	0.00 \pm 0.00a,B
	72	8.58 \pm 0.15c,A	10.97 \pm 0.30b,B	0.00 \pm 0.00a,C	0.00 \pm 0.00a,C
	96	9.54 \pm 0.06d,A	10.55 \pm 0.84b,B	4.12 \pm 0.28b,C	0.00 \pm 0.00a,D
<i>M. fructicola</i>	24	0.00 \pm 0.00a,A	0.00 \pm 0.00a,A	0.00 \pm 0.00a,A	0.00 \pm 0.00a,A
	48	7.84 \pm 0.47b,A	0.00 \pm 0.00a,B	0.00 \pm 0.00a,B	0.00 \pm 0.00a,B
	72	4.45 \pm 0.16c,A	6.52 \pm 0.69b,B	0.00 \pm 0.00a,C	0.00 \pm 0.00a,C
	96	6.82 \pm 0.89d,A	11.21 \pm 0.53c,B	0.00 \pm 0.00a,C	0.00 \pm 0.00a,C

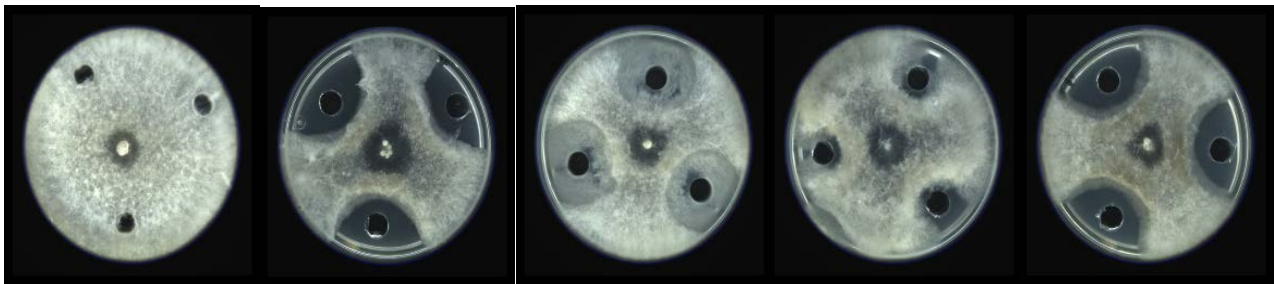


Figura 17. Halos de inhibición de los lipopéptidos extraídos de la cepa BUZ-14 tras 96 horas de cultivo en (de izquierda a derecha): control, medio 863, M3, Landy y MOLP frente *B. cinerea*.

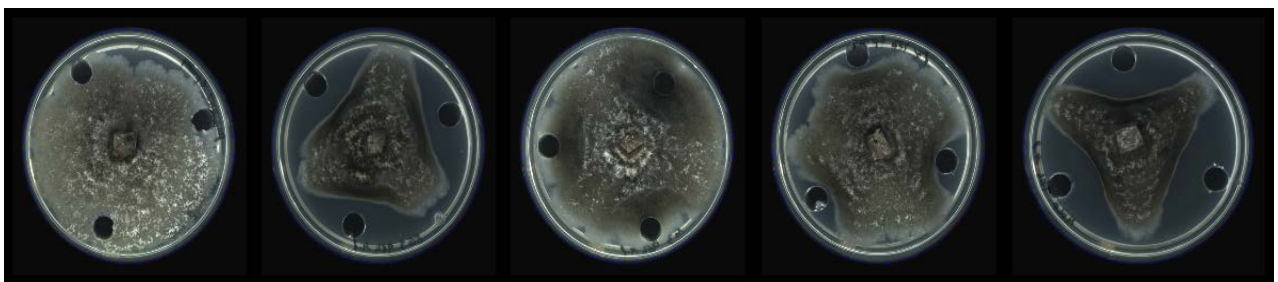


Figura 18. Halos de inhibición de los lipopéptidos extraídos de la cepa BUZ-14 tras 96 horas de cultivo en (de izquierda a derecha): control, medio 863, M3, Landy y MOLP frente *M. fructicola*.

4.3.2 Capa fina (TLC) y bioautografía

Se utilizó la técnica de la bioautografía con el objetivo de identificar y averiguar cuáles eran las familias lipopeptídicas activas responsables de la inhibición directa frente a *M. fructicola* y *B. cinerea*.

Previamente a la bioautografía se identificaron los valores de R_f encontrados al realizar la cromatografía en capa fina (TLC) a los estándares de iturina A, fengicinas y surfactinas (tabla 10). Estos R_f s fueron confirmados posteriormente por LC-MS-MS.

Tabla 10. R_f de estándares de compuestos pertenecientes a las principales familias de lipopéptidos, posteriormente confirmados mediante LC-MS-MS.

Familia de lipopéptidos	R_f
Iturinas	0.26-0.40
Fengicinas	0.10-0.20
Surfactinas	0.45-0.60

En la tabla 11 se pueden observar los R_f de la TLC-bioautografía realizada. En el medio 863 se obtuvieron R_f s aproximados de 0,25 tras 48, 72 y 96 horas; 0,29 tras 72 y 96 horas en medio MOLP y 0,31 tras 96 horas en medio Landy. Por tanto, todos los compuestos con la mayor actividad antifúngica *per se* frente a las dos especies ensayadas pertenecen a la familia de la iturina A. Este efecto antifúngico no se detectó ni en los medios M2 ni M3. En la figura 18 se muestran las inhibiciones de la TLC-bioautografía frente a *B. cinerea* y *M. fructicola* tras incubación de 96 h en medio 863.

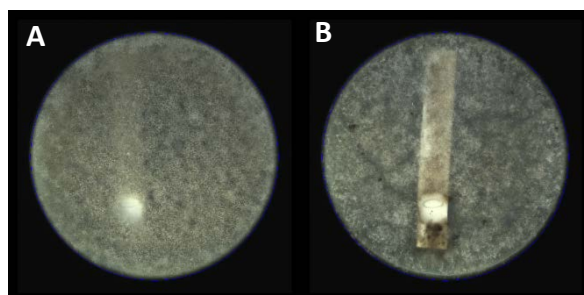


Figura 19. TLC-bioautografía de la fracción lipopeptídica extraída tras 96 h de incubación de BUZ14 en medio 863 frente a (A) *B. cinerea* y (B) *M. fructicola*.

Tabla 11. Valores de R_f de la/s sustancia/s con efecto antifúngico de la fracción lipopeptídica extraída de *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 contra *B. cinerea* y *M. fructicola* en los distintos medios ensayados.

Moho	Tiempo (h)	M 863	MOLP	Landy	M2/M3
<i>B. cinerea</i>	24	0.00	0.00	0.00	0.00
	48	0.23	0.00	0.00	0.00
	72	0.25	0.28	0.00	0.00
	96	0.25	0.30	0.31	0.00
<i>M. fructicola</i>	24	0.00	0.00	0.00	0.00
	48	0.24	0.00	0.00	0.00
	72	0.25	0.29	0.00	0.00
	96	0.25	0.29	0.30	0.00

Por tanto, se puede deducir que el compuesto o compuestos con actividad antifúngica en nuestro ensayo pertenece/n a la familia de las iturina A. En estudios realizados por Arrebola *et al.* (2010), realizaron este mismo ensayo utilizando los extractos de lipopéptidos (obtenidos tras incubar la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 en medio MOLP) frente a distintos patógenos (*Alternaria citri*, *Penicillium crustosum*...), se identificó el compuesto responsable de la actividad antifúngica con un $R_f = 0,3$ como iturina A. Sin embargo, Yanez-Mendizabal *et al.* (2012) identificaron la bacilomicina D con ese mismo R_f , mientras que la iturina A aparecía con un R_f de 0,4 utilizando la cepa CPA-8 de *B. subtilis* frente a diversos patógenos. En este caso, se identificaron además fengicina ($R_f=0.1-0.2$) y surfactinas ($R_f=0,7$). En este estudio, obtuvieron buenos crecimientos de la cepa tanto en los medios óptimos (863 y MOLP) como en un medio propio de bajo coste constituido por harina de soja desgrasada y melazas.

Para confirmar que, como se suponía, el compuesto con actividad antifúngica del presente estudio pertenece a la familia de la iturina A, se separó dicho compuesto de la silica gel de la capa fina mediante un bisturí y se extrajo con 1 mL de metanol mediante agitación magnética durante 12 horas a 300 rpm. Posteriormente, se sometió a centrifugación a $10000 \times g$ y el sobrenadante se analizó mediante Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas (LC-MS) (Acquity UPLC H-CLASS, Waters; Milfor, USA) confirmándose que el compuesto pertenecía a la familia iturina A.

Estos resultados estarían en concordancia con los obtenidos en los apartados 4.2.1 y 4.3.1, ya que los medios con mayor producción de iturina A han resultado ser los que mejores halos de inhibición han mostrado en los ensayos de inhibición *in vitro*.

4.3.3. Actividad antifúngica *in vivo*

Los frutos inoculados con ambos microorganismos se almacenaron durante 5 días a 25 °C y se evaluó la incidencia de la infección. Las uvas y las cerezas tuvieron una incidencia del 100 % y no se observó disminución de la severidad, sin embargo, BUZ14 consiguió controlar la infección causada por *M. fructicola* ya que ninguno de los melocotones tratados desarrolló la enfermedad. La inhibición de *M. fructicola* a pesar de la baja concentración de lipopéptidos hace pensar que *in vivo* se podrían dar otros mecanismos de acción distintos a la inhibición directa de estos antibióticos. Hay muchos estudios que relacionan la interacción entre estos agentes de biocontrol con las plantas fomentando sus mecanismos de resistencia o incluso podrían ser otras sustancias las que actúen en el fruto una vez se está multiplicando (Chen *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2014). Al fin y al cabo, en este trabajo sólo se ha estudiado una pequeña parte de todas las sustancias antimicrobianas que estas cepas son capaces de producir. Se ha concluido que *in vitro*, la iturina A parece ser la principal responsable por acción directa frente al patógeno, pero la forma de actuar en el fruto todavía debe ser investigada en mayor profundidad. Otros estudios destacan que son los lipopéptidos los principales responsables de inducir resistencias en plantas (Waewruedee *et al.*, 2014; Kawagoe *et al.*, 2015), por lo que seguir estudiando medios baratos para una aplicación industrial con los que se consiga producir altas cantidades de estas sustancias es otro reto para plantear a corto plazo.

5. CONCLUSIONES

Primera

Bacillus amyloliquefaciens BUZ-14 es capaz de crecer en medios de bajo coste formulados a partir de ingredientes baratos como harina de soja, almidones o melazas, similares a medios de referencia óptimos para la producción de metabolitos como 863, MOLP o Landy.

Segunda

Los medios de bajo coste estudiados, M2 y M3, limitan la producción de iturina A y fengicinas en comparación con los medios de referencia. Sin embargo, las surfactinas son en ambos casos muy similares a las obtenidas en el medio de referencia MOLP (5.000 ppm). Estas concentraciones tan elevadas convierten a la cepa BUZ en un candidato para la producción de estas sustancias para su posible aplicación en estudios farmacéuticos dado sus numerosas propiedades hemolíticas, antivíricas y antibacterianas.

Tercera

La iturina A ha sido identificada como la responsable de las inhibiciones directas *in vitro* frente a *Botrytis cinerea* y *Monilinia fructicola*. Sólo los medios 863 y MOLP mostraron inhibiciones en las bioautografías, mientras que en los medios baratos M2 y M3 no se observó inhibición alguna por parte de ninguna familia.

Cuarta

Con el medio Landy no se consiguió apenas producción de lipopéptidos ni inhibiciones, probablemente debido a la falta de ingredientes que aportaran nitrógeno (peptonas, triptonas, harinas o extracto de levadura). Este hecho resalta la importancia de algunos ingredientes a la hora de formular medios de cultivo para producción de metabolitos.

Quinta

Los estudios en fruta mostraron la limitada capacidad de BUZ-14 para crecer en sustratos con bajo pH (<4,5) como cerezas y uvas. Sin embargo, pHs cercanos a 5, como el de los melocotones, permite su desarrollo hasta 10^8 log UFC/cm².

Sexta

La producción de lipopéptidos en melocotón fue muy baja en el caso de la iturina A (28,98 ppm) y fengicina (86,65 ppm), aunque las surfactinas estuvieron cercanas a los 1.000 ppm. Aun así, BUZ-14 fue capaz de controlar la podredumbre marrón causada por *M. fructicola*, ya que no se observó la enfermedad en ninguno de los melocotones tratados.

Séptima

Los estudios *in vivo* han demostrado que los lipopéptidos podrían no ser los únicos y suficientes responsables de la actividad antifúngica en frutas y que su sinergia con otros metabolitos sería necesaria para limitar el desarrollo fúngico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahimou, F., Jacques, P., y Deleu, M. (2000). Surfactin y iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 749–754.
- Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., y Thonart, P. (2001). Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91–93, 551–561.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., y Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics y other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Fact.* 8, 63.
- Arrebola, E., Jacobs, R., y Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 108, 386–395.
- Baker, K. F. (1987). Evaluating concepts of biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25, 67–85.
- Bonmatin, J.-M., Laprevote, O., y Peypoux, F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins y surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6, 541–556.
- Broderick, N. a, Raffa, K.F., y Hyelsman, J. (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 15196–15199.
- Caccioni, D.R.L., y Guizzardi, M. (1994). Inhibition of germination y growth of fruit y vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *J. Essent. Oil Res.* 6, 173–179.
- Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., y Venturini, M.E. (2017). Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiol.*
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Anguera, M., y Teixidó, N. (2008). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Part II. Effectiveness of different cell formulations. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 96–106.
- Carrillo, C., Teruel, J.A., Arya, F.J., y Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1611, 91–97.
- Casals, C., Viñas, I., Lyl, A., Picouet, P., Torres, R., y Usall, J. (2010). Application of radio frequency heating to control brown rot on peaches y nectarines. *Postharvest Biol. Technol.* 58, 218–224.
- Chalutz, E., Droby, S. (1998). Biological control of postharvest disease. *Microbe In. Biol. Control.*
- Chen, X.-H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsis, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A.W., *et al.* (2006). Structural y functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* 188, 4024–4036.
- Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., y Borriss, R. (2009). Difficidin y bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol.* 140, 38–44.
- Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P., Thonart, P., y Paquot, M. (1999). Interfacial y emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 152, 3–10.
- Demoz, B.T., y Korsten, L. (2006). *Bacillus subtilis* attachment, colonization, y survival on avocado flowers y its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biol. Control* 37, 68–74.
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., y Jijakli, M.H. (2016). The science, development, y

commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biol. Technol.* 122, 22–29.

Emmert J., E., y Hyelsman, B. (1999). Biocontrol of plant disease: a gram-positvie perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 1–9.

Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., y Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils y evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control* 22, 896–902.

Grau, A., Gómez Fernández, J.C., Peypoux, F., y Ortiz, A. (1999). A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1418, 307–319.

Hamley, I.W. (2015). Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chem. Commun.* 51, 8574–8583.

Hsieh, F.-C., Li, M.-C., Lin, T.-C., y Kao, S.-S. (2004). Rapid detection y characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* y closely related species based on PCR. *Curr. Microbiol.* 49, 186–191.

Hsieh, F.C., Lin, T.C., Meng, M., y Kao, S.S. (2008). Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr. Microbiol.* 56, 1–5.

Kawagoe, Y., Shiraishi, S., Kondo, H., Yamamoto, S., Aoki, Y., y Suzuki, S. (2015). Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in Arabidopsis plants by activating SA y JA signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 1015–1020.

Kenig, M., Abraham, E.P. (1976). Antimicrobial activities y antagonists of bacilysin y anticapsin. *J. Gen. Microbiol.* 94, 37–45.

Kim, P., Chung, K. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol. Let.* 234: 177–183.

Koumoutsis, A., Chen, X., Henne, A., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R., y Liesegang, H. (2004). Structural y functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186, 1084–1096.

Lahlali, R., Raffaele, B., y Jijakli, M.H. (2011). UV protectants for *Cydia oleophila* (strain O), a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Plant Pathol.* 60, 288–295.

Laird, K., y Phillips, C. (2012). Vapour phase: A potential future use for essential oils as antimicrobials? *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 169–174.

Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Robert, F., y Steinberg, C. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biol. Control* 101, 17–30.

Lima, G., Sanzani, S.M., De Curtis, F., Ippolito, A., 2015. Biological control of postharvest diseases. In: Wills, R.B.H., Golding, J. (Eds.), *Advances in postharvest fruit y vegetable technology*. CRC Press, pp. 65–81.

Lin, T.P., Chen, C.L., Chang, L.K., Tschen, J.S.M., y Liu, S.T. (1999). Functional y transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 5060–5067.

Lu, H., Qian, S., Muhammad, U., Jiang, X., Han, J., y Lu, Z. (2016). Effect of fructose on promoting fengycin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* fmb-60. *J. Appl. Microbiol.* 121, 1653–1664.

Luckey, T.D. (1982). Hormesis with ionizing radiation. *J. Name Nucl. Sci. Eng.; (United States); J. Vol.* 823 Medium: X; Size: Pages: 365–366.

Margosan, D.A., Smilanick, J.L., Simmons, G.F., y Henson, D.J. (1997). Combination of hot water y ethanol to control postharvest decay of peach y nectarines. *Plant Dis.* 81, 1405–1409.

Massart, S., Margarita, M.M., y Jijakli, M.H. (2015). Biological control in the microbiome era: Challenges y opportunities. *Biol. Control* 89, 98–108.

Medeot, D.B., Bertorello-Cuenca, M., Liaudat, J.P., Alvarez, F., Flores-Cáceres, M.L., y Jofré, E. (2017).

Improvement of biomass y cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP₂₁₈ by modifying carbon y nitrogen sources y ratios of the culture media. *Biol. Control* 115, 119-128.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2013). Anuario de estadística 2013.

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA, 2016). Anuario de estadística 2016.

Mudgal, S., De Toni, A., Tostivint, C., Hokkanen, H., y Chyler, D. (2013). Scientific support, literature review y data collection y analysis for risk assessment on microbial organisms used as active substance in plant protection products – Lot 1 Environmental Risk characterisation. EFSA Support. Publ. 2013 EN-518.

EFSA (European Food Safety Authority). (2016). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI 600. *EFSA Journal* 2016;14(1):4359, 37 pp.

Ongena, M., y Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125.

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

Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., y Comitini, F. (2014). Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 y *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. *Postharvest Biol. Technol.* 96, 64–68.

Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., y Bakker, P.A.H.M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375.

Prabakaran, G., y Hoti, S.L. (2008). Optimization of spray-drying conditions for the large-scale preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* after downstream processing. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 103–107.

Rogers, E.W., y Molinski, T.F. (2007). Asymmetric synthesis of diastereomeric diaminoheptanetetraols. A proposal for the configuration of (+)-zwittermicin A. *Org. Lett.* 9, 437–440.

Romanazzi, G., y Murolo, S. (2008). Partial uprooting y pulling to induce recovery in Bois noir-infected grapevines. *J. Phytopathol.* 156, 747–750.

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

Rose, L., y Jenkins, A.T.A. (2007). The effect of the ionophore valinomycin on biomimetic solid supported lipid DPPE/EPC membranes. *Bioelectrochemistry* 70, 387–393.

Shellie, K.C., Neven, L.G., y Drake, S.R. (2001). Assessing “Bing” sweet cherry tolerance to a heated controlled atmosphere for insect pest control. *Horttechnology* 11, 308–311.

Sisquella, M., Casals, C., Picouet, P., Viñas, I., Torres, R., y Usall, J. (2013). Immersion of fruit in water to improve radio frequency treatment to control brown rot in stone fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 80, 31–36.

Sisquella, M., Picouet, P., Viñas, I., Teixidó, N., Segarra, J., y Usall, J. (2014). Improvement of microwave treatment with immersion of fruit in water to control brown rot in stone fruit. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 26, 168–175.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses y specific functions. *Mol. Microbiol.* 56, 845–857.

Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiró, A., y Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by

- Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. J. Appl. Microbiol. 96, 1151–1160.
- Gül, A., Kidoglu, F., Tüzel, Y., y Tüzel, H. (2008). Effects of nutrition y *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing in perlite. Span. J. Agric. Res. 3, 422–429.
- Waewthongrak, W., Leelasuphakul, W., y McCollum, G. (2014). Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS-S14 elicit defense-related gene expression in citrus fruit. PLoS One 9.
- Walker, J.E., y Abraham, E.P. (1970). The structure of bacilysin y other products of *Bacillus subtilis*. Biochem. J. 118, 563–570.
- Wilson, C.L., y Wisniewski, M.E. (1989). Biological control of fruits y vegetables: an emerging technology. Annu. Rev. Phytopathol. 27, 425–441.
- Wilson, C.L. & Wisniewski, M.E. (1994). Biological control of postharvest diseases of fruits y vegetables. Theory y Practice. CRC Press, Boca Ratón, Florida, U.S.A.
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., y Teixidó, N. (2012a). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products y by-products. Biol. Control 60, 280–289.
- Yáñez-Mendizábal, V., Zerrouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., Pérez-García, A., y Teixidó, N. (2012b). Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. Eur. J. Plant Pathol. 132, 609–619.
- Yang, Z., Cao, S., Su, X., y Jiang, Y. (2014). Respiratory activity y mitochondrial membrane associated with fruit senescence in postharvest peaches in response to UV-C treatment. Food Chem. 161, 16–21.
- Yaseen, Y., Gancel, F., Béchet, M., Drider, D., y Jacques, P. (2017). Study of the correlation between fengycin promoter expression y its production by *Bacillus subtilis* under different culture conditions y the impact on surfactin production. Arch. Microbiol. 1–12.
- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., y Bertagnolli, B.L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biol. Biochem. 34, 955–963.