



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción.....	3
1.1 Enfermedades de las plantas	3
1.2 Control biológico. Definición y estado actual	7
1.3 Mecanismos de acción de los agentes de biocontrol.....	9
1.4 El género <i>Bacillus</i> como agente de biocontrol.....	17
2. Antecedentes y objetivos	19
3. Material y Métodos	21
3.1 Microorganismos utilizados	21
3.2 Medios de cultivo.....	21
3.3 Determinación de la producción de sideróforos.....	23
3.4 Determinación de la producción de enzimas líticas.....	24
3.5 Crecimiento de los agentes de biocontrol en fruta	26
3.6 Análisis estadístico.....	27
4. Resultados y Discusión	28
4.1 Capacidad de quelar el hierro.....	28
4.2 Producción de enzimas líticas	30
4.3 Capacidad de crecimiento del agente de biocontrol en fruta	34
5. Conclusiones	37
6. Bibliografía.....	38

Resumen

Los hongos fitopatógenos son los principales responsables del deterioro de los productos hortofrutícolas, acarreando grandes pérdidas económicas anuales en el sector agrícola. Para combatirlos se suelen emplear fungicidas químicos que además de no ser respetuosos con el medio ambiente pueden provocar graves problemas de salud. Además, se ha evidenciado que la eficacia de estos compuestos químicos se va reduciendo debido a la aparición de resistencias. Como alternativa o complemento a estos tratamientos en los últimos años está tomando especial relevancia el biocontrol, el cual se caracteriza por utilizar microorganismos o los compuestos sintetizados por ellos con la finalidad de mermar las poblaciones fúngicas y limitar su propagación. Entre estos microorganismos destaca el género *Bacillus* que además de producir metabolitos extracelulares con acción antifúngica también actúa mediante la producción de sustancias quelantes del hierro (sideróforos) y enzimas líticas (quitinasas, β -1,3-glucanasa, β -1,4-glucanasa). Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar la producción *in vitro* de sideróforos y enzimas en las cepas de *Bacillus velezensis* BUZ-14, I3 e I5. Además, se evaluó la capacidad de crecimiento de estas cepas en distintas frutas lo que facilitaría su acción inhibitoria, especialmente en postcosecha. La producción de sideróforos de BUZ-14, I3 e I5 fue superior a la detectada en el microorganismo control empleado (*Pseudomonas fluorescens*) y parece ser que éstos son del tipo hidroxamato, los cuales se caracterizan por ser estables, hidrofílicos y por poseer una alta afinidad por el hierro. La producción de enzimas líticas, sin embargo, no fue elevada y disminuyó con el tiempo de incubación. En los ensayos *in vivo* se observó que las cepas estudiadas no son capaces de crecer en las frutas ensayadas (uva, naranja y limón), debido a sus bajos pHs, y que incluso sufren un descenso en sus poblaciones iniciales en el caso de los cítricos. Sin embargo, parece ser que la concentración inicial de sustancias antifúngicas en los cultivos inhibió el desarrollo de las podredumbres por *Botrytis cinerea* y por *Penicillium italicum* en uva y naranja, respectivamente, mientras que no fue suficiente para evitar el crecimiento de *Penicillium digitatum* en limón.

Palabras clave: biocontrol, postcosecha, sideróforos, quitinasa, glucanasa

Abstract

Phytopathogenic fungi are the main cause of the deterioration of fruit and vegetable products, leading to large annual economic losses in the agricultural sector. In order to combat them, chemical fungicides are usually used, which are characterized by not being environmentally friendly and likely to cause serious health problems. Furthermore, these products' efficacy has decreased due to the appearance of fungicide resistant strains. As an alternative or complement to these treatments, biocontrol has become especially relevant in recent years. It is characterized by using microorganisms or even the compounds synthesized by them with the purpose of reducing fungal populations and limiting their spread. Among these microorganisms, the genus *Bacillus* outstands not only for the production of extracellular metabolites with antifungal action, but also for the production of iron chelating substances (siderophores) and lytic enzymes (chitinases, β -1,3-glucanase, β -1,4-glucanase). Therefore, the aim of this research has been to study the *in vitro* production of siderophores and enzymes in *Bacillus velezensis* strains BUZ-14, I3 and I5. In addition, the growth capacity of these strains has been assessed in different fruits; an ability that would ease their inhibitory action, especially in a post-harvest phase. The production of siderophores of BUZ-14, I3 and I5 was higher than the one detected in the control microorganism used (*Pseudomonas fluorescens*) and it seems that these would be of the hydroxamate type, characterized by being stable, hydrophilic and having a high affinity for iron. Nonetheless, the production of lytic enzymes was not high and it decreased along the incubation time. In the *in vivo* tests it was observed that the studied strains are not capable of growing in the tested fruits (grape, orange and lemon), due to their low pHs, and that, in the case of citrus fruits, they even suffered a decrease in their initial populations. Although it appears that the initial concentration of antifungal substances in the crops inhibited the development of *Botrytis cinerea* and *Penicillium italicum* rot in grapes and oranges, respectively it was not sufficient to prevent the growth of *Penicillium digitatum* in lemons.

Keywords: biocontrol, postharvest, siderophores, chitinase, glucanase

1. Introducción

1.1 Enfermedades de las plantas

El sector agrícola siempre ha tenido que sortear varios inconvenientes, como plagas y enfermedades. A estos problemas se le suman otros como el cambio climático, el cual ha aumentado el número de plagas y enfermedades de plantas que dificultan el abastecimiento de alimentos de origen vegetal, acarreando consigo impactos económicos, sociales y ambientales. Los impactos de estos problemas varían entre regiones y años. No obstante, económicamente, las plagas se traducen en pérdidas mundiales en torno a 65 mil millones de euros anuales, mientras que las enfermedades de las plantas ascienden hasta los 206 mil millones de euros anuales. Estas afecciones son difíciles de controlar y gestionar, puesto que se transmiten con una enorme facilidad por los propios materiales de siembra, el comercio y los viajeros, así como vectores de transmisión naturales como el aire o los animales (FAO, 2017). El grupo de fitopatógenos capaz de causar enfermedades en las plantas es muy variado, incluyendo virus, bacterias, hongos, nemátodos, plantas de semillas parasitarias, etc. Asimismo, el desarrollo de síntomas y de la enfermedad puede variar en el tiempo (Segaran & Sathiavelu, 2019) pero en la mayoría de casos, el ataque de estos fitopatógenos ocurre en las etapas de producción, postcosecha o en la cadena de suministro de alimentos (FAO, 2011).

Se estima que en torno a un 33 % de toda la fruta y hortaliza que se cosecha mundialmente se desaprovecha (Dukare et al., 2019). La pérdida de alimentos supone un desperdicio de recursos, como tierra, agua y energía entre otros. Además, la producción de alimentos que no se consumirán acarrea emisiones innecesarias de anhídrido carbónico (FAO, 2011).

La principal causa del desperdicio de alimentos vegetales ocurre por las infecciones ocasionadas por **hongos fitopatógenos** capaces de producir la descomposición del producto tanto en el campo como después de haber sido cosechado. En países en vías de desarrollo este problema se agrava, puesto que no se disponen de las condiciones óptimas de refrigeración o servicios de transporte adecuados (Dukare et al., 2019). Por otra parte, en los países desarrollados este problema también existe, estimándose que alrededor del 20-25% de frutas y hortalizas se desperdician porque están siendo atacadas por hongos patógenos (Calvo et al., 2017).

Los géneros fúngicos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gloeosporium*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Mucor* y *Rhizopus* se corresponden con los principales

fitopatógenos postcosecha que originan las pérdidas anteriormente mencionadas (Dukare et al., 2019). Pueden encontrarse en una gran variedad de hábitats como en la vegetación, aire, agua, suelos, compost, insectos y animales, entre otros muchos (McKay et al., 2012; Ostry, 2008; Sanzani et al., 2016; Thornton et al., 2010). Estos organismos ejercen su acción cuando se producen estreses en el hospedador, que pueden ser tanto bióticos como abióticos.

Algunos ejemplos de estreses bióticos pueden ser la maduración de la propia fruta (Dukare et al., 2019), por estructuras que faciliten la infección, como los apresorios, para sujetarse al hospedador para luego romper su cutícula con enzimas líticas como la cutinasa; por la creación de un ambiente por parte del patógeno que causa la muerte de la célula del huésped como la síntesis y liberación de metabolitos fitotóxicos, por procesos oxidativos por la acumulación de radicales libres o peróxido de hidrógeno; por la secreción de ácido oxálico, el cual proporciona el ambiente idóneo para las enzimas líticas del hongo; o por la inducción a la apoptosis de las células vegetales (van Kan, 2006). En cambio, algunos estreses abióticos pueden ser las lesiones mecánicas de la cosecha (Dukare et al., 2019), la temperatura o el grado de humedad que tengan lugar durante el transporte, la comercialización y el almacenamiento de la fruta, etc. (Mercier & Smilanick, 2005; Thornton et al., 2010).

Gracias a estos fenómenos por separado o por una combinación de ellos, los hongos fitopatógenos pueden germinar y penetrar en la cutícula del tejido del huésped. Asimismo, en ocasiones los patógenos pueden residir endofíticamente en los extremos del tallo o penetrar directamente la cutícula del huésped durante el periodo de crecimiento del fruto. Durante el proceso de crecimiento, el fitopatógeno va matando los tejidos del huésped, tomando de él los nutrientes, al mismo tiempo que va teniendo lugar la descomposición del tejido infectado (Dukare et al., 2019). Por otra parte, los hongos fitopatógenos representan un claro riesgo para la salud, ya sea por la producción de micotoxinas, fitotoxinas (Ostry, 2008; Pétriacq et al., 2018) o metabolitos carcinogénicos entre otros (Dukare et al., 2019).

Para lidiar con el problema de los fitopatógenos y evitar grandes pérdidas económicas se recurre al empleo de pesticidas o plaguicidas. Estos se pueden definir como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias de ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga o regular el crecimiento de las plantas” (FAO & WHO, 2016, p.6). Además, los pesticidas también se suelen utilizar para aumentar la cantidad y calidad de las cosechas, principalmente en países en vías de desarrollo (Kafaei et al., 2020).

A pesar de que su uso es habitual, se ha visto que la utilización de **pesticidas** puede acarrear

problemas tanto para el medio ambiente como para la salud humana (Calvo et al., 2017; Pérez-García et al., 2011). Los principales problemas medioambientales causados por el uso de pesticidas son: la resistencia ambiental, la bioacumulación y su transporte a largas distancias, entre otros. La gran mayoría de estos compuestos son OCPs (pesticidas organoclorados) puesto que son altamente rentables y los más eficaces. Los OPC se han encontrado en numerosos ambientes, como por ejemplo el agua, el suelo o incluso el aire, siendo el suelo el entorno en el que más abundan por su uso en la agricultura. Asimismo, dado que su degradación en los suelos es bastante lenta, es frecuente que los OPC sean absorbidos por las plantas, ingresando así a la cadena alimentaria. Por otra parte, los procesos de bioacumulación se deben principalmente a que estos pesticidas son hidrofóbicos y por tanto son absorbidos por los componentes orgánicos del suelo. Una vez unidos a los componentes orgánicos, los OPC pueden pasar tanto a la atmósfera como a las aguas superficiales o subterráneas, pudiendo recorrer largas distancias (Kafaei et al., 2020). Por otra parte, el uso de pesticidas también puede alterar determinadas funciones en el ecosistema, como por ejemplo la polinización, como consecuencia de su acción tóxica contra organismos que no eran el objetivo, pero que igualmente se ven afectados (FAO & WHO, 2016).

Los problemas ocasionados por los pesticidas en la salud humana pueden ser bastante variados, pudiendo originar diversas enfermedades como consecuencia de su bioacumulación en los tejidos. De esta forma, su detección en el organismo podría ayudar a identificar la enfermedad que causa los síntomas en el paciente. Los pesticidas pueden detectarse con anterioridad estudiando la composición de la leche materna, la sangre o tejidos grasos (Meftaul et al., 2020; Ntow et al., 2008; Sanghi et al., 2003). Otra forma para determinar su presencia es a través del análisis de la composición del cabello de los animales o personas, debido a que los pesticidas son capaces de acumularse por el contenido relativamente alto de lípidos en el cabello. Adicionalmente, cuando estos compuestos se encuentran en el organismo ejercen su acción tóxica por varias vías. Un ejemplo es el efecto antagónico que poseen sobre los andrógenos y estrógenos. Asimismo, hay varios estudios que relacionan a los pesticidas con un aumento de las probabilidades de padecer cáncer de mama, de próstata, de cuello uterino y pulmón en individuos adultos (Behrooz et al., 2012; Meftaul et al., 2020; Mishra et al., 2012), mientras que en el feto puede originar endometriosis (crecimiento anómalo de tejido endometrial fuera del útero), criotorquidia (descenso incompleto de uno o ambos testículos) e hipospadias (anomalía característica de hombres en la que la uretra no se encuentra en la parte superior del pene) así como alterar la diferenciación neuronal, sinaptogénesis y mielinización

entre otros muchos (Behrooz et al., 2012). Asimismo, los pesticidas son capaces de dañar órganos, como el tracto gastrointestinal, el hígado o los riñones; o sistemas enteros, como el cardiovascular, respiratorio y endocrino (Meftaul et al., 2020). Por otra parte, se ha visto una posible relación entre los OPC y un aumento de padecer otras enfermedades como: leucemia, Parkinson, diabetes tipo 2 y asma (Kim et al., 2017).

Otro inconveniente es la evidencia de que cada vez la efectividad de estos compuestos es menor por la aparición de **cepas resistentes** (Calvo et al., 2017; Pérez-García et al., 2011). En los últimos años se han registrado múltiples casos de hongos resistentes a fungicidas, teniendo lugar graves pérdidas económicas nuevamente. Sin embargo, se ha observado que la adquisición de esta resistencia no es la misma en todos los pesticidas. Por ejemplo, mientras que para aquellos fungicidas con compuestos organomercuriales se tardó 40 años en registrar el primer caso de pérdida de eficacia; a otros fungicidas como los benzimidazoles, las fenilamidas o las estrobilurinas, se tardaron solo 2 años para que hongos fitopatógenos se volvieran resistentes a estos compuestos. Se cree que existe una relación entre la adquisición de resistencia y el número de dianas que tenga un fungicida. De esta forma, a los hongos fitopatógenos les cuesta más tiempo desarrollar resistencia frente aquellos fungicidas pluriespecíficos, o con múltiples dianas, que a aquellos monoespecífico, o con una sola diana. Adicionalmente, hay autores que clasifican la resistencia generada en cualitativa o cuantitativa. La resistencia cualitativa es aquella que se adquiere por mutaciones. De esta forma, si la mutación se produce en el gen que codifica la proteína diana de un fungicida determinado, este no se podría unir o inhibir la función de esta proteína, perdiendo así su eficacia. Adicionalmente, cuando se aplique el tratamiento fungicida, solo los fitopatógenos mutantes y unos pocos del tipo salvaje sobrevivirán. Sin embargo, las aplicaciones consecutivas del fungicida en cuestión ejercerán una selección por la cepa mutante, hasta que finalmente la cepa de tipo salvaje sea extirpada o extinguida. (Deising et al., 2008). Por otra parte, la resistencia cuantitativa es aquella que se adquiere con bajas concentraciones intracelulares del fungicida. Esto se consigue por: 1) la síntesis de transportadores que excretan las moléculas de los fungicidas, 2) modificaciones en la membrana que reducen la permeabilidad de los fungicidas o 3) por la síntesis de enzimas degradadoras de estos compuestos. Asimismo, se ha observado que la adquisición de este tipo de resistencia también puede deberse a la sobreexpresión del gen que codifica la proteína diana del fungicida o por la utilización de rutas metabólicas alternativas a la que afecta el fungicida (Deising et al., 2008; Del Sorbo et al., 2000; Kontoyiannis et al., 1999; Löffer et al., 2000; Schnabel & Jones, 2001).

Por tanto, en base a lo anteriormente expuesto, es necesario el desarrollo de otras técnicas de control de las enfermedades de las plantas más respetuosas con el medioambiente y que no conlleven riesgos para la salud humana. Entre ellas, el control biológico o biocontrol ha resurgido en los últimos años como una alternativa eficaz y medioambientalmente sostenible.

1.2 Control biológico. Definición y estado actual

El control biológico o biocontrol se puede definir como el empleo de uno o varios microorganismos para mermar la población de un determinado patógeno o de su actividad fitopatógena (Baker, 1987). Con el paso del tiempo esta definición se ha ampliado, incluyéndose a los compuestos sintetizados por estos microorganismos o incluso sus genes, no solo para disminuir la población, sino también para limitar su propagación (De Silva et al., 2019).

Este método surgió para ofrecer una alternativa a los pesticidas, al mismo tiempo que se pretendía disminuir o sustituir el uso de productos químicos por sus repercusiones en la salud y el medio ambiente (Droby et al., 2009; Horak et al., 2019). Por otra parte, los agentes de biocontrol son aquellos organismos que llevan a cabo el control biológico por medio de un proceso que se le conoce como antagonismo, que es un fenómeno por el cual el crecimiento, desarrollo y actividad normal de los fitopatógenos se ve interferida, mermada o suprimida por parte del agente de biocontrol o antagonista (Dukare et al., 2019).

El biocontrol se planteó en la segunda mitad del siglo pasado cuando se observó que determinadas poblaciones de microorganismos presentes en la rizosfera o epífitas en determinadas estructuras de algunas plantas actuaban como antagonistas impidiendo el desarrollo de enfermedades por fitopatógenos (Wilson & Pusey, 1985; Wilson & Wisniewski, 1989). Actualmente, hay numerosas publicaciones e investigaciones científicas en curso en las que se trabaja con numerosos antagonistas de distinta naturaleza, bacterianos o fúngicos, como agentes de biocontrol para controlar los patógenos que afectan a los cultivos (Dukare et al., 2019).

Además de ser un candidato para sustituir a los pesticidas, el biocontrol y sus agentes ofrecen otras ventajas como pueden ser: no se generan residuos tóxicos, son respetuosos con el medio ambiente, ofrece un método de aplicación más seguro, son más económicos a la hora de producirlos (Dukare et al., 2019) y pueden prevenir o retrasar la aparición de poblaciones fúngicas resistentes por tener varios y distintos mecanismos de acción (Pertot et al., 2017). No obstante, para poder comercializar un organismo vivo como agente de biocontrol, además

de las características anteriormente mencionadas, también se busca que: sean genéticamente estable, tiene que ser efectivo a baja concentración, no debe tener requerimientos nutricionales exigentes, debe ser capaz de soportar condiciones adversas, es recomendable que sea eficaz contra una amplia gama de patógenos en varios productos, presentar un buen crecimiento en medios económicos, ser fácil de dispensar y no ser perjudicial para la salud humana entre otros muchos (Wilson & Wisniewski, 1989).

Por estos motivos, las **bacterias** son candidatas a ser agentes de biocontrol, sobre todo aquellas capaces de formar endosporas, garantizando su viabilidad a largo plazo, lo que facilita el desarrollo de productos comerciales (Wu et al., 2015). Adicionalmente, las especies de *Bacillus* son buenas candidatas ya que no interfieren con la microflora de muchas plantas debido a que normalmente se suelen encontrar como un miembro más de estas comunidades (Rabbee et al., 2019). En cambio, las levaduras también se han escogido como agentes de biocontrol por una serie de factores como: su capacidad de tolerar altos niveles de sales, especies reactivas de oxígeno, por su buena capacidad para adherirse a la superficie del patógeno, del huésped o ambos y por resistir condiciones ambientales estresantes como cambios temperaturas extremas, fluctuaciones de pH, desecación y tolerar un amplio rango de humedad relativa entre otros muchos (Droby et al., 2009; Droby, et al., 2016).

De todos los que existen, algunos de los **agentes de biocontrol** más utilizados son las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Citrobacter* así como bacterias ácido lácticas. Algunos ejemplos de levaduras con esta misma función son de los géneros *Pichia*, *Rhodotorula*, *Kloeckera* o *Candida* entre otros (Dukare et al., 2019; Ren et al., 2019). A muchos de ellos se les sigue investigando para conocer sus mecanismos de acción o para desarrollar formulados comerciales para que puedan ser aplicados en el campo. En cambio, hay muchos otros que ya han pasado esas fases y actualmente se comercializan y se aplican. La primera generación de productos de biocontrol incluía a *Candida oleophila* (Aspire®, Ecogen, Langhorne, PA, E.E.U.U.), *Cryptococcus albidus* (YieldPlus®, Lallemand, Montreal, Canadá), *Candida sake* (Candidfruit®, IRTA, Lleida, España) y *Pseudomonas syringae* Van Hall (BioSave®, JET Harvest, Longwood, FL, E.E.U.U.), de los cuales solo Biosave sigue comercializándose. Más adelante se sacaron al mercado otros agentes de biocontrol más rentables económicamente. Por ejemplo, en Israel se ha registrado a *Metschnikowia fructicola* (Shemer®, Bayer, Leverkusen, Alemania) para la aplicación a diversas frutas y hortalizas tanto antes como después de la cosecha (Droby et al., 2016). Adicionalmente, la Unión Europea participa en la fabricación de biofungicidas, destacando: *Bacillus velezensis* (Botrybel®,

Probelte, Murcia, España) (Olishevskaya et al., 2019), *B. amyloliquefaciens* FZB42 (RhizoVital®, ABiTEP, GmbH, Berlín, Alemania), *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* D747 (Amylo-X® WG, Certis Europe BV, Netherlands) o *C. oleophila* (Nexy®, Leasafre, Lille, Francia). Otros países como Estados Unidos también están involucrados en el control biológico y ha desarrollado múltiples biofungicidas, de los cuales destacan *Bacillus pumilus* QST 2808 (Sonata®, Agra Quest, Davis, CA, E.E.U.U.) o *B. subtilis* QST 713 (Serenade®, Agra Quest, Davis, CA, E.E.U.U.) (Bailey et al., 2012; Ferraz et al., 2019; Rabbee et al., 2019).

1.3 Mecanismos de acción de los agentes de biocontrol

El efecto antagónico de los agentes de biocontrol se consigue por distintos mecanismos, algunos de ellos son: impidiendo o dificultando el crecimiento de fitopatógenos a través de la competencia por nutrientes y espacio, por el desplazamiento físico de los fitopatógenos, por la secreción de sideróforos, por la producción y liberación de enzimas o a través de la síntesis de antibióticos o compuestos volátiles al medio (Dukare et al., 2019; Li et al., 2015; Ren et al., 2019; Trapet et al., 2016).

De todos estos mecanismos, el más común suele ser la competencia por nutrientes. Sin embargo, es frecuente que los antagonistas utilicen conjuntamente una combinación de varios mecanismos de acción. No obstante, es complejo estudiar las funciones del agente de biocontrol *in vivo* por las múltiples interacciones que tienen lugar entre la planta, el patógeno y el antagonista, así como, en ocasiones, otros microorganismos presentes en la propia planta. Paralelamente, en el biocontrol, además del antagonista, también es frecuente utilizar productos naturales que han demostrado ejercer efectos directos sobre el patógeno y/o que modifican el microambiente y la resistencia del huésped. Esta adición conjunta del agente de biocontrol con determinados productos naturales ha mostrado un aumento en la eficacia, consiguiéndose niveles similares a los que se observan con los fungicidas (Droby et al., 2009).

a) Competencia por nutrientes y espacio

La competencia por los nutrientes disponibles es un modo de acción con bastante peso en el control biológico, puesto que regula la dinámica de las poblaciones de microorganismos que comparten el mismo nicho ecológico (Daguerre et al., 2014). Al establecerse una competencia trófica, los nutrientes disponibles se ven reducidos por la acción de los antagonistas, ya que estos se alimentan más rápido, inhibiendo así la germinación y el crecimiento de los patógenos (Dukare et al., 2019; Lastochkina et al., 2019). En este mecanismo de acción se le da más importancia a las fuentes de carbono, como la celulosa y la hemicelulosa, puesto que suelen ser

las principales fuentes de energía para la mayoría de los hongos fitopatógenos. En segundo lugar, se le da prioridad a las fuentes de nitrógeno, ya que se ha demostrado que hay fitopatógenos que sobreexpresan genes transportadores de aminoácidos durante el micoparasitismo (Daguerre et al., 2014). Asimismo, también se pueden establecer competiciones por otros nutrientes como pueden ser vitaminas, nitratos, oxígeno o micronutrientes como el hierro. No obstante, la colonización y competencia por nutrientes por parte de los agentes de biocontrol puede verse alterada por la microbiota natural no patógena de las frutas o por la concentración del antagonista y la especie de fruta, puesto que se ha visto que no todos los agentes de biocontrol se adaptan de igual forma a todas las frutas (Dukare et al., 2019).

En relación con la **competición por micronutrientes**, hay que mencionar que el **hierro** es un elemento que se encuentra en abundancia en el suelo. Sin embargo, la mayor parte de este se encuentra formando complejos insolubles, de manera que no se encuentra disponible para que sea utilizado por las plantas u otros organismos. De esta forma, el empleo de **sideróforos** es una forma de satisfacer los requisitos de este elemento. Por lo tanto, los sideróforos son pequeñas moléculas peptídicas con cadenas laterales y grupos funcionales que presentan una alta afinidad por los grupos férricos. Estos compuestos son sintetizados como metabolitos secundarios con la finalidad de quitar el hierro, mejorar su absorción formando un complejo férrico-sideróforo y transportarlo a través de la membrana celular (Arora & Verma, 2017; Villarreal-Delgado et al., 2018). Los sideróforos son producidos por diversos microorganismos, tanto bacterias y hongos patógenos para los humanos como microorganismos ambientales, como por ejemplo, las PGPR (Plant-Growth-Promoting-Rhizobacteria). Estos metabolitos secundarios se pueden clasificar en clases en función de sus características estructurales, grupos funcionales y tipos de ligandos. Las cuatro clases principales son: carboxilato, hidroxamato, catecolatos y de tipo mixto. Los carboxilatos son representativos por presentar tanto hidroxicarboxilatos como carboxilatos; los hidroxamatos se caracterizan por presentar ésteres, cloruros ácidos o ácidos carboxílicos; los catecolatos poseen grupos de unión a fenolato o 2,3-dihidroxibenzoato y finalmente los de tipo mixto presentan una mezcla de grupos funcionales de los otros tres tipos de sideróforos (Arora & Verma, 2017).

El mecanismo por el cual se produce la incorporación del hierro del medio es el siguiente: una vez unido la forma férrica al sideróforo y formar un complejo sideróforo-hierro, este último ingresa a las células a través de receptores específicos presentes en la membrana celular. No obstante, el transporte del complejo sideróforo-hierro se realiza de manera distinta en las

bacterias Gram⁺ y Gram⁻. Para las primeras, el transporte se realiza mediante la participación de proteínas como las permeasas y ATPasas de sideróforos; mientras que para las bacterias Gram⁻, como los complejos sideróforo-hierro son demasiado grandes para pasar por porinas, primero el complejo sideróforo-hierro se debe unir a un receptor de membrana externa, luego se transfiere el complejo sideróforo-hierro al espacio periplásmico con el gasto de ATP a través de un complejo de proteínas de unión periplásmica para finalmente unirse a una proteína de membrana citoplasmática que se corresponde con un transportador dependiente de ATP (transportadores ABC). En ambos casos, una vez entra el complejo al citosol, el hierro férrico se reduce, liberándose así del complejo quelante. Finalmente, la forma ferrosa reducida se incorpora a distintas rutas metabólicas y el sideróforo libre puede ser degradado o bien excretado de nuevo al medio por medio de un sistema de bomba de flujo (Krewulak & Vogel, 2008; Kumar et al., 2017).

Desde otra perspectiva, también se ha visto que estos metabolitos secundarios ayudan a proteger a las plantas del ataque de fitopatógenos, ya que la excreción de sideróforos implica una competencia por el hierro disponible en el suelo, privando a los hongos de este microelemento esencial, puesto que los sideróforos fúngicos tienen una menor afinidad por el hierro que los sideróforos bacterianos. Finalmente, el hongo muere por ser incapaz de obtener el suficiente hierro que necesita para la germinación, el crecimiento y la proliferación, ya que lo requieren para el correcto funcionamiento de citocromos, como componente de proteínas o como cofactores de varias enzimas (Arora, 2015; Dukare et al., 2019).

b) Producción y liberación de enzimas

La pared celular de los hongos está compuesta por glucoproteínas y polisacáridos entre otros compuestos (**Figura 1**). No obstante, la fracción más predominante es la polisacáridica, ejerciendo una función estructural y de resistencia mecánica en la pared, pudiendo llegar a constituir aproximadamente el 80 % de esta estructura. Dentro de esta fracción, entre los componentes mayoritarios se encuentran la quitina y los glucanos, suponiendo entre un 10-20% y un 50-60 % respectivamente (Dukare et al., 2019; Villarreal-Delgado et al., 2018). Por lo tanto, el desarrollo de enzimas líticas capaces de degradar estos biopolímeros se ha propuesto como un mecanismo esencial de los agentes de biocontrol para combatir infecciones fúngicas. Algunas de estas enzimas son la **quitinasa**, la **β-1,3-glucanasa** y la **β-1,4-glucanasa**.

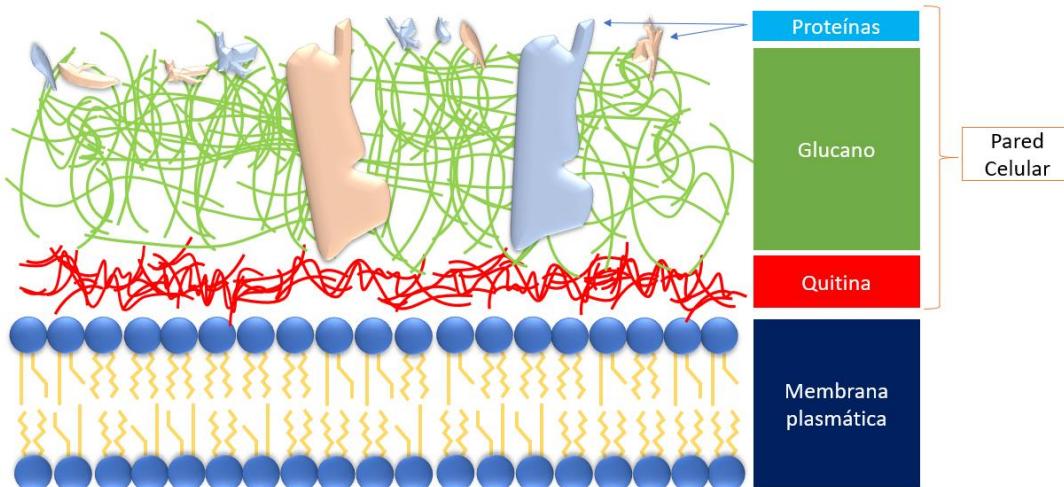


Figura 1. Estructura de la pared celular de los hongos.

La quitina es el polímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa. Este polisacárido lineal se compone de subunidades de N-acetilglucosamina unidos por enlaces β -1,4 y desempeña un papel fundamental para la fabricación de tejidos de soporte o protección de gran resistencia para un elevado número de organismos. La quitina se puede encontrar en estructuras del exoesqueleto de insectos, arácnidos, miriápodos, crustáceos, braquiópodos y en la concha de moluscos, así como en nemátodos, anélidos y otros invertebrados. Asimismo, como se comentó anteriormente, este polisacárido es un componente de las paredes celulares de bastantes hongos, pudiendo encontrarse también en determinados tunicados y algas clorofíceas (Castro et al., 2011; Dukare et al., 2019; Villarreal-Delgado et al., 2018). La enzima utilizada por los agentes de biocontrol para este polímero es la quitinasa, la cual degrada la quitina en N-acetilglucosamina rompiendo los enlaces glucosídicos del biopolímero, siendo utilizado por la bacteria como fuente de carbono y nitrógeno (Halimahtussadiyah et al., 2017; Horak et al., 2019). Por otra parte, indirectamente la acción de las quitininas promueve la activación de mecanismos de defensa por parte del hospedador. Se ha observado que cuando la quitina es degradada, los oligosacáridos que se liberan al medio desencadenan mecanismos de resistencia sistémica inducida (ISR) como la activación de genes que codifican proteínas con una función protectora, entre ellas quitininas vegetales y la generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales a su vez promueven la expresión de más genes de resistencia (Lastochkina et al., 2019).

Por otra parte, los glucanos son los polisacáridos de la glucosa que reticulan los polímeros de quitina. Los glucanos se clasifican por los enlaces químicos de las subunidades de glucosa en:

α -glucanos y β -glucanos. Los α -glucanos se caracterizan por presentar enlaces α -(1,3) y/o α -(1,4), funcionando como componentes de la matriz. En cambio, los β -glucanos, son característicos por presentar enlaces β -(1,3), β -(1,4) o β -(1,6), y ejercen su función proporcionando rigidez a la pared celular. El componente estructural más abundante en la paredes de los hongos es el β -(1,3)-D-glucano, al cual se unen covalentemente el resto de componentes de la pared (Daguerre et al., 2014; Garcia-Rubio et al., 2020). Las enzimas que utilizan los agentes de biocontrol para degradar estos compuestos son las glucanasas, en concreto las β -1,3-glucanasas y β -1,4-glucanasas (Narasimhan et al., 2013).

c) Síntesis de antibióticos y bacteriocinas

Los antibióticos se pueden definir como un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular sintetizados por bacterias que son capaces de inhibir o reducir el crecimiento y desarrollo de otros microorganismos por numerosas vías. Hay estudios que demuestran que algunas bacterias antagonistas producen una amplia gama de antibióticos que son eficaces contra varios fitopatógenos, como por ejemplo *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botryosphaeria ribis*, *Helminthosporium maydis*, *Phomopsis gossypii* y *Colletotrichum gloeos* entre otros muchos (Lastochkina et al., 2019). Algunos de estos antibióticos sirven tanto para controlar la infección, puesto que algunos de ellos son fungicidas (Arora, 2015); como para eliminar al fitopatógeno que está alterando la fruta, como sucede con la siringomicina liberada por *P. syringae* (Sharma et al., 2009).

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados por las bacterias de una longitud comprendida entre 12-50 aminoácidos y que pueden adquirir una gran diversidad estructural. Generalmente, estos compuestos suelen ser activos contra cepas de bacterias relacionadas íntimamente con las bacterias productoras (Olishevskaya et al., 2019), pero también pueden ejercer efectos contra otros microorganismos que no guardan relación (Horak et al., 2019). Algunos ejemplos de bacteriocinas pueden ser: la subtilina sintetizada por *B. subtilis*, la coagulina que produce *B. coagulans*, la entomicina 9 de *B. thuringiensis* o la amilolisisa de *B. amyloliquefaciens*. Las bacteriocinas ofrecen una serie de ventajas, que en la práctica, las posicionan por delante de los antibióticos, principalmente porque es más difícil que los microorganismos adquieran resistencia, especialmente a los antibióticos dirigidos a lípidos II, por sus múltiples mecanismos de acción. Adicionalmente, estos compuestos son económicos, los hay tanto de amplio como de estrecho espectro y carecen de efectos tóxicos o inmunogénicos (Olishevskaya et al., 2019).

d) Lipopéptidos y policétidos

Como su nombre indica, los **lipopéptidos** son ácidos grasos unidos a cadenas peptídicas de longitud variable, las cuales pueden ser lineales, cílicas o mixtas (Lastochkina et al., 2019). Su biosíntesis está regulada por sintetasas de péptidos no ribosomales (Olishevska et al., 2019) y en función de la secuencia de aminoácidos que los componen y las ramas de ácidos grasos a los que se unen, los lipopéptidos cílicos se pueden clasificar en: **surfactinas, iturinas y fengicinas**. La acción de estos compuestos ha sido ampliamente estudiada, aplicándose en el biocontrol por su capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos al impedir la germinación de esporas, la formación de tubos de brotación y la ramificación de hifas. Esto se consigue por la naturaleza anfipática de los lipopéptidos, los cuales se integran en las membranas de los hongos y forman poros, interrumpiendo el funcionamiento normal de esta estructura. Asimismo, se han visto efectos sinérgicos de determinados lipopéptidos cuando se aplica de manera conjunta. De esta forma la fengicina es capaz de activar la expresión de genes de protección en el hospedador y micosubtilina promueve la síntesis de peróxido de hidrógeno y otros componentes de defensa contra los patógenos (Lastochkina et al., 2019). Además, otro aspecto favorable es su baja probabilidad de desarrollar resistencia, además de poseer una baja toxicidad o una alta biodegradabilidad (Olishevska et al., 2019).

En cambio, los **policétidos** son metabolitos secundarios los cuales muchos de ellos poseen compuestos antibacterianos bioactivos, pudiendo actuar también como inmunosupresores y antitumorales entre otros (Chen et al., 2006). La biosíntesis de estos compuestos se realiza por sucesivas condensaciones de ácidos carboxílicos por la acción de las sintetasas de péptidos policétidos y sus mecanismos de acción se centran principalmente en la inhibición selectiva de la biosíntesis de proteínas en procariotas como es el caso de la **bacilina, dificidina o la macrolactina** (Horak et al., 2019; Olishevska et al., 2019).

Es común que al mecanismo de acción por medio de estos compuestos reciba el nombre de antibiosis (Ferraz et al., 2019; Lahlali et al., 2020; Touré et al., 2004).

e) Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles son compuestos lipofílicos de bajo peso molecular sintetizados por bacterias, levaduras y algunos hongos que han demostrado tener efectos inhibitorios en el crecimiento de fitopatógenos de origen fúngico (Dukare et al., 2019), y que se expanden muy fácilmente por el aire y los poros del suelo (Lastochkina et al., 2019) por lo que es frecuente que se utilicen por los agentes de biocontrol para controlar las enfermedades. En observaciones a microscopía electrónica se logró detectar alteraciones en las hifas tras la exposición de

compuestos volátiles. Dichas alteraciones se produjeron en las vacuolas de las células de los hongos, se produjo una permeabilización de las membranas y una hinchazón de las hifas. Estas modificaciones morfológicas son las responsables de que posteriormente sea imposible la germinación de conidios o la formación de apresorios (Dukare et al., 2019). Adicionalmente, se sabe que los compuestos volátiles son capaces de promover el crecimiento de las plantas así como inducir resistencia a las enfermedades (Liu & Zhang, 2015). No obstante, la principal ventaja de estos compuestos también supone su principal limitación, puesto que al propagarse sin problemas por el aire, facilitando la biofumigación, si tienen lugar corrientes de aire vigorosas se limitaría drásticamente la eficacia del tratamiento (Calvo et al., 2020).

f) Estimulación de resistencia sistémica inducida

Las plantas también pueden poner en marcha varios mecanismos defensivos para combatir infecciones. De todos ellos, el que más destaca en el biocontrol es la ISR (Resistencia Sistémica Inducida). La ISR es un estado fisiológico de resistencia inducido por agentes biológicos o químicos que protegen a la planta de ataques por fitopatógenos tanto unicelulares (bacterias y hongos principalmente) como pluricelulares (insectos, nemátodos, etc.). Asimismo, este estado fisiológico de defensa puede ser puesto en marcha tanto por la propia planta, por ejemplo por el ataque de insectos, como por la acción de determinados microorganismos beneficiosos o incluso por compuestos químicos que bien sintetizan estos seres vivos o bien que se aplican por parte del ser humano. Todos estos estímulos desencadenan rutas de señalización mediadas por fitohormonas, como el ácido jasmónico y el etileno, que ponen en marcha este estado fisiológico. Una vez activada, la ISR se expresa tanto local como sistémicamente por todos los tejidos vegetales (Pieterse et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, este estado fisiológico de defensa puede ser puesto en marcha por la acción de determinados microorganismos, como las rizobacterias (Li et al., 2015). Este grupo de rizobacterias que colonizan las raíces de muchas plantas, también estimulan el crecimiento de estas, por lo que se les ha asignado el nombre de PGPR. Algunos ejemplos de estas bacterias son *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis* entre otras muchas. Se ha observado que la colonización radicular de muchos PGPR es eficaz para prevenir varias enfermedades, incluso en las partes aéreas de la planta por medio de la ISR (Peng et al., 2019).

Adicionalmente, se sabe que algunos metabolitos antimicrobianos, como los lipopéptidos (iturina y fengicina, por ejemplo) o los compuestos volátiles anteriormente mencionados, son

capaces de inducir la resistencia en plantas (Lastochkina et al., 2019). Aún se desconoce si el huésped posee receptores específicos de lipopéptidos que se activen para desencadenar esta respuesta, pero se cree algunos lipopéptidos pueden inducir canales transitorios en la membrana plasmática del huésped y que una vez en el interior celular, activa varias rutas metabólicas que derivan en una mayor defensa por parte de la planta (Pérez-García et al., 2011). En cambio, otros autores consideran que la ISR se produce por la acumulación de fitoalexinas, los cuales son una serie de compuestos antimicrobianos de amplio espectro sintetizados por la propia planta (Lastochkina et al., 2019).

Un caso similar, en el que se desconoce el método por el que se induce la ISR, ocurre con los sideróforos. Se ha observado que algunas pioverdinas sintetizadas por *Pseudomonas* desencadenan la ISR en determinadas plantas contra varios fitopatógenos, pero el mecanismo exacto se desconoce y depende de varios factores como el tipo de sideróforo y los patógenos en cuestión. Se ha propuesto un método indirecto en el que los microorganismos productores de sideróforos generan una deficiencia transitoria de hierro, la cual activará posteriormente la inmunidad de la planta. No obstante, se ha observado que la pioverdina también puede perjudicar al huésped en presencia de *Botrytis cinerea* por crear las condiciones deficientes de hierro. Para este último caso, los autores han propuesto que el efecto que se ejerce bajo condiciones deficientes de hierro dependerá del estado fisiológico de la planta. De esta forma, si la planta se encuentra en un estado fisiológico de crecimiento, se activarán una serie de genes que promuevan el crecimiento e inhiban la inmunidad, así que aunque esté siendo atacada por un patógeno, la planta prioriza el crecimiento, por lo que la deficiencia de hierro y la actividad del patógeno repercutirán negativamente en la planta (Trapet et al., 2016).

Por otro lado, se ha demostrado que compuestos volátiles como la acetoína también pueden activar la ISR, reduciendo la gravedad de la infección producida por *P. syringae* en *Arabidopsis thaliana* con concentraciones superiores a 5 g/L por mejorar la actividad de las enzimas peroxidasa, polifenol oxidasa y fenilalanina amonio liasa y por la acumulación de peróxido de hidrógeno en las hojas (Peng et al., 2019).

Al igual que las PGPR promueven la síntesis de fitohormonas involucradas en la ISR, algunas bacterias fitopatógenas también pueden hacerlo, incluso catabolizar dichas hormonas, con la finalidad de suprimir los sistemas de defensa de la planta. Asimismo, la ISR estimulado por las PGPR permanece activo en los huéspedes durante un periodo de tiempo prolongado, incluso en condiciones de almacenamiento, sobre todo por la acumulación de especies reactivas de

oxígeno y por la síntesis de factores de transcripción que mantienen activos los genes de protección de plantas (Lastochkina et al., 2019).

1.4 El género *Bacillus* como agente de biocontrol

El género *Bacillus* se ha considerado un prometedor agente de biocontrol debido a que es capaz de formar esporas, promueve el crecimiento de las plantas y ejerce efectos antifúngicos gracias a la síntesis y liberación de péptidos antimicrobianos, como los **lipopéptidos** cíclicos iturina, fengicina, surfactina o bacilomicina (Kushwaha et al., 2019), policétidos (Chen et al., 2009; Olishevská et al., 2019), **enzimas líticas** como las quitinasas y glucanasas (Villarreal-Delgado et al., 2018), **compuestos volátiles** (Lastochkina et al., 2019; Peng et al., 2019, Calvo et al., 2020) y **sideróforos** (Ali & Vidhale, 2013). Aunque puede variar entre especies, actualmente se sabe que las bacterias de este género destinan aproximadamente entre un 5-10% de su genoma a la síntesis los compuestos antimicrobianos mencionados anteriormente. Asimismo, la expresión de estos genes y la síntesis de algunos de estos compuestos puede aumentarse en la presencia de determinados patógenos (Lastochkina et al., 2019). Por ejemplo, se ha observado que *B. amyloliquefaciens* aumenta significativamente la síntesis de los lipopéptidos iturina y fengicina tras la exposición de patógenos como *Pythium aphanidermatum* y *F. oxysporum* (Cawoy et al., 2015).

a) *Bacillus velezensis*

Ruiz-García et al. (2005) fueron los primeros en aislar e identificar a *B. velezensis* como una nueva especie de *Bacillus* a partir de muestras del río Vélez en Málaga, España. Estos autores encontraron que estaba emparentada con otros agentes de biocontrol del mismo género como *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens* (Ruiz-García et al., 2005). No obstante, la cepa que más fama ha adquirido es *B. amyloliquefaciens* subsp *plantarum* FZB42, la cual ha sido reclasificada como *B. velezensis*. Se ha investigado bastante sobre esta bacteria y actualmente se sabe que posee una amplia batería de genes destinados a la síntesis de compuestos antimicrobianos, concretamente lipopéptidos, policétidos y bacteriocinas (Wu et al., 2015).

Un ejemplo que demuestra el efecto antagónico de *B. velezensis* es contra el patógeno *Erwinia amylovora*, responsable del tizón de fuego bacteriano en árboles frutales. Este patógeno vio limitado su crecimiento en flores por la síntesis de los policétidos dificidina, bacilina y macrolactina por parte de la bacteria (Chen et al., 2009). Por otra parte, este agente de biocontrol también ha demostrado ser eficaz contra hongos fitopatógenos como *F. oxysporum* por su alta producción del lipopéptido bacilomicina D (J. Liu et al., 2011) y contra el hongo *Verticillium*

dahliae en ensayos *in vitro*, cuando se cultivó la bacteria y el hongo conjuntamente, por la liberación al medio de compuestos volátiles, sideróforos, enzimas líticas, lipopéptidos y policétidos, además de promover el crecimiento de plantas de tomate *in vivo* tanto con la presencia como la ausencia del patógeno (Dhouib et al., 2019).

Adicionalmente, se ha demostrado que *B. velezensis* sintetiza múltiples compuestos con un efecto antagonista contra fitopatógenos, ya que además de los policétidos bacilinas, dificidinas y macrolactinas anteriormente comentados (Chen et al., 2009; Rabbee et al., 2019), produce compuestos volátiles como acetoína y 2,3-butanodiol, que además de estimular el crecimiento vegetal inducen la resistencia sistémica (Peng et al., 2019). También sintetiza el sideróforo bacilibactina y la bacteriocina bacilisina (Rabbee et al., 2019).

2. Antecedentes y objetivos

Las cepas de *Bacillus velezensis* BUZ-14, I3 e I5 se aislaron de la superficie de melocotones y se identificaron mediante la secuenciación de la región de RNAr 16S y la secuencia del gen *gyrB* por el Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España (Calvo et al., 2019).

Calvo et al. (2017) han demostrado el efecto antifúngico de la cepa BUZ-14. Estos autores observaron que es capaz de inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de los patógenos *B. cinerea*, *Monilinia fruticola*, *M. laxa*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum* y *P. italicum*, tanto las células vegetativas y las endosporas de la cepa bacteriana como los sobrenadantes libres de células, siendo estos últimos los que demostraron tener una inhibición más fuerte. Asimismo, sugieren que estos hallazgos son beneficiosos para en un futuro poder desarrollar formulaciones comerciales, ya que las endosporas son más estables y resistentes que las células vegetativas. Por otra parte, también discuten sobre el posible uso preventivo que se le podría dar a esta bacteria para controlar las enfermedades en las frutas causadas por las especies de los géneros *Penicillium*, así como el efecto curativo sobre las especies de los géneros *Monilinia* al ser las más susceptibles a los efectos antagónicos de BUZ-14.

Posteriormente, Calvo et al. (2019) observaron que esta bacteria es capaz de ejercer su efecto antagónico por la producción de los lipopéptidos surfactina, fengicina e iturina, teniendo cada uno varias isoformas. De todos ellos, la iturina A se identificó como el principal responsable de la actividad antagonista, siendo eficaz incluso a bajas concentraciones.

Finalmente, las últimas investigaciones han demostrado que las tres cepas también producen compuestos volátiles capaces de inhibir el crecimiento en ensayos *in vitro* de los hongos patógenos que han utilizado en las investigaciones anteriores (Calvo et al., 2020). A las cepas BUZ-14 e I3 se le han identificado respectivamente 16 y 14 compuestos volátiles diferentes, aunque no todos son producidos en la misma concentración. Eliminando aquellos compuestos que presentaban un mal olor, por presentar características tóxicas, concentraciones mínimas inhibitorias altas o no mostraban efectos inhibitorios *in vivo*, destacaron los compuestos volátiles diacetilo y benzaldehído como los más eficaces y con la menor concentración mínima inhibitoria.

En base a lo anteriormente expuesto, se ha propuesto como objetivo general del presente trabajo realizar un estudio complementario a los diversos mecanismos de acción implicados en

la actividad antifúngica de estas tres cepas de *Bacillus velezensis*. Por ello se estudiará:

1. La capacidad de quelar el hierro por medio de sideróforos.
2. La producción de enzimas líticas (quitinasas y glucanasas).
3. La interacción de los microorganismos de biocontrol con los mohos fitopatógenos en cuanto a la competición por espacio y nutrientes.

Asimismo, en el Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal nunca se habían realizado ensayos para la determinación de la capacidad de quelar el hierro ni para la actividad enzimática. Por lo tanto, en primer lugar se procedió a ultimar toda la metodología a seguir para cada una de las respectivas pruebas. Para ello se buscaron en la literatura científica diversas metodologías, se llevaron a cabo y se seleccionaron aquellas que presentaron los mejores resultados en varios ensayos preliminares tras variar factores como la temperatura y tiempo de incubación, las concentraciones de los reactivos y de los componentes de los medios de cultivos, entre otros. Cuando se optimizaron todos estos factores se puso en marcha la metodología con la que se obtuvieron los resultados que se presentan en el siguiente trabajo.

3. Material y Métodos

3.1 Microorganismos utilizados

a) Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este Trabajo de Fin de Máster se utilizaron las cepas de *Bacillus velezensis* BUZ-14, I3 e I5, las cuales fueron aisladas e identificadas (Calvo et al., 2019; Calvo et al., 2020) por el Grupo de Investigación de Alimentos de Origen Vegetal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, España. Además, como microorganismo control positivo para la determinación de la producción de sideróforos se empleó *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525). Las soluciones bacterianas se obtuvieron tras la incubación de una perla de criovial de cada una de las cepas a 30 °C durante 24 h en medio TSB (Caldo Triptona Soja, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, U.K.). Para el ajuste de concentraciones se hicieron diluciones seriadas en agua de peptona 0,1 % y posteriormente se sembraron 100 µL en placas de TSA (Triptona Soja Agar) para comprobar la concentración. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h y se realizó el recuento, expresando el resultado en UFC (Unidades Formadoras de Colonia)/mL.

b) Mohos fitopatógenos

Las cepas de mohos fitopatógenos empleadas en este estudio fueron *Botrytis cinerea* VG1, *Penicillium digitatum* VG 20 y *P. italicum* VG 101 pertenecientes a la colección del Grupo de Investigación Alimentos de Origen Vegetal. Las cepas fueron sembradas en medio PDA (Patata Dextrosa Agar, Oxoid) e incubadas a 25 °C por 10 d. Las suspensiones de esporas se obtuvieron por rascado de la superficie del medio y suspensión en 0,1% de agua de peptona con 0,05 % Tween 80. Posteriormente se determinó su concentración por conteo en un hemocitómetro y se ajustó por dilución en caldo patata dextrosa (PDB, Oxoid) a las concentraciones empleadas para el estudio.

3.2 Medios de cultivo

a) Medio para la producción de sideróforos

Para determinar la producción de sideróforos se siguió la metodología propuesta por Louden et al. (2011). Para preparar este medio se disolvieron, por una parte 0,06 g del reactivo CAS (Chrome Azurol S) en 50 mL de agua destilada (Solución I), por otra parte 0.0027 g de FeCl₃ – 6 H₂O en 10 mL de HCl (10 mM) (Solución II); y por otra parte 0.073 g de HDTMA (bromuro

de hexadeciltrimetilamonio) en 40 mL de agua destilada (Solución III). A continuación, se mezcló la Solución I con 9 mL de la Solución II, se agitó y posteriormente se añadió la Solución III. Se agitó nuevamente y se autoclavó.

En segundo lugar, se prepararon 100 mL de MM9 (Medio Mínimo 9), compuesto por KH_2PO_4 (3%), NaCl (5%), NH_4Cl (10%). Paralelamente, se preparó una solución de glucosa 20%, una solución de NaOH 17% y una solución de peptona 11%. A esta última se le añadió 8-hidroxiquinolona disuelta en cloroformo (3%) para eliminar cualquier molécula de hierro. Una vez añadido, se esterilizó la solución haciéndola pasar por un filtro (0,45 μm).

A continuación, se mezclaron los 100 mL de MM9 con 750 mL de agua, y en agitación constante y midiendo el pH, se fue disolviendo 32,24 g de PIPES (ácido 2-etanosulfónico). A medida que se fue disolviendo, descendió el pH, por lo que con ayuda de una pipeta Pasteur se fue añadiendo lentamente la solución de NaOH 17% hasta alcanzar un pH de 6,5. Posteriormente, se añadió 15 g de agar, se hirvió y se autoclavó. Se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 50 °C aproximadamente y se añadió 30 mL de la solución de peptona y 10 ml de la solución de glucosa 20%. Finalmente, se agitó cuidadosamente para no formar espuma y se vertió en placas de Petri.

b) Medio de producción enzimática para determinar la actividad quitinasa por espectrofotometría

El medio de producción enzimático para la actividad quitinasa se preparó con los ingredientes: peptona (0,5%), quitina (1%), extracto de carne (0,3%), cloruro sódico (0,5%). Para los ensayos, se pesaron estos componentes para un volumen de 150 mL en matraces Erlenmeyer y se esterilizó. Se eligió dicho medio de cultivo en base a los buenos resultados obtenidos por Narasimhan et al. (2013), cuyo trabajo se centra en la actividad enzimática de una cepa de *B. subtilis*.

c) Medio de producción enzimática para determinar la actividad β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa por espectrofotometría

Para preparar estos medios de producción enzimática se procedió de la misma forma que anteriormente para la quitinasa, sustituyendo la quitina por extracto de levadura (1%) en el caso de la β -1,3-glucanasa y por carboximetilcelulosa (1%) en el caso de β -1,4-glucanasa. La razón de la elección de estos medios fue la misma que para el caso de la quitinasa y consultando la misma bibliografía.

d) Medio de producción enzimática para determinar la actividad quitinasa por ensayos en placa

Otra forma de determinar la actividad quitinasa que se realizó fue a través de ensayos en placa siguiendo la metodología descrita por Nurdebyandaru et al. (2010). Para ello, se preparó el medio compuesto por: quitina coloidal (1%), $\text{MgSO}_4 \text{ - 7 H}_2\text{O}$ (0,1%), KH_2PO_4 (0,02%), extracto de levadura (0,1%) y agar (1,5%). A continuación se esterilizó y se vertió en placas estériles bajo condiciones de asepsia.

e) Medio de producción enzimática para determinar la actividad la actividad β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa por ensayos en placa

Al igual que en el caso anterior, para las actividades β -1,3-glucanana y β -1,4-glucanana también se realizaron ensayos en placa. Para estas pruebas se siguió la metodología descrita por Renwick et al. (1991). En este ensayo se preparó el medio compuesto por: CaCO_3 (0,002%), $\text{FeSO}_4 \text{ - 7 H}_2\text{O}$ (0,001%), KCl (0,17%), $\text{MgSO}_4 \text{ - 7 H}_2\text{O}$ (0,005%), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ - 12 H}_2\text{O}$ (0,4%) y agar (1,5%). Además, se le añadió extracto de levadura (1%) o carboximetilcelulosa (1%) en el caso de la β -1,3-glucanasa y la β -1,4-glucanasa respectivamente. Posteriormente se esterilizó y se vertió en placas estériles bajo condiciones de asepsia.

3.3 Determinación de la producción de sideróforos

En primer lugar, se inocularon placas de agar nutritivo con 10 μL de las cepas bacterianas con una concentración de 10^6 UFC/mL y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Como control positivo se utilizó *Pseudomonas fluorescens*, ya que en la bibliografía se observó que eran productoras de sideróforos (Renwick et al., 1991; Trapet et al., 2016). Una vez preparado el medio de cultivo para determinar la producción de sideróforos (véase apartado 3.2a), se vertió en las placas de agar nutritivo. Cuando se solidificó la segunda capa de agar, se volvió a incubar durante 48 h a 30 °C. El medio para la determinación de producción de sideróforos utiliza como indicador los compuestos CAS y HDTMA. De esta forma, cuando el CAS y el HDTMA están unidos al hierro formando complejos el medio presenta una coloración azulada. Sin embargo, si los microorganismos que se cultivan en el son productoras de sideróforos, se elimina el hierro del medio y los complejos CAS-HDTMA adquirirán otra tonalidad, indicando que el hierro ha sido eliminado y formándose halos alrededor de la colonia de un color distinto al del medio (Louden et al., 2011). Para realizar una estimación de la producción de sideróforos, se midieron los halos producidos por las bacterias en el medio con un pie de rey.

3.4 Determinación de la producción de enzimas líticas

a) Determinación de la actividad enzimática por espectrofotometría

Para valorar la producción de enzimas líticas por espectrofotometría se tomó como referencia la metodología descrita por Narasimhan et al. (2013) ligeramente modificada. En primer lugar, se prepararon los medios de producción enzimáticos descritos anteriormente (véase apartados 3.2b y 3.2c). Una vez esterilizados los matraces Erlenmeyer, se inoculó 200 μ L de cada microorganismo con una concentración de 10^6 UFC/mL en los matraces correspondientes como se indica en la **Figura 2**. Acto seguido, se llevaron a incubar a 30 °C y 120 rpm, tomando alícuotas de 10 mL a las 24 y 72 h. Las alícuotas se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4 °C, encontrándose las enzimas en el sobrenadante. A continuación se incubaron en un baño termostático, previamente calentado a 50 °C, tubos que contenían 1 mL de extracto enzimático con 1 mL de la solución de sustrato correspondiente (quitina 1% en tampón fosfato 0,1 M pH = 6,5; extracto de levadura 1% o carboximetilcelulosa 1% para la quitinasa, β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa respectivamente). El tiempo de incubación fue de 1 h para la quitinasa y de media h para la β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa.

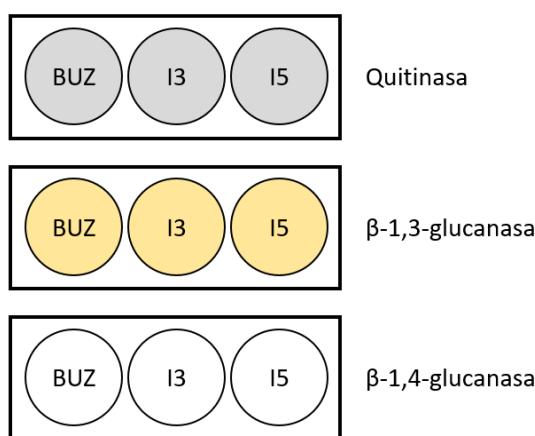


Figura 2. Esquema de los matraces con los medios de producción enzimáticos y microorganismos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación se añadió 1 mL del reactivo DNS a cada tubo y las muestras se llevaron a ebullición durante 10 min. Seguidamente, se añadieron 10 mL de agua destilada a cada tubo, se tomaron muestras de 1 mL en cubetas para espectrofotometría y se leyó la absorbancia a 540 nm. El reactivo DNS reaccionará con los azúcares reductores producidos tras la actividad enzimática (siendo el azúcar reductor la N-acetilglucosamina para la quitinasa y la glucosa para la β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa), formando un producto

coloreado, variando la intensidad de color de amarillo a rojo ladrillo en función de la concentración de azúcares reductores presentes en el tubo de ensayo. De esta forma, el color que se produzca tras la incubación adquirirá una tonalidad amarilla cuando exista una baja concentración de azúcares en el tubo de ensayo o una tonalidad rojo ladrillo cuando hay una alta concentración de azúcares en el tubo. Por lo tanto, cuanta más actividad presenten las enzimas, más azúcares reductores se generarán y más oscuro será el color que se desarrolle tras la adición del reactivo DNS.

Asimismo, antes de realizar las incubaciones de las enzimas con sus respectivos sustratos se preparó una recta patrón con concentraciones que aumentaban progresivamente en un rango de 0,1 a 1,9 g/ mL de N-acetilglucosamina para la quitinasa y de glucosa para la β -1,3-glucanasa y la β -1,4-glucanasa para poder cuantificar la degradación enzimática en cada caso (**Figura 3**).

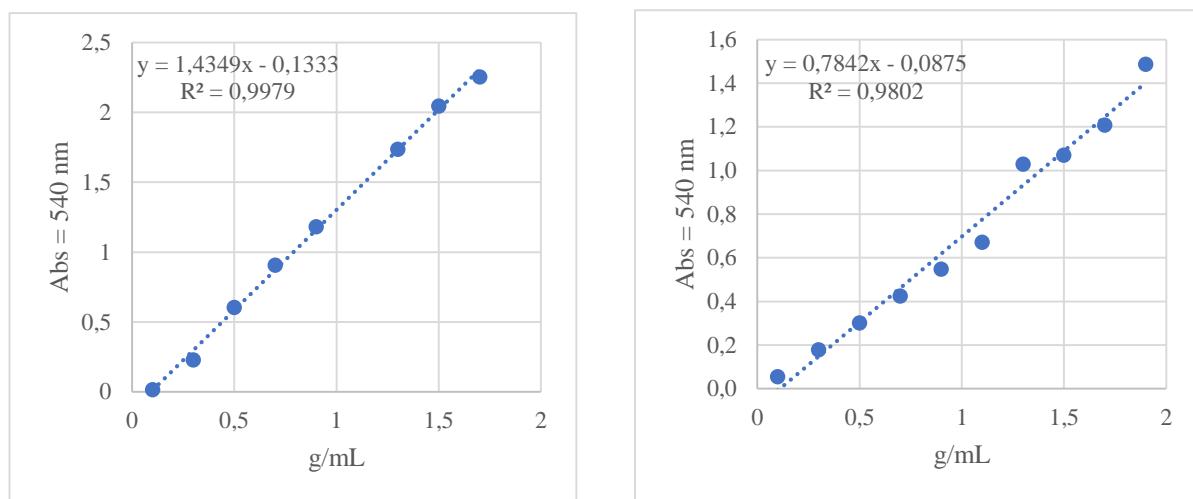


Figura 3. Izquierda: recta patrón de N-acetilglucosamina para calcular las actividades enzimáticas de la quitinasa. Derecha: recta patrón de glucosa para calcular las actividades enzimáticas de la β -1,3-glucanasa y la β -1,4-glucanasa.

Cada ensayo para cada enzima y microorganismo se realizó por triplicado en cada punto de análisis (24 y 72 h). Para los ensayos de las tres enzimas se definió una unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μ mol de sustrato por minuto. Una vez convertidos los valores de absorbancia a 540 nm a g/mL con ayuda de la recta patrón, se calcularon los moles por mililitro de cada azúcar con la ayuda de la masa molar (N-acetilglucosamina: 221,21 g/mol; Glucosa: 180,16 g/mol). Finalmente, los resultados se convirtieron a μ mol/mL, con una regla de tres se calcularon las unidades enzimáticas y el resultado se dividió por el tiempo de incubación de cada enzima (quitinasa: 60 min; β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa: 30 min), para expresarlo en $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

b) Determinación de la actividad enzimática por ensayos en placa

Para la determinación de la actividad de enzimas líticas por ensayos en placa por parte de BUZ-14, I3 e I5, se sembraron en cuatro puntos de las placas 10 μ L de las cepas bacterianas con una concentración de 10^6 UFC/mL. Una vez se hubiera absorbido el inóculo, se incubaron las placas a 40 °C durante 48 h en el caso de la determinación de la actividad quitinasa y a 30 °C durante 72 h en el caso de la determinación de la actividad β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa. Una vez finalizado el tiempo de incubación se debería observar un halo alrededor de las colonias indicando la degradación de la quitina por la acción de la quitinasa. Asimismo, en el caso de la β -1,3-glucanasa y la β -1,4-glucanasa, una vez finalizado el tiempo de incubación, debería verse un halo alrededor de la colonia tras la adición de una solución de rojo Congo (0,1%) como consecuencia de la degradación de glucanos presentes en el medio por la acción de las enzimas β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa. Cada ensayo para cada enzima y microorganismo se realizó por triplicado.

3.5 *Crecimiento de los agentes de biocontrol en fruta*

Para evaluar el crecimiento y desarrollo de BUZ-14, I3 e I5 en los productos vegetales se realizó un recuento microbiológico. Para ello, las frutas (uva, naranja y limón) se sumergieron en una solución de NaClO₂ al 0,5% durante 1 minuto y en una solución de etanol al 70% durante 5 minutos, con la finalidad de eliminar cualquier residuo de fungicida o restos biológicos que pudieran permanecer en ellas. A continuación, se realizaron incisiones en la fruta con la punta de una pipeta (**Figura 4**), se extrajo el jugo de la incisión y se inocularon 10 μ l de las cepas bacterianas con una concentración de 10^6 UFC/mL. La fruta se dejó reposar durante media h para conseguir una buena absorción del inóculo y tras ello se inocularon 10 μ L de los mohos fitopatógenos (*P. italicum* en naranja, *P. digitatum* en limón y *B. cinerea* en uva).

Los frutos se incubaron durante 5 d a 20 °C y se realizó el recuento a las 0, 24, 48, 72 y 96 h. La toma de muestra se realizó con ayuda de un bisturí, con el que se separó una porción de unos 2,5 cm² alrededor de la herida en caso de los limones y las naranjas. En el caso de las 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 1,5 minutos a 230 rpm. Se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona 0.1% que se sembraron en TSA para su posterior recuento tras 24 h a 30 °C. Se analizaron 3 frutas por día de análisis y agente de biocontrol. Paralelamente también se determinó la capacidad de inhibición ejercida por los agentes sobre el crecimiento fúngico. Para ello, diariamente se

observó la presencia de signos de podredumbre en las heridas inoculadas y se determinó el diámetro de las lesiones.



Figura 4. Detalle de las incisiones realizadas en las distintas frutas para la determinación de la capacidad de crecimiento de los agentes de biocontrol.

3.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico a los resultados obtenidos utilizando el software PSPP versión 1.2.0 (GNU PSPP, Boston, EE. UU.). Las diferencias en los valores medios de los resultados obtenidos se analizaron con un ANOVA (Análisis de Varianza) de una vía y se separaron mediante la prueba de diferencia significativa de Tukey ($p < 0,05$).

4. Resultados y Discusión

4.1 Capacidad de quelar el hierro

Las bacterias productoras de sideróforos destacan por su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas. No obstante, como se mencionó anteriormente, en el biocontrol estos microorganismos se emplean para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos al privarles del hierro, un micronutriente que necesitan para su metabolismo (Azizoglu, 2019). Además, los sideróforos pueden actuar como señales que induzcan a la planta a activar mecanismos de resistencias (Lastochkina et al., 2019). Por tanto, la síntesis de estos compuestos es una característica a tener en cuenta en los agentes de biocontrol, además de ser útil para comparar antagonistas de distintas especies (Dukare et al., 2019; Lastochkina et al., 2019).

Tras los estudios realizados se observó que todas las cepas estudiadas demostraron ser productoras de sideróforos, ya que en todos los casos se produjo un cambio de color en el agar, indicando que el hierro había sido eliminado (**Figura 5**). El color que se produjo en el medio de producción de sideróforos fue amarillo en todas las bacterias durante todos los ensayos realizados. Estos resultados contrastan con otras especies de *Bacillus*, como *B. subtilis* por ejemplo, que producen halos de color naranja, habiéndose identificado como un sideróforo del tipo catecolato (Yu et al., 2011). Por otra parte, se sabe que el sideróforo que sintetiza *P. fluorescens* es del tipo hidroxamato (Ali & Vidhale, 2013; Arora & Verma, 2017), al igual que otras bacterias del mismo género (Arora, 2015; Khan et al., 2018). El hecho de que los sideróforos producidos por las cepas objeto de estudio sean del mismo color que el control positivo induce a pensar que el sideróforo que sintetizan BUZ-14, I3 e I5 podrían ser del tipo hidroxamato. Si el sideróforo que estas cepas bacterianas es del tipo comentado podría suponer una ventaja a la hora de fabricar formulados para aplicarse en el campo, puesto que estos tipos de sideróforos, además de por su estabilidad, destacan por su alta capacidad para quelar el hierro del suelo (Sayyed & Chincholkar, 2006), así como por ser hidrofílicos y promover el crecimiento en las plantas (Khan et al., 2018).

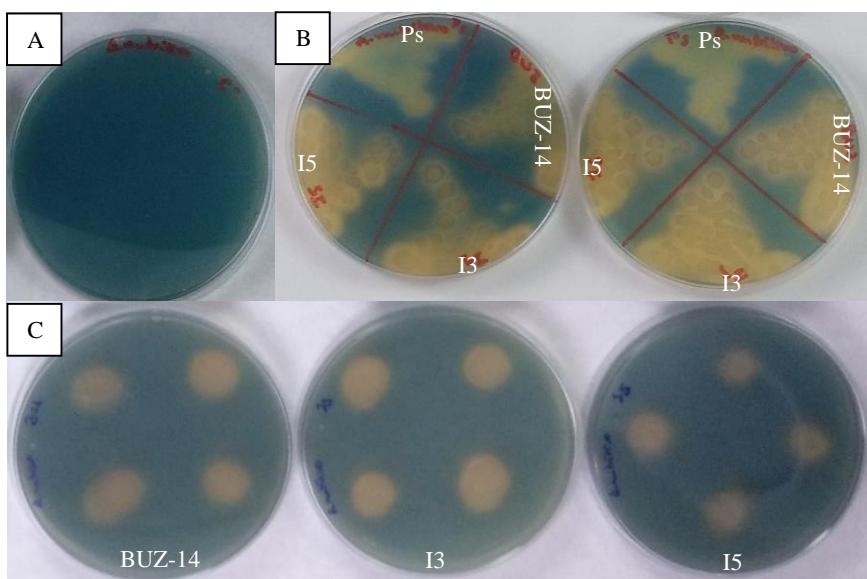


Figura 5. Ensayos en placa para determinar la producción de sideróforos. A: control negativo. B: ensayo en placa para la valoración cualitativa de la producción de sideróforos por *P. fluorescens* (Ps; control positivo) y las cepas BUZ-14, I3 e I5. C: ensayos en placa para medir los halos producidos al quelar el hierro por la producción de sideróforos. De izquierda a derecha: BUZ-14, I3 e I5.

Asimismo, la medición de los halos producidos por cada bacteria permitió comparar la producción de sideróforos entre las cepas y la bacteria control (**Figura 6**). La producción de sideróforos siempre fue mayor en las cepas de *Bacillus* estudiadas que en el microorganismo control (*P. fluorescens*), detectándose además diferencias estadísticamente significativas con la cepa BUZ-14. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre las cepas de *Bacillus*, las cuales presentaron unos halos medios de 1,86, 1,69 y 1,78 cm para BUZ-14, I3 e I5 respectivamente.

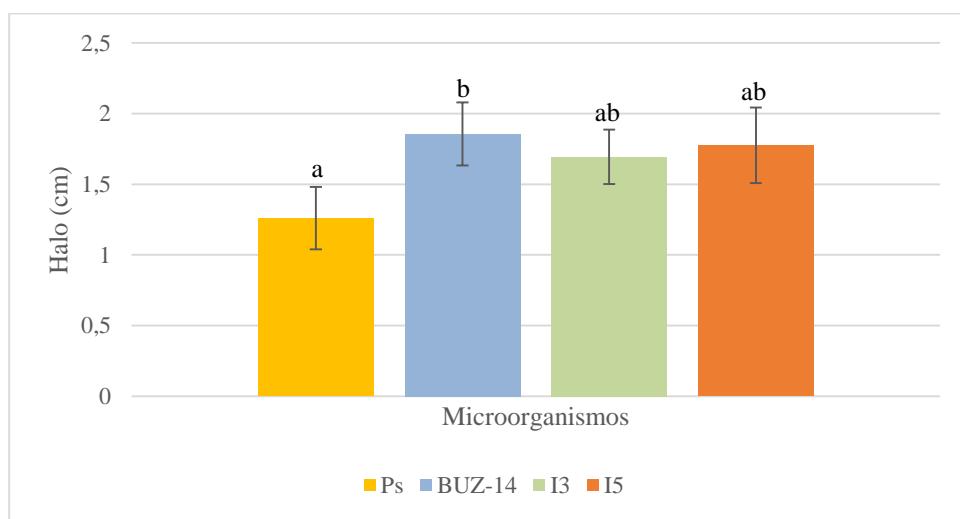


Figura 6. Diámetro de los halos (cm) producidos por la síntesis de sideróforos. Los datos representan los valores promedios de los 8 ensayos con sus respectivas desviaciones estándar. Ps: *P. fluorescens*, BUZ-14: *Bacillus velezensis* BUZ-14, I3: *Bacillus velezensis* I3 e I5: *Bacillus velezensis* I5. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Comparando los resultados del presente ensayo con los obtenidos por Kushwaha et. al (2019) con varias especies de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. cereus*), se ha observado que las tres cepas de *B. velezensis* producen halos de mayor tamaño que las cepas de estos autores. No obstante, la cepa *B. cereus* EPP5 de Kushwaha et. al (2019), produjo halos de hasta 2,57 cm, siendo considerablemente superior al tamaño del halo promedio producido por *B. velezensis* BUZ-14 (1,86 cm). Sin embargo, hay que mencionar que estos autores incubaron las bacterias 5 d, mientras que los resultados presentados en este trabajo son tras 2 d de incubación de las cepas. En ambos casos se utilizó la misma temperatura de incubación, por lo tanto, se puede afirmar que las tres cepas de *B. velezensis* presentan una mayor velocidad de crecimiento o que los sideróforos que producen estas cepas presentan una mayor afinidad por el hierro que los sideróforos sintetizados por la cepa EPP5. Estas afirmaciones están basadas en las discusiones del trabajo de Schwyn y Neilands (1987), los cuales plantean que la sideroforogénesis se produce cuando los niveles de hierro presentes en el medio limitan el crecimiento. De esta manera, cuanto más rápido proliferen los microorganismos, antes se agotarán las fuentes de este micronutriente y quedaría reflejado como un halo de mayor tamaño. Paralelamente, los sideróforos que muestren una mayor afinidad por el hierro se unirán antes a este micronutriente, formando el halo en menos tiempo que los sideróforos que tengan una afinidad más pobre, requiriendo, por tanto, menos tiempo de incubación.

Por otra parte, se ha comparado los resultados de esta prueba con los desarrollados por Sahu y Sindhu (2011), los cuales trabajaron con otras especies de bacterias productoras de sideróforos (*Pseudomonas*). De esta forma, se ha observado que las cepas BUZ-14, I3 e I5 producen halos de mucho mayor tamaño que las cepas de estos autores, los cuales obtuvieron halos de tan solo 0,22 cm con la cepa de mayor producción de sideróforos tras 3 d de incubación a la misma temperatura que las llevadas a cabo en este ensayo. Adicionalmente, en comparación con los resultados por Sadeghi et al. (2012), puede contemplarse que los tamaños de los halos producidos por las bacterias del género *Streptomyces* son ligeramente inferiores a los que producen BUZ-14, I3 e I5 en el medio de producción de sideróforos.

4.2 Producción de enzimas líticas

En el biocontrol, la producción de enzimas líticas es uno de los principales mecanismos de acción por la que se busca ejercer los efectos antagónicos (Villarreal-Delgado et al., 2018). Su importancia radica en la capacidad de lisar las paredes fúngicas, destruyendo así las hifas de los fitopatógenos y, por tanto, reduciendo la incidencia de la enfermedad. Además, las enzimas

líticas son capaces inducir la ISR en la planta huésped por medio de la presencia de oligosacáridos que se liberan al romper las paredes de los hongos (Lastochkina et al., 2019) o incluso impedir que las esporas de los hongos fitopatógenos germinen (Dukare et al., 2019). Por lo tanto, la producción de enzimas líticas es una característica que se valora bastante en la selección de agentes de biocontrol (Dhouib et al., 2019).

a) Determinación de la actividad enzimática por espectrofotometría

En los ensayos de la determinación de la actividad enzimática por espectrofotometría se observó que las tres cepas objeto de estudio poseen las enzimas quitinasa, β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa (**Tabla 1**), ya que tras su incubación con sus respectivos sustratos se detectaron azúcares reductores que reaccionaron con el reactivo DNS, dando lugar a un producto coloreado como consecuencia de la actividad lítica de estas enzimas. Se puede percibir que con mayores tiempos de incubación se detectan menos azúcares reductores. También se observó que la enzima que presentó una mayor degradación de sustrato fue la β -1,4-glucanasa en las tres cepas y en los dos tiempos de incubación. Por otra parte, la cepa BUZ-14 fue la que presentó una mayor actividad lítica en las tres enzimas en todos los tiempos de incubación, con la excepción de la quitinasa y la β -1,4-glucanasa que sintetizó la cepa I3, mostrando una degradación de sustrato ligeramente superior tras 72 h de incubación.

Tabla 1. Cuantificación de la cantidad de producto producido por las enzimas líticas de *B. velezensis* BUZ-14, I3 e I5 a las 24 y 72 h de incubación. Los datos representan los valores promedios de todos los ensayos con sus respectivas desviaciones estándar. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Tiempo de incubación (h)	Microorganismo	Cantidad de producto liberado por las enzimas (g/mL)		
		Quitinasa	β -1,3-glucanasa	β -1,4-glucanasa
24	BUZ-14	3,01 ± 0,33a	4,64 ± 0,5a	5,54 ± 1,02a
	I3	2,94 ± 0,61a	4,53 ± 0,56a	5,35 ± 0,93a
	I5	2,54 ± 0,5a	4,42 ± 0,59a	5,53 ± 0,72a
72	BUZ-14	0,27 ± 0,01b	0,37 ± 0,03b	0,47 ± 0,03b
	I3	0,28 ± 0,01b	0,36 ± 0,02b	0,49 ± 0,12b
	I5	0,21 ± 0,01b	0,36 ± 0,04b	0,46 ± 0,04b

Asimismo, también se determinó la actividad enzimática de las tres cepas y las tres enzimas (**Figuras 7, 8 y 9**). Se puede comprobar un drástico descenso de la actividad enzimática a las 72 h por parte de todas las enzimas, disminuyendo aproximadamente $0,2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en el caso de la quitinasa, $0,8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en el caso de la β -1,3-glucanasa y $0,9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en

el caso de la β -1,4-glucanasa. Este hecho posiblemente sea consecuencia del agotamiento de nutrientes en el medio de cultivo. Asimismo, las enzimas de BUZ-14 fueron las que presentaron una mayor actividad enzimática en todos los casos, alcanzando valores máximos de $0,23 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ para la quitinasa, $0,86 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ para la β -1,3-glucanasa y $1,02 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ para la β -1,4-glucanasa tras 24 h de incubación. No obstante, en todos los casos, independientemente de los tiempos de incubación, todas las enzimas de las tres cepas presentaron valores de actividad enzimática bastante próximos entre sí. Por otra parte, en los valores de actividad enzimática destacaron las actividades enzimáticas de la β -1,4-glucanasa de las tres cepas objeto de estudio, alcanzando valores en torno a $1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Estos resultados están en sintonía con los resultados expuestos anteriormente sobre la cantidad de producto producido por cada enzima.

Paralelamente, los resultados de actividad enzimática de la quitinasa, la β -1,3-glucanasa y la β -1,4-glucanasa también están en consonancia con los resultados obtenidos con *B. subtilis* por Narasimhan et al. (2013), sin percibir grandes diferencias en los resultados obtenidos en este ensayo con BUZ-14, I3 e I5. No obstante, si comparamos los resultados obtenidos con estas tres cepas con los presentados por Gómez et al. (2004), se observa que *B. thuringiensis* presenta una mayor actividad quitinolítica que las cepas estudiadas, siendo máxima a las 108 h de incubación y alcanzando valores cercanos a $60 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, aproximadamente. De manera similar, en las pruebas realizadas por Wang et al. (2013), se observó que la cepa de *B. subtilis* SM21 presentó los mayores niveles de expresión de enzimas líticas (quitinasa y β -1,3-glucanasa) a las 72 h; es decir, totalmente lo contrario a lo que se observó que ocurre con BUZ-14, I3 e I5. Asimismo, no todas las bacterias del género *Bacillus* sintetizan las mismas enzimas. Por ejemplo, se ha visto que algunas cepas de *B. subtilis* o *B. mojavensis* no producen la enzima quitinasa, pero sí la β -1,4-glucanasa (Lahlali et al., 2020).

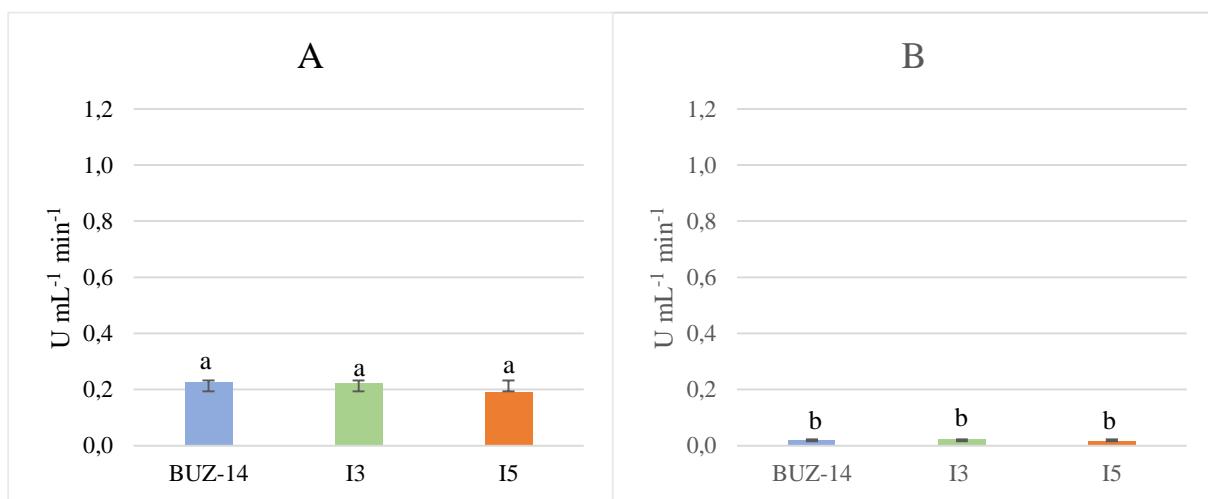


Figura 9. Actividad enzimática de la quitinasa tras 24 (A) y 72 h (B) de incubación. BUZ-14: *Bacillus velezensis* BUZ-14, I3: *Bacillus velezensis* I3 e I5: *Bacillus velezensis* I5. Para un mismo tiempo de incubación, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

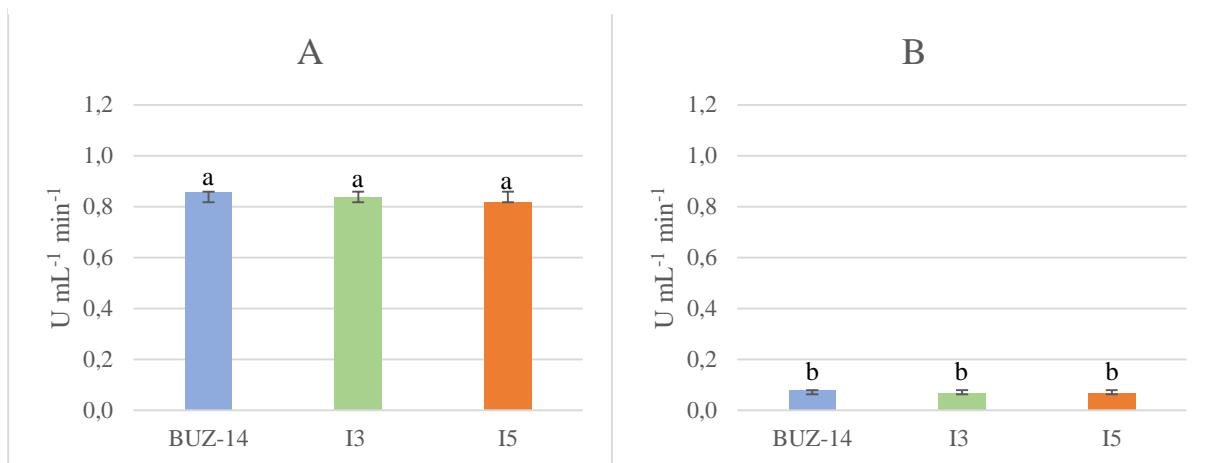


Figura 8. Actividad enzimática de la β -1,3-glucanasa tras 24 (A) y 72 h (B) de incubación. BUZ-14: *Bacillus velezensis* BUZ-14, I3: *Bacillus velezensis* I3 e I5: *Bacillus velezensis* I5. Para un mismo tiempo de incubación, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

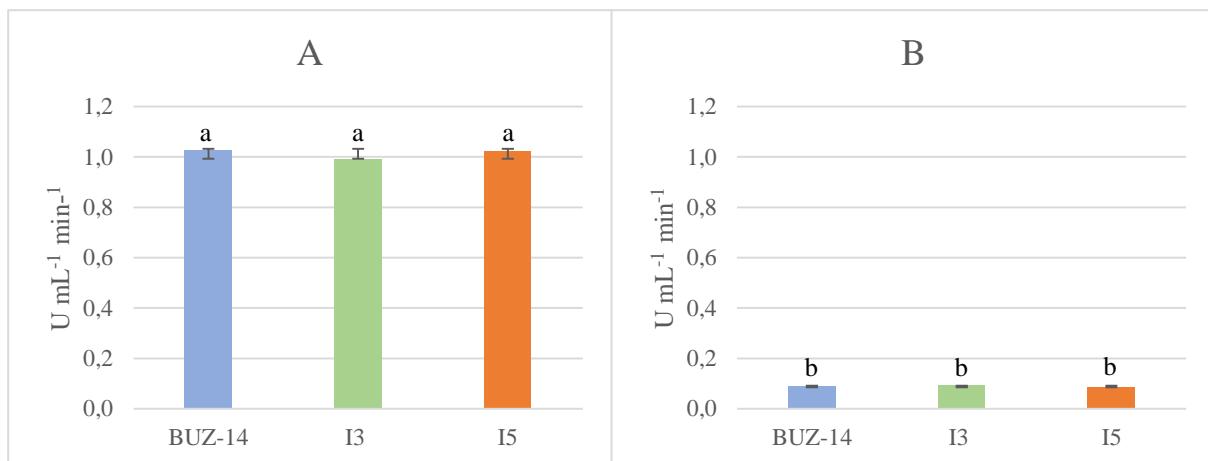


Figura 7. Actividad enzimática de la β -1,4-glucanasa tras 24 (A) y 72 h (B) de incubación. BUZ-14: *Bacillus velezensis* BUZ-14, I3: *Bacillus velezensis* I3 e I5: *Bacillus velezensis* I5. Para un mismo tiempo de incubación, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

En cambio, comparando con los resultados de Montreal y Reese (1969) con *Serratia marcescens*, se puede observar que la actividad quitinolítica de la bacteria de estos autores, por una parte aumentó con el tiempo de incubación y, por otro lado, que dicha actividad fue considerablemente mayor que las actividades enzimáticas de BUZ-14, I3 e I5. La actividad enzimática de *S. marcescens* alcanzó aproximadamente valores en torno a $0,3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ a las 24 h y de $0,9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ a las 72 h. Sin embargo, la bacteria de estos autores no es capaz de sintetizar ni la β -1,3-glucanasa ni la β -1,4-glucanasa, a diferencia de BUZ-14, I3 e I5. Asimismo, Chakrabortty et al. (2012) también trabajaron con *S. marcescens*, y observaron que la enzima de esta bacteria puede alcanzar valores de actividad enzimática de $10,87 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, siendo máximos a las 72 h de incubación, momento a partir del cual comienza a disminuir. Por lo tanto, se puede decir que *S. marcescens* presenta una mayor actividad quitinolítica pero que *B. velezensis* BUZ-14, I3 y I5 presentan un espectro más amplio de enzimas líticas. Finalmente, la cepa de Lee et al. (2012) del género *Streptomyces* mostró tener valores de actividad bastante más elevados que BUZ-14, I3 e I5 en las enzimas líticas quitinasa y β -1,3-glucanasa, además de presentar un aumento en la síntesis de estas enzimas conforme se prolongaba la incubación. De esta forma, se alcanzaron valores de actividad enzimática de $7,17 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ y $13 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para la quitinasa y la β -1,3-glucanasa respectivamente a las 120 h de incubación.

b) Determinación de la actividad enzimática por ensayos en placa

Por otra parte, en los ensayos para la determinación enzimática en placas no se observó formación de halos en ninguna de las cepas objetos de estudio para ninguna de las enzimas, a pesar de que en los ensayos espectrofotométricos expuestos anteriormente indiquen que las cepas BUZ-14, I3 e I5 son capaces de degradar la quitina y los glucanos. La ausencia de halo tras el tiempo de incubación podría deberse a que las actividades enzimáticas sean bajas, por lo que sería necesario una mayor síntesis de enzimas líticas para observar halos alrededor de la colonia como se describe en la metodología empleada para este ensayo.

4.3 Capacidad de crecimiento del agente de biocontrol en fruta

La capacidad de crecer en el producto vegetal determina en gran parte el éxito de un agente de biocontrol, sobre todo cuando el tratamiento se basa en una acción preventiva en la que se precisa que el agente se desarrolle y a la vez que compite por espacio y nutrientes pueda producir sus sustancias antifúngicas *in vivo*.

En las **Figura 10, 11 y 12** se puede apreciar que las cepas de *Bacillus* no fueron capaces de

crecer en las frutas estudiadas, uva, naranja y limón. Sin embargo, en la uva se mantuvieron las poblaciones microbianas de BUZ-14 e I3 cercanas a las iniciales con unos recuentos a las 96 h de incubación de 5,1 y 4,8 log UFC/herida, respectivamente. En el caso de I3 las poblaciones iniciales se mantienen durante las primeras 48 h de incubación para luego descender hasta 3,4 log UFC/herida. Por el contrario, las poblaciones microbianas mostraron un notable descenso en los cítricos probablemente como consecuencia de los bajos niveles de pH de la naranja (pH=3,6) y del limón (pH=2,0), sensiblemente menores a los de la uva (3,9). Estos descensos a las 96 h fueron de aproximadamente 2-3 unidades logarítmicas en el caso de la naranja y una desaparición total en el caso del limón.

Estos resultados están en completa sintonía con los resultados obtenidos por Calvo et al. (2017) que ya habían evidenciado que valores de pH inferiores a 5 pueden ejercer efectos inhibitorios sobre el crecimiento de BUZ-14. En ese mismo estudio también se puso de manifiesto que el agente de biocontrol sí que era capaz de desarrollarse en melocotones cuyo pH era de 5,1. Estos autores, en otro estudio posterior corroboraron que BUZ-14 era capaz de crecer en melocotones a la vez que producía cantidades significativas de lipopéptidos y también evitaba el crecimiento de *M. fructicola* y *M. laxa*. Sin embargo, no detectaron crecimiento del agente ni producción de lipopéptidos en fresas, ni en mandarinas ni en manzanas manteniéndose los recuentos en torno a los iniciales (5 log UFC/g) (Calvo et al., 2019). Adicionalmente, otros autores han demostrado que bacterias del género *Bacillus* presentan una buena capacidad para desarrollarse en heridas de frutas. Así, Touré et al. (2004) detectaron un considerable crecimiento celular de *B. subtilis* GA1 en manzanas llegando hasta 9×10^7 UFC por herida y Hao et al. (2011), revelan crecimiento de *B. amyloliquefaciens*, con valores de hasta 10^7 UFC por herida, en mandarinas tanto a 6 como a 25 °C. Estos distintos resultados únicamente pueden explicarse teniendo en cuenta el distinto comportamiento de las cepas estudiadas.

Por último, destacar que no se detectaron signos de podredumbre gris en las uvas ni de podredumbre azul en las naranjas durante los 4 d de incubación a pesar de que los agentes de biocontrol no se desarrollaron y por tanto tampoco pudieron competir por espacio y nutrientes ni producir lipopéptidos *in situ*. Sin embargo, al final del estudio sí que se detectaron signos de crecimiento de *P. digitatum* en los limones. Al igual que en el estudio de Calvo et al. (2019) este hecho puede estar relacionado con la concentración inicial de lipopéptidos que se inocula en la herida junto con el agente de biocontrol y que, en algunos casos, puede ser suficiente para inhibir desde un primer momento el desarrollo del moho. No obstante, no podemos asegurar

este hecho ya que no se determinó la concentración de lipopéptidos en las suspensiones de los agentes de biocontrol.

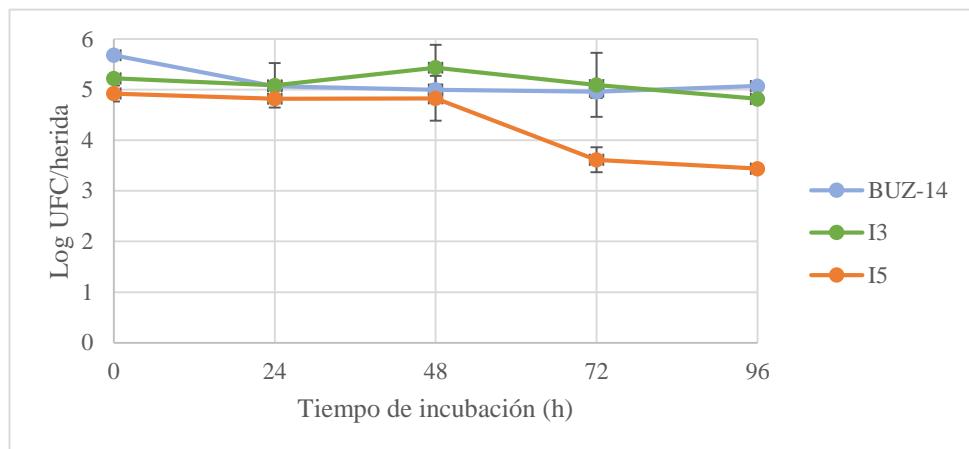


Figura 10. Crecimiento de las cepas BUZ-14, I3 e I5 en uvas inoculadas con *B. cinerea* y conservadas a 20 °C.

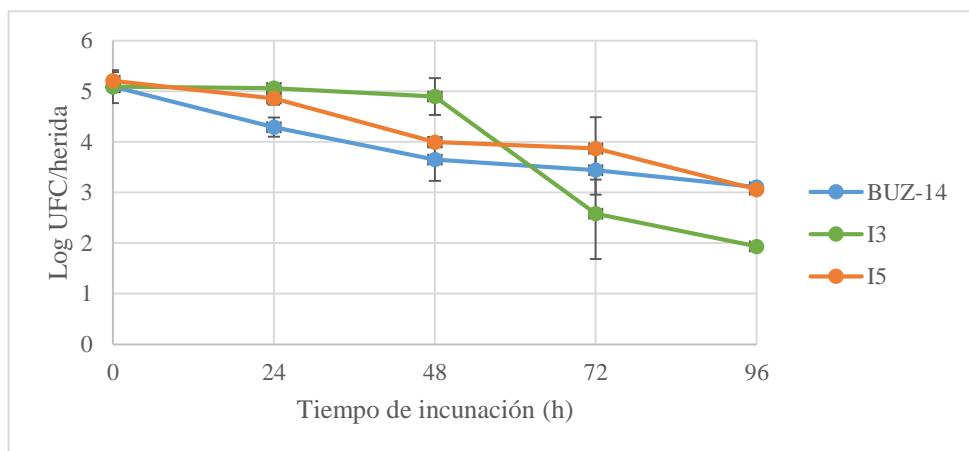


Figura 11. Crecimiento de las cepas BUZ-14, I3 e I5 en naranjas inoculadas con *P. italicum* y conservadas a 20 °C.

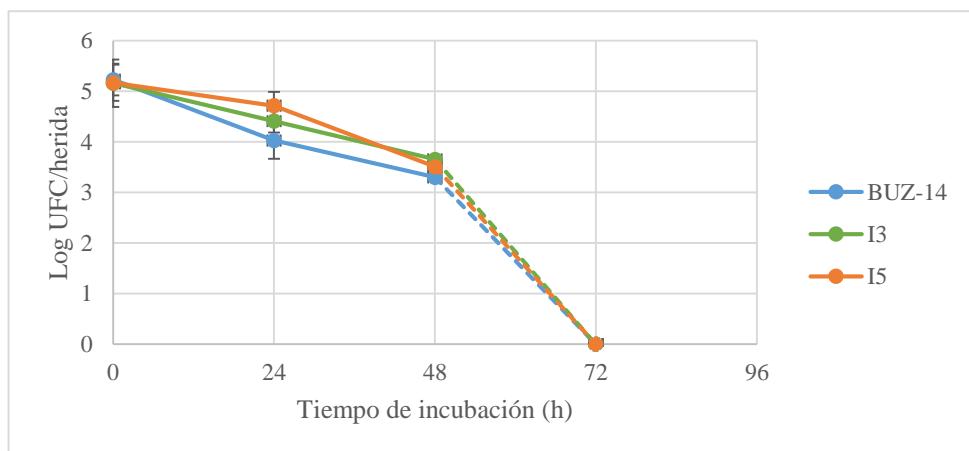


Figura 12. Crecimiento de las cepas BUZ-14, I3 e I5 en limones inoculadas con *P. digitatum* y conservadas a 20 °C.

5. Conclusiones

En base a lo que se ha desarrollado en los apartados anteriores y teniendo en cuenta los objetivos propuestos, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Las cepas de *Bacillus velezensis* BUZ-14, I3 e I5 son capaces de sintetizar sideróforos, siendo éstos más eficaces que los producidos por el microorganismo control *Pseudomonas fluorescens*. Dada la coloración del medio de cultivo, éstos compuestos podrían ser del tipo hidroxamato, los cuales se caracterizan por ser estables, hidrofílicos y por poseer una alta afinidad por el hierro.
2. Las tres cepas estudiadas son productoras de enzimas líticas como la quitinasa, la β -1,3-glucanasa o la β -1,4-glucanasa. Sin embargo, sus actividades enzimáticas no son muy elevadas si se comparan con las sintetizadas por otras cepas de este mismo género. Esta actividad enzimática disminuye sensiblemente conforme aumenta el tiempo de incubación de las cepas.
3. *B. velezensis* BUZ-14, I3 e I5 no han sido capaces de multiplicarse en las frutas estudiadas (uva, naranja y limón). Las concentraciones iniciales se mantienen en la uva pero disminuyen en los cítricos probablemente por el bajo pH (3,6 en las naranjas y 2 en los limones). Sin embargo, no se detectó crecimiento ni de *B. cinerea* en uva ni de *P. italicum* en naranja lo que puede atribuirse al hecho de que la concentración inicial de sustancias antifúngicas en los cultivos fue suficiente para inhibir el desarrollo de estas podredumbres.
4. Estos resultados, especialmente la producción de sideróforos, demuestran que las cepas de *B. velezensis* BUZ-14, I3 e I5 son capaces de ejercer efectos antagónicos antifúngicos por varios mecanismos, no sólo por la producción de lipopéptidos y compuestos volátiles, por lo que son unas buenas candidatas como agentes de biocontrol para combatir las podredumbres en frutas causadas por hongos fitopatógenos y para elaborar formulados que sustituyan a los fungicidas sintéticos, además de ser más respetuosos con el medio ambiente y no tener repercusiones en la salud.

6. Bibliografía

- Ali, S. S., & Vidhale, N. N. (2013). Bacterial siderophore and their application: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(12), 303-312. <http://www.ijcmas.com>
- Arora, N. K. (Ed.). (2015). *Plant microbes symbiosis: Applied Facets*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8>
- Arora, N. K., & Verma, M. (2017). Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotech*, 7(6). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1008-y>
- Azizoglu, U. (2019). *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Current Microbiology*, 76, 1379-1385. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9>
- Bailey, K. L., Derby, J., Boyetchko, S. M., Sawchyn, K., Becker, E., Sumampong, G., Shamoun, S., James, D., Masri, S., & Varga, A. (2012). *In vivo* studies evaluating commercial biofungicide suppression of blight caused by *Phytophthora ramorum* in selected ornamentals. *Biocontrol Science and Technology*, 22(11), 1268-1283. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.724659>
- Baker, K. F. (1987). Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 67-85. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8228-7_1
- Behrooz, R. D., Barghi, M., Bahramifar, N., & Esmaili-Sari, A. (2012). Organochlorine contaminants in the hair of Iranian pregnant women. *Chemosphere*, 86(3), 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.031>
- Calvo, H. (2020). *Biocontrol de podredumbres en frutas por Bacillus amyloliquefaciens BUZ-14* [Tesis doctoral no publicada]. Universidad de Zaragoza, España.
- Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., & Venturini, M. E. (2017). Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*, 63, 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.004>
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2019). The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. *Food Microbiology*, 82, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.010>
- Castro, R., Álvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., & García, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(2), 101-108.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/amyloliquefaciens.

- Microbial Biotechnology*, 8(2), 281-295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
- Chakrabortty, S., Bhattacharya, S., & Das, A. (2012). Optimization of process parameters for chitinase production by a marine isolate of *Serratia marcescens*. *International Journal of Pharmacy and Biological Science*, 2(2), 8-20.
- Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., & Borriss, R. (2009). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*, 140(1-2), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.015>
- Chen, X. H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsi, A., Hitzereth, G., Grammel, N., Strittmatter, A. W., Gottschalk, G., Süssmuth, R. D., & Borriss, R. (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4024-4036. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-06>
- Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V., & Steinberg, C. (2014). Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: A review. *Fungal Biology Reviews*, 28(4), 97-125. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.11.001>
- De Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133-148. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>
- Deising, H. B., Reimann, S., & Pascholati, S. F. (2008). Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 286-295. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200017>
- Del Sorbo, G., Schoonbeek, H. J., & De Waard, M. A. (2000). Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology*, 30(1), 1-15. <https://doi.org/10.1006/fgb.2000.1206>
- Dhouib, H., Zouari, I., Ben Abdallah, D., Belbahri, L., Taktak, W., Triki, M. A., & Tounsi, S. (2019). Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium* wilt disease. *Biological Control*, 139, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104092>
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*,

- 122, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>
- Dukare, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R. K. (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(9), 1498-1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>
- FAO (Ed.). (2011). *Global food losses and food waste - Exent, causes and prevention*. Roma, Italia.
- FAO (Ed.). (2017). *The future of food and agriculture - Trends and challenges*. Roma, Italia.
- FAO, & WHO (Eds.). (2016). *International code of conduct on pesticide management. Guidelines on highly hazardous pesticides*. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2017.01.005>
- Ferraz, P., Cássio, F., & Lucas, C. (2019). Potential of yeasts as biocontrol agents of the phytopathogen causing cacao witches' broom disease: is microbial warfare a solution? *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01766>
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>
- Gómez Ramírez, M., Rojas Avelizapa, L. I., Rojas Avelizapa, N. G., & Cruz Camarillo, R. (2004). Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R®, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 213-219. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.011>
- Halimahtussadiyah, R., Natsir, M., Kurniawati, D., & Utamy, S. P. (2017). Isolation and identification of chitinolytic bacteria of pohara river of South East Sulawesi and the optimization production of chitinase enzyme. *AIP Conference Proceedings*, 1823, 020062. <https://doi.org/10.1063/1.4978135>
- Hao, W., Li, H., Hu, M., Yang, L., & Rizwan-ul-Haq, M. (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(3), 316-323. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.10.002>
- Horak, I., Engelbrecht, G., van Rensburg, P. J., & Claassens, S. (2019). Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. *Journal of Applied Microbiology*, 127(2), 326-343. <https://doi.org/10.1111/jam.14218>
- Kafaei, R., Arfaeinia, H., Savari, A., Mahmoodi, M., Rezaei, M., Rayani, M., Sorial, G. A., Fattahi, N., & Ramavandi, B. (2020). Organochlorine pesticides contamination in agricultural soils of southern Iran. *Chemosphere*, 240, 124983. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124983>
- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator –

- Siderophore: A review. En *Microbiological Research* (Vols. 212-213, pp. 103-111). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
- Kim, K., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575, 525-535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kontoyiannis, D. P., Sagar, N., & Hirschi, K. D. (1999). Overexpression of Erg11p by the regulatable GAL1 promoter confers fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(11), 2798-2800. <https://doi.org/10.1128/aac.43.11.2798>
- Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(9), 1781-1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.026>
- Kumar, V., Menon, S., Agarwal, H., & Gopalakrishnan, D. (2017). Characterization and optimization of bacterium isolated from soil samples for the production of siderophores. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 434-439. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.04.004>
- Kushwaha, P., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K., & Tiwari, R. K. (2019). Plant growth promoting and antifungal activity in endophytic *Bacillus* strains from pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00172-5>
- Lahlali, R., Aksissou, W., Lyousfi, N., Ezrari, S., Blenzar, A., Tahiri, A., Ennahli, S., Hrustić, J., MacLean, D., & Amiri, S. (2020). Biocontrol activity and putative mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* (SF14 and SP10), *Alcaligenes faecalis* ACBC1, and *Pantoea agglomerans* ACBP1 against brown rot disease of fruit. *Microbial Pathogenesis*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103914>
- Lastochkina, O., Seifikalhor, M., Aliniaiefard, S., Baymiev, A., Pusenkova, L., Garipova, S., Kulabuhova, D., & Maksimov, I. (2019). *Bacillus* spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plants*, 8(4), 1-24. <https://doi.org/10.3390/plants8040097>
- Lee, S. Y., Tindwa, H., Lee, Y. S., Naing, K. W., Hong, S. H., Nam, Y., & Kim, K. Y. (2012). Biocontrol of anthracnose in pepper using chitinase, β -1,3-glucanase, and 2-furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(10), 1359-1366. <https://doi.org/10.4014/jmb.1203.02056>
- Li, Y., Gu, Y., Li, J., Xu, M., Wei, Q., & Wang, Y. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers in Microbiology*, 6(883). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00883>
- Liu, J., Zhou, T., He, D., Li, X. Z., Wu, H., Liu, W., & Gao, X. (2011). Functions of lipopeptides

- Bacillomycin D and Fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 43-52. <https://doi.org/10.1159/000323501>
- Liu, X. M., & Zhang, H. (2015). The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00774>
- Löffer, J., Einsele, H., Hebart, H., Schumacher, U., Hrastnik, C., & Daum, G. (2000). Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 185(1), 59-63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09040.x>
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1), 51-53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
- McKay, A. H., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2012). Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. *Plant Disease*, 96(2), 235-242. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0525>
- Meftaul, I. M., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P., & Megharaj, M. (2020). Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. *Science of the Total Environment*, 711, 134612. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134612>
- Mercier, J., & Smilanick, J. L. (2005). Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodorus albus*. *Biological Control*, 32(3), 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.12.002>
- Mishra, K., Sharma, R. C., & Kumar, S. (2012). Contamination levels and spatial distribution of organochlorine pesticides in soils from India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, 215-225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.014>
- Monreal, J., & Reese, E. T. (1969). The chitinase of *Serratia marcescens*. *Canadian journal of microbiology*, 15(7), 689-696. <https://doi.org/10.1139/m69-122>
- Narasimhan, A., Bist, D., Suresh, S., & Shivakumar, S. (2013). Optimization of mycolytic enzymes (chitinase, β -1,3- glucanase and cellulase) production by *Bacillus subtilis*, a potential biocontrol agent using one-factor approach. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 72(3), 172-178.
- Ntow, W. J., Tagoe, L. M., Drechsel, P., Kelderman, P., Gijzen, H. J., & Nyarko, E. (2008). Accumulation of persistent organochlorine contaminants in milk and serum of farmers from Ghana. *Environmental Research*, 106(1), 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.05.020>
- Nurdebyandaru, N., Mubarik, N. R., & Prawasti, T. S. (2010). Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: chitinase characterization and application as biocontrol for *Aphis gossypii*.

- Microbiology Indonesia*, 4(3), 103-107. <https://doi.org/10.5454/mi.4.3.1>
- Olishevska, S., Nickzad, A., & Déziel, E. (2019). *Bacillus* and *Paenibacillus* secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 1189-1215. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9541-0>
- Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 175-188. <https://doi.org/10.3920/wmj2008.x013>
- Peng, G., Zhao, X., Li, Y., Wang, R., Huang, Y., & Qi, G. (2019). Engineering *Bacillus velezensis* with high production of acetoin primes strong induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiological Research*, 227(May), 126297. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126297>
- Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Pertot, I., Giovannini, O., Benanchi, M., Caffi, T., Rossi, V., & Mugnai, L. (2017). Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Protection*, 97, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.010>
- Pétriacq, P., López, A., & Luna, E. (2018). Fruit decay to diseases: can induced resistance and priming help? *Plants*, 7(4), 1-16. <https://doi.org/10.3390/plants7040077>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Rabbee, M. F., Sarafat, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. (2019). *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 24(6), 1-13. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Ren, J., He, W., Li, C., He, S., & Niu, D. (2019). Purification and identification of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* XB-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(150), 3-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2726-6>
- Renwick, A., Campbell, R., & Coe, S. (1991). Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 40(4), 524-532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02415.x>
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 191-195.

<https://doi.org/10.1099/ijjs.0.63310-0>

Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., & Askari, H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1503-1509. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0952-7>

Sahu, G. K., & Sindhu, S. S. (2011). Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *Pseudomonas* sp. En *Research Journal of Microbiology* (Vol. 6, Número 10, pp. 735-749). <https://doi.org/10.3923/jm.2011.735.749>

Sanghi, R., Pillai, M. K. K., Jayalekshmi, T. R., & Nair, A. (2003). Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Human and Experimental Toxicology*, 22(2), 73-76. <https://doi.org/10.1191/0960327103ht321oa>

Sanzani, S. M., Reverberi, M., & Geisen, R. (2016). Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.003>

Sayyed, R. Z., & Chincholkar, S. B. (2006). Purification of siderophores of *Alcaligenes faecalis* on Amberlite XAD. *Bioresource Technology*, 97(8), 1026-1029. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.045>

Schnabel, G., & Jones, A. L. (2001). The 14 α -Demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology*, 91(1), 102-110. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.1.102>

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Segaran, G., & Sathiavelu, M. (2019). Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101284. <https://doi.org/10.1016/j.biocab.2019.101284>

Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205-221. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>

Thornton, C. R., Slaughter, D. C., & Davis, R. M. (2010). Detection of the sour-rot pathogen *Geotrichum candidum* in tomato fruit and juice by using a highly specific monoclonal antibody-based ELISA. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 166-172.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.012>

Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1151-1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>

Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., Mazurier, S., Lemanceau, P., Wendehenne, D., & Besson-Bard, A. (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiology*, 171(1), 675-693. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01537>

van Kan, J. A. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11(5), 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.005>

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

Wang, X., Wang, J., Jin, P., & Zheng, Y. (2013). Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 164(2-3), 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.010>

Wilson, C. L., & Pusey, P. L. (1985). Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Disease*, 69, 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(1), 425-441. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.002233>

Wu, L., Wu, H. J., Qiao, J., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01395>

Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>