

Universitat de Lleida

Potencial de la cepa CPA–8 de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta

Viviana del Rocío Yáñez Mendizábal

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

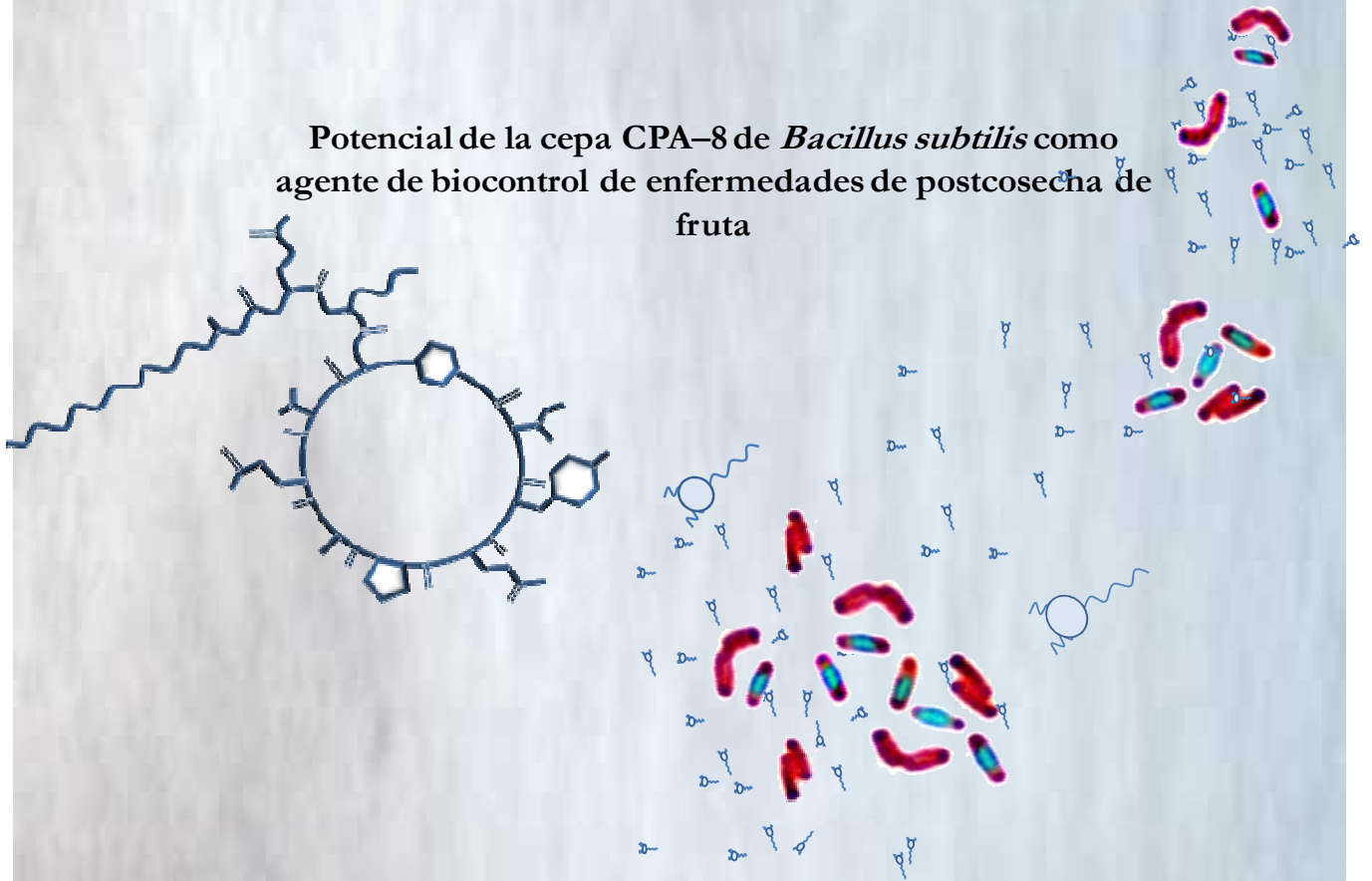
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat de Lleida
Departament de Tecnologia
d'Aliments

Potencial de la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta



Viviana del Rocío Yáñez Mendizábal
Lleida, enero 2012



Universitat de Lleida

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

Departament de Tecnologia d'Aliments

**Potencial de la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis*
como agente de biocontrol de enfermedades de
postcosecha de fruta**

Memoria presentada por: **Viviana del Rocío Yáñez Mendizábal**

Directoras: **Dra. Neus Teixidó i Espasa**
Dra. Inmaculada Viñas Almenar

Lleida, enero 2012

Los estudios presentados en esta tesis doctoral se realizaron en el Laboratorio de Patología del Área de Postcosecha del Centro IRTA de Lleida, con excepción del estudio incluido en el capítulo 2, en el cual parte de los experimentos se realizaron en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM–UMA–CSIC).

Para la realización de este trabajo se recibió soporte económico del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación del Gobierno Español a través de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (MAEC–AECID) con la beca MAEC–AECID programas II.A y II.E; y los proyectos Europeo REDBIO y Proyecto Ecológico UdL (Universitat de Lleida) 2009.

A mis padres Guadalupe y Miguel Ángel

A mis hermanos Caty y Víctor Miguel

A mis pequeños Ma. José, Carolina, Ma. Paula y Aarón

Agradecimientos

Bueno comenzar esta parte, sin duda una de las más importantes del trabajo, resulta un reto porque resume el reconocimiento al apoyo incondicional brindado por la gran familia IRTA, instituciones, personas y familia propia en beneficio de mi progreso profesional. Pues allá voy:

A mi tutora **Inmaculada Viñas** porque a pesar de sus arduas ocupaciones, en el trabajo siempre me brindó tiempo de calidad, apreciaciones claras y prácticas; y en lo personal ese soporte indispensable que necesitamos los que estamos lejos de casa. Gracias Inma.

A mi tutora **Neus Teixidó** de quien he tenido invaluable lecciones a nivel profesional y personal. Gracias Neus por servirme de ejemplo de autoexigencia, trabajo riguroso, tenaz y constante. Muchísimas gracias también por tu infinita preocupación y paciencia.

A **Josep Usall** por brindarme la valiosa oportunidad de incorporarme al equipo IRTA y por sus constantes y significativos aportes para mi superación en el ámbito profesional y personal. Gracias Pep.

A **Charo** por su ayuda en el avance de mi trabajo, por su apertura para contestar mis preguntas y su punto de vista siempre acertado, pero sobre todo muchas gracias por ser siempre tan positiva y brindarme ánimo para ir superando metas día a día. Gracias Charo.

A **Maribel** por su predisposición para atender mis múltiples consultas e inquietudes de una forma clara y afable. La de veces que he pensado voy a preguntarle porque sin duda lo puede plantear de una forma estupenda. Gracias Maribel.

A **Lucía** por sus comentarios de aliento y compartir experiencias de cómo llevar adelante el trabajo doctoral. Gracias Lucía.

A **Cristina** por su constante apoyo para que este trabajo se planifique, ejecute y divulgue de la mejor forma. ¡Ja ho tenim Cris, mira que ens ha costat hores i hores de feina!. Per tot això moltíssimes gràcies.

A **Carla Casals** porque desde que llegue al IRTA me ha servido de guía para desarrollar mi trabajo. Gracias Carlita dos Santos da Silva y otras hierbitas más.

A **Gemma, Lulú** y **Celia** por ser unas magníficas compañeras y amigas, por su apoyo incondicional en el trabajo y por su continuo soporte, ánimo y preocupación para mi bienestar personal. Gracias pequeñas que habría hecho sin ustedes.

A mis compañeros doctorandos **Marcia, Carlos, Isa Alegre, María, Laura** y **Pilar** por los momentos compartidos entre preocupaciones, inquietudes, cansancio y todo lo demás que involucra la tesis doctoral. Gracias amigos y ánimos en vuestro trabajo.

A **Elena, Marina, Neus Lamarca, Rosa Vilaplana, Rosa Altisent, Robert Oró, Isa Alonso** y demás personal del laboratorio y del STP quienes siempre me brindaron ayuda en todos los experimentos de esta tesis con una eficiencia impresionante. Gracias a todos y cada uno.

A los profesores, investigadores y compañeros de Málaga principalmente a **Alejandro, Antonio** y **Houda** con quienes tuve la dicha de aprender valiosas metodologías y compartir momentos inolvidables. Gracias gente linda.

A mis amigos y compañeros de la UdL, particularmente a **Bernarda** y **Cyndia**, que en esta última etapa me han brindado el apoyo que necesitaba. Gracias amigos.

A los amigos de Ecuador, principalmente a **César Falconí**, por sus invaluable consejos y guía para mi desarrollo profesional.

Al personal de Casa Amèrica Catalunya, en especial **Teresa M. de Ochoa**, por brindarme apoyo siempre de una forma rápida y eficiente.

A la **UdL** y el **IRTA** por acogerme, darme soporte logístico para el desarrollo de esta tesis y por ser mi segunda casa.

A la **AECID** por invertir el fondo semilla en mi formación que espero poder revertir en beneficio de esa tierra linda llamada Ecuador que tanto necesita de trabajo y desarrollo.

Y al final pero sin lugar a duda para mí lo más importante mi familia no sólo por su aporte en mi trabajo durante este tiempo lejos de casa, sino en mi vida. Gracias **Mami, Papá, Caty, Vio Miguel** y **pequeños** todos sois mis héroes personales y el motor que me impulsa día a día a la superación profesional.

A todos muchísimas GRACIAS.

Frases

¡Buenas noticias! Que si ya estás en la ‘etapa frases’ es que el resto lo tienes superado
(*Anónimo*)

No hay enigmas, si un problema puede plantearse, es que puede resolverse
(*Ludwig Wittgenstein*)

Lo entretenido de la investigación es que por cada respuesta obtenida una infinidad de preguntas más vienen a inquietarte y casi siempre de madrugada
(*propia*)

Abreviaturas

ABC	Agente de biocontrol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
a_w	Actividad de agua
BCA	Agente de control biológico (inglés)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CFU	Unidades formadoras de colonia (inglés)
CICYT	Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología
CK	Control
CO ₂	Dióxido de carbono
con	Conidias
CPA	Colección de Antagonistas de la Unidad de Patología
DL ₅₀	Dosis letal cincuenta
DSF	Harina de soja desengrasada 44 % (inglés)
Eh	Potencial redox
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
Fe ²⁺	Catión hierro
GLU	Glucosa
GSS	Semillas de soja molidas (inglés)
HR	Humedad relativa
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agraria
IRTA	Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (catalán)
K ₂ SO ₄	Sulfato de potasio
KCl	Cloruro de potasio
MAL	Maltosa

Mg ²⁺	Catión magnesio
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
mM	Milimolar
Mn ²⁺	Catión manganeso
MOL	Melaza (inglés)
MOLP	Medio optimizado para producción de lipopéptidos
NCCB	Colección Holandesa de cultivos bacterianos (inglés)
NH ₄ ⁺	Ión amonio
NO ₃ ⁻	Ión nitrato
NYDA	Agar nutritivo levadura dextrosa (inglés)
O ₂	Oxígeno
p/v	Relación peso/volumen
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (inglés)
PDA	Agar patata dextrosa (inglés)
PEP	Peptona
pH	Potencial hidrógeno
pO ₂	presión parcial de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Secado por atomización (inglés)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (inglés)
TLC	Cromatografía en capa fina (inglés)
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonia
USA	Estados Unidos de América (inglés)
USDA	Departamento de Agricultura de USA (inglés)
WSF	Harina de soja dietética (inglés)
YE	Extracto de levadura (inglés)
Zn ²⁺	Catión cinc

Índice	
Resúmenes	I
Resumen	III
Resum	VII
Summary	XI
Introducción General	1
1. Control Biológico	3
1.1. Definición y antecedentes	3
1.2. Microorganismos antagonicos	4
1.3. Desarrollo de un agente de control biológico	5
1.3.1. Criterios de selección de un antagonista ideal	5
1.3.2. Etapas y factores en el desarrollo de un agente de biocontrol para la obtención de productos comerciales	5
1.4. Situación actual y perspectivas de futuro en el control biológico de enfermedades en postcosecha de fruta	6
2. <i>Bacillus subtilis</i> como agente de control biológico	7
2.1. Características prácticas	7
2.1.1. Producción de moléculas bioactivas: lipopéptidos antifúngicos	8
2.1.2. Producción de endosporas	10
2.1.3. Correlación entre lipopéptidos, células vegetativas y endosporas	11
2.2. Modo de acción	12

2.2.1. Antibiosis: iturinas, fengicinas y surfactinas	12
2.2.2. Otros mecanismos: competencia, inducción de defensas secundarias	12
2.3. Aplicación y perspectivas en postcosecha	13
2.4. El agente de control biológico <i>B. subtilis</i> cepa CPA-8	13
3. Producción de agentes de control biológico	14
3.1. Crecimiento bacteriano (metabolismo celular)	15
3.2. Factores que afectan el crecimiento bacteriano	15
3.2.1. Factores extrínsecos	15
3.2.2. Factores intrínsecos	16
3.3. Medios de crecimiento: líquidos y sólidos	19
3.3.1. Medios de cultivo químicamente definidos	19
3.3.2. Medios complejos (producción de bajo coste)	19
3.4. Pasos del proceso de producción	21
4. Formulación de agentes de control biológico	22
4.1. Bases para la formulación de agentes de biocontrol	22
4.2. Tipos de formulación	23
4.2.1. Formulaciones líquidas	23
4.2.2. Formulaciones sólidas	23
5. La formulación de bacterias mediante atomización	26
5.1. Conceptos básicos de la atomización	26

5.2. Parámetros que afectan la viabilidad de las bacterias secadas mediante atomización	28
5.2.1. Parámetros del proceso	28
5.2.2. Parámetros del producto (agentes protectores y/o materiales de soporte)	29
5.2.3. Parámetros biológicos	29
5.2.4. Condiciones de almacenamiento (temperatura y envasado) y medios de rehidratación	30
5.3. Ventajas y desventajas del secado por atomización	31
Referencias	33
Objetivos	47
Organización y estructura de la tesis	51
Capítulo 1	55
Potential of a new strain of <i>Bacillus subtilis</i> CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit Biocontrol Science and Technology 2011, 21 (4), 409–426	
Capítulo 2	79
Biological control of peach brown rot (<i>Monilinia</i> spp.) by <i>Bacillus subtilis</i> CPA-8 is based essentially on production of fengycin-like lipopeptides European Journal of Plant Pathology, doi: 10.1007/s10658-011-9905-0 (en prensa)	

Capítulo 3	99
Production of the postharvest biocontrol agent <i>Bacillus subtilis</i> CPA–8 using commercial products and by-products	
Biological Control, doi:10.1016/j.biocontrol.2011.12.001 (en prensa)	
Capítulo 4	125
Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol agent <i>Bacillus subtilis</i> CPA–8	
Biotechnology Letters, doi: 10.1007/s10529-011-0834-y (en prensa)	
Capítulo 5	139
Formulation development of the biocontrol agent <i>Bacillus subtilis</i> CPA–8 by spray-drying	
Journal of Applied Microbiology (enviado)	
Discusión General	163
1. Estudio de <i>B. subtilis</i> cepa CPA–8 como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta	166
1.1. Caracterización de la cepa CPA–8 y su actividad antifúngica <i>in vitro</i>	166
1.2. Evaluación de la efectividad de <i>B. subtilis</i> CPA–8 en el control de podredumbres de postcosecha en naranja, manzana y fruta de hueso	168
2. Estudio del mecanismo de acción de <i>B. subtilis</i> CPA–8	171
2.1. Estudio de la actividad antifúngica de sobrenadantes libres de células y caracterización de lipopéptidos antifúngicos	172

2.2. Determinación del rol de las fengicinas en el potencial de control de <i>B. subtilis</i> CPA-8 mediante construcción de mutantes defectivos	174
3. Optimización de la producción de <i>B. subtilis</i> CPA-8 mediante un medio de bajo coste	178
3.1. Búsqueda de productos comerciales y subproductos agroalimentarios como fuentes de nitrógeno y carbono para la optimización de un medio de bajo coste	179
3.2. Producción de <i>B. subtilis</i> CPA-8 en bioreactor de laboratorio	183
3.3. Efectividad de <i>B. subtilis</i> CPA-8 crecido en medio de cultivo de bajo coste para el control de <i>Monilinia</i> spp. en fruta de hueso	185
4. Formulación de <i>B. subtilis</i> CPA-8 mediante secado por atomización	186
4.1. Estudio comparativo del efecto de la atomización de <i>B. subtilis</i> CPA-8 y <i>Pantoea agglomerans</i> CPA-2	188
4.2. Búsqueda de la sustancia protectora/material de soporte más adecuada	190
4.3. Efecto del medio de rehidratación en la recuperación de células de CPA-8 en productos atomizados	192
4.4. Vida útil y efectividad de formulados de CPA-8	192
Referencias	197
Conclusiones	205

Resúmenes

Resumen

La limitación en el uso de fungicidas para el control de enfermedades en postcosecha de fruta es un grave problema en el sector frutícola actual. Debido a esto, el uso de estrategias alternativas como el control biológico microbiano son fundamentales para la producción de fruta de calidad. Sin embargo, el desarrollo de programas de biocontrol eficaces requiere de un fuerte conocimiento de la capacidad de control y los mecanismos de acción usados por el agente microbiano que se pretende emplear, así como de la posibilidad para que éste pueda ser producido y formulado a nivel comercial. En este contexto, la bacteria *Bacillus subtilis* cepa CPA-8 aislada de la superficie de nectarinas en el Laboratorio de Patología de Postcosecha del Centro IRTA (Lleida) ha demostrado tener una importante capacidad de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta de hueso. Su futuro uso a nivel comercial depende del estudio de su potencial de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta; así como del desarrollo de procesos para su óptima producción y formulación.

La presente tesis tiene como objetivo fundamental evaluar aspectos clave para el desarrollo de *B. subtilis* CPA-8 como agente eficaz de control biológico de enfermedades de postcosecha de fruta. Para cumplir con este objetivo, en primer lugar, se realizó un análisis detallado de las características biológicas de la cepa CPA-8 como su crecimiento en medio de cultivo, producción de endosporas y sustancias antifúngicas; así como su potencial para el control de importantes podredumbres de postcosecha de naranja, manzana y fruta de hueso (Capítulo 1). Con estos resultados el siguiente paso fue estudiar el modo de acción usado por *B. subtilis* CPA-8 para la supresión de patógenos de postcosecha, concretamente contra *Monilinia* spp. causante de la podredumbre marrón en fruta de hueso (Capítulo 2). Mediante la combinación de herramientas de análisis químico, molecular y biológico se determinaron los principales factores implicados en la capacidad antagonista de la cepa CPA-8 contra *Monilinia* spp. El siguiente paso fue optimizar la producción de *B. subtilis* CPA-8, para lo cual se desarrolló un medio de cultivo de bajo coste que proporcionase un crecimiento alto y mantuviese la eficacia de biocontrol (Capítulo 3). Primero se buscaron fuentes de nitrógeno y carbono económicas entre productos comerciales y subproductos agroalimentarios. Posteriormente se realizó el escalado de producción de la bacteria en un bioreactor de 5 L y se comprobó la efectividad para el control de *Monilinia* spp. en melocotones. El paso final fue la formulación de *B. subtilis* CPA-8 mediante secado por atomización (Capítulos 4 y 5). Este método fue seleccionado por dos motivos, por un lado porque ésta es una técnica de secado viable para formulación de bacterias a bajo coste y en base a los resultados obtenidos en el capítulo 1 sobre la capacidad de la bacteria para producir endosporas resistentes al calor y eficaces contra patógenos de postcosecha de fruta. Primero se realizó un estudio comparativo del efecto de la atomización sobre la supervivencia de *B. subtilis* CPA-8 y del agente de biocontrol *Pantoea agglomerans* CPA-2 (Capítulo 4). Posteriormente se realizó una evaluación de las sustancias protectoras/material de soporte más adecuadas para la atomización de la cepa CPA-8, y de los mejores productos atomizados se evaluaron los distintos medios de rehidratación y la actividad antifúngica; así como su vida útil y efectividad durante conservación (Capítulo 5).

Los resultados obtenidos en el capítulo 1 indicaron que *B. subtilis* CPA-8 produce células, endosporas resistentes al calor y compuestos que tienen una alta actividad antagónica *in vitro* contra los principales patógenos de postcosecha de fruta *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Penicillium expansum*. Los tratamientos de células, endosporas y sobrenadantes libres de células de la cepa CPA-8 mostraron diferentes niveles de efectividad para el control de podredumbres en naranja, manzana y fruta de hueso, presentando los mejores resultados contra *Monilinia* spp. en fruta de hueso con reducciones de la incidencia de la enfermedad hasta del 100 %. El ensayo de dosis de diferentes tratamientos de la cepa CPA-8 a 10^8 , 10^7 y 10^6 UFC mL⁻¹ fueron efectivos contra *Monilinia* spp., de forma similar o mejor que Serenade Max®.

El estudio del modo de acción de *B. subtilis* CPA-8 (Capítulo 2) demostró que los sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos líquidos tenían una alta actividad antifúngica *in vitro* contra *Monilinia* spp. similar a la observada con suspensiones celulares. Los análisis mediante PCR y bioautografía en TLC de extractos butanólicos de estos sobrenadantes en comparación con los de las cepas de referencia de *B. subtilis* UMAF6614 y UMAF6639, revelaron la producción de las principales familias de lipopéptidos antifúngicos conocidos en *Bacillus* (fengicinas, iturinas y surfactinas), lo que apuntó a la antibiosis como el principal mecanismo de acción implicado en la capacidad de biocontrol de *B. subtilis* CPA-8. Las fracciones correspondientes a las fengicinas fueron las responsables de la actividad inhibitoria de la cepa CPA-8 frente a *Monilinia* spp. Estos resultados fueron definitivamente corroborados mediante la construcción de mutantes de *B. subtilis* CPA-8 defectivos para la producción de fengicina interrumpiendo la expresión del gen *fenB*. Los análisis por PCR y bioautografía en TLC revelaron que los mutantes defectivos de la cepa CPA-8 perdieron la capacidad de inhibir a *Monilinia* spp. por su incapacidad para producir fengicinas. Los ensayos de efectividad en fruta utilizando tratamientos provenientes de los mutantes de la cepa CPA-8 demostraron que éstos habían perdido su capacidad para controlar la podredumbre causada por *Monilinia* spp. con porcentajes de incidencia similares a los observados en el control sin tratar, mientras que los tratamientos con la cepa parental o Serenade Max® presentaron reducciones de enfermedad de hasta el 100 %. Todos estos resultados demostraron que la producción de fengicinas juega un papel muy importante en la efectividad de *B. subtilis* CPA-8 para controlar la podredumbre marrón del melocotón; y que éste resulta ser el principal mecanismo de acción implicado en su capacidad de biocontrol.

En la optimización de la producción de *B. subtilis* CPA-8 (Capítulo 3) los resultados obtenidos demostraron que se pueden conseguir altos niveles de biomasa (superiores a 3×10^9 UFC mL⁻¹) usando dos medios de bajo coste compuestos por harina de soja desengrasada 44 % a 40 g L⁻¹ como fuente de nitrógeno en combinación con sacarosa a 20 g L⁻¹ o melaza a 5 g L⁻¹ como fuentes de carbono. Además la producción de la cepa CPA-8 en este medio de bajo coste pudo ser escalada a nivel de laboratorio en un bioreactor de 5 L de capacidad a 30 °C, con agitación de 200 rpm y flujo de aire de 100 L h⁻¹, manteniendo las concentraciones de la bacteria a 3×10^9 UFC mL⁻¹. Los ensayos en fruta con tratamientos de la cepa CPA-8 crecida en el medio optimizado de bajo coste demostraron que ésta mantenía su

IV

eficacia de biocontrol contra *M. fructicola* en melocotones con reducciones de enfermedad de hasta el 95 %, similar a los tratamientos de la bacteria crecidos en medios de laboratorio. Las poblaciones de CPA-8 sobrevivieron en heridas de melocotones inoculados, independientemente de los medios de cultivo utilizados. Estos resultados proporcionan una base fiable para la producción de la cepa CPA-8 a nivel industrial.

En la formulación de *B. subtilis* CPA-8 mediante secado por atomización (Capítulos 4 y 5) los resultados demostraron que esta bacteria es capaz de sobrevivir a las altas temperaturas del proceso (32.3 % de viabilidad y 3.3×10^9 UFC g⁻¹ de concentración final de producto), comparado con *P. agglomerans* CPA-2 utilizada como modelo de bacteria sensible al calor y no formadora de endosporas que no fue resistente (menos del 2 % de viabilidad). La supervivencia de la cepa CPA-8 a la atomización estuvo directamente relacionada con su capacidad para producir endosporas resistentes a las altas temperaturas. La resistencia al calor de la cepa CPA-8 además dependió de la fase de crecimiento, siendo el cultivo de 72 h, más resistente que el de 24 h, probablemente por su mayor contenido de endosporas.

Los resultados obtenidos en el estudio de la sustancia protectora/material de soporte más adecuada para la atomización de *B. subtilis* CPA-8 demostraron que cuatro diferentes combinaciones de leche desnatada en polvo y MgSO₄ proveían una buena recuperación de polvo (28–38 %) y contenidos de humedad del 7–13 %. La supervivencia de la cepa CPA-8 varió considerablemente en los atomizados con los cultivos de 24 h y los de 72 h. Las formulaciones de 72 h mostraron una mayor supervivencia (28–32 %) y con concentraciones finales entorno a $1.6\text{--}3.3 \times 10^9$ UFC g⁻¹, mientras que la viabilidad de los atomizados de 24 h fue inferior al 1 %, por lo cual se seleccionaron para su posterior evaluación. Diferentes rehidratantes como el agua o tampón fosfato proporcionaron una buena recuperación de células viables en las formulaciones de CPA-8 similares a las obtenidas en leche desnatada en polvo o sacarosa al 10 % por lo que el agua puede utilizarse como rehidratante con la ventaja a nivel práctico que supone. El estudio de la vida útil de las formulaciones de la cepa CPA-8 almacenadas a 4 °C (frío) y a 20 °C (temperatura ambiente) demostró que la viabilidad se mantuvo o disminuyó ligeramente entorno a 0.2–0.3 log durante 6 meses de almacenamiento. Además después de 4 y 6 meses de almacenamiento estas formulaciones controlaron la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. en nectarinas y melocotones mostrando reducciones de la incidencia de la enfermedad entre el 90 y 100 %. Los resultados obtenidos demostraron que la atomización podría ser un método de secado adecuado para obtener formulaciones estables y eficaces de *B. subtilis* CPA-8.

En conclusión los estudios realizados en esta tesis demuestran el potencial del agente de biocontrol *B. subtilis* CPA-8 para el control de enfermedades de postcosecha de fruta y sientan las bases para su posterior implementación de la producción y formulación a nivel comercial

Resum

La limitació en l'ús de fungicides per al control de malalties en postcollita de fruita és una problemàtica d'elevada magnitud en el sector fructícola actual. Degut a això l'ús d'estratègies alternatives com el control biològic microbià són fonamentals per a la producció de fruita de qualitat. Malgrat tot, el desenvolupament de programes de biocontrol eficaços requereix d'un coneixement profund de la capacitat de control i els mecanismes d'acció utilitzats per l'agent microbià que es pretén emprar, així com de la possibilitat per a què aquest pugui ésser produït i formulat a nivell comercial. En aquest context, la bactèria *Bacillus subtilis* soca CPA-8 aïllada de la superfície de nectarines al Laboratori de Patologia de Postcollita del Centre IRTA (Lleida) ha demostrat tenir una bona capacitat de biocontrol de malalties de postcollita de fruita de pinyol. El seu futur ús a nivell comercial depèn de l'estudi del seu potencial de biocontrol de malalties de postcollita de fruita; així com del desenvolupament de processos per a l'optimització de la producció i formulació.

La present tesi tenia com a objectiu principal avaluar aspectes clau per al desenvolupament de *B. subtilis* CPA-8 com agent efectiu per al control biològic de malalties de postcollita de fruita. Per a complir amb aquest objectiu, en primer lloc, es va dur a terme una anàlisi detallada de les característiques biològiques de la soca CPA-8 com ara el seu creixement en medi de cultiu, producció d'endòspores i substàncies antifúngiques; així com el seu potencial per al control de malalties importants en postcollita de taronja, poma i fruita de pinyol (Capítol 1). Amb aquests resultats, el següent pas fou estudiar el mode d'acció utilitzat per *B. subtilis* CPA-8 per a la supressió de patògens de postcollita, concretament contra *Monilinia* spp. causant de la podridura marró en fruita de pinyol (Capítol 2). Mitjançant la combinació d'eines d'anàlisi químic, moleculars i biològiques es van determinar els principals factors implicats en la capacitat antagonica de la soca CPA-8 contra *Monilinia* spp. El pas següent fou optimitzar la producció de *B. subtilis* CPA-8, en aquest sentit es va desenvolupar un medi de cultiu de baix cost que proporcionés un creixement alt i mantingués l'eficàcia de biocontrol (Capítol 3). Primer es van buscar fonts de nitrogen i de carboni econòmiques entre productes comercials i subproductes agroalimentaris. Posteriorment es va dur a terme l'escalat de la producció de la bactèria en un bioreactor de 5 L i es va comprovar l'efectivitat per al control de *Monilinia* spp. en préssecs. El pas final fou la formulació de *B. subtilis* CPA-8 mitjançant l'assecat per atomització (Capítols 4 i 5). Aquest mètode fou seleccionat per dos motius, d'una banda perquè aquesta és una tècnica d'assecat viable per a formulació de bacteries a baix cost i per l'altra banda en base als resultats obtinguts en el capítol 1 sobre la capacitat de la bactèria per produir endòspores resistents al calor i efectives contra patògens de postcollita de fruita. Primer es va dur a terme un estudi comparatiu de l'efecte de l'atomització sobre la supervivència de *B. subtilis* CPA-8 i de l'agent de biocontrol *Pantoea agglomerans* CPA-2 (Capítol 4). Posteriorment es va realitzar una avaluació de les substàncies protectores/material de suport més adequades per a l'atomització de la soca CPA-8, i amb els millors productes atomitzats es van avaluar diferents medis de rehidratació i l'activitat antifúngica; així com la vida útil i l'efectivitat durant l'emmagatzemament (Capítol 5).

Els resultats obtinguts en el capítol 1 demostraren que *B. subtilis* CPA-8 produeix cèl·lules, endòspores resistents al calor i compostos que tenen una alta activitat antagònica *in vitro* contra els principals patògens de postcollita de fruita *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* i *Penicillium expansum*. Els tractaments de cèl·lules, endòspores y sobrenedants lliures de cèl·lules de la soca CPA-8 mostraren diferents nivells d'efectivitat per al control de podridures en taronja, poma i fruita de pinyol, presentant els millors resultats contra *Monilinia* spp. en préssecs i nectarines amb reduccions de la incidència de la malaltia fins al 100 %. L'assaig de dosis de diferents tractaments de la soca CPA-8 a 10^8 , 10^7 i 10^6 UFC mL⁻¹ foren efectius contra *Monilinia* spp. de forma semblant o millor al Serenade Max®.

L'estudi del mode d'acció de *B. subtilis* CPA-8 (Capítol 2) va demostrar que els sobrenedants lliures de cèl·lules provinents de cultius líquids tenen una alta activitat antifúngica *in vitro* contra *Monilinia* spp. similar a l'observada amb suspensions cel·lulars. Les anàlisis mitjançant PCR i bioautografia en TLC d'extractes butanòlics d'aquests sobrenedants en comparació amb els de les soques de referència de *B. subtilis* UMAF6614 i UMAF6639, van revelar la producció de les principals famílies de lipopèptids antifúngics coneguts en *Bacillus* (fengícines, iturines i surfactines), fet que apuntava l'antibiosi com a principal mecanisme d'acció implicat en la capacitat de biocontrol de *B. subtilis* CPA-8. Les fraccions corresponents a les fengícines foren les responsables de l'activitat inhibidòria de la soca CPA-8 enfront de *Monilinia* spp. Aquests resultats van ser corroborats definitivament mitjançant la construcció de mutants de *B. subtilis* CPA-8 defectius per a la producció de fengicina interrompent l'expressió del gen *fenB*. Les anàlisis per PCR i bioautografia en TLC revelaren que els mutants defectius de la soca CPA-8 perdien la capacitat d'inhibir a *Monilinia* spp. per la seva incapacitat per a produir fengícines. Els assaigs d'efectivitat en fruita utilitzant tractaments provinents dels mutants de la soca CPA-8 van demostrar que aquests havien perdut la capacitat de controlar la podridura causada per *Monilinia* spp. amb percentatges d'incidència similars als observats en el control sense tractar, mentre que els tractaments amb la soca parental o Serenade Max® presentaven reduccions de la malaltia de fins el 100 %. Tots aquests resultats demostraren que la producció de fengícines juga un paper molt important en l'efectivitat de *B. subtilis* CPA-8 per a controlar la podridura marró del préssec; i que aquest resulta ser el principal mode d'acció implicat en la seva capacitat de biocontrol.

En l'optimització de la producció de *B. subtilis* CPA-8 (Capítol 3) els resultats obtinguts van demostrar que és possible aconseguir alts nivells de biomassa (superiors a 3×10^9 UFC mL⁻¹) emprant dos medis de baix cost compostats per farina de soja desengreixada 44 % a 40 g L⁻¹ com a font de nitrogen en combinació amb sacarosa a 20 g L⁻¹ o melassa a 5 g L⁻¹ com a fonts de carboni. A més a més, la producció de la soca CPA-8 en aquest medi de baix cost va poder ser escalada a nivell de laboratori en un bioreactor de 5 L de capacitat a 30 °C, amb agitació de 200 rpm i flux d'aire de 100 L h⁻¹, mantenint les concentracions de la bactèria a 3×10^9 UFC mL⁻¹. Els assaigs en fruita amb tractaments de la soca CPA-8 crescuda en el medi optimitzat de baix cost van demostrar que aquesta mantenia la seva eficàcia de biocontrol contra *M. fructicola* en préssecs amb reduccions de la malaltia de fins al 95 %, similar als

VIII

tractaments de la bactèria crescuts en medis de laboratori. Les poblacions de CPA-8 van sobreviure en ferides de préssecs inoculats, independentment dels medis de cultiu utilitzats. Aquests resultats proporcionen una base fiable per a la producció de la soca CPA-8 a nivell industrial.

En la formulació de *B. subtilis* CPA-8 mitjançant assecat per atomització (Capítols 4 i 5) els resultats demostraren que aquesta bactèria és capaç de sobreviure a les altes temperatures del procés (32.3 % de viabilitat i 3.3×10^9 UFC g⁻¹ de concentració final de producte), comparada amb *P. agglomerans* CPA-2 utilitzada com a model de bactèria sensible a la calor i no formadora d'endòspores que no fou resistent (menys del 2 % de viabilitat). La supervivència de la soca CPA-8 a l'atomització va estar directament relacionada amb la seva capacitat per a produir endòspores resistents a les altes temperatures. La resistència a la calor de la soca CPA-8 a més a més va dependre de la fase de creixement, essent el cultiu de 72 h, més resistent que el de 24 h, probablement pel seu major contingut d'endòspores.

Els resultats obtinguts en l'estudi de la substància protectora/material de suport més adequada per a l'atomització de *B. subtilis* CPA-8 van demostrar que quatre diferents combinacions de llet desnatada en pols i MgSO₄ proveïen una bona recuperació de pols (28–38 %) i continguts d'humitat del 7–13 %. La supervivència de la soca CPA-8 fou diferent en els atomitzats dels cultius de 24 i 72 h. Les formulacions de 72 h mostraven una major supervivència (28–32 %) y amb concentracions finals al voltant d' $1.6–3.3 \times 10^9$ UFC g⁻¹, mentre que la viabilitat dels atomitzats de 24 h fou inferior a l'1 %, fet pel qual les primeres van seleccionar-se per a la seva posterior avaluació. Diferents rehidratants como l'aigua o el tampó fosfat van proporcionar una bona recuperació de cèl·lules viables en les formulacions de CPA-8 similars a les obtingudes amb llet desnatada en pols o sacarosa al 10 % amb el que es dedueix que l'aigua pot utilitzar-se com a rehidratant amb l'avantatge a nivell pràctic que això suposa. L'estudi de la vida útil de les formulacions de la soca CPA-8 emmagatzemades a 4 °C (fred) i a 20 °C (temperatura ambient) va demostrar que la viabilitat es mantenia o disminuïa lleugerament (0.2–0.3 log) durant 6 mesos d'emmagatzematge. A més a més, després de 4 i 6 mesos de conservació aquestes formulacions controlaven la podridura marró causada per *Monilinia* spp. en nectarines i préssecs mostrant reduccions de la incidència de la malaltia entre el 90 i 100 %. Els resultats obtinguts van demostrar que l'atomització podria ser un mètode d'assecat adequat per a obtenir formulacions estables i efectives de *B. subtilis* CPA-8.

En conclusió els estudis realitzats en aquesta tesi demostren el potencial de l'antagonista *B. subtilis* CPA-8 per al control de malalties de postcollita de fruita i estableixen les bases per a la seva posterior implementació de la producció i formulació a nivell comercial.

Summary

Synthetic fungicides are the primary means to reduce losses caused by postharvest diseases. However, public concern for their negative impact on human health and environment associated with undesirable chemical residues on fruit and proliferation of fungicide-resistant isolates have impelled the search for alternative methods. Biological control using microorganisms has emerged as an effective alternative to control postharvest diseases and to produce quality fruit free of fungicide residues. However, the development of a successful biocontrol product requires a strong knowledge about the antagonistic ability and mechanisms of action used by the microbial agent to disease suppression and the possibility for its production and formulation to commercial application. In this context, *Bacillus subtilis* strain CPA-8 isolated from nectarines surface in the Postharvest Pathology Laboratory from IRTA centre (Lleida) has shown a significant capacity for biocontrol of postharvest diseases of stone fruit. Its future use on a commercial level depends on its antagonistic potential to control fruit postharvest diseases as well as an optimum production and formulation systems.

This thesis has the main objective to evaluate key aspects involved in development of *B. subtilis* CPA-8 as an effective biocontrol agent of postharvest diseases on fruit. To achieve this objective, first, the CPA-8 growth and production of endospores and antifungal substances were characterized. Then, biocontrol potential of *B. subtilis* CPA-8 was tested against the main postharvest decay on oranges, apples and stone fruit (Chapter 1). Based on these results, the mechanism of action used by CPA-8 to suppress postharvest pathogens, particularly against *Monilinia* spp. causing brown rot in stone fruit was studied (Chapter 2). Based on chemical, molecular and biological analysis the key factors involved in the biocontrol activity of CPA-8 against *Monilinia* spp. were identified. Next step was optimizing *B. subtilis* CPA-8 production by developing a low cost medium that provide maximum bacterium growth and maintain its biocontrol efficacy (Chapter 3). First, different media combining economical nitrogen and carbon sources from commercial products and by-products were evaluated. Second, CPA-8 production was scaled up in a 5-liter bioreactor and the efficacy to control of *Monilinia* spp. in peaches was evaluated. The final step was *B. subtilis* CPA-8 formulation by spray drying (Chapters 4 and 5). This method was selected because it is a cost effective technique for bacteria preservation and results of Chapter 1 indicated that CPA-8 was heat resistant by endospores production capacity. These endospores had also demonstrated good antifungal activity against fruit postharvest pathogens. First, the role of endospore production by *B. subtilis* CPA-8 on its survival to spray-drying process was investigated by comparing CPA-8 with the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 as model of heat-sensitive and non-spore forming bacterium (Chapter 4). Finally, carriers/protectants were evaluated to prepare CPA-8

formulations by spray drying; and with the best CPA-8 formulations rehydration media, shelf life stability and biocontrol efficacy during storage were evaluated (Chapter 5).

The results obtained in Chapter 1 indicated that CPA-8 produces cells, heat-resistant endospores and compounds with high antifungal activity *in vitro* against the major fruit postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* and *Penicillium expansum*. Treatment of cells, endospores and cell-free supernatants of CPA-8 showed different efficacy levels to control fungal decay on oranges, apples and stone fruit, obtaining the best results against *Monilinia* spp. on stone fruit with disease reductions up to 100%. Dose tests demonstrated that different CPA-8 treatments at 10^8 , 10^7 and 10^6 CFU mL⁻¹ were effective against *Monilinia* spp., similar or better than Serenade Max[®], a commercial biocontrol product based in a *B. subtilis* strain. Experimental evidence suggested that *B. subtilis* CPA-8 has biocontrol potential to control postharvest diseases on several fruit types, particularly against peach brown rot.

The mode of action study (Chapter 2) showed that cell free supernatants and butanolic extracts from liquid cultures of *B. subtilis* CPA-8 had a strong antifungal activity *in vitro* against *Monilinia* spp. similar to that observed with cell suspensions. Fengycin, iturin and surfactin lipopeptides were identified by TLC in butanolic extracts from cell free supernatants of CPA-8 by comparison with the *B. subtilis* reference strains UMAF6614 and UMAF6639, indicating that antibiosis could be the major factor involved in the CPA-8 biological control ability. TLC-bioautography analysis showed that CPA-8 antifungal activity was associated only with fengycin lipopeptide. These results were definitively supported by mutagenesis analysis targeted to suppress fengycin biosynthesis by disruption of the *fenB* gene. PCR and TLC-bioautography analysis allowed to identify CPA-8 transformants with reduced or suppressed antifungal activity and to select the defective phenotype associated with the lack of fengycin bands. Fruit trials confirmed that fengycin-defective mutants lost their ability to control peach brown rot disease in comparison with CPA-8 wild type strain or Serenade Max[®]. Taken together our data indicate that fengycin-like lipopeptides play a major role in the biological control potential of *B. subtilis* CPA-8 against peach brown rot.

The results obtained in Chapter 3 indicate that high production levels of *B. subtilis* CPA-8 ($>3 \times 10^9$ CFU mL⁻¹) could be achieved in a low cost medium based on defatted soy flour 44 % (40 g L⁻¹) with sucrose (20 g L⁻¹) or molasses (5 g L⁻¹). CPA-8 production in the optimized low cost medium was scaled-up in a 5-L bioreactor at 30 °C under shaking at 200 rpm and with air flow of 100 L h⁻¹ and production was maintained around 3×10^9 CFU mL⁻¹. Fruit trials with cells and cell free supernatants obtained from CPA-8 grown in optimized medium maintained biocontrol efficacy against *M. fructicola* in peaches showing disease reduction up to 95 %, similar to the treatment from bacterium grown in expensive laboratory media. CPA-8 populations survived in wounds on inoculated peaches, regardless

of the culture media used. The results could be used to provide a reliable basis for the fermentation scaling-up process to an industrial level.

The results obtained in Chapters 4 and 5 indicate that *B. subtilis* CPA-8 is heat resistant to high temperatures involved in spray-drying process by endospore production comparing with the heat sensitive and non-spore forming *P. agglomerans* CPA-2. The 72-h-old CPA-8 cultures spray-dried showed the best survival with 32.3 % viable cells recovery and a final concentration product of 3.3×10^9 CFU g⁻¹, while CPA-2 viability was lower than 2 %. Heat resistance of CPA-8 was also depending on growth time, being 72-h-old culture more resistant than 24-h-old culture, probably due to the higher content of endospores. These results suggest that endospore production improves CPA-8 resistance to spray-drying formulation system.

The study of carriers/protectants addition in spray-drying CPA-8 formulations showed that four different combinations of skim milk and MgSO₄ provided reasonable recovery powder (28–38 %) and moisture content (7–13 %). CPA-8 survival varied considerably among spray-dried 24- and 72-h-old formulations. The 72 h-old CPA-8 culture spray dried showed the highest survival (28–32 %) and a final concentration product of $1.6\text{--}3.3 \times 10^9$ CFU g⁻¹, while viability of 24 h-old culture formulations were lower than 1 %. Rehydration media as water or phosphate buffer provided good recovery of dried cells from CPA-8 formulations as well as skim milk or sucrose both at 10%. This result is a practical advantage. CPA-8 formulations after 4 and 6 month of storage at 4 °C (cold) or at 20 °C (room temperature) maintained survival and efficacy to control brown rot caused by *Monilinia* spp. on nectarines and peaches achieving disease incidence reductions among 90 and 100 %. Spray drying could be considered a suitable method to obtain stable and effective formulations of *B. subtilis* CPA-8.

In conclusion, the studies in this thesis demonstrated the biocontrol potential of *B. subtilis* CPA-8 to control postharvest diseases of fruit and established the bases for subsequent implementation of production and formulation at commercial level.

Introducción General

Introducción general

1. Control Biológico

1.1. Definición y antecedentes

En la actualidad existe una demanda creciente de los consumidores por alimentos de calidad, dentro de los cuales las frutas en fresco y sus procesados constituyen un segmento prioritario por el importante papel que desempeñan en la dieta humana (Kapooria 2007). El concepto de calidad involucra principalmente la disponibilidad de fruta libre de enfermedades y de residuos químicos nocivos para la salud humana (National Research Council 1987), especialmente la infantil (National Research Council 1993). Por esta razón, la producción y el manejo de la fruta mediante estrategias alternativas para reducir o sustituir la aplicación de productos químicos sintéticos usados para controlar enfermedades de postcosecha han adquirido una gran importancia.

Las estrategias alternativas para el control de las enfermedades de postcosecha de fruta incluyen el uso de atmósferas controladas, medidas profilácticas, incremento de la resistencia natural, tratamientos de calor y con gases (CO₂, Ozono, O₂), irradiación, pesticidas obtenidos de extractos naturales, productos químicos de bajo riesgo y control biológico. Algunas de estas estrategias se encuentran en fase experimental y resultan menos factibles de utilizar debido a su elevado coste de aplicación y baja efectividad, mientras que otras como los fungicidas de bajo riesgo, los tratamientos térmicos (curado) y el control biológico solas o combinadas, están empezando a ser utilizadas a nivel comercial (Palou *et al.* 2001; Usall *et al.* 2001; Lima *et al.* 2006; Torres *et al.* 2007).

Dentro de las estrategias alternativas, el control biológico de enfermedades de postcosecha en frutales usando microorganismos ha sido un área de investigación muy activa en los últimos veinte años (Droby *et al.* 2009). En un sentido amplio, el control biológico se puede definir como la reducción del agente patógeno causante de la enfermedad por la acción de microorganismos vivos (Baker 1987). En la práctica el control biológico consiste en el uso de agentes antagonistas, usualmente aislados de la superficie de los frutos o del material vegetal, que al ser estimulados *in situ* o reintroducidos artificialmente actúan contra las poblaciones del patógeno suprimiendo o disminuyendo así el desarrollo de las enfermedades de postcosecha (Barkai–Golan 2001).

1.2. Microorganismos antagónicos

En las últimas dos décadas, el estudio de diversos microorganismos para el control de enfermedades de postcosecha de fruta ha avanzado intensamente (Teixidó *et al.* 2011). Varios microorganismos, especialmente levaduras y bacterias, han sido descritos como agentes efectivos en la reducción de las podredumbres de postcosecha de fruta de hueso (Wilson y Pusey 1985; Larena *et al.* 2005; Guijarro *et al.* 2006), peras y manzanas (Leibinger *et al.* 1997; Chand-Goyal y Spotts 1997; Viñas *et al.* 1998; Lima *et al.* 1999; El Ghaouth *et al.* 2000; Janisiewicz *et al.* 2001; Torres *et al.* 2005; Sugar y Basile 2008; Zhang *et al.* 2006, 2008), cítricos (Teixidó *et al.* 2001; Zheng *et al.* 2005; Nunes *et al.* 2009) y fresas (Karabulut *et al.* 2004).

Las principales ventajas del control mediante microorganismos frente a otros sistemas de control se pueden resumir en:

- ◆ Son más seguros en comparación con los principales productos químicos utilizados actualmente, porque tienen menos riesgos de toxicidad ya que no se acumulan en los alimentos.
- ◆ Son más persistentes en el tiempo, proporcionando un control más eficaz.
- ◆ Producen un efecto insignificante en el balance ecológico de la planta debido a que sólo interactúan sobre las especies patógenas contra las que son aplicadas, sin interferir sobre el resto de la microbiota natural existente, ni favorecer la aparición de enfermedades nuevas (Griffiths 1981).
- ◆ Son compatibles con otros sistemas de control con los que se pueden aplicar conjuntamente.

Los inconvenientes que limitan la utilización de microorganismos como agentes de biocontrol son:

- ◆ Similar a los productos químicos, el elevado coste que supone la determinación de la inocuidad del microorganismo antagónico en la salud humana y animal.
- ◆ En general, un espectro de acción muy específico si se comparan con los productos químicos de síntesis. Además, los agentes de biocontrol generalmente reducen las pérdidas causadas por la enfermedad a niveles aceptables aunque raramente eliminan la enfermedad completamente (Janisiewicz 1991).
- ◆ Igual que las moléculas químicas la existencia de dificultades en cuanto al paso de los agentes de biocontrol del laboratorio al mercado, sobre todo, debido a la inefectividad que éstos presentan al ser sometidos a las condiciones incontroladas de campo.
- ◆ La falta de impulso económico necesario para el desarrollo de una tecnología adecuada que permita un uso efectivo de los antagonistas (Wisniewski y Wilson 1992).
- ◆ A diferencia de los productos químicos, problemas en la formulación y vida útil debido a que son seres vivos que han de sobrevivir a las condiciones de limitación de nutrientes y condiciones limitadas de temperatura, desecación, actividad de agua (a_w), etc.
- ◆ Problemas en el registro de las formulaciones.

1.3. Desarrollo de un agente de control biológico

1.3.1. Criterios de selección de un antagonista ideal

A la hora de seleccionar un microorganismo como agente para control biológico en postcosecha, además de estudiar su poder inhibitorio se han de tener en cuenta muchas características. Según Wilson y Wisniewski (1989) un antagonista ideal de patógenos de postcosecha para el desarrollo de productos comerciales ha de ser:

- ◆ Genéticamente estable.
- ◆ Efectivo a bajas concentraciones.
- ◆ Poco exigente en sus requerimientos de nutrientes.
- ◆ Capaz para sobrevivir a condiciones ambientales adversas (incluyendo bajas temperaturas y almacenamiento bajo condiciones controladas).
- ◆ Eficaz contra una amplia gama de patógenos en diferentes tipos de frutas.
- ◆ Capaz de reproducirse en medios de crecimiento económicos.
- ◆ Prestarse a la formulación y almacenado por largos periodos sin perder capacidad de control.
- ◆ Fácil de aplicar.
- ◆ Resistente a productos químicos utilizados en postcosecha.
- ◆ No perjudicial para la salud humana.
- ◆ Compatible con los procedimientos de procesado comercial.

Adicionalmente, el uso de agentes microbianos de control biológico contra enfermedades de postcosecha de fruta demanda un amplio conocimiento de los mecanismos de acción a través de los cuales éstos actúan (El Ghaouth *et al.* 2004). A pesar del gran número de investigaciones sobre los microorganismos antagónicos sus mecanismos de acción no han sido completamente dilucidados (Janisiewicz y Korsten 2002). Los mecanismos utilizados por los agentes microbianos de biocontrol suelen ser diversos e incluyen la reducción directa de las poblaciones de los patógenos, protección en la superficie de la fruta por competencia por nutrientes y espacio, producción de antibióticos e inhibidores de crecimiento de patógenos e inducción de procesos de resistencia secundaria en el huésped (Compant *et al.* 2005).

1.3.2. Etapas y factores en el desarrollo de un agente de biocontrol para la obtención de productos comerciales

La identificación, desarrollo y comercialización de un producto biológico es un proceso largo y costoso (Droby *et al.* 1998, 2000; Blachinsky *et al.* 2007) que en las etapas iniciales demanda al investigador una inversión considerable de tiempo para desarrollar un

"concepto de producto" y resolver los posibles obstáculos para la comercialización. Para que un microorganismo se convierta en un agente de control biológico y se pueda comercializar como un producto comercial más, es necesaria la colaboración entre grupos de investigación y empresas del sector agrícola y alimentario; y ha de seguirse una serie de etapas (Figura 1) que demuestren principalmente: (1) la efectividad de microorganismo frente al patógeno, (2) la bioseguridad del antagonista seleccionado tanto para el hombre, como para el ambiente, y para los organismos que no ha de controlar, (3) la posibilidad de obtener productos de alta viabilidad y estables a un bajo coste, (4) la posibilidad de patentar y registrar para un uso comercial, (5) la factibilidad de comercializarlo como un producto con un rango de efectividad amplio y de fácil aplicación (Droby *et al.* 2009).

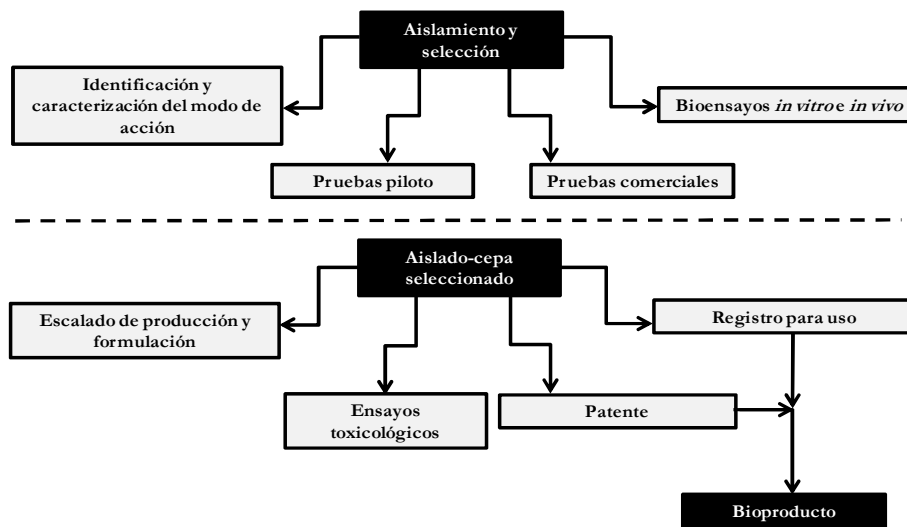


Figura 1. Etapas y factores en el desarrollo de un bioproducto (adaptado de Droby *et al.* 2009).

Adicionalmente, una vez descubierto el antagonista, y con el objetivo de incrementar su uso práctico se ha de seguir trabajando en otras estrategias para mejorar su efectividad como: la manipulación del ambiente nutricional, desarrollo de mezclas de antagonistas y combinación con otros sistemas de control.

1.4. Situación actual y perspectivas de futuro en el control biológico de enfermedades en postcosecha de fruta

En los pasados 20 años, a pesar del gran número de investigaciones realizadas en la búsqueda y aplicación de agentes microbianos efectivos en la reducción de las podredumbres de postcosecha de fruta, pocos de estos agentes han sido implementados a

nivel comercial; y comparado con el desarrollo de sistemas biológicos para el control de patógenos del suelo esta área sigue siendo muy joven (Droby *et al.* 2009; Teixidó *et al.* 2011).

Actualmente, los productos biológicos disponibles en el mercado son **Bio-Save®10 y 11 LP** (Jet Harvest Solutions, Longwood, Florida USA) (Janisiewicz y Korsten 2002) formulados a base de *Pseudomonas syringae* ESC10 y ESC11 registrados en USA por la Environmental Protection Agency (EPA) para el control de podredumbre en cítricos, cerezas, manzanas y peras; **Shemer WGD** (AgroGreen Minrav, Israel y en proceso por Bayer Cropscience) autorizado para su uso en Israel, Turquía, Italia y USA a base de la levadura *Metschnikowia fructicola* (Kurtzman y Droby 2001) para tratamientos de campo y líneas de empacado contra podredumbres de cítricos, uva, fresas, frutas de pepita y hueso; y a nivel europeo, **Boni Protect®** (BioFem GmbH, Alemania); a base de *Aureobasidium pullulans* para el control de podredumbres de frutas de pepita; **Nexy** (BioNext sprl, Bélgica) a base de *Candida oleophila* y autorizado para control de *P. expansum* y *B. cinerea* en manzana y pera. Dentro del grupo de trabajo de Patología de Postcosecha del Centro IRTA de Lleida se han desarrollado dos agentes de control biológico: **Candifruit** un formulado líquido a base de la levadura *Candida sake* CPA-1 (Viñas *et al.* 1998; Usall *et al.* 2001) para el control de enfermedades de frutas de pepita y **Pantovital** un formulado en polvo a base de la bacteria *Pantoea agglomerans* CPA-2 para el control de las principales podredumbres de cítricos y frutas de pepita (Nunes *et al.* 2002; Plaza *et al.* 2004; Cañamás *et al.* 2008a). Ambos microorganismos están preparados para ser comercializados y pueden obtenerse bajo previa demanda.

2. *Bacillus subtilis* como agente de control biológico

2.1. Características prácticas

Bacillus subtilis (Conh) pertenece a la familia *Bacillaceae*, género *Bacillus* y sus características son: bacilo Gram-positivo, catalasa-positivo, aerobio estricto (aún que puede crecer en vía anaeróbica), productor de endosporas, de antibióticos y matriz extracelular (biofilm) que comúnmente se encuentra en el suelo. En cultivo en placa, las colonias son de color blanco, opacas, con consistencia viscosa, margen ondulado, elevación plana y forma irregular. En el microscopio electrónico de barrido (Scanning Electronic Microscope, SEM) se observa que las células son bacilares y presentan flagelos peritricos que le permiten el movimiento.

El potencial de *B. subtilis* se basa en su capacidad para producir una amplia gama de moléculas bioactivas, que muestran fuertes propiedades antifúngicas, junto con una baja

toxicidad, alta biodegradabilidad y características amigables con el medio ambiente en comparación con los pesticidas químicos (Chen *et al.* 2008). Adicionalmente, la capacidad para formar endosporas, que le proporciona un alto nivel de resistencia a condiciones ambientales extremas, hace que estas bacterias sean buenas candidatas para el desarrollo de bioproductos (Errington 2003; Ongena *et al.* 2009).

B. subtilis se ha utilizado durante décadas para la elaboración de suplementos alimentos (probióticos) para animales y humanos así como de medicinas (Cutting 2011). Actualmente, un gran número de cepas de *B. subtilis* y sus metabolitos como enzimas son usadas a nivel comercial en elaboración de alimentos, medicamentos, cosméticos y productos biológicos de uso agrícola y para bioremediación (Ongena y Jacques 2008). En agricultura, *B. subtilis* junto con otras especies del género *Bacillus* representan aproximadamente la mitad de los bioplaguicidas disponibles comercialmente en el mercado mundial (Fravel 2005). En USA *B. subtilis* se encuentra dentro del grupo de sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe) y diferentes productos comercializados bajo el nombre de Serenade® (*B. subtilis* QST 713; AgraQuest Inc., California, USA) son utilizados para el control de enfermedades fúngicas en vegetales, frutas, frutos secos y cultivos vitícolas. A nivel Europeo, Serenade® es comercializado por la BASF (Ludwigshafen, Alemania) y su principio activo *B. subtilis* cepa QST 713 está incluida en el Anexo 1 de la UE.

En las condiciones de postcosecha, *B. subtilis* fue la primera especie bacteriana descrita como agente de biocontrol de la podredumbre marrón del melocotón causada por *Monilinia fructicola* (Pusey y Wilson 1984). Estos trabajos incluso brindaron una base para los principios del control biológico microbiano usados en estas dos décadas. Actualmente, algunas cepas de *B. subtilis* y su estrechamente relacionada *Bacillus amyloliquefaciens* *sp. nov., nom. rev.* están siendo estudiadas y testadas en aplicaciones de postcosecha de fruta en ensayos piloto y a nivel comercial (Obagwu y Korsten 2003; Arrebola *et al.* 2010b; Casals *et al.* 2010; Osman *et al.* 2011). Adicionalmente, algunos estudios han evaluado el potencial del producto comercial Serenade® para el control de podredumbres en melocotón (Restuccia *et al.* 2006); y otros como Kodiak® and Epic® formulados a base de las cepas GB03 y GB07 de *B. subtilis* contra la podredumbre causada por *P. digitatum* en naranjas (Zhang y Dou 2002).

2.1.1. Producción de moléculas bioactivas: lipopéptidos antifúngicos

Un significativo número de cepas de *B. subtilis* se han identificado como verdaderas microfábricas de una amplia gama de compuestos bioactivos potencialmente inhibidores del crecimiento de hongos fitopatógenos (Stein 2005). Esta capacidad de *B. subtilis* se relaciona a que un promedio entre el 4 y el 5 % del genoma se dedica a la producción de

antibióticos (Stein 2005). Los compuestos producidos por *B. subtilis* son moléculas bioactivas de naturaleza química compleja que tienen una fuerte capacidad antibiótica y antifúngica (Ongena y Jacques 2008). Los grupos principales están constituidos por antibióticos como zwittermicin-A (He *et al.* 1994; Hsieh *et al.* 2008), kanosamina (Stabb *et al.* 1994) y lipopéptidos (Ongena y Jacques 2008). De estos tres grupos, los lipopéptidos son los compuestos más estudiados por su alta actividad biocida, el potencial biotecnológico y las posibles aplicaciones en biocontrol (Chen *et al.* 2008).

Los lipopéptidos son proteínas cíclicas sintetizadas a partir de complejos multienzimáticos largos (Stein 2005). Su estructura química comprende una parte cíclica constituida por un único ácido graso que tiene ligados de 7 a 10 α -aminoácidos (Akpa *et al.* 2001). Están agrupados en tres familias: surfactinas, iturinas y fengicinas (Peypoux *et al.* 1978; Razafindralambo *et al.* 1993; Peypoux *et al.* 1999) (Figura 2). La familia de **surfactinas** son heptapéptidos que tienen un ácido graso β -hidroxilo con una cadena de átomos de carbono de 13 a 16. Son poderosos surfactantes con excepcionales propiedades emulsificantes y espumantes usados en bioremediación y biotecnología (Jacques 2011). No son fungitóxicas por ellas mismas pero muestran actividad antifúngica en sinergismo con iturina A (Maget-Dana *et al.* 1992). La familia de las **iturinas** (principalmente iturina A y C, bacillomicina D, F, L y LC y micosubtilina) al igual que las surfactinas son heptapéptidos con un ácido graso β -amino de C₁₄ a C₁₇ de largo, que tienen actividad antifúngica e inhibitoria del crecimiento de un amplio rango de patógenos de plantas (Romero *et al.* 2007a); y la familia de las **fengicinas** (principalmente fengicina A y B) son decaapéptidos con un anillo interno de lactona en la fracción peptídica y un ácido graso β -hidroxilo de C₁₄-C₁₈ que pueden ser saturados o insaturados. Las fengicinas son menos conocidas que las iturinas y surfactinas, pero mantienen una actividad fungitóxica fuerte, especialmente contra los hongos filamentosos (Vanittanakom *et al.* 1986; Romero *et al.* 2007b).

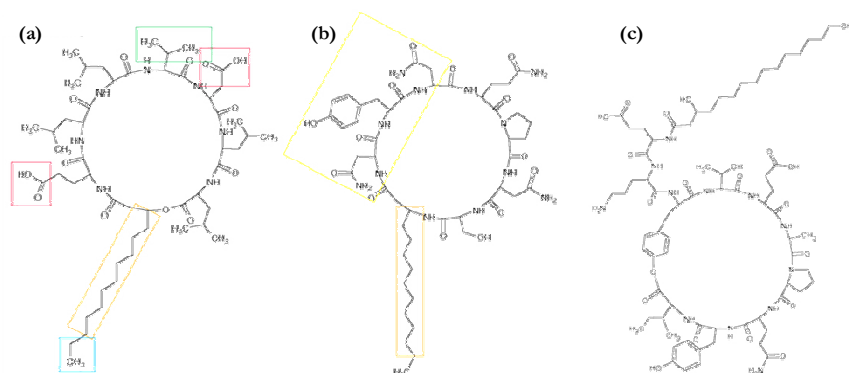


Figura 2. Estructura representativa de lipopéptidos de las familias (a) surfactina; (b) iturina y (c) fengicina (Peypoux *et al.* 1999; Bonmatin *et al.* 2003; Dufour *et al.* 2005).

2.1.2. Producción de endosporas

Las endosporas son producidas de forma natural por determinados grupos de bacterias como un medio para sobrevivir a las condiciones ambientales extremas y durante largos períodos de tiempo (Nicholson *et al.* 2000). Las bacterias formadoras de endosporas normalmente están dentro de los géneros Gram positivo *Bacillus* y *Clostridium*, aunque un gran número de otros géneros menos conocidos también son formadores de endosporas. La especie formadora de endosporas más estudiada es *B. subtilis*; utilizada como un sistema modelo en estudios bioquímicos, fisiológicos y genéticos. La esporulación en *B. subtilis* particularmente es una herramienta valiosa para entender varios procesos bacterianos, como la regulación transcripcional y el ciclo celular a nivel molecular (Errington 2003; Madigan y Martinko 2006). Las endosporas producidas por *B. subtilis* son estructuras de reposo (no reproductivas) que se caracterizan por tener un estado metabólico prácticamente detenido. La estructura de la endospora bacteriana, intrínseca a la supervivencia, contiene un cromosoma condensado e inactivo y capas adicionales alrededor, incluyendo una corteza rica en peptidoglicano y una o más capas de material proteico como envoltura de la spora (Henriques y Moran 2007) (Figura 3). En conjunto estos elementos, protegen la endospora de la escasez de nutrientes, desecación, temperaturas extremas de calor (normalmente hasta 80–85 °C en la mayoría de las especies), agentes oxidantes, radiación UV y gama, la exposición a solventes, detergentes, el peróxido de hidrógeno y enzimas como la lisozima (Nicholson *et al.* 2000).

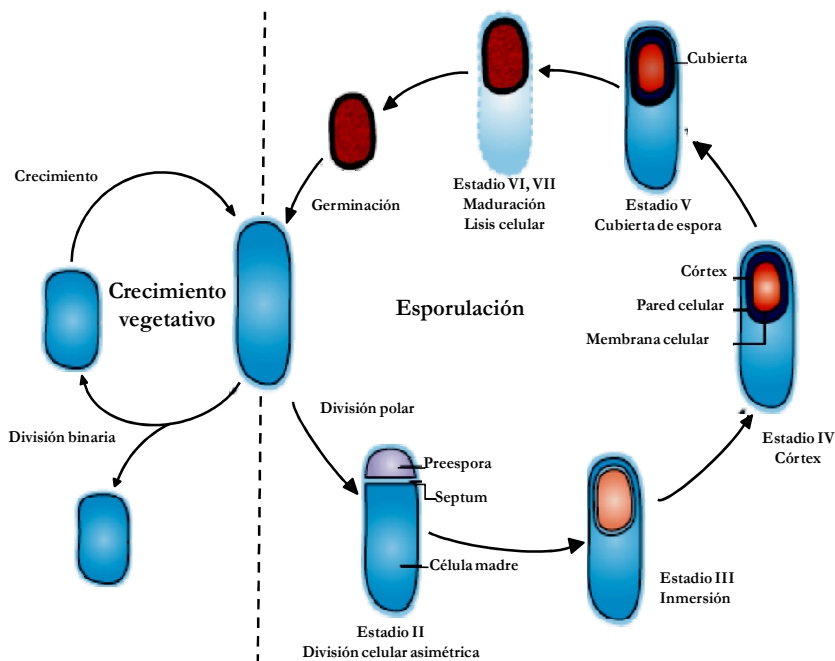


Figura 3. Ciclo de esporulación de *B. subtilis* (Errington 2003; Cutting 2011).

En condiciones naturales extremas para la supervivencia en el suelo, materia vegetal o el aire, las células vegetativas sufren una serie de complejos cambios genéticos, metabólicos y estructurales denominados esporogénesis. Estos cambios les conducen a la diferenciación, en su interior de una célula durmiente (la endospora). La célula madre (la célula vegetativa original que generó la endospora) finalmente se autolisa, liberando la endospora, que es capaz de permanecer en estado criptobiótico durmiente, varios decenios e incluso siglos. Las endosporas son fácilmente diseminadas por el aire y cuando caen en un medio líquido, como el agua, se desencadena su rápida germinación y se reinicia la actividad metabólica, de modo que cada endospora genera una nueva célula vegetativa, capaz de división binaria (Sharp y Pogliano 2002).

En condiciones artificiales de crecimiento (cultivo líquido o sólido), cuando los niveles de fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo caen por debajo de un umbral, constituye una señal bioquímica que indica a las células vegetativas que se avecina un largo período de privación de nutrientes y se desencadenan procesos genéticos y fisiológicos para la producción de endosporas (Errington 2003). Desde el punto de vista biotecnológico, la producción de endosporas otorga a la especie excepcionales ventajas ecológicas y resulta ser una característica tremendamente atractiva debido a que facilita su conservación por períodos largos como producto formulado (Zhang y Dou 2002).

2.1.3. Correlación entre lipopéptidos, células vegetativas y endosporas

En cuanto a la eficiencia de lipopéptidos, células vegetativas y endosporas, a pesar de que varios estudios han descrito el potencial biocida por separado, aún se conoce poco acerca de cómo cada uno de estos componentes contribuyen en forma global a la eficacia final del microorganismo (Touré *et al.* 2004; Ongena y Jacques 2008). De la información existente, los lipopéptidos como la iturina A, fengicinas y surfactinas, producidos *in vitro*, podrían tener una acción inmediata sobre poblaciones de patógenos después de la aplicación; así mismo podría ser incrementada mediante la secreción adicional de lipopéptidos *in situ* por crecimiento de las células vegetativas y endosporas presentes en el medio (Pryor *et al.* 2007). Adicionalmente el efecto de la combinación de ambos podría ser necesaria para maximizar la eficacia del microorganismo (Pryor *et al.* 2007).

Otro punto a considerar en el desarrollo de productos efectivos a base de *B. subtilis* es el hecho que durante el proceso de producción las concentraciones de células vegetativas, endosporas y lipopéptidos se expresan en diferentes niveles y son codependientes entre sí y de las condiciones del cultivo (Jacques *et al.* 1999). Esto se debe a que la regulación de síntesis de lipopéptidos está controlada por la expresión de genes que controlan el proceso de esporulación (Fawcett *et al.* 2000). Por ejemplo, en cultivo líquido los mayores niveles de producción de surfactinas ocurren en la fase de crecimiento exponencial entre las 0 a 20 h,

cuando las concentraciones de nutrientes son altas; a diferencia de las iturinas y fengicinas cuyas concentraciones más altas se expresan en la fase estacionaria a partir de las 48 h, cuando el microorganismo ha entrado en la fase estacionaria, ha dejado de multiplicarse y se encuentra produciendo altas cantidades de endosporas porque los nutrientes son escasos (Rahman *et al.* 2006).

2.2. Modo de acción

Aún cuando el modo de acción contra los patógenos de plantas más ampliamente descrito para *B. subtilis* es la antibiosis a través de lipopéptidos antifúngicos, otros mecanismos menos conocidos como competencia por espacio e inducción de defensas secundarias en el huésped han sido también descritos (Ongena *et al.* 2005a, b). Avances recientes muestran que este microorganismo y sus lipopéptidos no sólo pueden actuar como 'antagonistas' al inhibir el crecimiento de los patógenos, sino también como 'bloqueadores' del crecimiento mediante competencia y como 'inmuno estimuladores' por reforzar la resistencia del huésped (Ongena *et al.* 2005a).

2.2.1. Antibiosis: iturinas, fengicinas y surfactinas

En cuanto a los mecanismos de antibiosis usados por *B. subtilis*, el efecto de las iturinas ha sido el más estudiado por su fuerte actividad biocida contra un amplio rango de patógenos del suelo, foliares y de postcosecha (Gueldner *et al.* 1988; Romero *et al.* 2007b). Las fengicinas, especialmente A y B han demostrado tener una fuerte actividad antifúngica como las iturinas, pero más específica contra los hongos filamentosos (Ongena *et al.* 2005b). A pesar de que los mecanismos de acción de fengicinas son menos conocidos en comparación con otros lipopéptidos, diversos estudios han demostrado que interactúan fácilmente con componentes principales de la membrana del patógeno como el ergosterol alterando la estructura y la permeabilidad de forma dosis dependiente (Vanittanakom *et al.* 1986; Touré *et al.* 2004); y otros estudios demuestran que actúan de manera sinérgica con las iturinas (Romero *et al.* 2007b; Liu *et al.* 2011). Las surfactinas no tienen actividad antifúngica por sí solas pero actúan en sinergismo con iturina A (Maget-Dana *et al.* 1992).

2.2.2. Otros mecanismos: competencia, inducción de defensas secundarias

Recientes investigaciones han arrojado luz sobre el hecho de que los lipopéptidos también pueden influir en la capacidad de *B. subtilis* contra los patógenos utilizando mecanismos de acción por competencia e inducción de defensas secundarias en el huésped (Ongena *et al.* 2009). Así por ejemplo, se ha demostrado que las surfactinas cumplen un importante papel en

la colonización de cepas de *Bacillus* mediante producción de películas en la interface aire-agua (Chollet-Imbert *et al.* 2009), en entramado (Julkowska *et al.* 2005) o en la formación de biopelículas en las raíces (Bais *et al.* 2004; Branda *et al.* 2006). La posible aplicación de esta característica para el control de patógenos de postcosecha ha comenzado a discutirse en recientes trabajos con *B. amyloliquefaciens* (Arrebola *et al.* 2010a). Nuevos trabajos sobre el potencial de fengicinas han descrito que éstas actúan como inductores de defensas en el huésped solas o en sinergismos con otros lipopéptidos (Ongena *et al.* 2005b; Ongena y Jacques 2008).

2.3. Aplicación y perspectivas en postcosecha

Los avances en el uso de *B. subtilis* para el control de enfermedades en postcosecha de fruta se están dirigiendo a explorar aspectos fisiológicos y genéticos de la especie en cuanto a la multiplicación celular, producción de endosporas y antibióticos, procesos biotecnológicos de fermentación líquida y sólida, eficiencia postaplicación de extractos puros y concentrados de lipopéptidos y dinámica poblacional sobre la superficie de la fruta para producción *in situ* de sustancias antifúngicas (Pryor *et al.* 2007). Se estudia el potencial de cepas de *B. subtilis* productoras de lipopéptidos activos en la supresión de patógenos de postcosecha; así como la posibilidad de incorporarlas en sistemas de manejo integrado con otras estrategias de control considerando sus características de baja toxicidad, alta biodegradabilidad y amigables con el medio ambiente comparadas con los productos químicos sintéticos (Chen *et al.* 2008; Arrebola *et al.* 2010b; Osman *et al.* 2011; Casals *et al.* 2010).

2.4. El agente de control biológico *B. subtilis* cepa CPA-8

La cepa CPA-8 de *B. subtilis* fue aislada de la superficie de nectarinas provenientes de campos experimentales de Lleida y pertenece a la colección de microorganismos del Laboratorio de Patología de Postcosecha del Centro IRTA de Lleida (Figura 4) (Casals *et al.* 2010). Esta cepa fue identificada como miembro del complejo de especies de *B. subtilis* mediante análisis parcial de su 16S rADN comparado con las cepas tipo depositadas en la NCCB (Casals *et al.* 2010). La cepa CPA-8 presenta una gran capacidad de inhibición para controlar la podredumbre marrón en nectarinas y melocotones causada por *Monilinia* spp. sola o combinada con otras estrategias alternativas de control como agua caliente (Casals *et al.* 2010) o curado (Casals *et al.* 2012).

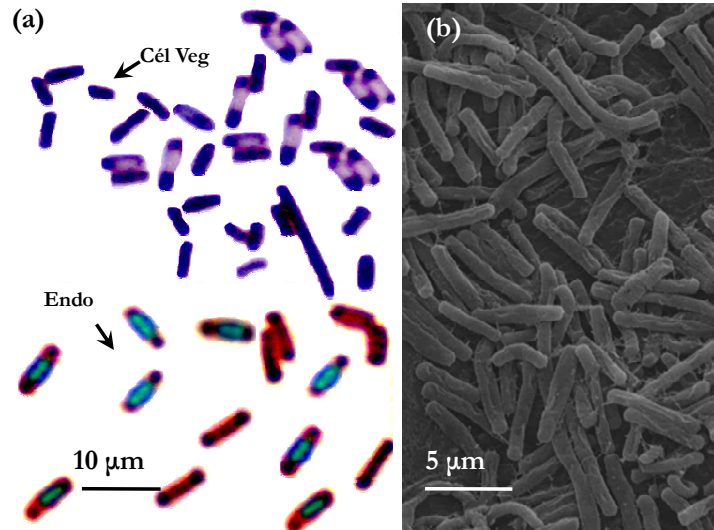


Figura 4. *B. subtilis* cepa CPA-8. En (a) cultivo con tinción de Gram y de endosporas bajo microscopio óptico de luz. Las flechas señalan las células vegetativas (**Cél Veg**) y endosporas (**Endo**). En (b) bacilos de la cepa CPA-8 crecidos sobre la superficie de nectarinas y observados bajo un microscopio electrónico de barrido (SEM).

3. Producción de agentes de control biológico

La producción de agentes de control biológico es un paso esencial para su uso comercial como bioproductos (Droby et al. 2009). Un factor clave a considerar es el desarrollo de un medio de cultivo económico que permita la obtención de grandes cantidades de un agente microbiano a un precio bajo manteniendo la eficacia de control biológico (Patiño-Vera *et al.* 2005; Teixidó *et al.* 2011). Los componentes de un medio de bajo coste deben satisfacer los requerimientos básicos para la producción de biomasa y metabolitos, al proporcionar un suministro adecuado de energía para el mantenimiento de la biosíntesis y el mantenimiento celular (Stanbury *et al.* 1995). Un medio económico debe proporcionar también una base sólida para ampliar el proceso de producción a nivel industrial. El uso de productos comerciales o subproductos provenientes de las industrias agroalimentarias como fuentes de nitrógeno y carbono, han sido empleados para la formulación de medios de bajo coste debido a que son sustratos baratos que permiten el crecimiento de agentes microbianos (Zabriskie *et al.* 1980). Sin embargo, la presencia de productos indeseables y los problemas de falta de homogeneidad en los sustratos de bajo coste y subproductos puede limitar su uso en un proceso industrial (Zhang y Greasham 1999).

3.1. Crecimiento bacteriano (metabolismo celular)

En microbiología, la palabra crecimiento se define como un incremento en el número de células, consecuencia de la división celular (Madigan y Martinko 2006). En condiciones artificiales, el crecimiento bacteriano (metabolismo celular) depende de la capacidad de la célula para utilizar los nutrientes del medio de cultivo y sintetizar los compuestos macromoleculares de las estructuras celulares y los compuestos de bajo peso molecular necesarios para vivir y reproducirse (Waites *et al.* 2001). Por otro lado, el crecimiento se ve altamente influenciado por las condiciones ambientales y el entorno (Ward 1991).

3.2. Factores que afectan el crecimiento bacteriano

3.2.1. Factores extrínsecos

Los factores extrínsecos son propios del ambiente e incluyen temperatura, humedad y tensión superficial de oxígeno. Estos parámetros pueden influir sobre el crecimiento de las bacterias que corresponden a los cambios producidos en el ambiente que las rodea, modificando su estructura y mecanismos de funcionamiento para poder sobrevivir en las nuevas condiciones.

- ◆ **Temperatura.** Las bacterias pueden crecer en un amplio rango de temperaturas, desde aquellas cercanas al punto de congelación hasta el punto de ebullición del agua. Según el margen de temperatura de crecimiento las bacterias se dividen frecuentemente en cinco grupos: **termófilas** que crecen a temperaturas elevadas entre 50 y 80 °C; **termótrofas** que tienen temperaturas óptimas entre 42 y 46 °C; **mesófilas** que crecen bien en un margen intermedio entre 30 y 37 °C; **psicótrofas** capaces de crecer a temperaturas mínimas entre -5 y 5 °C y **psicrófilas** que crecen a temperaturas mínimas entre -15 y 5 °C. La temperatura óptima de crecimiento está normalmente cerca del final del intervalo de temperaturas utilizadas por el microorganismo; y por encima de esa temperatura la velocidad de crecimiento decae rápidamente, debido al incremento de la tasa de muerte microbiana (Ward 1991). Estudios realizados por Jacques *et al.* (1999) demostraron que la temperatura óptima de *B. subtilis* en medio líquido se encuentra entre 25 y 37 °C.

La adaptación del microorganismo a temperaturas que no son sus óptimas de crecimiento representa: (1) una variación en la estabilidad térmica de sus proteínas, así por ejemplo, se observa una mayor resistencia al calor en las proteínas de microorganismos termófilos (Koffer y Gale 1957) y (2) una variación en la composición lipídica celular. De modo que a medida que disminuye la temperatura aumenta el contenido relativo de ácidos grasos insaturados en los lípidos celulares incluida la membrana, produciéndose un cambio en el grado de fluidez de la misma (Marr y

Ingraham 1962). En el caso de *B. subtilis* varios estudios han demostrado que la resistencia a altas temperaturas (40–60 °C) está correlacionada con la producción de diversas proteínas de estrés (Hecker *et al.* 1996; Movahedi y Waites 2000), pequeñas proteínas solubles en ácido (Fairhead *et al.* 1993) y de endosporas (Nicholson *et al.* 2000).

- ◆ **Humedad.** La humedad relativa del ambiente que rodea al microorganismo está relacionada de una forma muy estrecha con la actividad de agua de los mismos. De hecho, la humedad relativa es esencialmente una medida del agua de la fase gaseosa que rodea al microorganismo (Waites *et al.* 2001).
- ◆ **Tensión superficial de oxígeno.** Por el uso del oxígeno, los microorganismos se pueden clasificar en: **aerobios estrictos** que requieren la presencia de oxígeno para crecer, usándolo para su metabolismo y no llevan a cabo fermentación; **anaerobios estrictos** que no llevan a cabo fosforilación oxidativa y la presencia de oxígeno resulta tóxica; **anaerobios aerotolerantes** que respiran anaeróbicamente, pero pueden sobrevivir en presencia de oxígeno; **anaerobios facultativos** que pueden llevar a cabo tanto la fermentación como la respiración aeróbica, en ausencia o presencia de oxígeno; y **microaerófilos** que crecen bien a bajas concentraciones de oxígeno, pero no resisten altas concentraciones. Durante el crecimiento, la aireación del medio de cultivo permite la aportación del oxígeno necesario para la respiración y eliminación del CO₂ producido por el metabolismo de los sustratos carbonados.

B. subtilis ha sido ampliamente descrito como aerobio estricto, pero recientes estudios han demostrado que también puede crecer anaeróbicamente mediante la utilización de nitratos o nitritos como electrones aceptores o por fermentación en ausencia de electrones aceptores (Nakano y Zuber 2002). El paso de metabolismo aerobio a anaerobio, en *B. subtilis* está regulado principalmente a nivel transcripcional y en algunos casos por modulación de actividad enzimática (Nakano y Zuber 2002). La disponibilidad o ausencia de oxígeno en cultivos líquidos de *B. subtilis* está estrechamente relacionada con la producción de sustancias antifúngicas y endosporas (Pryor *et al.* 2007).

3.2.2. Factores intrínsecos

Los factores intrínsecos son la expresión de las propiedades físicas y la composición química del medio de cultivo, así como las propiedades biológicas del microorganismo. Entre éstas se incluyen:

- ◆ **Actividad de agua (a_w).** Todos los microorganismos requieren agua y su disponibilidad es un factor importante para el crecimiento microbiano en la naturaleza. La mayoría de bacterias son incapaces de prosperar en ambientes con muy baja a_w , de modo que: o bien simplemente mueren, o se deshidratan y pasan a condiciones latentes durante un tiempo

indefinido. Las bacterias pueden crecer sólo en o sobre los materiales con un adecuado contenido de agua libre y la tolerancia a la falta de agua (deseccación) puede ser tolerada en diferentes grados dependiendo de la especie bacteriana (Singleton 1999).

Generalmente cuando los microorganismos crecen a a_w por debajo de la óptima, su tolerancia a otros factores limitantes se ve reducida. Así por ejemplo a bajas a_w los intervalos de pH en los cuales pueden crecer los microorganismos son más pequeños. Lo mismo ocurre con la temperatura, de manera que a valores bajos de a_w el mínimo de temperatura al que puede crecer un microorganismo aumenta (Mossel *et al.* 1995).

- ◆ **pH.** Cada microorganismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y generalmente posee un pH óptimo muy bien definido. La mayoría de los ambientes naturales tienen valores de pH de 5.9 y los organismos habituales son los que presentan un pH óptimo equivalente. La mayoría de bacterias crecen sobre un intervalo de pH con un óptimo cercano al neutro (pH=7). Por otro lado, la mayoría de bacterias no pueden desarrollarse en pH ácido por debajo de pH 4.5–5 (Tortora *et al.* 2007). En *B. subtilis* el pH tiene un significativo efecto durante el crecimiento en medio líquido. Estudios realizados por Jacques *et al.* (1999) demostraron que el pH óptimo de *B. subtilis* es de 7. Adicionalmente la producción de endosporas y lipopéptidos antifúngicos están estrechamente relacionados con los cambios de pH durante fermentación líquida (Pryor *et al.* 2007).
- ◆ **Potencial redox.** La clasificación de los microorganismos como aerobios, microaerobios, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos, se basa en el potencial redox (Eh) necesario para su metabolismo y multiplicación (Hewitt 1950). El potencial redox es un índice de su grado de oxidación, es decir de la tendencia intrínseca a oxidarse y de la concentración de sustancias oxidantes, reductoras y del pH del medio o composición química del mismo. El potencial redox y la presión del oxígeno influyen en el crecimiento de las bacterias. Para la producción de biomasa a niveles altos, el oxígeno disuelto debe estar por encima de la concentración crítica, que varía en función de la bacteria y del medio de crecimiento (Ward 1991).
- ◆ **Requerimientos nutricionales.** Los microorganismos necesitan agua, carbono, nitrógeno, minerales, a veces factores de crecimiento, y si son aerobios oxígeno para formar su biomasa y como fuente de energía para la síntesis y mantenimiento celular. La composición elemental de la mayoría de microorganismos es muy similar (Greashan y Herber 1997; Costa *et al.* 2002a; Hernández 2003), y en consecuencia puede utilizarse como punto de partida para diseñar un medio de fermentación óptimo.

Fuentes de carbono. Uno de los requerimientos más importantes para el crecimiento microbiano es el carbono (Waites *et al.* 2001). Este elemento constituye la estructura básica de la materia viva; y es necesario para todos los compuestos orgánicos que forman una

célula viva. El 50 % del peso seco de una célula bacteriana típica es carbono, como elemento mayoritario de sus macromoléculas. En *B. subtilis*, se ha demostrado que diversas fuentes de carbono simples o complejas como glucosa o sacarosa influyen el crecimiento celular y la biosíntesis de antibióticos (Tabbene *et al.* 2009).

Fuentes de nitrógeno. Además del carbono los microorganismos necesitan otros elementos para la síntesis del material celular, principalmente proteínas, DNA, RNA y otros constituyentes celulares importantes como el ATP. El nitrógeno es el segundo elemento más abundante de una célula bacteriana y constituye cerca del 14 % de su peso seco (Waite *et al.* 2001). La mayoría de las bacterias utilizadas en procesos industriales pueden asimilar fuentes orgánicas e inorgánicas. El nitrógeno orgánico puede ser aplicado en forma de aminoácidos, urea, fuentes proteicas derivadas de subproductos o destilados de carne y levaduras (Stanbury *et al.* 1995). Las bacterias descomponen las proteínas presentes en estas fuentes y reincorporan los aminoácidos en las proteínas recién sintetizadas y otros compuestos que contengan nitrógeno. Otras bacterias utilizan el nitrógeno proveniente de los iones de amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-) que se encuentran en fuentes inorgánicas como amonio, sales de amonio o nitratos (Tortora *et al.* 2007). En *B. subtilis* diversas fuentes de nitrógeno como la peptona tienen un significativo efecto en la producción de sustancias antifúngicas particularmente (Jacques *et al.* 1999; Tabbene *et al.* 2009).

Elementos traza o oligoelementos. Las bacterias requieren cantidades muy pequeñas de elementos minerales, como hierro, cobre, molibdeno, magnesio y cinc; denominados elementos traza u oligoelementos (Waite *et al.* 2001). Los oligoelementos son esenciales en las actividades enzimáticas, y por lo general actúan como cofactores. En *B. subtilis* los oligoelementos han sido ampliamente referidos como factores importantes para su crecimiento y la producción de sus metabolitos (Cooper *et al.* 1981). Varios autores han descrito que los cationes Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} provenientes de sales inorgánicas disueltas en el medio de cultivo a concentraciones milimolares (mM) pueden incrementar la producción de células y metabolitos en diferentes cepas de *B. subtilis* (Abdel-Mawgoud *et al.* 2008; Tabbene *et al.* 2009).

Factores de crecimiento orgánicos. Los compuestos orgánicos esenciales que un organismo no puede sintetizar se conocen como factores de crecimiento orgánico. Al igual que los oligoelementos se necesitan en pequeñas cantidades e incluyen las vitaminas, aminoácidos y purinas. Las vitaminas son los factores más comúnmente utilizados y actúan como coenzimas (Waite *et al.* 2001). Muchas bacterias pueden sintetizar la totalidad de sus propias vitaminas y no dependen de fuentes externas, pero algunas son incapaces de hacerlo, por lo cual deben ser suplementadas. Las vitaminas más comúnmente requeridas por los microorganismos son tiamina, biotina, piridoxina y cobalina (Davis 1996).

B. subtilis es capaz de sintetizar importantes vitaminas como la riboflavina (vitamina B₂), biotina, ácido fólico y cobalmina, que se utilizan como aditivos en fabricación de alimentos para animales y humanos (Cutting 2011).

3.3. Medios de crecimiento: líquidos y sólidos

La composición y concentración de nutrientes en el medio de cultivo debe ser adecuada para el microorganismo específico que se desea desarrollar, junto con otros factores como el pH. En el caso de las bacterias, algunas pueden crecer casi en cualquier medio de cultivo; otras requieren medios especiales y muy pocas no pueden crecer en ninguno de los medio existentes hasta ahora (Tortora *et al.* 2007).

En general, se pueden distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio (Hernández 2003). En función de la composición y concentración de nutrientes los medios de cultivo pueden ser medios químicamente definidos o medios complejos (Zhang y Greasham 1999).

3.3.1. Medios de cultivo químicamente definidos

Los medios de cultivo químicamente definidos tienen como principal ventaja su estandarización y estabilidad en el tiempo debido a que se conoce su composición química exacta. Sin embargo, estos medios suelen reservarse para el crecimiento de bacterias (particularmente autótrofas) a nivel de laboratorio ya que la producción obtenida con ellos no suele ser elevada (Zhang y Greasham 1999; Hernández 2003).

3.3.2. Medios complejos (producción de bajo coste)

Los medios complejos que generan una alta productividad de microorganismos contienen ingredientes de origen natural cuya composición no es completamente conocida. Generalmente los sustratos utilizados son fuentes de nitrógeno orgánico como extracto de levaduras, carne o plantas o digeridos de proteínas de estas y otras fuentes (Tortora *et al.* 2007). Estos sustratos satisfacen los requerimientos de energía, carbono, nitrógeno y azufre de los microorganismos y proporcionan aminoácidos, oligoelementos, vitaminas y factores de crecimiento orgánicos para una alta producción (Crueger y Crueger 1993; Tortora *et al.* 2007). Sin embargo, estos sustratos tienen un elevado coste para ser utilizados en la producción a nivel industrial, por esta razón se recurre al uso de subproductos provenientes de las industrias alimenticia y agrícola que puedan brindar un balance nutricional adecuado (Zabriskie *et al.* 1980; Waites *et al.* 2001).

Los subproductos usados en el medio de cultivo deben satisfacer los requisitos básicos de cada microorganismo para la producción de biomasa y metabolitos, al proporcionar un suministro adecuado de nutrientes y energía para la biosíntesis y el mantenimiento celular (Stanbury *et al.* 1995). Además, un medio de bajo coste debe proporcionar una base sólida para el escalado de producción a nivel industrial.

Las principales ventajas que presenta el uso de subproductos son: el coste bajo, la alta disponibilidad y el beneficio medioambiental al ser productos reciclados que se incorporan nuevamente en la cadena alimenticia. Los inconvenientes más importantes son: la composición química variable comparada con la composición definida de los productos puros, que implica poca homogeneidad en el medio de cultivo (Zhang y Greasham 1999); y la posible presencia de productos tóxicos o metabolitos que pueden afectar al crecimiento del microorganismo (Stanbury *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1996).

Los subproductos de bajo coste comúnmente utilizados para la producción de bacterias incluyendo una amplia variedad de aislados de *B. subtilis* son:

- ◆ **Concentrados proteicos de origen animal.** Los concentrados proteicos de origen animal provienen de la desecación y molturación de desechos de pescado y carne. Son fuentes proteicas de gran valor biológico y alto contenido de aminoácidos esenciales.
- ◆ **Subproductos de soja.** Los subproductos de desecho provenientes de elaboración de alimentos a base de soja son considerados como excelentes sustratos para la producción industrial de bacterias benéficas y sus metabolitos. Esto se debe a que contienen elevados porcentajes de proteínas (40 %), carbohidratos (35 %), vitaminas y minerales. Subproductos de la soja como diferentes tipos de harina desengrasada, leche, licor y molturas de soja son utilizados para la producción industrial de bacterias benéficas y sus metabolitos incluido *B. subtilis* (Reis *et al.* 2004; Yu *et al.* 2008; Ewe *et al.* 2010).
- ◆ **Melazas.** Es un subproducto proveniente de la elaboración del azúcar a partir de la caña de azúcar y en menor grado de la remolacha azucarera. Debido al bajo coste y a su composición rica en azúcares fermentables (principalmente de sacarosa en un 50 %), sustancias nitrogenadas, vitaminas del grupo B y abundantes minerales como hierro, fósforo, potasio, zinc, sodio, cobre y magnesio constituye una de las fuentes de carbono más utilizadas para la producción industrial de microorganismos (Costa *et al.* 2001; Younis *et al.* 2010). Los medios constituidos por melaza en combinación con otras fuentes de nitrógeno proveen de nutrientes y energía necesarios para un rápido incremento y mantenimiento celular.
- ◆ **Lactosuero.** Es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la fabricación de quesos. Es un medio rico en nutrientes: lactosa como fuente de carbono, sales minerales, vitaminas solubles, proteínas solubles y algo de grasa (Scott 1991).

- ◆ **Subproductos de los cereales.** Se obtienen a partir del proceso de fabricación de harina de trigo. La principal diferencia entre los productos de trigo es el porcentaje de almidón y fibra que los componen.

3.4. Pasos del proceso de producción

Los microorganismos usados como agentes de biocontrol, especialmente las bacterias, generalmente se producen mediante cultivo líquido sumergido (Stanbury *et al* 1995; Tortora *et al.* 2007). Los pasos o etapas en el desarrollo del proceso de producción se muestran en la figura 5 y son:

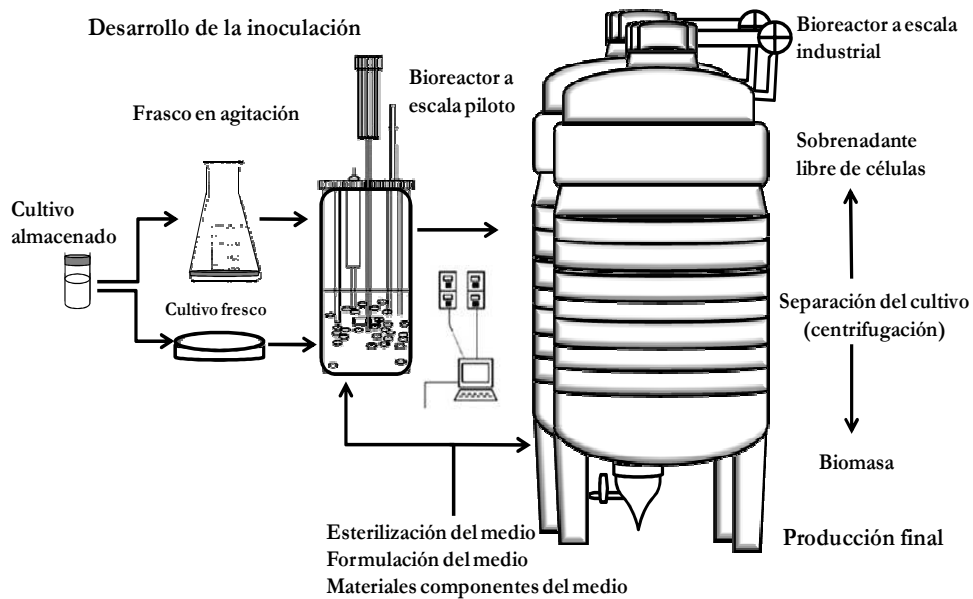


Figura 5. Esquema del proceso de producción en bioreactor. Etapas de escalado de producción.

- ◆ **Crecimiento del inóculo.** Se parte de un cultivo bacteriano puro generalmente almacenado a baja temperatura (5 °C) o en criocongelación (-80 °C) el cual se siembra en medio líquido o sólido con el fin de obtener un cultivo fresco denominado inóculo o cultivo iniciador.
- ◆ **Crecimiento en bioreactor a escala piloto.** Constituye una etapa de producción a pequeña escala con el objetivo de conseguir velocidades de crecimiento altas para disponer de niveles elevados de biomasa viable y en un estado fisiológico adecuado para ser utilizada como inóculo en la siguiente etapa. En esta etapa se realiza la producción de la

bacteria en un medio igual o similar al que se utilizará en la producción a nivel industrial (Ward 1991; Waites *et al.* 2001).

- ◆ **Crecimiento a nivel industrial.** En esta etapa se trabaja con un medio y condiciones de fermentación o crecimiento optimizadas que permitan tener producciones con altos rendimientos de masas de células viables y metabolitos (Ward 1991; Waites *et al.* 2001).
- ◆ **Obtención del producto final y su efectividad.** Las etapas de recuperación y purificación representan una parte muy importante en el proceso de producción de una bacteria; ya que se desea recuperar el máximo del producto, con el mayor grado de pureza y en un mínimo de tiempo y coste. Después de la producción los componentes del cultivo, dependiendo del compuesto de interés sólido (biomasa) o líquido (sobrenadante) se pueden separar mediante centrifugación o filtración (Hernández 2003). En el caso de los agentes de biocontrol, otro punto a considerar es su efectividad, es decir comprobar que la bacteria y sus metabolitos continúan siendo activos contra el patógeno.

4. Formulación de agentes de control biológico

4.1. Bases para la formulación de agentes de biocontrol

Junto con la producción, la formulación de agentes de control biológico es otro de los pasos esenciales para su uso comercial. Las formulaciones microbianas deben ser eficaces contra los patógenos de forma similar a los microorganismos en fresco, además deben mantener su viabilidad durante largos periodos de almacenamiento (vida útil) y ser fáciles de manipular y aplicar (Rhodes 1993).

La principal diferencia en la formulación de agentes de biocontrol frente a los químicos es que en el primer caso se está hablando de microorganismos vivos, por lo que durante el proceso se ha de garantizar las condiciones necesarias para mantener la viabilidad durante toda la vida útil del producto. El trabajo con microorganismos implica un gran número de problemas técnicos que pueden conducir a la pérdida de viabilidad, inactivación e incluso muerte durante el proceso de formulación (Rudge 1991).

La pérdida de viabilidad de los microorganismos después de la formulación y durante el almacenamiento y distribución es un problema añadido. Los productos formulados deberían poder almacenarse entre 2 y 4 años sin perder su actividad y sin suponer unas condiciones estrictas de almacenamiento (Rhodes 1993). Igualmente importante es conseguir que el material de envase y aplicación sean similares a aquellos a los que el productor está acostumbrado, de modo que el paso de productos químicos a biológicos

sea lo menos drástico posible. De este modo, preferiblemente el producto envasado debe tener el tamaño y la forma estándar (Butt *et al.* 1999), debe aplicarse mediante las técnicas y equipos ya existente y debe tener los mismos canales de distribución de los agroquímicos.

4.2. Tipos de formulación

Las formulaciones de los agentes de biocontrol se pueden realizar por diferentes métodos divididos principalmente en líquidos y sólidos, consistiendo en guardar el microorganismo fresco simplemente comprimido y conservado a 4 °C hasta complejos sistemas como la liofilización, atomización, lecho fluido y conservación en atmósfera de nitrógeno (Powell 1992; Morgan *et al.* 2006).

4.2.1. Formulaciones líquidas

El principal inconveniente de las formulaciones líquidas es que necesitan normalmente ser almacenadas y distribuidas bajo temperaturas de refrigeración y tienen una vida comercial bastante corta.

Se pueden distinguir dos tipos:

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

4.2.2. Formulaciones sólidas

La preservación de los microorganismos en estado sólido mediante diferentes métodos de secado se ha utilizado durante décadas, debido a que proporcionan una vida útil larga. El principio es que la eliminación del agua ralentiza el metabolismo de las células, previene la acumulación de productos tóxicos y disminuye la desnaturalización de las proteínas. Esta

alternativa es usada con éxito en bacterias, levaduras y hongos. Sin embargo, no todos los microorganismos muestran el mismo comportamiento y muchos de ellos tienden a perder viabilidad durante el proceso de deshidratación y su posterior almacenamiento debido a las altas temperaturas de secado y al estrés osmótico y oxidativo especialmente cuando se almacenan a temperatura ambiente (Teixeira *et al.* 1995; Gardiner *et al.* 2000; Silva *et al.* 2002).

Para evitar o disminuir los daños causados por el proceso de secado se puede añadir agentes protectores durante el crecimiento del microorganismo, o antes del secado. El tipo de protector depende en gran medida del microorganismo, sin embargo, hay algunos que parecen funcionar bien con muchas especies. Estos incluyen sólidos no grasos de leche, suero, trehalosa, glicerol, betaína, adonitol, sacarosa, glucosa, lactosa y polímeros como el dextrán y polietilenglicol (Hubalek 2003). Estudios realizados por Teixidó *et al.* (2006) han demostrado que la conservación de microorganismos utilizados como agentes de biocontrol en seco puede mejorar induciendo la acumulación de solutos intracitoplasmáticos, de forma que se logre un equilibrio osmótico entre el interior y el exterior celular. Esto se consigue sometiendo al microorganismo a un crecimiento en medios de cultivo con baja a_w para provocar estrés hídrico, de forma que se produzcan y acumulen solutos compatibles como polihidroxialcoholes, carbohidratos o aminoácidos. Otras investigaciones para la obtención de formulados a base de *Bacillus* incluyen el uso de choques térmicos para incrementar la producción de endosporas resistentes al calor (Chung *et al.* 2007; Sorokulova *et al.* 2008).

La gran mayoría de formulaciones sólidas incluyen un material de soporte que es el que ocupa el mayor volumen, por tanto, deben ser baratos, fácilmente esterilizables y no tóxicos para el microorganismo. Algunos de estos materiales añadidos a las formulaciones de las bacterias son tierras de diatomeas, talco, vermiculita, y otros polímeros como la goma xantano (Morgan *et al.* 2006).

La formulación de microorganismos en estado sólido puede realizarse por diferentes métodos de embebido en soportes o matrices y secado como:

- ◆ **Adsorción en turba** es un método muy utilizado para la formulación de inóculos de *Rhizobium* o *Pseudomonas fluorescens* (McIntyre y Press 1991). La función de la turba es la de dispersante y medio de protección de los microorganismos. Sin embargo, esta técnica tiene como principal inconveniente el hecho de que la turba es un material poco uniforme y de que la vida útil de la turba no estéril es muy limitada.
- ◆ **Encapsulación.** Consiste en la inclusión del agente de biocontrol en poliacrilamida o alginato sódico (Glass 1993). El principal inconveniente de esta técnica es la lenta hidratación y liberación de la materia activa. Como ejemplo de este tipo de formulación se podría citar, la encapsulación en alginato del *Gliocladium virens* (Soil Gard) (Lumsden *et al.* 1995).

- ◆ **Matrices de polisacáridos.** Consiste en el uso de polisacáridos como la metilcelulosa o la goma xantano para la desecación y protección de células microbianas. El principal inconveniente de estas formulaciones es que suelen perder viabilidad durante el almacenamiento. Con este método se han formulado varios hongos utilizando una matriz de gluten de trigo (Quimby *et al.* 1999).
- ◆ **Liofilización.** Es la técnica más usada para la conservación de microorganismos incluyendo colecciones tipo debido a que se puede mantener la viabilidad de los microorganismos por más de veinte años y no requiere condiciones especiales de baja temperatura para la conservación posterior (Champagne *et al.* 1991; Morgan *et al.* 2006). Consiste en la extracción del agua de células congeladas utilizando presión reducida (sublimación) dentro de una cámara de vacío. En este método el agua de las células congeladas en estado sólido pasa directamente a vapor mediante vacío. Generalmente, se usan sustancias crioprotectoras como la leche, suero o glutamato de sodio. El nivel de la viabilidad después de la liofilización varía en función de numerosos factores, incluyendo el microorganismo, así como la eficacia del agente de protección utilizado durante el proceso.
- ◆ **Atomización.** La atomización es un método de secado más barato usado para producción y formulación industrial de cultivos probióticos (Santivarangkna *et al.* 2007) y está siendo muy estudiada actualmente para la formulación de bacterias probióticas (Chávez y Ledebor 2007; Golowczyc *et al.* 2010). Debido a que este método es uno de los puntos a tratar en esta tesis, se explicará con más detalle en el próximo apartado.
- ◆ **Secado por contacto de aire.** En este método de secado el material a secar se deposita sobre una bandeja, cinta o tambor caliente. El secado puede ser acelerado mediante vacío o agitación y la elección del tipo de secador va en función de la sensibilidad al calor del material a secar, del ratio de producción a obtener, de la forma de alimentación (líquida, pasta, gránulos) y del tiempo y uniformidad del secado que se quiera obtener. El principal inconveniente de este método es que el secado depende de la superficie de contacto y el secador suele tener gran tamaño y trabaja en forma discontinua (Oakley 1997).
- ◆ **Secado por corriente de aire.** En este método de secado una capa de material a secar se deposita sobre una cinta que va pasando a través de un túnel de secado donde una corriente de aire caliente evapora el agua del producto. Este sistema permite trabajar de forma continua, aun cuando los tiempos de secado son elevados (Oakley 1997). Secadores de cinta y túnel son utilizados para la producción de levadura seca activa (Reed y Nagowithana 1991).

- ◆ **Lecho fluido.** El microorganismo mezclado con coadyuvantes en forma de pasta se extrusiona y deposita sobre bandejas perforadas a través de las cuales pasa una corriente de aire que fluidifica el producto produciéndose el secado. Las principales ventajas de este método son que se pueden obtener productos de baja humedad en corto tiempo y a bajos costes de mantenimiento con temperaturas de secado moderadas (35–45 °C). El uso del lecho fluido junto con liofilización ha sido descrito como exitoso para la conservación de los agentes de biocontrol *Epicoccum nigrum* (Larena *et al.* 2003a), *Penicillium oxalicum* (Larena *et al.* 2003b) y *Penicillium frequentans* (Guijarro *et al.* 2006).
- ◆ **Formación de espuma.** Es una nueva técnica de secado que utiliza matrices de azúcar como protectores para transformar suspensiones microbianas en espuma seca mecánicamente estable. La espuma es producida por ebullición, bajo vacío a temperatura ambiente para inducir un proceso llamado vitrificación, donde se produce espuma inmóvil y amorfa, no cristalina directamente desde un líquido. La espuma, a continuación, es nuevamente secada a temperatura elevada para aumentar su estabilidad a temperatura ambiente. Este proceso omite la necesidad de congelar previamente y por lo tanto, elimina los inconvenientes asociados; además se puede usar para secar grandes volúmenes, comparado con otras técnicas de evaporación similares. Se ha descrito para *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica* (Bronshstein 2004).

5. La formulación de bacterias mediante atomización

5.1. Conceptos básicos de la atomización

La atomización es un proceso ampliamente utilizado en la industria alimentaria, principalmente láctea, debido a que puede producir grandes cantidades de productos deshidratados a un bajo coste. El secado de microorganismos por atomización se remonta a 1920. Desde entonces, muchas investigaciones han estudiado el potencial de la atomización en la preservación de bacterias y el mantenimiento de cultivos “stock” (Prajapati *et al.* 1987; Teixeira *et al.* 1995; Bhandari *et al.* 2008). Actualmente, varios estudios han examinado la posibilidad de utilizar este método por su bajo coste y alto rendimiento para la preservación de las bacterias probióticas (Gardiner *et al.* 2000; Silva *et al.* 2002; Corcoran *et al.* 2004; Chávez y Ledebøer 2007; Riveros *et al.* 2009; Golowczyk *et al.* 2010; Peighamardoust *et al.* 2011). Existen pocos estudios sobre el uso de la atomización para la formulación de agentes de biocontrol (Costa *et al.* 2002b; Larena *et al.* 2003a, b; Abadías *et al.* 2005; Guijarro *et al.* 2006) y la mayoría con niveles de supervivencia bajos.

En la atomización se produce polvo seco a partir de una suspensión o cultivo microbiano líquido. El producto líquido es bombeado a una velocidad continua a través de una aguja inyectora o de un sistema centrífugo (atomizado) (Figura 6) en forma de millones de microgotas ($10\text{--}200\ \mu\text{m}$) dentro de una cámara de secado, donde es deshidratado usando aire caliente a elevadas temperaturas (entre $150\text{--}170\ \text{°C}$). Las microgotas atomizadas, se secan instantáneamente en gránulos de polvo por acción del aire caliente que circula a alta velocidad dentro de la cámara y antes de que lleguen a la base son arrastradas al separador de polvo (ciclón) para ser recogidas en un depósito colector (Bhandari *et al.* 2008).

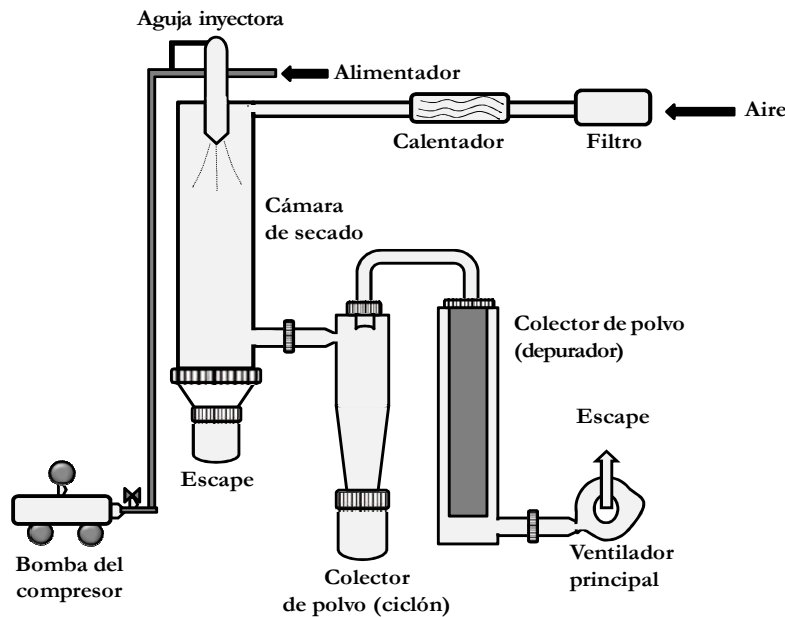


Figura 6. Esquema del proceso de secado de secado mediante atomización por inyección (Devakate *et al.* 2009).

Las características del polvo atomizado son directamente influidas por el tipo de atomizador utilizado (Peighambardoust *et al.* 2011). El atomizador es el encargado de formar las microgotas y distribuir las dentro de la cámara de secado. En los atomizadores centrífugos, la fuerza centrífuga es la encargada de generar las microgotas que salen despedidas hacia los laterales de la cámara y en los atomizadores de inyección las microgotas se forman al pasar la suspensión líquida a través de una aguja inyectora por un pequeño orificio. La selección del atomizador se realiza en función de las propiedades del líquido que se desea atomizar y de los requerimientos deseados en el producto final (Peighambardoust *et al.* 2011). Con el atomizador de inyección, el polvo obtenido tiene una mayor densidad de partícula debido a que se incorpora menos aire, lo que permite una fácil rehidratación del producto, una mejor vida útil y una reducción de pérdidas comparado con otros atomizadores (Devakate *et al.*

2009). El atomizador de inyección a escala de laboratorio es el sistema utilizado en los estudios de esta tesis.

5.2. Parámetros que afectan la viabilidad de las bacterias secadas mediante atomización

La conservación exitosa de una bacteria obtenida por atomización, requiere una evaluación de muchas variables relacionadas con el proceso (temperatura, flujo y el tiempo de exposición al calor); con el producto (agentes protectores); con la biología de la bacteria (especie, crecimiento en medio de cultivo, fase de crecimiento); con el pre-tratamiento (inducción de respuestas de estrés o tolerancia, sustancias protectoras) y con las condiciones de almacenamiento (medios de rehidratación, condiciones de envasado y de almacenado) (Chávez y Ledebøer 2007).

5.2.1. Parámetros de proceso

- ◆ **Tamaño de la cámara de secado.** Cuanto mayor es el volumen de la cámara de secado mayor es el porcentaje de viabilidad obtenido (To y Etzel 1997). Esto podría ser debido al incremento del contacto entre el aire y las microgotas de modo que las células se deshidratan más rápido y así se disminuye el período en el que se producen daños celulares (Fu y Etzel 1995).
- ◆ **Temperatura de entrada y salida.** Aunque se ha descrito que la temperatura del aire entrante puede disminuir la viabilidad celular (Mauriello *et al.* 1999), su incremento a niveles altos no está directamente relacionado con la inactivación celular y tiene un efecto bajo sobre la destrucción bacteriana comparada con la temperatura del aire saliente (Kim y Bhowmik 1990). Esto puede ser debido a que el grado de inactivación de las bacterias durante el secado depende de la combinación de la temperatura-tiempo. Varios investigadores han referenciado que el aumento de la temperatura de salida tiene una influencia importante en la reducción de la supervivencia después del secado (To y Etzel 1997; Lian *et al.* 2002).

La temperatura de salida es considerada el parámetro principal que afecta a la viabilidad de las bacterias atomizadas. Este parámetro depende de la temperatura de entrada, del caudal de aire, de la velocidad de la tasa de alimentación, de la composición del líquido atomizado, del tamaño de la gota en el atomizador y de la cámara de secado (Santivarangkna *et al.* 2008). Sin embargo, la configuración adecuada para estas variables es difícil de calcular previamente, esto puede permitir optimizar el secado y la obtención de un producto con alta viabilidad (Roelans y Taeymans 1990). Muchos investigadores han obtenido mayor viabilidad de las células microbianas a bajas temperaturas de salida (Bielecka y Majkowska 2000; Desmond *et al.* 2002).

5.2.2. Parámetros del producto (agentes protectores y/o materiales de soporte)

Los agentes protectores y/o materiales de soporte son sustancias que solas o en combinación pueden añadirse al microorganismo durante su crecimiento, antes o después de atomizar para aumentar la supervivencia de éste al proceso de secado y el volumen de producto final (Morgan *et al.* 2006). El tipo y concentración de sustancia transportadora influye en el radio de supervivencia y en la actividad enzimática del microorganismo atomizado. Estas sustancias permiten formar un polvo con el peso suficiente para poder ser recogido en el ciclón. Matrices alimentarias compuestas por proteínas (gelatina, leche de soja previamente fermentada) (Lian *et al.* 2002; Wang *et al.* 2004), polisacáridos (celulosa, almidón, goma arábiga), azúcares, especialmente disacáridos (sacarosa, trealosa) (Crowe 2002), polímeros (dextrans, polietilenglicol, polivinilpirrolidona), polialcoholes (sorbitol), sales (glutamato monosódico, KCl, MgSO₄, K₂SO₄) y productos lácteos (leche desnatada en polvo, lactosuero) han sido probados por varios autores (Costa *et al.* 2002b; Lian *et al.* 2002; Wang *et al.* 2004; Golowczyc *et al.* 2010).

5.2.3. Parámetros biológicos

- ◆ **Especie.** La viabilidad de distintas especies de un género determinado o incluso diferentes cepas de una misma especie difiere bajo las mismas condiciones de secado por atomización (Simpson *et al.* 2005; Santivarangkna *et al.* 2007). Trabajos recientes han demostrado que diferentes cepas de probióticos pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces* tienen diferente grado de tolerancia-sensibilidad a temperaturas altas entre 45 y 65 °C; y que esto puede ser un buen parámetro para determinar su supervivencia a la atomización (Corcoran *et al.* 2004; Golowczyc *et al.* 2010). Respecto a las bacterias del género *Bacillus*, particularmente de *B. thuringiensis*, recientes trabajos han demostrado el potencial de la atomización como método de formulación basados en su habilidad para formar endosporas resistentes a altas temperaturas (Prabakaran y Hoti 2008).
- ◆ **Medio y fase de crecimiento (inducción de respuestas al estrés por desecación y termotolerancia).** El medio y las condiciones de crecimiento afectan en la viabilidad de los microorganismos durante el secado y el período de almacenamiento posterior (Teixidó *et al.* 1998a, b). Durante el secado, los microorganismos se enfrentan a una decreciente actividad de agua (a_w) por lo que algunos acumulan solutos compatibles a fin de mantener el equilibrio osmótico con el ambiente extracelular altamente concentrado (Abadias *et al.* 2000). En general, las bacterias de interés comercial no sintetizan solutos compatibles por lo cual dependen del entorno para obtener los solutos que puedan ayudar a estabilizar las proteínas y la membrana celular durante situaciones de estrés osmótico por la baja a_w durante el proceso de secado (Teixidó

et al. 1998a, b; Morgan *et al.* 2006). Se ha demostrado que solutos compatibles como aminoácidos, aminos cuaternarias (glicina, betaína, carnitina) y azúcares en el medio incrementan la viabilidad de bacterias probióticas (Kets *et al.* 1996) y agentes de biocontrol como *Candida sake* durante el secado (Abadias *et al.* 2000). Algunos trabajos han demostrado que azúcares como la lactosa (Carvalho *et al.* 2004) o sales como NaCl (Teixidó *et al.* 2005, 2006) añadidas al medio de crecimiento mejoran la termotolerancia de las bacterias benéficas *Lactobacillus bulgaricus* y *Pantoea agglomerans*, respectivamente.

La fase de crecimiento celular es un parámetro importante en el secado por atomización y depende en gran parte del microorganismo (Morgan *et al.* 2006). En bacterias probióticas se ha demostrado que cultivos en la última etapa de crecimiento exponencial o en fase estacionaria temprana tienen mayor viabilidad tras el proceso de secado que la observada en cultivos en fase de crecimiento exponencial (Teixeira *et al.* 1995; Van de Guchte *et al.* 2002; Corcoran *et al.* 2004). Posiblemente el agotamiento de nutrientes en estas etapas condiciona a las células a desarrollar mecanismos de respuesta al estrés osmótico que mejoran la resistencia al calor durante el proceso de secado (Van de Guchte *et al.* 2002). En cepas de *Bacillus* spp., usadas como agentes de control de plagas y enfermedades agrícolas, la obtención de productos por atomización o lecho fluido se basa en el uso de cultivos en la fase estacionaria donde la depleción de nutrientes ha inducido la producción de proteínas de estrés y endosporas resistentes al calor (Sorokulova *et al.* 2008).

Basados en la fase de crecimiento, varios estudios destacan el uso de condiciones adversas como choques de calor durante el crecimiento para aumentar la tasa de supervivencia de productos atomizados. Se ha demostrado que la realización de choques de calor en *L. bulgaricus* y *C. sake* durante la fase de crecimiento exponencial aumentan la viabilidad después de la atomización (Teixeira *et al.* 1995; Cañamás *et al.* 2008b). En bacterias del género *Bacillus* el uso de tratamientos de calor a temperaturas subletales entre 40–60 °C durante la fase estacionaria pueden conducir a respuestas de termotolerancia por aumento en la producción de endosporas resistentes al calor (Chung *et al.* 2007).

5.2.4. Condiciones de almacenamiento (temperatura y envasado) y medios de rehidratación

La temperatura de conservación del material atomizado tiene una influencia importante sobre la viabilidad de éste durante el almacenado. Se ha demostrado que formulados de bacterias atomizadas o liofilizadas permanecen activos durante varios meses cuando se

conservan a baja temperatura (4 °C) comparados con los almacenados a temperatura ambiente (25 °C) (Costa *et al.* 2002b; Wang *et al.* 2004).

El envasado también es un parámetro importante para la conservación de un microorganismo atomizado durante el almacenado. Aunque hay poca información sobre el efecto del envase sobre la viabilidad celular, algunos estudios con formulaciones sólidas de bacterias ácido lácticas y agentes de biocontrol demuestran que estos microorganismos pueden sobrevivir bien en bolsas plastificadas, botellas de vidrio y frascos de tereftalato de polietileno (Wang *et al.* 2004). El envasado incluye otros aspectos importantes relacionados con la supervivencia (vida útil) como la atmósfera de envasado y humedad de la muestra. Sistemas de envasado al vacío han demostrado mejorar la viabilidad de las bacterias probióticas con nitrógeno o aire en algunas bacterias probióticas (Chávez y Ledebor 2007). El contenido de agua-humedad residual es un parámetro importante para la estabilidad de los microorganismos atomizados (Wang *et al.* 2004; Santivarangkna *et al.* 2007). El contenido de humedad residual óptimo depende de la composición del producto atomizado (microorganismos + aditivos), la atmósfera de almacenamiento y la especie bacteriana (Wang *et al.* 2004). En productos bacterianos la humedad residual óptima se ha descrito en torno al 8–12 %. Un exceso de secado puede interferir en el contenido de agua estructural.

Para su uso el agente de biocontrol ha de rehidratarse. La rehidratación es considerada un paso crítico en la recuperación de un microorganismo atomizado. Las propiedades del polvo junto con el tipo de medio y las condiciones de rehidratación pueden afectar a la tasa de supervivencia de los microorganismos atomizados. Las propiedades del polvo como la mojabilidad, la sumergibilidad, la dispersabilidad y la solubilidad son importantes en la reconstitución (Bhandari *et al.* 2008). Diferentes medios de rehidratación como leche desnatada en polvo, agua desionizada o tampón fosfato presentan diferencias en la supervivencia de las células atomizadas (Costa *et al.* 2002b; Abadias *et al.* 2005). Otro factor que debe tenerse en cuenta es la velocidad de rehidratación. Se ha demostrado que la rehidratación lenta puede mejorar la viabilidad, posiblemente porque limita los daños en las células por choque osmótico (Teixeira *et al.* 1995).

5.3. Ventajas y desventajas del secado por atomización

La principal ventaja de la atomización es el secado de grandes cantidades de líquido de forma rápida, continua y a un bajo coste de producción comparado con la liofilización (Tabla 1). Adicionalmente, los equipos de atomización son fácilmente accesibles y fáciles de manejar. Sin embargo, en comparación con otros métodos de secado de microorganismos la atomización ha sido menos desarrollada a nivel comercial. La principal razón son las bajas tasas de supervivencia en productos debido al estrés térmico y deshidratación durante el secado (se

utilizan temperaturas muy elevadas), la baja estabilidad en el almacenamiento posterior y la dificultad de rehidratación (Teixeira *et al.* 1995; Costa *et al.* 2002b; Ananta *et al.* 2005).

Tabla 1. Comparación de costes de diferente métodos de deshidratación con respecto al método de liofilización (Santivarangkna *et al.* 2007).

Proceso de secado	Costes fijos (%)	Costes de manufacturación (%)
Liofilización	100.0	100.0
Secado al vacío	52.2	51.6
Atomización	12.0	20.0
Secado en tambor	9.3	24.1
Lecho fluido	8.8	17.9
Aire caliente	5.3	17.9

Es obvio que la exposición a temperaturas altas del aire, que son necesarias para facilitar la evaporación del agua durante el paso de las bacterias en la cámara de secado, ejerce un impacto negativo sobre su viabilidad y por lo tanto la actividad en el producto atomizado. Por otra parte, ya que el agua contribuye a la estabilidad de las moléculas biológicas su eliminación puede causar cambios irreversibles en la integridad estructural y funcional de la membrana y las proteínas bacterianas. La preservación de estas funciones esenciales y la estructura es fundamental para la supervivencia de las bacterias y la conservación de su funcionalidad (Morgan *et al.* 2006).

Aún así, este método no se ha descartado para la conservación y formulación de productos microbianos, y en los últimos años se han impulsado su uso en bacterias, especialmente probióticas y con aplicaciones en agricultura (Peighambardoust *et al.* 2011).

Referencias

- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Solsona, C., Viñas, I. (2005) Survival of the postharvest biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 after dehydration by spray-drying. *Biocontrol Sci Technol* **15**, 835–846.
- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., Magan, N. (2000) Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. *J Appl Microbiol* **89**, 1009–1017.
- Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. (2003) Liquid formulation of postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology* **93**, 436–442.
- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.H. (2008) Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Appl Biochem Biotechnol* **150**, 305–325.
- Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., Thonart, P. (2001) Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Appl Biochem Biotechnol* **91**, 551–561.
- Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D. (2005) Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int Dairy J* **15**, 399–409.
- Arrebola, E., Jacobs, R., Korsten, L. (2010a). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J Appl Microbiol* **108**, 386–395.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., Korsten, L. (2010b) Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Prot* **29**, 369–377.
- Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M. (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin. *Plant Physiol* **134**, 307–319.
- Baker, K.F. (1987) Evaluating concepts of biological control of plant pathogens. *Ann Rev Phytopathol* **25**, 67–85.
- Barkai-Golan, R. (2001) Postharvest diseases of fruits and vegetables. Development and control. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Bhandari, B.R., Patel, K.C, Chen, X.D. (2008) Spray drying of food materials—process and product characteristics. En: Che, X.D. y Mujumdar, A.S. (Eds.). *Drying Technologies in food processing*. Oxford, pp 133–159.

- Bielecka, M., Majkowska, A. (2000) Effect of spray drying temperature of yoghurt on the survival of starter cultures, moisture content and sensoric properties of yoghurt powder. *Nahrung* **44**, 257–260.
- Blachinsky, D., Antonov, J., Bercovitz, A., Elad, B., Feldman, K., Husid, A., Lazare, M., Marcov, N., Shamai, I., Keren-Zur, M., Droby, S. (2007) Commercial applications of “Shemer” for the control of pre- and postharvest diseases. *IOBCWPRS Bull* **30**, 75–78.
- Bonmatin, J.M., Laprévotte, O., Peypoux, F. (2003) Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity–structure relationships to design new bioactive agents. *Comb Chem High Throughput Screen* **6**, 541–556.
- Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R., Kolter, R. (2006) A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* **59**, 1229–1238.
- Bronshtein, V. (2004) Preservation by foam formation. *Pharm Technol* **28**, 86–92.
- Butt, T.M., Harris, J.G., Powell, D.A. (1999) Microbial pesticides. En: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.) *Biopesticides Use and delivery*. Humana Press, New Jersey, pp 23–43.
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Magan, N., Solsona, C., Teixidó, N. (2008b) Impact of mild heat treatments on induction of thermotolerance in the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 and viability after spray-drying. *J Appl Microbiol* **104**, 767–775.
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Anguera, M., Teixidó, N. (2008a). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Part II. Effectiveness of different cell formulations. *Postharvest Biol Technol* **49**, 96–106.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P. (2004) Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnol Progress* **20**, 248–254.
- Casals, C., Elmer, P.A.G., Viñas, I., Teixidó, N., Sisqueira, M. and Usall J. (2012) The combination of curing with either chitosan or *Bacillus subtilis* CPA-8 to control brown rot infections caused by *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biol Technol* **64**, 126–132.
- Casals, C., Teixidó, N., Viñas, I., Silvera, E., Lamarca, N., Usall, J. (2010) Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *Eur J Plant Pathol* **128**, 51–63.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Brochu, E., Beaulieu, Y. (1991) The freeze drying of lactic-acid bacteria—A review. *Can Inst Food Sci Technol J* **24**, 118–128.

- Chand–Goyal, T., Spotts, R.A. (1997) Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi–commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biol Control* **10**, 199–206.
- Chávez, B.E., Ledebøer, A.M. (2007) Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Dry Technol* **25**, 1193–1201.
- Chen, H., Wang L., Su C.X., Gong G.H., Wang, P., Yu, A.L. (2008) Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* **47**, 180–186.
- Chollet–Imbert, M., Gancel, F., Slomianny, C., Jacques, P. (2009) Differentiated pellicle organization and lipopeptide production in standing culture of *Bacillus subtilis* strains. *Arch Microbiol* **191**, 63–71.
- Chung, S., Lim, H.M., Kim, S.D. (2007) Formulation of stable *Bacillus subtilis* AH18 against temperature fluctuation with highly heat–resistant endospores and micropore inorganic carriers. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 217–224.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka E.A. (2005) Use of plant growth–promoting bacteria for biocontrol plant disease: principles mechanisms of action, and prospective. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4951–4059.
- Cooper, D.G., MacDonald, C.R., Duff, S.J.B., Kosaric, N. (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl Environ Microbiol* **42**, 408–412.
- Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. (2004) Comparative survival of probiotic lactobacilli spray–dried in the presence of prebiotic substances. *J Appl Microbiol* **96**, 1024–1039.
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés E., Viñas, I. (2002a) The effect of nitrogen and carbon sources on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA–2. *Lett Appl Microbiol* **35**, 117–120.
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés, E., Viñas, I. (2001) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA–2 using commercial products and by–products. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 367–371.
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Fons, E., Gimeno, V., Delgado J., Viñas I. (2002b) Survival of *Pantoea agglomerans* strain CPA–2 in a spray–drying process. *J Food Prot* **65**, 185–191.
- Crowe, L.M. (2002) Lessons from nature: The role of sugars in anhydrobiosis. *Comp Biochem Physiol A–Mol Integr Physiol* **131**, 505–513.

- Crueger, W., Crueger, A. (1993) Sustratos para la fermentación industrial. En: Biotecnología: manual de microbiología industrial. Acibia, Madrid, pp 413.
- Cutting, S.M. (2011) *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* **28**, 214–220.
- Davis, B.D. (1996) Nutrición, energía y transporte a través de membranas. Quimiostaxis. En Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. (Eds.). Masson S.A., Barcelona, pp. 61–87.
- Desmond, C., Ross, R.P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G., Stanton, C. (2002) Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J Appl Microbiol* **93**, 1003–1011.
- Devakate, R.V., Patil, V.V., Waje, S.S., Thorat, B.N. (2009) Purification and drying of bromelain. *Separ Purif Technol* **64**, 259–264.
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren–Tzur, M., Shachnai, A. (1998) Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol Control* **12**, 97–101.
- Droby, S., Wilson, C., Wisniewski, M., El Ghaouth, A. (2000) Biologically based technology for the control of postharvest diseases of fruits and vegetables. En: Wilson, C.L, Droby, S. (Eds.), Microbial Food Contamination. CRC Press, Boca Raton, pp. 187–206.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol Technol* **52**, 137–145.
- Dufour, S, Deleu, M., Nott, K., Wathélet, B., Thonart, P., Paquot, M. (2005) Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. *Biochim Biophys Acta* **1726**, 87–95.
- El Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Wisniewski, M., Wilson, C. (2000) Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Plant Dis* **84**, 249–253.
- El Ghaouth, A., Wilson, C., Wisniewski, M. (2004) Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases of fruits and vegetables. En: Diseases of fruits and vegetables volume II: Diagnosis and management Naqvi, S.A.M.H. (Ed.) USA, pp 511–535.
- Errington, J. (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **1**, 117–126.
- Ewe, J.A., Wan–Abdullah, W.N., Liong, M.T. (2010) Viability and growth characteristics of *Lactobacillus* in soymilk supplemented with B-vitamins. *Int J Food Sci Nutr* **61**, 87–107.

- Fairhead, H., Setlow, B., Setlow, P. (1993) Prevention of DNA damage in spores and *in vitro* by small, acid-soluble proteins from *Bacillus* species. *J Bacteriol* **175**, 1367–1374.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., Youngman, P. (2000) The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8063–8068.
- Fravel, D.R. (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 337–359.
- Fu, W.Y., Etzel, M. R. (1995) Spray drying of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 and cellular injury. *J Food Sci* **60**, 195–200.
- Gardiner, G.E., O’Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M.A.E., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Ross, R.P., Stanton, C. (2000) Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2605–2612.
- Glass, D.J. (1993) Commercialization of soil microbial technologies. En: Blaine-Metting, F. (Ed.) Marcel Dekker, New York, pp 595–618.
- Golowczyc, M., Silva, J., Abraham, A., De Antoni, G., Teixeira, P. (2010) Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray-drying. *Lett Appl Microbiol* **50**, 7–12.
- Greashan, R.L., Herber, W.K., (1997) Design and optimization of growth media. En: Rhodes, P.M., Stanbury, P.F. (Eds.). Applied microbial physiology. A practical approach. Oxford University Press, Oxford, pp. 53–74.
- Griffiths, E. (1981) Iatrogenic plant diseases. *Ann Rev Phytopathol* **19**, 69–82.
- Gueldner, R.C. Reilly, C.C., Pusey, P.L., Costello, C.E., Arrendale, R.F., Cox, R.H., Himmelsbach, D., Crumley, F.G., Cutler, H.G. (1988) Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *J Agric Food Chem* **36**, 366–370.
- Guijarro, B., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2006) Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia* spp. *Biocontrol Sci Technol* **16**, 257–269.
- He, H., Silo-Suh, L.A., Handelsman, J. (1994) Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Lett* **35**, 2499–2502.
- Hecker, M.W., Schumann, W., Völker, U. (1996) Heat shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**, 417–428.
- Henriques, A.O., Moran, C.P. (2007) Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol* **61**, 555–588.

- Hernández, A. (2003) Microbiología industrial. Editorial EUNED, Costa Rica, pp 296.
- Hewitt, L.F. (1950) Oxidation reduction potentials in bacteriologic and biochemistry. *Livingstone-Edingourg* **5**, 215–220.
- Hsieh, F.S., Lin T., Meng, M., Kao, S. (2008) Comparing Methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr Microbiol* **56**, 1–5.
- Hubalek, Z. (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* **46**, 205–229.
- Ingraham, J.L., Ingraham, C.A. (1998) Introducción a la microbiología. Vol I. Reverte S.A. Barcelona, pp 191–213.
- Jacques, P. (2011) Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. En: G. Soberón-Chávez (Ed.) Biosurfactants, Microbiology Monographs 20. Springer-Verlag. Berlin, pp. 57–77.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P. (1999) Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. *Appl Biochem Biotech* **77**, 223–233.
- Janisiewicz, W. (1991) Biological control of postharvest fruit diseases. En: Handbook of applied mycology. Vol. 1: Soil and plants. Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G., Knudsen, G.R., (Eds.) Marcel Deker, New York, pp 301–326.
- Janisiewicz, W., Korsten, L. (2002) Biological control of postharvest diseases of fruit. *Ann Rev Phytopathol* **40**, 411–441.
- Janisiewicz, W.J., Tworowski, T.J., Kurtzman, C.P. (2001) Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Phytopathology* **91**, 1098–1108.
- Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I.B., Séror, S.J. (2005) Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *J Bacteriol* **187**, 65–76.
- Kapooria, R.G. (2007) An Overview of biological control of fruit and vegetable diseases En: Chincholkar, S.B., Mukerji, K.G. (Eds.) Biological control of plant diseases. The Haworth Press. Canada, pp 191–221.
- Karabulut, O.A., Tezcan, H., Daus, A., Cohen, L., Wiess, B., Droby, S. (2004) Biological control of preharvest and postharvest rots in strawberries by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol Sci Technol* **14**, 513–521.
- Kets, E.P.W., Teunissen, P.J.M., DeBont, J.A.M. (1996) Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Appl Environ Microbiol* **62**, 259–261.

- Kim, S.S., Bhowmik, S.R. (1990) Survival of lactic acid bacteria during spray drying of plain yogurt. *J Food Sci* **55**, 1008–1010.
- Koffer, H., Gale, G.O. (1957) The relative thermostability of cytoplasmic proteins from thermophilic bacteria. *Arch Biochem Biophys* **66**, 249.
- Kurtzman, C.P., Droby, S. (2001) *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rot. *Syst Appl Microbiol* **24**, 395–399.
- Larena, I., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P. (2003a) Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease. *J Appl Microbiol* **94**, 508–514.
- Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2003b) Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. *J Phytopathology* **151**, 600–606.
- Larena, I., Torres, R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., Bellini, A., Mandrin, J.F., Lichou, J., Ochoa de Eribe, X., Usall, J. (2005) Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peach by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biol Control* **32**, 305–310.
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., Mendgen, K. (1997) Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* **87**, 1103–1110.
- Lian, W.C., Hsiao, H.C., Chou, C.C. (2002) Survival of bifidobacteria after spray-drying. *Int J Food Microbiol* **74**, 79–86.
- Lima, G., Arru, S., De Curtis, F., Arras, G. (1999) Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**, 223–229.
- Lima, G., De Curtis, F., Piedimonte, D., Spina, A.M., De Cicco, V. (2006) Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biol Technol* **40**, 301–307.
- Liu, J., Zhou, T., He, D., Li, X.Z., Wu, H., Liu, W., Gao, X. (2011) Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**, 43–52.
- Lumsden, R.D., Walter, J.F. (1995) Development of the biocontrol fungus *Gliocladium virens* risk assessment and approval for horticultural use. En: Hokkanen, H.M.T., Lynch, J.M. (Eds.) *Biological Control: Benefits and Risks*, Cambridge Univ Press. Cambridge, pp 263–69.
- Madigan, M., Martinko, J. (2006) Cell structure. En: *Microbiology of Microorganisms* 17a Edition Brock.

- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptack, M. (1992) Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochemistry* **74**, 1047–1051.
- Marr, A.G., Ingrahan, J.L. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli* *J Bacteriol* **84**, 1260.
- Mauriello, G., Aponte, M., Andolfi, R., Moschetti, G., Villani, F. (1999) Spray-drying of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J Food Protec* **62**, 773–777.
- McIntyre, J.L., Press, L.S. (1991) Formulation, delivery systems and marketing of biocontrol agents and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). En: Keister, D.L., Cregan, P.B. (Eds.) *The rhizosphere and plant growth*. Academic Publishers, Netherlands, pp 90–112.
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., Vesey, G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods* **66**, 183–193.
- Mossel, D.A., Ingrand, M. (1995) The physiology of microbial spoilage of foods. *J Appl Bacteriol* **18**, 95–232.
- Movahedi, S., Waites, W. (2000) A two dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of *Bacillus subtilis* cells during sporulation. *J Bacteriol* **182**, 4758–4763.
- Nakano, M.M., Zuber P. (2002) Anaerobiosis. En: Sonenshein, A.L., Hoch J.A., Losick, R. (Eds.) *Bacillus subtilis* and its clased relatives from genes to cell. American Society for Microbiology Press. Washington, pp 393–404.
- National Research Council (1987) Regulating Pesticides in Food: The Delaney Paradox. En: report of The Committee of Scientific and Regulatory Issues Underlying Pesticide Use Patterns and Agricultural Innovation. The National Academy Press. Washington, pp 288.
- National Research Council (1993) Pesticides in the Diets of Infants and Children. En: report of The Committee on Pesticides in the Diets of Infants and Children. The National Academy Press. Washington, pp 203–266.
- Nicholson, W.J., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol Bio. Rev* **64**, 548–572.
- Nunes, C., Manso, T., Lima-Costa, M.E. (2009) Postharvest biological control of citrus fruit. *Tree Forestry Sci Biotechnol* **3**, 116–126.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. (2002) Postharvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *J Appl Microbiol* **92**, 247–255.

- Oakley, D.E. (1997) Produce uniform particles by spray drying. *Chemical Engineering Progress* **93**, 48–54.
- Obagwu, J., Korsten, L. (2003) Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biol Technol* **28**, 187–194.
- Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommes, J., Thonart, P. (2005a) *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 692–698.
- Ongena, M., Henry, G., Thonart, P. (2009) The roles of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. En: Gisi, U., Chet, L., Gullino, M.L. Recent Developments in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21st Century Springer Verlag. Berlin, pp. 59–69.
- Ongena, M., Jacques, P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* **16**, 115–125.
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., Thonart, P. (2005b) Involment of fengycin-type lipopeptides in multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**, 29–38.
- Osman, M.S., Sivakumar, D., Korsten, L. (2011) Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. *Crop Prot* **30**, 173–178.
- Palou, L., Smilanick, J., Fresno, C.A., Usall, J., Viñas I. (2001) Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Dis* **85**, 371–376.
- Patiño-Vera, M., Jimenez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A., Galindo, E. (2005) Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *J Appl Microbiol* **99**, 540–550.
- Peighambaroust, S.H., Golshan Tafti, A., Hesari, J. (2011) Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review *Trends Food Sci Technol* **22**, 215–224.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J. (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 553–563.
- Peypoux, F., Guimand, M., Michel, G., Delcambe, L., Das, B.C., Lederec, E. (1978) Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **17**, 3992–3996.

- Plaza, P., Usall, J., Smilanick, J.L., Lamarca, N., Viñas, I. (2004) Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. *J Food Protect* **67**, 781–786.
- Powell, K.A. (1992) Biocontrol product fermentation, formulation and marketing. En: MacCarthy, D. (Ed.) Concentration and drying of food. Elsevier Applied Science Publisher, London, pp 203–220.
- Prabakaran, G., Hoti, S.I. (2008) Optimization of spray-drying conditions for the large-scale preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* after downstream processing. *Biotechnol Bioeng* **100**, 103–107.
- Prajapati, J.B., Shah, R.K., Dave, J.M. (1987) Survival of *Lactobacillus acidophilus* in blended-spray dried acidophilus preparations. *Aust J Dairy Technol* **42**, 17–21.
- Pryor, S.W., Gibson, D.M., Hay, A.G., Gossett, J.M., Walker, L.P. (2007) Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. *Appl Biochem Biotechnol* **143**, 63–79.
- Pusey, P.L., Wilson, C. (1984) Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis* **68**, 753–756.
- Quimby, P.C., Zidack, N.K., Boyette, C.D., Grey, W.E. (1999) A simple method for stabilizing and granulating fungi. *Biocontrol Sci Technol* **9**, 5–8.
- Rahman, M.S., Ano, T., Shoda, M. (2006) Short communication Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. *J Biotechnol* **125**, 513–515.
- Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Jacques, P., Destain, J., Thonart, P. (1993) Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **639**, 81–85.
- Reed, G., Nagowithana, T.W. (1991) Yeast Technology. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Reis, F.A.S.L., Servulo, E.F.C., De Franca, F.P. (2004) Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. *Appl Biochem Biotechnol* **113**, 899–912.
- Restuccia, C., Giusino, F., Licciardello, F., Randazzo, C., Caggia, C. and Muratore, G. (2006) Biological Control of peach pathogens by commercial products and indigenous yeasts. *J Food Protec* **69**, 2465–2470.
- Rhodes, D.J. (1993) Formulation of biological control agents. En: Jones, D.G. (Ed.) Exploitation of microorganisms. Chapman & Hall, London, pp 411–439.
- Riveros, B., Ferrer, J., Bórquez, R. (2009) Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Dry Technol* **27**, 123–132.

- Roelans, E., Taeymans, D. (1990) Effect of drying conditions on survival and enzyme activity of microorganisms. En: Spiess, W. E. L., Schubert, H. (Eds.), Engineering and food, Volume 3. Advanced processes. Elsevier Applied Science. New York, pp 559–569.
- Romero, D., de Vicente, A., Olmos, J.L., Dávila, J.C., Pérez-García, A. (2007a) Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *J Appl Microbiol* **103**, 969–976.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.V., Dufour, S.E., Veenig, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P. (2007b) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* towards *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 430–440.
- Rudge, R.H. (1991) Formulation of biocontrol agents. En: Kirsop, B.E., Doyle A. (Eds.) Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods. Academic Press, London, pp 411–439.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2007) Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol Prog* **23**, 302–315.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2008) Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J Appl Microbiol* **105**, 1–13.
- Scott, R. (1991) Fabricación de queso. Acribia. Zaragoza.
- Sharp, M., Pogliano K. (2002) Cell Architecture. En: Sonenshein, A.L., Hoch J.A., Losick, R. (Eds.) *Bacillus subtilis* and its closed relatives from genes to cell. American Society for Microbiology Press. Washington, pp 15–57.
- Silva, J., Carvalho, A.S., Teixeira, P., Gibbs, P.A. (2002) Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol* **34**, 77–81.
- Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. (2005) Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *J Appl Microbiol* **99**, 493–501.
- Singleton, P. (1999) Growth and reproduction. En: Bacteria in biology, biotechnology and medicine. John Wiley e Hijos, LSD West Sussex, pp 36–56.
- Sorokulova, I.B., Krumnow, A.A., Pathirana, S., Mandell, A.J., Vodyanoy, V. (2008) Novel methods for storage stability and release of *Bacillus* spores. *Biotechnol Prog* **24**, 1147–1153.
- Stabb, E.V., Jacobson, L.M., Handlesman, J. (1994) Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl Environ Microbiol* **60**, 4404–4412.

- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. (1995) Media for industrial fermentations. En: Whitaker, A., Hall, S.J. (Eds.) Principles of fermentation technology. Pergamon Press. Oxford, pp 93–121.
- Stein, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**, 845–857.
- Sugar, D., Basile, S.R. (2008) Timing and sequence of postharvest fungicide and biocontrol agent applications for control of pear decay. *Postharvest Biol Technol* **49**, 107–112.
- Tabbene, O., Slimene, I.B., Djebali, K., Mangoni, M.L., Urdaci M.C., Limam F. (2009) Optimization of medium composition for the production of antimicrobial activity by *Bacillus subtilis* B38. *Biotechnol Prog* **25**, 1266–1274.
- Teixeira, P.C., Castro, M.H., Malcata, F.X., Kirby, R.M. (1995) Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying. *J Dairy Sci* **78**, 1025–1031.
- Teixidó, N., Cañamás, T.P., Abadías, M., Usall, J., Solsona, C., Casals, C., Viñas, I. (2006) Improving low water activity and desiccation tolerance of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 by osmotic treatments. *J Appl Microbiol* **101**, 927–937.
- Teixidó, N., Cañamás, T.P., Usall, J., Torres, R., Magan, N., Viñas, I. (2005) Accumulation of the compatible solutes, glycine-betaine and ectoine, in osmotic stress adaptation and heat shock cross protection in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Lett Appl Microbiol* **41**, 248–252.
- Teixidó, N., Torres, R., Viñas, I., Abadías, M., Usall, J. (2011) Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. En: Lacroix, C. (Ed.) Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 201. Cambridge, pp 364–402.
- Teixidó, N., Usall, J., Palou, L., Asensio, A., Nunes, C., Viñas, I. (2001) Improving control of green and blue molds on oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *Eur J Plant Pathol* **107**, 685–694.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N. (1998a) Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology* **88**, 960–964.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N. (1998b) Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* (strain CPA-1) by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content. *Mycol Res* **102**, 409–417.

- To, B.C.S., Etzel, M.R. (1997) Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *J Food Sci* **62**, 576–585.
- Torres, R., Nunes, C., García, J., Abadías, I., Viñas, I., Manso, T., Olmo, A., Usall, J. (2007) Application of *Pantoea agglomerans* CPA–2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases affecting citrus fruit at several mediterranean locations. *Eur J Plant Pathol* **118**, 73–83.
- Torres, R., Teixidó, N., Usall, J., Abadías, M., Viñas, I. (2005) Post–harvest control of *Penicillium expansum* on pome fruits by the bacterium *Pantoea ananatis* CPA–3. *J Hortic Sci Biotech* **80**, 75–81.
- Tortora G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2007) Microbiology: an introduction. 9na. edición, pp 931.
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P. (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol* **96**, 1151–1160.
- Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., Ochoa de Eribe, X., Viñas, I. (2001) Pilot tests of *Candida sake* (CPA–1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biol Technol* **21**, 147–156.
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Intern J Gen Mol Microbiol* **82**, 187–216.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch U., Jung, G. (1986) Fengycin–A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F–29–3. *J Antibiot* **39**, 888–901.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchís, V. (1998) Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int J Food Microbiol* **40**, 9–16.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higton, G. (2001) Industrial microbiology: an introduction Blackwell Science. Oxford, 293 pp.
- Wang, Y.C., Yu, R.C., Chou, C.C. (2004) Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *Int J Food Microbiol* **93**, 209–217.
- Ward, O.P. (1991) Biotecnología de la fermentación. Acribia, Zaragoza.
- Wilson, C., Pusey, P.L. (1985) Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Dis* **69**, 375–378.
- Wilson, C., Wisniewski, M. (1989) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu Rev Phytopathol* **27**, 425–441.

- Wisniewski, M., Wilson, C. (1992) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hortscience* **27**, 94–98.
- Younis, M.A.M., Hezayen F.F., Nour-Eldein, M.A., Shabeb M.S.A. (2010) Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. *American-Eurasian J Agric Environ Sci* **7**, 31–37.
- Yu, B., Lu, Z.X. Bie, X.M., Lu, F.X., Huang, X.Q. (2008) Optimisation of the medium composition for production of protease and soybean peptides by *Bacillus subtilis* SHZ using response surface methodology. *Int J Food Sci Technol* **43**, 1365–2621.
- Zabriskie, D.W., Armiger, W.B., Phillips, D.H., Albano, P.A. (1980) Traders' guide to fermentation medium formulation. Memphis, Traders Protein.
- Zhang, H., Wang, S., Huang, X., Dong, Y., Zheng, X. (2008) Integrated control of postharvest blue mold decay of pears with hot water treatment and *Rhodotorula glutinis*. *Postharvest Biol Technol* **49**, 308–313.
- Zhang, H.Y., Zheng, X.D., Su, D.M. (2006) Postharvest control of blue mold rot of pear by microwave treatment and *Cryptococcus laurentii*. *J Food Eng* **77**, 539–544.
- Zhang, J., Dou H. (2002) Evaluation of *Bacillus subtilis* as potential biocontrol agent for postharvest green mold control on 'Valencia' orange. *Proc Fla State Hort Soc* **115**, 60–64.
- Zhang, J., Greasham, R. (1999) Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 407–421.
- Zhang, J., Marcin, C., Shiffet, M.A., Salmom, P., Brix, T., Greasham, R., Buckland, B., Chartrain, M. (1996) Development of a defined medium fermentation process for physostigmine production by *Streptomyces griseofuscus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**, 568–575.
- Zheng, X.D., Zhang, H.Y., Sun, P. (2005) Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. *Eur Food Res Technol* **220**, 353–357

Objetivos

Objetivos

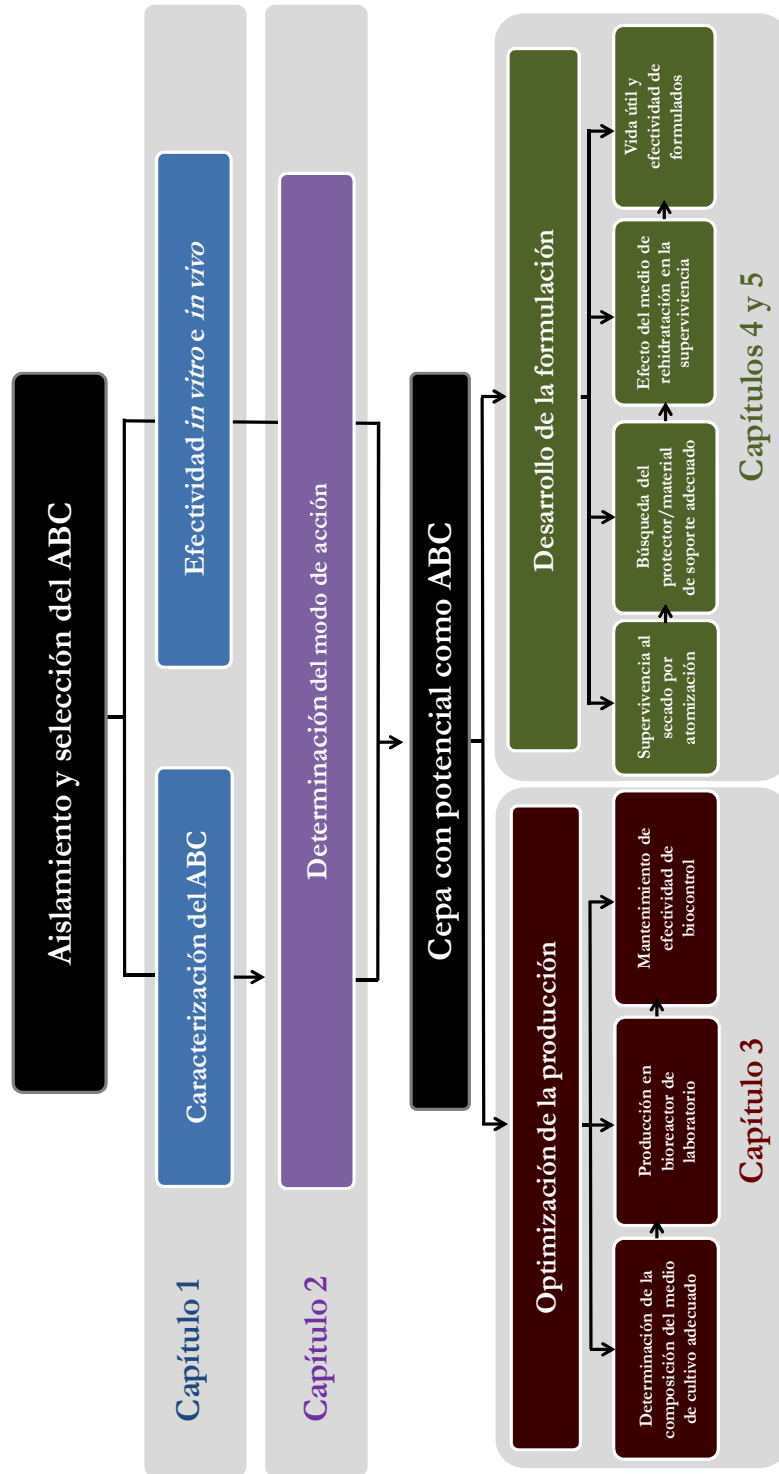
La limitación o prohibición del uso de fungicidas para el control de enfermedades en postcosecha de fruta es una problemática de elevada magnitud en el sector frutícola actual, por lo cual el desarrollo de estrategias alternativas como el control biológico microbiano es fundamental para la producción de fruta de calidad. La implementación de programas de biocontrol eficaces, sin embargo, requiere de un fuerte conocimiento de la capacidad de control y los mecanismos de acción usados por el agente microbiano que se pretende emplear, así como de la factibilidad para que éste pueda ser producido y formulado a nivel comercial. Por tanto, la presente tesis se ha enfocado en el estudio del potencial de *B. subtilis* CPA-8 para el control de enfermedades de postcosecha de fruta mediante un análisis detallado de sus características biológicas, potencial antagonico, mecanismos de acción y manejo para su producción y formulación, como una primera aproximación para implementación dentro de programas de manejo integrado de fruta. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la capacidad de *B. subtilis* CPA-8 para el control de enfermedades de postcosecha de fruta.
 - 1.1. Caracterización del crecimiento y evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de *B. subtilis* CPA-8 contra los principales patógenos de postcosecha de fruta.
 - 1.2. Evaluación de la eficacia de los tratamientos de células, endosporas y sobrenadantes libres de células de *B. subtilis* CPA-8 contra podredumbres en naranjas, manzanas y frutas de hueso.
2. Dilucidar los mecanismos de acción implicados en la capacidad antagonista de *B. subtilis* CPA-8 contra la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. en fruta de hueso.
 - 2.1. Análisis de la actividad antifúngica *in vitro* de sobrenadantes libres de células contra *M. laxa* y *M. fructicola*; identificación de los compuestos antifúngicos producidos por *B. subtilis* CPA-8 responsables de su actividad antagonica usando TLC-bioautográfica.
 - 2.2. Determinación del papel de los compuestos producidos por *B. subtilis* CPA-8 en el antagonismo contra *Monilinia* spp. con la construcción y análisis de mutantes defectivos para la producción de fengicinas a través de PCR, TLC-bioautográfica y efectividad sobre fruta.

3. Obtención de un medio de cultivo de bajo coste basado en productos comerciales y subproductos de industrias agroalimentarias que proporcione un óptimo crecimiento de *B. subtilis* CPA-8, a pequeña escala, manteniendo su eficacia de biocontrol.
 - 3.1. Búsqueda de fuentes de nitrógeno y carbono económicas para el crecimiento de *B. subtilis* CPA-8.
 - 3.2. Análisis del crecimiento en bioreactor a nivel de laboratorio.
 - 3.3. Evaluación de la efectividad y dinámica de poblaciones de *B. subtilis* CPA-8 crecido en un medio optimizado de bajo coste.

4. Evaluar la atomización como método apropiado para la formulación de *B. subtilis* CPA-8.
 - 4.1. Estudio comparativo del efecto de la atomización sobre *B. subtilis* CPA-8 y el agente de biocontrol *Pantoea agglomerans* CPA-2 basado en la capacidad de *B. subtilis* CPA-8 para producir endosporas resistentes al calor.
 - 4.2. Búsqueda de la sustancia protectora/material de soporte más adecuada para el secado de *B. subtilis* CPA-8.
 - 4.3. Evaluación del efecto de los medios de rehidratación en la recuperación de células viables en atomizados de *B. subtilis* CPA-8.
 - 4.4. Evaluación del efecto de los mejores atomizados obtenidos de *B. subtilis* CPA-8 sobre la inhibición de la germinación de *M. fructicola*.
 - 4.5. Evaluación de la vida útil y de la eficacia de control de los mejores atomizados de *B. subtilis* CPA-8 contra *Monilinia* spp. en fruta de hueso.

Organización y estructura de la tesis



Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit

Viviana Yáñez-Mendizábal, Josep Usall, Inmaculada Viñas, Carla Casals, Sonia Marín, Cristina Solsona, Neus Teixidó

Biocontrol Science and Technology, 2011, 21: 409–426

<http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>

Abstract

Biocontrol potential of *B. subtilis* strain CPA-8 was tested against the main postharvest diseases of orange, apple and stone fruit. Previously, CPA-8 growth was characterized and its antifungal activity *in vitro* determined against *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa*, *M. fructicola*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, and *P. italicum*. *In vivo* activity against these pathogens was tested by treating fruits with cells, endospores or cell free supernatants. CPA-8 treatments cannot control decay caused by *P. digitatum* and *P. italicum* on oranges. The higher concentrations of CPA-8 studied were effective in controlling *B. cinerea* on apple, showing grey mold incidence from 70 % to 12.5 % in comparison with 100 % in the control. However, in general, CPA-8 treatments were not effective in controlling *P. expansum*. The best results of CPA-8 treatments were obtained in stone fruit against *M. laxa* and *M. fructicola* where most treatments resulted in brown rot incidence of 0 % compared with 70 % and 90 % in the control. Based on these results, cultures, cells and cell free supernatants at different concentrations were tested against *M. laxa* and *M. fructicola* on stone fruit. Most bacterial concentrations were effective in controlling *M. laxa* and *M. fructicola* as well as or better than Serenade Max[®], in some treatments showing brown rot incidences of 0 % in comparison with 100 % of control. Bacterial populations of CPA-8 were maintained stable or increased up to 2-log inside wounds, showing the ability of the bacteria to colonize injured tissues. Experimental evidence suggests that *B. subtilis* CPA-8 has biocontrol potential for control of postharvest disease on several fruit types.

Keywords: biocontrol • endospores • cell free supernatant • antifungal activity • stone fruit.

<http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>

**Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.)
by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of
fengycin-like lipopeptides**

Viviana Yáñez-Mendizábal, Houda Zerriouh, Inmaculada Viñas, Rosario Torres, Josep Usall, Antonio de Vicente, Alejandro Pérez-García, Neus Teixidó

European Journal of Plant Pathology, doi: 10.1007/s10658-011-9905-0 (en prensa)

<http://www.springerlink.com/content/71125107q5441424/>

Abstract

Bacillus subtilis CPA-8, a strain with demonstrated ability to control *Monilinia* spp. in peaches, was studied to elucidate its mechanisms of antifungal activity. Growth inhibition assays using cell-free supernatants and butanolic extracts showed strong antifungal activities against *Monilinia laxa* and *Monilinia fructicola*. By comparison with the reference *B. subtilis* strains UMAF6614 and UMAF6639, fengycin, iturin and surfactin lipopeptides were identified by thin layer chromatography in butanolic extracts from cell-free supernatants, indicating that antibiosis could be a major factor involved in the biological control ability of CPA-8. TLC-bioautography analysis confirmed the presence of fengycin, iturin and surfactin lipopeptides but strong antifungal activity could be associated only with fengycin lipopeptides. These results were definitively supported by mutagenesis analysis targeted to suppress fengycin biosynthesis by disruption of the *B. subtilis* *fenB* gene. By TLC-bioautography analysis it was possible to identify transformants from CPA-8 with reduced or suppressed antifungal activity, and this phenotype was associated with the lack of fengycin bands. Fruit trials confirmed that fengycin-defective mutants and their cell-free supernatants lost their ability to control peach brown rot disease in comparison with CPA-8 wild type strain or Serenade Max®, a commercial formulation based on *B. subtilis*. Furthermore, population dynamics studies determined that CPA-8 fengycin-deficient mutants survived in wounds in peach fruit equally well as the CPA-8 wild type. Taken together our data indicate that fengycin-like lipopeptides play a major role in the biological control potential of *B. subtilis* CPA-8 against peach brown rot.

Keywords: antibiosis • biocontrol • lipopeptides • *Monilinia laxa* • *Monilinia fructicola* • postharvest diseases.

<http://www.springerlink.com/content/71125107q5441424/>

Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products

Viviana Yáñez-Mendizábal, Inmaculada Viñas, Josep Usall, Rosario Torres, Cristina Solsona, Neus Teixidó

Biological Control, 2012: 60 280–289

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964411003276>

Abstract

The aim of this research was to identify a low cost medium based on commercial products and by-products that provided maximum *Bacillus subtilis* CPA-8 growth and maintained biocontrol efficacy. Low cost media combining economical nitrogen and carbon sources such as yeast extract, peptone, soy products, sucrose, maltose and molasses were tested. Tests were carried out in 250-mL flasks containing 50 mL of each tested medium. Maximum cell growth ($>3 \times 10^9$ CFU mL⁻¹) was obtained in defatted soy flour 44 % combined with sucrose or molasses media. Second, CPA-8 production was scaled up in a 5-L fermenter and CPA-8 population dynamics, pH and oxygen consumption in the optimized medium (defatted soy flour 44 % – molasses) was recorded. In these tests, there was a 5-h lag phase before growth, after which exponential growth occurred and maximum production was 3×10^9 CFU mL⁻¹ after 20 h. Fruit trials with cells and cell free supernatants from CPA-8 grown in optimized medium maintained biocontrol efficacy against *Monilinia fructicola* on peaches, resulting in disease reductions up to 95 %. CPA-8 populations survived in wounds on inoculated peaches, regardless of the culture media used. The results show that *B. subtilis* CPA-8 can be produced in a low cost medium combining inexpensive nitrogen and carbon sources (40 g L⁻¹ defatted soy flour 44 %, 5 g L⁻¹ molasses plus mineral trace supplements) in shake flasks and a laboratory fermenter (5 L). The results could be used to provide a reliable basis for scaling up the fermentation process to an industrial level.

Keywords: biocontrol agent production • defatted soy flour 44 % • molasses • postharvest diseases • stone fruit • *Monilinia fructicola*.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964411003276>

Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8

Viviana Yáñez-Mendizábal, Inmaculada Viñas, Josep Usall, Teresa Cañamás, Neus Teixidó

Biotechnology Letters, doi: 10.1007/s10529-011-0834-y (en prensa)

<http://www.springerlink.com/content/v47174j377x3302x/>

Abstract

The role of endospore production by *Bacillus subtilis* CPA-8 on survival during spray-drying was investigated by comparison with a non-spore-forming biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Endospore formation was found to promote heat resistance in CPA-8 depending on growth time (72-h-old cultures were more resistant than 24-h-old cultures). The survival of CPA-8 and CPA-2 after spray-drying was determined after both organisms were grown in optimised media for 24 and 72 hours. Spray-dried 72-h-old CPA-8 showed the best survival (32.3 %), while CPA-2 viability was less than 2 %. CPA-8 survival directly related with its ability to produce endospores. Spray-dried CPA-8 reduced *Monilinia fructicola* conidia germination similarly to fresh cells, demonstrating that spray-drying did not negatively affect biocontrol efficacy. Endospore production thus appears to improve CPA-8 resistance to spray-drying. These results could be used to provide a reliable basis for the optimisation of the spray-drying formulation process for CPA-8 and other microorganisms.

Keywords: endospore • formulation • *Monilinia fructicola* • postharvest biocontrol • spray-drying.

<http://www.springerlink.com/content/v47174j377x3302x/>

**Formulation development of the biocontrol agent
Bacillus subtilis CPA-8 by spray-drying**

Viviana Yáñez-Mendizábal, Inmaculada Viñas, Josep Usall, Rosario Torres,
Maribel Abadías, Cristina Solsona, Neus Teixidó

Journal of Applied Microbiology (aceptado)

Abstract

The aim was to prepare commercially acceptable formulations of *Bacillus subtilis* CPA-8 by spray-drying with long storage life and retained efficacy to control peach brown rot caused by *Monilinia* spp. CPA-8 24- and 72-h-old cultures were spray-drying using 10 % skimmed milk, 10 % skimmed milk plus 10 % MgSO₄, 10 % MgSO₄ and 20 % MgSO₄ as carriers/protectants. All carriers/protectants gave good percentages of powder recovery (28–38 %) and moisture content (7–13 %). CPA-8 survival varied considerably among spray-dried 24- and 72-h-old cultures. Seventy-two hours culture spray dried formulations showed the highest survival (28–32 %) with final concentration products of 1.6–3.3×10⁹ CFU g⁻¹, while viability of 24-h-old formulations were lower than 1 %. Spray-dried 72-h-old formulations were selected to subsequent evaluation. Rehydration of cells with water provided a good recovery of CPA-8 dried cells, similar to other complex rehydration media tested. Spray-dried formulations stored at 4 °C and 20 °C showed good shelf life during 6 months and viability was maintained or slightly decreased around 0.2–0.3-log. CPA-8 formulations after 4 and 6 months storage were effective to control brown rot caused by *Monilinia* spp. on nectarines and peaches showing disease reductions among 90–100 %. The results demonstrated that stable and effective formulations of biocontrol agent *B. subtilis* CPA-8 could be obtained by spray drying to control brown rot on peach.

Keywords: *B. subtilis* • spray-dried formulation • shelf life • *Monilinia* spp. • biocontrol efficacy.

Discusión General

Discusión general

Ante la creciente demanda por parte de consumidores y productores de fruta para minimizar o reemplazar el uso de fungicidas, el control biológico microbiano de enfermedades en postcosecha ha surgido como una alternativa fundamental para mejorar la seguridad y calidad de los productos. El control biológico, no obstante, para ser incorporado dentro de un plan de manejo integrado de enfermedades debe ser además de efectivo, aplicable a nivel comercial sin aumentar los costes de producción y los precios de la fruta en el mercado. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue analizar a fondo el potencial de *B. subtilis* cepa CPA-8 para el control de enfermedades de postcosecha de fruta; así como los aspectos base para su desarrollo como un producto biológico que pueda ser usado a nivel comercial.

Como se muestra en la Figura 1, la secuencia de pasos tratados en esta tesis para el desarrollo de la cepa CPA-8 como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta fueron: el análisis de sus características biológicas, capacidad antagonica y modo de acción, para con esta información, evaluar su producción y formulación a bajo coste como producto comercial.

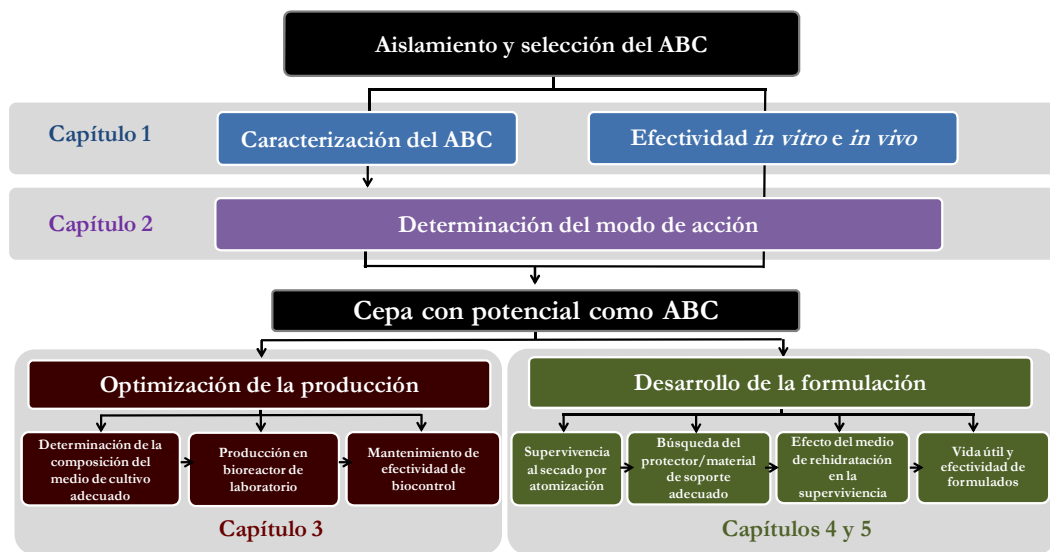
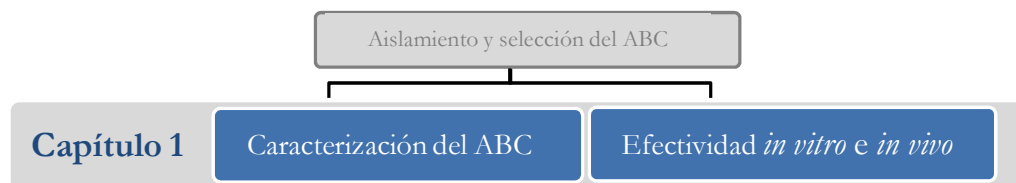


Figura 1. Diagrama de pasos seguidos para el desarrollo de *B. subtilis* CPA-8 como bioproducto.

1. Estudio de *B. subtilis* cepa CPA-8 como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta



Para desarrollar un programa de control biológico es indispensable tener un fuerte conocimiento del microorganismo que se pretende utilizar, por lo cual en esta primera etapa se estudiaron aspectos propios de la bacteria como su crecimiento, producción de endosporas y compuestos antifúngicos; así como su capacidad antagónica y potencial de control en bioensayos *in vitro* e *in vivo* sobre la superficie de fruta (Capítulo 1).

1.1. Caracterización de la cepa CPA-8 y su actividad antifúngica *in vitro*

Previo al inicio de este estudio, la cepa CPA-8 identificada como *B. subtilis* (mediante análisis parcial 16S rDNA) fue seleccionada entre más de 200 aislados bacterianos provenientes de la superficie de nectarinas y melocotones por su capacidad para controlar la podredumbre marrón causada por *M. laxa* sola o combinada con tratamientos de agua caliente (Casals *et al.* 2010). Adicionalmente, estudios recientes han demostrado que tratamientos de curado combinados con CPA-8 son efectivos para controlar la podredumbre marrón causada por *M. fructicola* (Casals *et al.* 2012).

Sobre esta base, se caracterizó el crecimiento de la cepa CPA-8 (curva de crecimiento), la producción de endosporas y de sobrenadantes; así como su actividad antifúngica *in vitro* contra los principales patógenos en postcosecha de fruta: *B. cinerea*, *M. fructicola*, *M. laxa*, *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum*.

La cepa CPA-8 cultivada en un medio convencional de laboratorio (863) presentó una fase de latencia (lag) estimada de 5.8 h y las concentraciones máximas de células viables de 1×10^8 UFC mL⁻¹ se obtuvieron a partir de las 18 h y se mantuvieron hasta las 120 h de seguimiento. Estos datos demostraron que CPA-8 tiene un crecimiento bacteriano típico con fase lag, fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria. Las producciones de endosporas resistentes al calor fueron bajas a las 24 y 48 h y a partir de las 72 h se incrementaron, obteniéndose las máximas concentraciones de 1.5×10^7 UFC mL⁻¹ a partir de las 96 h hasta las 120 h de seguimiento. Como se ha descrito en numerosos estudios la esporulación de *B. subtilis* en medio de cultivo es estimulada por la disminución de nutrientes durante la fase estacionaria; incrementándose las concentraciones a medida que

la edad del cultivo avanza (Nicholson *et al.* 2000; Errington 2003). En cuanto a la obtención de sobrenadantes, se consiguió poner a punto una metodología eficiente para la obtención de sobrenadantes libres de células activas, y se consiguió información sobre la tolerancia de compuestos antifúngicos a altas temperaturas.

Los ensayos de actividad antifúngica *in vitro* demostraron que las células, endosporas y sobrenadantes libres de células de la cepa CPA-8 tuvieron una alta capacidad antagónica contra los aislados patogénicos de *B. cinerea*, *M. fructicola*, *M. laxa*, *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum*. La actividad antifúngica de células y endosporas estuvo siempre asociada a la formación de zonas de inhibición del crecimiento del patógeno y de precipitados blancos alrededor de la bacteria como se muestra en el ejemplo de la Figura 2.

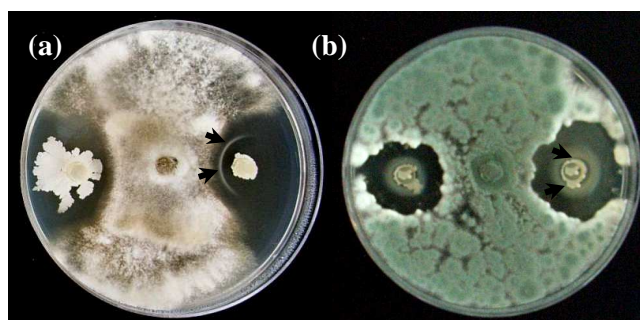


Figura 2. Actividad antifúngica *in vitro* de células y endosporas de *B. subtilis* CPA-8. En (a) efecto de células contra *B. cinerea* y en (b) endosporas contra *P. expansum*. Las flechas muestran la zona de inhibición de crecimiento del hongo alrededor de la bacteria y la presencia de precipitados por efecto de compuestos fungitóxicos producidos por la cepa CPA-8.

Los sobrenadantes libres de células de la cepa CPA-8 inhibieron el crecimiento de micelio y la esporulación de todos los patógenos estudiados entre el 89 y 100 %. Como se muestra en el ejemplo de la figura 3, la actividad antagónica de sobrenadantes libres de células fue igual o mejor que la observada con las células y endosporas.

La actividad antagónica de la cepa CPA-8 contra los patógenos de postcosecha estudiados a través de células fue similar a la descrita para otras cepas de *B. subtilis* (Pusey y Wilson 1984; Arras 1993; Touré *et al.* 2004). La actividad antifúngica de las endosporas aporta nueva información sobre el potencial de *B. subtilis* para la supresión del crecimiento de patógenos de postcosecha de fruta. En ambos casos, el hecho de que la actividad antifúngica de CPA-8 estuviera asociada a la formación de zonas de inhibición de crecimiento del patógeno fue el primer indicio de que su capacidad de biocontrol podía estar relacionada con la producción de compuestos antifúngicos. Los resultados obtenidos con sobrenadantes libres de células corroboraron la hipótesis anterior. En

general los resultados *in vitro* sugieren que la síntesis de compuestos antifúngicos podría ser el principal modo de acción utilizado por la bacteria para la supresión de enfermedades de postcosecha de fruta como ha sido propuesto por Gueldner *et al.* (1988) y Wisniewski y Wilson (1992). Aún cuando los resultados de actividad antagonista *in vitro* no pueden extrapolarse directamente a la efectividad de la cepa CPA-8 para el control de enfermedades en fruta, aportaron información importante sobre la bacteria requerida para los siguientes ensayos de efectividad y estudio del modo de acción.

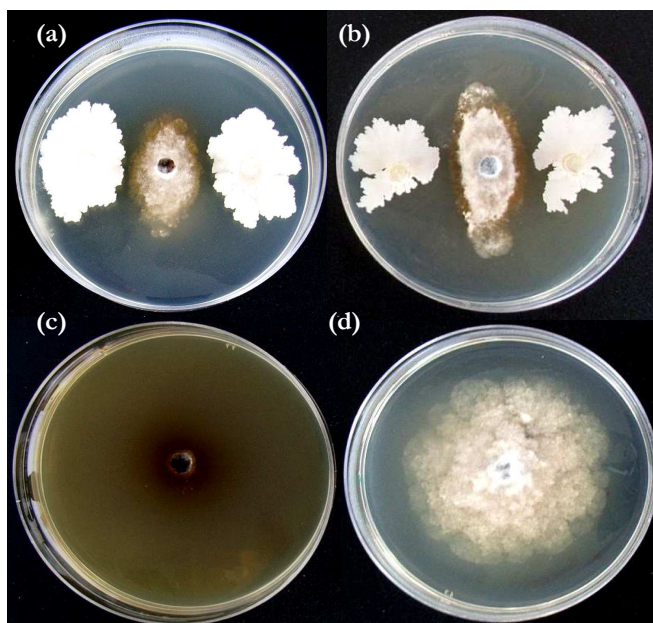


Figura 3. Actividad antagonista *in vitro* de *B. subtilis* CPA-8 contra *M. laxa* (micelio y esporulado activo). En (a) el efecto de células; en (b) de endosporas, en (c) de sobrenadantes libres de células (medio PDA+sobrenadantes filtrados) y en (d) el tratamiento control *M. laxa* (micelio y esporulado activo) en PDA.

1.2. Evaluación de la efectividad de *B. subtilis* CPA-8 en el control de podredumbres de postcosecha en naranja, manzana y fruta de hueso

La efectividad de *B. subtilis* CPA-8 en el control de las podredumbres causadas por *P. digitatum* y *P. italicum* en naranja; *B. cinerea* y *P. expansum* en manzana; y *M. laxa* y *M. fructicola* en fruta de hueso fue investigada mediante tratamientos de la fruta con células, endosporas y sobrenadantes libres de células. Las dosis de los tratamientos fueron en células de 10^9 UFC mL⁻¹, en endosporas de 10^8 UFC mL⁻¹, en sobrenadantes libres de células puros y diluciones 1:10 de todos estos tratamientos. Si bien las dosis ensayadas fueron altas para ser aplicadas a nivel práctico, sirvieron para aportar la primera

información sobre la efectividad de *B. subtilis* a nivel experimental. Con este antecedente, los tratamientos de la cepa CPA-8 a base de células, endosporas y sobrenadantes libres de células demostraron diferentes niveles de efectividad en la reducción de la incidencia de los principales patógenos de postcosecha de naranja, manzana y fruta de hueso.

Los tratamientos de células, endosporas y sobrenadantes libres de células no controlaron la podredumbre causada por *P. digitatum* y *P. italicum* en naranjas. En contraste, datos experimentales descritos por Arras (1993) y Arras y D'hallewin (1994) habían demostrado que tratamientos de *B. subtilis* son efectivos en el control de podredumbres de cítricos, pero cuando se aplican antes que el patógeno. Al comparar estos resultados con los datos publicados para otros aislados de *B. subtilis* en inoculaciones artificiales de naranja con *P. digitatum*, se confirma la idea de que se registran niveles altos de incidencia de la enfermedad cuando los tratamientos bacterianos son aplicados con posterioridad al patógeno (Zhang y Dou 2002; Leelasuphakul *et al.* 2008) como es nuestro caso. Adicionalmente, según lo descrito por Arrebola *et al.* (2010) la eficacia de aplicaciones preventivas de *B. amyloliquefaciens* en cítricos podría asociarse con la colonización bacteriana y la producción de compuestos antifúngicos (biopelículas) que protegen la superficie de la fruta contra la infección del patógeno. Sin embargo, la evaluación del potencial real de la cepa CPA-8, en este trabajo, intentaba simular al máximo las condiciones naturales de infección de *P. digitatum* y *P. italicum* en la fruta (que son patógenos que ya se encuentran en pre-cosecha en campo) y el efecto de los tratamientos en postcosecha.

En manzana, los tratamientos de la cepa CPA-8 controlaron la podredumbre causada por *B. cinerea*, mostrando incidencias entre el 70 % y el 12.5 % en comparación con el 100 % del tratamiento control y no fueron efectivos en el control de *P. expansum*. Sin embargo, los tratamientos de células, endosporas y sobrenadantes libres de células contra *B. cinerea* fueron efectivos a concentraciones altas. Ongena *et al.* (2005b) y Touré *et al.* (2004) habían publicado resultados similares con tratamientos preventivos de endosporas y extractos de lipopéptidos para reducir la podredumbre gris en manzana. La falta de eficacia de CPA-8 en el control del moho azul podría estar relacionada con el espectro antimicrobiano de la bacteria (Vanittanakom *et al.* 1986) y su incapacidad para inhibir la germinación de esporas (McKeen *et al.* 1986).

Los mejores resultados de efectividad de la cepa CPA-8 se obtuvieron en fruta de hueso contra *M. laxa* y *M. fructicola* donde la mayoría de los tratamientos de células, endosporas y sobrenadantes libres de células controlaron la podredumbre causada por ambos patógenos con reducciones de la incidencia de hasta el 100 % en comparación con el tratamiento control (70 % – 90 % de incidencia de podredumbre), como se muestra en el ejemplo de la figura 4.



Figura 4. Efectividad de *B. subtilis* CPA-8 en el control de la podredumbre marrón en nectarinas 'Big Top'. Los resultados corresponden al efecto de endosporas a 10^8 UFC mL^{-1} provenientes de cultivos de 120 h de incubación contra **(a)** *M. laxa* y **(b)** *M. fructicola*.

Los resultados en fruta de hueso confirmaron el potencial de biocontrol de *B. subtilis* contra *M. fructicola* ya citado en otros estudios (Pusey y Wilson 1984; Wilson y Pusey 1985; Pusey *et al.* 1986, 1988) y proporcionaron nueva información sobre la efectividad de tratamientos de endosporas; además del control junto con células y sobrenadantes libres de células contra *M. laxa*. Los tratamientos de endosporas tuvieron un importante efecto contra *M. laxa* y *M. fructicola* en fruta de hueso, similar al descrito por Leelasuphakul *et al.* (2008) y Touré *et al.* (2004) para células y sobrenadantes concentrados libres de células contra patógenos de postcosecha de cítricos y manzanas. El efecto de control de las endosporas de forma similar a lo que se ha descrito para las células, probablemente se puede relacionar con la producción *in situ* de células y secreción de compuestos antifúngicos. Desde un punto de vista tecnológico, la eficacia de las endosporas junto con las células vegetativas y los compuestos antifúngicos hace de esta bacteria un buen candidato para desarrollar un producto biológico (Brannen y Kenney 1997; Fravel 2005). Además, la eficacia de compuestos antifúngicos, ampliamente descritos como sustancias con baja toxicidad, alta biodegradabilidad y características favorables al medio ambiente podría ser otro punto a favor para el uso de *B. subtilis* CPA-8 en comparación con los plaguicidas químicos (Chen *et al.* 2008).

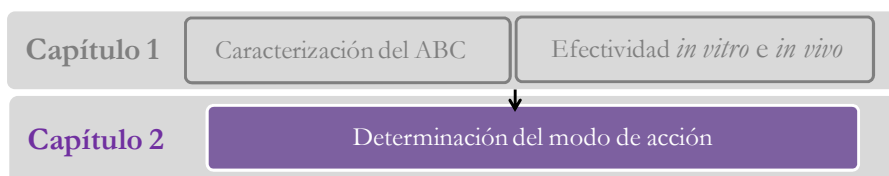
Basándose en resultados obtenidos en la fruta de hueso contra *Monilinia* spp. se decidió profundizar en esta relación; optimizando las dosis, el tipo de tratamiento: cultivos (consistentes en células + endosporas + metabolitos antifúngicos en el medio de crecimiento), células y sobrenadantes libres de células, y comparándolos con el producto comercial Serenade Max® formulado a base de *B. subtilis*. Los tratamientos a base de cultivos y suspensiones celulares fueron evaluados en dosis de 10^8 , 10^7 y 10^6 UFC mL^{-1} y los sobrenadantes libres de células puros y diluidos 1:10. Los diferentes tratamientos fueron efectivos contra *M. laxa* y *M. fructicola* de forma similar o mejor que Serenade Max®;

siendo los más efectivos los cultivos con incidencias de la enfermedad del 0 % en comparación al 85 y 95 % en los controles. Según Pryor *et al.* (2007) la mayor eficacia de los cultivos de la cepa CPA-8 podría deberse a la acción combinada de las células vegetativas, endosporas y compuestos antifúngicos presentes en el medio. Respecto a las dosis, en general la mayoría de las concentraciones fueron eficaces; y aunque en los tratamientos con células a 10^6 UFC mL⁻¹ se observó una ligera disminución de la efectividad comparada con las dosis 10^7 y 10^8 UFC mL⁻¹, con el resto de tratamientos la reducción de la enfermedad fue prácticamente total (hasta el 100 %). Estudios en otras frutas de Touré *et al.* (2004) y Zhang y Dou (2002) concuerdan con que las dosis usadas en nuestro estudio son adecuadas para aplicaciones bacterianas a nivel comercial.

Los resultados del estudio de las poblaciones bacterianas en heridas de frutas tratadas con cultivos y suspensiones celulares indicaron que las poblaciones bacterianas se mantuvieron estables o aumentaron hasta 2-log, demostrando una buena capacidad de la cepa CPA-8 para sobrevivir y colonizar los tejidos de fruta lesionados. Esto sugirió además que el entorno específico en la superficie de la fruta no representa un medio desfavorable para el crecimiento de este agente de biocontrol. Aunque todos los tratamientos bacterianos fueron inoculados en concentraciones similares, las poblaciones provenientes de las frutas tratadas con cultivos fueron en general superiores a las alcanzadas con suspensiones celulares o con Serenade Max®, posiblemente porque la presencia del medio de cultivo ayudó a la supervivencia y al crecimiento de la cepa CPA-8 sirviéndole seguramente como nutriente.

En conclusión, este primer estudio proporcionó un conocimiento detallado de las características de *B. subtilis* CPA-8 y su potencial para controlar enfermedades de fruta. La información obtenida apoya que esta bacteria tiene potencial para ser usada como un agente de biocontrol efectivo de la podredumbre marrón en fruta de hueso y la factibilidad de que ésta pueda ser desarrollada como formulación comercial.

2. Estudio del mecanismo de acción de *B. subtilis* CPA-8



El desarrollo comercial de agentes de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta tradicionalmente se ha basado en estudios de ecología microbiana aplicada; sin embargo los mecanismos de acción usados por los agentes de biocontrol para suprimir a los patógenos aún son poco conocidos. Según Janisiewicz y Korsten (2002) un conocimiento amplio sobre los mecanismos de acción de un agente de biocontrol es un requerimiento clave para

su desarrollo como producto biológico. Adicionalmente, este conocimiento aplicado en potenciales agentes de biocontrol ya identificados puede ser útil para mejorar su eficacia a través del desarrollo de métodos apropiados para su producción, formulación y aplicación, así como facilitar su distribución y registro (Wilson y Wisniewski 1989; Droby *et al.* 2009).

En la especie *B. subtilis* se han descrito un gran número de cepas como potentes agentes de control de enfermedades agrícolas por su capacidad para producir una amplia variedad de compuestos antimicrobianos, especialmente lipopéptidos antifúngicos (Shoda 2000; Ongena y Jacques, 2008). Sin embargo, la mayoría de estudios se han centrado en el potencial de biocontrol de esta bacteria, y los mecanismos de acción para suprimir enfermedades a través de compuestos antifúngicos aún son poco conocidos (Ongena *et al.* 2005a). En condiciones de postcosecha, han sido pocos los estudios que han discutido el papel de los lipopéptidos antifúngicos producidos por *B. subtilis*, como iturinas y fengicinas, en la reducción de podredumbres de melocotón y manzana (Gueldner *et al.* 1988; Touré *et al.* 2004), existiendo un creciente interés debido a las características de los lipopéptidos ya que presentan una alta actividad antagonica, un modo de acción versátil y son amigables con el ambiente comparados con los fungicidas químicos (Ongena *et al.* 2009).

En base a la información del potencial de *B. subtilis* CPA-8 para el control de enfermedades de postcosecha de fruta (Capítulo 1) el siguiente paso en este trabajo se enfocó a dilucidar el principal mecanismo de acción implicado en su capacidad de biocontrol (Capítulo 2). La abundante información sobre el potencial de compuestos fungitóxicos producidos por diferentes cepas de *B. subtilis*, especialmente lipopéptidos, ayudó además a dirigir el análisis a los aspectos genéticos y fisiológicos implicados en la expresión de genes y en la síntesis de estos compuestos en la cepa CPA-8.

2.1. Estudio de la actividad antifúngica de sobrenadantes libres de células y caracterización de lipopéptidos antifúngicos

En primer lugar se llevaron a cabo ensayos de actividad antifúngica *in vitro* con sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos líquidos de *B. subtilis* CPA-8, los cuales suministraron la primera evidencia sobre el papel de los lipopéptidos producidos por la cepa CPA-8 en la supresión de *M. laxa* y *M. fructicola*. Los sobrenadantes libres de células y sus extractos lipopeptídicos (obtenidos con *n*-butanol) presentaron una fuerte actividad antifúngica contra ambos patógenos, similar o igual que la observada con suspensiones celulares. Este hecho concordó con los resultados publicados por McKeen *et al.* (1986) sobre el efecto inhibitorio de extractos etílicos de *B. subtilis* B-3 contra una amplia gama de hongos fitopatógenos, incluyendo *M. fructicola*, y apuntó a la antibiosis como principal mecanismo de acción implicado en el potencial de biocontrol de CPA-8.

El siguiente paso fue identificar los lipopéptidos producidos por CPA-8 y discriminar su actividad antifúngica. El análisis de los extractos butanólicos de CPA-8 por TLC en comparación con los extractos obtenidos de las cepas de *B. subtilis* UMAF6639 y UMAF6614 productoras de lipopéptidos utilizadas como cepas de referencia (Romero *et al.* 2007a, b), mostró la presencia de las tres clases de lipopéptidos: fengicinas, iturinas (iturina A y bacillomicina) y surfactinas, como se muestra en el ejemplo de la figura 5a.

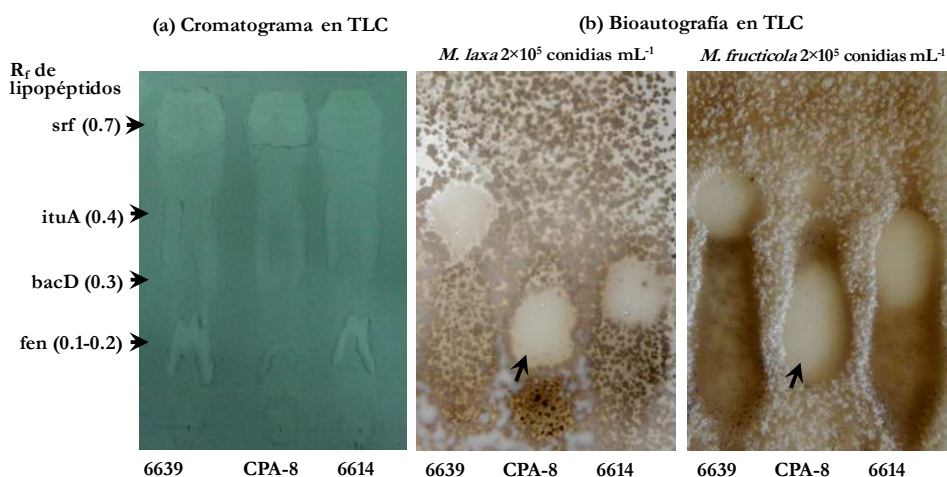


Figura 5. Identificación de lipopéptidos producidos por *B. subtilis* CPA-8 y las cepas de referencia UMAF6639 y UMAF6614 mediante análisis de extractos butanólicos en (a) cromatografía de capa fina (TLC) y en (b) bioautografía (actividad antifúngica) contra *M. laxa* o *M. fructicola*. Las flechas indican la posición de los lipopéptidos surfactina (srf), iturina A (ituA), bacillomicina D (bacD) y fengicina (fen) en el cromatograma y sus correspondientes zonas de inhibición del crecimiento de los patógenos.

Los tres tipos de familias de lipopéptidos han sido ampliamente descritos para la especie por su fuerte actividad antifúngica contra diversos hongos fitopatógenos (Razafindralambo *et al.* 1993; Ongena *et al.* 2009). Al combinar este ensayo con pruebas de inhibición del crecimiento por bioautografía, los resultados revelaron que la fracción correspondiente a fengicinas era la responsable de la actividad antifúngica de la cepa CPA-8 contra *M. laxa* y *M. fructicola*, mientras que la de iturinas tuvo una limitada acción inhibitoria y la de surfactinas no mostró ninguna actividad de inhibición (Figura 5b). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la antibiosis constituye el principal mecanismo de acción de la cepa CPA-8 contra los patógenos de postcosecha. Además, resulta interesante desde un punto de vista práctico porque amplía el limitado número de cepas de *B. subtilis* productoras de fengicina que han sido citadas como potencialmente bioactivas en la supresión de patógenos de postcosecha, concretamente contra el moho gris en manzanas (Touré *et al.* 2004; Ongena *et al.* 2005b).

2.2. Determinación del rol de las fengicinas en el potencial de control de *B. subtilis* CPA-8 mediante construcción de mutantes defectivos

En base a la identificación de la fengicina como principal factor implicado en la actividad antifúngica de la cepa CPA-8, la atención se centró en el desarrollo de una estrategia de mutagénesis dirigida a inactivar la expresión de los genes que codifican para la síntesis de fengicinas a fin de clarificar el papel de estos lipopéptidos en la capacidad de biocontrol de CPA-8. Como se muestra en el ejemplo de la figura 6 con el conocimiento de que la cepa CPA-8 sintetiza fengicinas, previa a la construcción de los mutantes defectivos se identificó la expresión del gen *fenB* por PCR. Se identificó la expresión de este gen en *B. subtilis* CPA-8 mediante comparación con la cepa de referencia UMAF6639. La transformación de la cepa CPA-8 a través de bloquear la expresión del gen *fenB* se realizó considerando que la alteración de este gen, en particular, podría bloquear la expresión de los genes *fen A-D* que codifican para la síntesis del complejo multienzimático de fengicinas Fen A-D o Fen 1-5, como ha sido descrito por Steller *et al.* (1999).

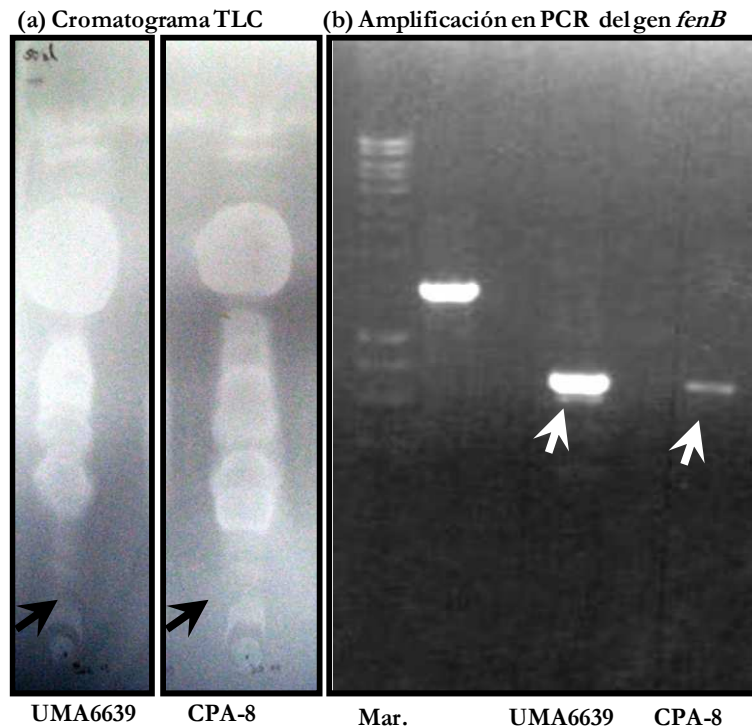


Figura 6. Identificación de la síntesis de fengicinas y de la expresión del gen *fenB* por *B. subtilis* CPA-8 y la cepa de referencia UMA6639. En (a) el cromatograma en TLC mostrando la síntesis de fengicinas y en (b) la expresión del gen *fenB* que codifica para síntesis de fengicina B mediante amplificación en PCR. Las flechas indican presencia de fracciones de fengicinas en el cromatograma y las bandas del gen *fenB* (~1481bp) en el gel de agarosa al 1 % comparadas con el marcador hyperLadder I (Mar.).

La mutagénesis constituye un método exitoso para identificar el papel de los antibióticos producidos por un agente de biocontrol bacteriano en la supresión de enfermedades de las plantas a nivel molecular (Silo–Suh *et al.* 1994; Hokeberg *et al.* 1998). La inactivación de la producción de antibióticos por mutagénesis alterando los genes implicados en su biosíntesis, generalmente resulta en la reducción o la pérdida de la capacidad antagonista bacteriana para controlar el patógeno (Raaijmakers *et al.* 2002). En postcosecha esta técnica ha sido usada recientemente con los trabajos de Arrebola *et al.* (2010) y Liu *et al.* (2011) para la construcción de mutantes de *B. amyloliquefaciens* defectivos para la supresión de enfermedades de cítricos y melocotón, siendo nuestra investigación el primer trabajo sobre fengicinas producidas por *B. subtilis* implicadas en el control de *Monilinia* spp.

En este trabajo, el uso del protocolo optimizado de electroporación de protoplastos desarrollado por Romero *et al.* (2006) para transformar las cepas recalcitrantes de *B. subtilis* UMAF6639 y UMAF6614, permitió la construcción de mutantes defectivos para la producción de fengicina a partir de la cepa parental CPA–8. Aunque éste es un método delicado y con frecuencias de recuperación bajas, fue suficientemente robusto para obtener transformantes estables de la cepa CPA–8 que pudieron ser manipulados y utilizados en los ensayos posteriores a nivel molecular, químico y biológico.

El análisis de los transformantes de la cepa CPA–8 por PCR demostró la integración del vector de interrupción *pfen2–2* en la secuencia del gen *fenB* que codifica para la síntesis de fengicina B (Figura 7). El análisis de los extractos de lipopéptidos por bioautografía en TLC demostró que los mutantes de la cepa CPA–8 (Figura 7b) perdieron o redujeron su capacidad

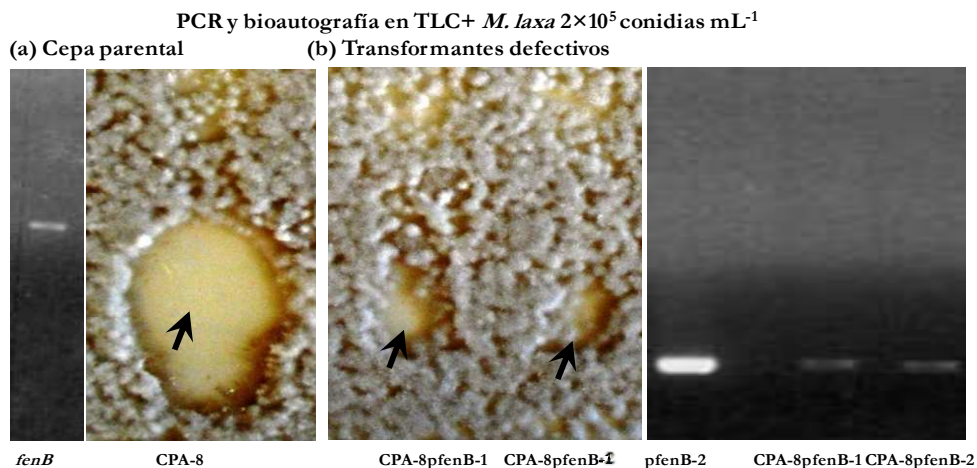


Figura 7. Análisis de transformantes de *B. subtilis* CPA–8 defectivos para la producción de fengicinas por PCR en el gel de agarosa al 1 % y bioautografía en TLC. En **(a)** la banda del gen *fenB* (~1481 bp) y la actividad antifúngica de fengicinas de la cepa parental CPA–8 contra *M. laxa*. En **(b)** la banda gen *fenB* con el vector de interrupción *pfen2–2* (~423 bp) y la pérdida de actividad antifúngica de los transformantes defectivos CPA–8 *pfenB* contra *M. laxa*. Las flechas indican las zonas de inhibición o pérdida de inhibición del crecimiento del patógeno.

antagónica contra *M. laxa* y *M. fructicola* comparados con la cepa parental (Figura 7a) debido a que dejaron de producir fengicina. Estos resultados corroboraron la importancia de la producción de fengicina en la actividad antagónica de *B. subtilis* CPA-8 contra ambos patógenos y permitieron la selección de los fenotipos mutantes de la cepa CPA-8 que habían perdido la capacidad antagónica contra *Monilinia* spp. para los ensayos de efectividad en fruta.

Una vez obtenidos los mutantes defectivos para la síntesis de fengicinas se procedió a estudiar su efectividad para el control de *Monilinia* spp. en melocotón, comparándola con la cepa parental. Los ensayos de efectividad en fruta utilizando tratamientos a base de células y sobrenadantes libres de células confirmaron que los mutantes de la cepa CPA-8 defectivos para la producción de fengicinas perdieron en gran parte su capacidad para controlar la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. Como se muestra en el ejemplo de la figura 8 la fruta tratada con suspensiones provenientes de los mutantes defectivos en fengicinas presentó porcentajes de podredumbre altos, en algunos casos similares a los observados en el

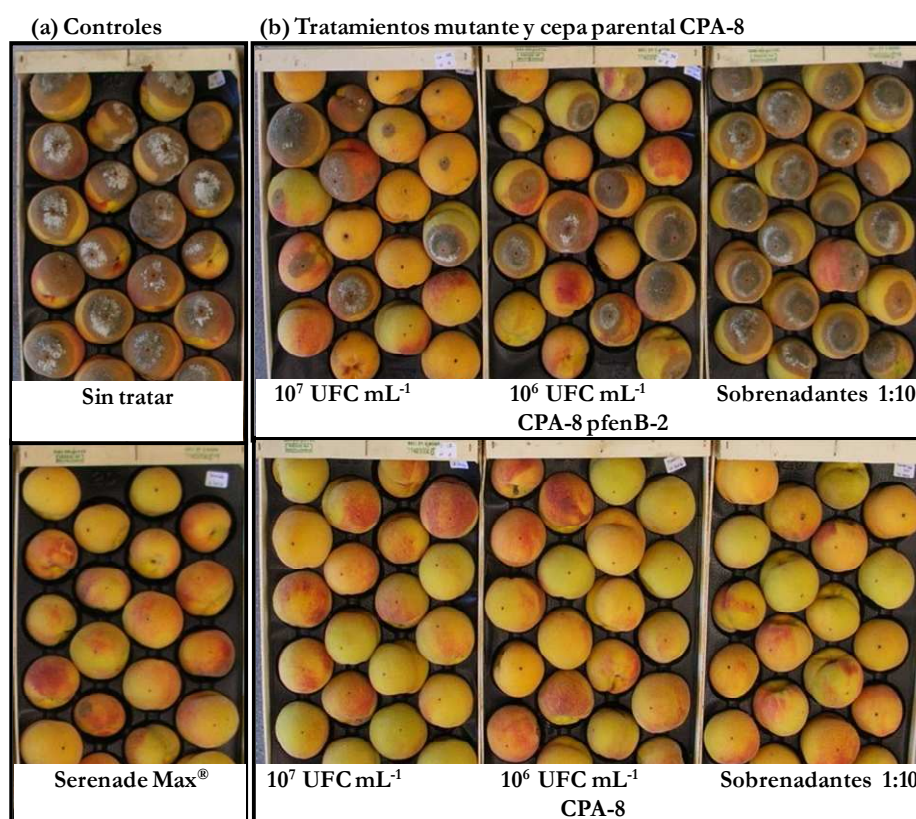


Figura 8. Pérdida de efectividad de mutantes de *B. subtilis* CPA-8 defectivos para la producción de fengicinas contra *M. laxa* (2×10^3 conidias mL⁻¹) en melocotones 'Plácido' ecológicos. En (a) fruta sin tratar y tratada con Serenade Max® 2.5 g L⁻¹ (1.8×10^7 UFC mL⁻¹). En (b) fruta tratada con diferentes suspensiones de CPA-8 pfenB-2 y la cepa parental CPA-8.

tratamiento control sin tratar, mientras que los tratamientos con la cepa parental presentaron reducciones de la enfermedad de hasta el 100 %, efectividad similar o mejor que el producto comercial Serenade Max®. Aunque los tratamientos de células provenientes de los mutantes de CPA-8 conservaron cierto un efecto de reducción de la podredumbre marrón, los sobrenadantes libres de células fueron completamente ineficaces para controlar esta enfermedad, lo que indicó que la producción de fengicinas es un factor esencial en el mecanismo de acción de CPA-8.

El hecho de que los tratamientos a base de células de los mutantes de la cepa CPA-8 conservaran alguna actividad antifúngica contra la podredumbre marrón podría estar relacionado con su capacidad para producir otros lipopéptidos como iturinas y surfactinas, y el posible efecto sinérgico entre ambos como ha sido propuesto por Magnet-Dana *et al.* (1992) y Arrebola *et al.* (2010). El efecto de biocontrol de los mutantes CPA-8 además podría estar relacionado con la habilidad de la bacteria para desarrollar otros mecanismos de biocontrol (Janisiewicz y Korsten 2002; Morikawa 2006).

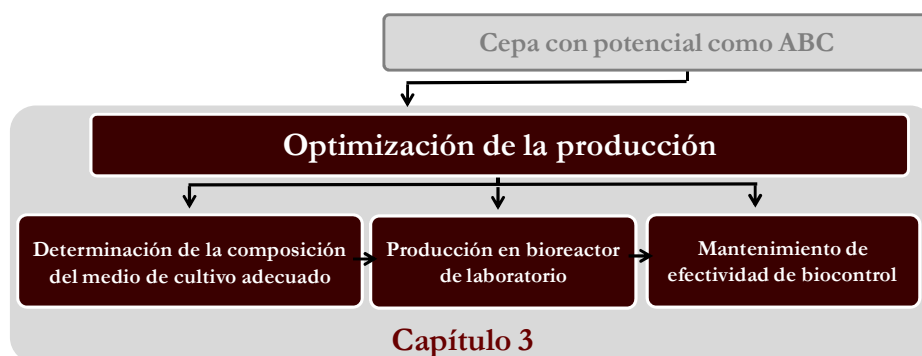
El estudio de la dinámica de poblaciones de la cepa parental CPA-8 y sus mutantes en la superficie de la fruta demostró que los mutantes fueron capaces de sobrevivir y colonizar la superficie de la fruta de forma similar a la cepa parental. Este resultado corroboró que la pérdida de eficacia en el control de la podredumbre marrón puede ser sólo atribuida a su incapacidad para producir fengicinas. Los resultados obtenidos con la cepa parental fueron similares a los reportados por Touré *et al.* (2004) quienes demostraron que la eficacia de la cepa GA 1 de *B. subtilis* contra el moho gris en manzana es debido a su supervivencia sobre la superficie de la fruta y la producción de fengicinas. Estos autores además sugirieron la importancia de usar mutantes defectivos, como los que fueron desarrollados en este trabajo, para comprobar el efecto de biocontrol de fengicinas.

Desde un punto de vista patológico, sólo un número reducido de estudios han destacado los daños morfológicos y fisiológicos de los lipopéptidos pertenecientes al grupo de las fengicinas sobre la estructura de los patógenos. Según lo descrito por Vanittanakom *et al.* (1986) y Deleu *et al.* (2005) el efecto fungicida de las fengicinas se debe a que estos lipopéptidos pueden interactuar con los componentes lipídicos de la membrana citoplasmática del hongo como el ergosterol y alterar su estructura y permeabilidad por la formación de un complejo fengicina-ergosterol de manera dosis dependiente. Este efecto fue probado por Vanittanakom *et al.* (1986) quien demostró las alteraciones morfológicas causadas por fengicinas en diferentes hongos fitopatógenos incluyendo *M. fructicola*. En este sentido, la alta susceptibilidad exhibida por *M. laxa* y *M. fructicola* podría explicarse por el efecto de fengicinas producidas por CPA-8 sobre las estructuras de ambos hongos que inciden en su viabilidad y posterior incapacidad de desarrollarse para causar podredumbre sobre la fruta.

Desde un punto de vista práctico, los resultados de efectividad de la cepa CPA-8 para el control de la podredumbre marrón fueron similares o incluso mejores que los observados con Serenade Max[®], una formulación comercial basada en la cepa QST-713 de *B. subtilis*. Hecho que corrobora la adecuación de esta cepa para ser utilizada como agente de control biológico de enfermedades de postcosecha. En Europa, la preocupación de introducir antagonistas que producen antibióticos en la dieta que puedan afectar la salud humana puede presentar un obstáculo para la aceptación pública de esta tecnología; sin embargo una gran cantidad de nuevos trabajos describen las características amigables de los lipopéptidos con el ambiente y la salud humana comparados con fungicidas químicos (Chen *et al.* 2008). En USA diferentes cepas de *B. subtilis* son consideradas como sustancias GRAS y usadas como productos biológicos para el control de enfermedades agrícolas (Fravel 2005). Además, los lipopéptidos producidos por bacterias del género *Bacillus*, incluida la especie *B. subtilis* son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia y farmacéutica (Cutting 2011) y han sido propuestos como potenciales candidatos para reemplazar fungicidas agrícolas (Banat *et al.* 2000).

La evidencia acumulada en este estudio proporcionó un conocimiento detallado del principal mecanismo usado por *B. subtilis* CPA-8 para la supresión de patógenos de postcosecha a través de la producción de compuestos fungitóxicos, específicamente lipopéptidos de la familia fengicinas contra la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. Estos aspectos fundamentales sobre los mecanismos de acción de CPA-8 además de contribuir con nueva información de la biología de un agente de biocontrol, son de gran interés a nivel práctico para su futuro uso como alternativa a los fungicidas químicos establecidos actualmente para el manejo de fruta.

3. Optimización de la producción de *B. subtilis* CPA-8 mediante un medio de bajo coste



Basados en las evidencias sobre el potencial de la cepa CPA-8 para el control de enfermedades de postcosecha de fruta y sobre su modo de acción obtenidas en los capítulos 1

y 2, el siguiente paso en el desarrollo de esta bacteria como agente de control biológico fue realizar estudios para la optimización de su producción y formulación.

La producción y formulación de un agente de biocontrol son pasos indispensables para su uso como producto comercial. Siendo el principal requerimiento la producción de altas concentraciones del microorganismo, por lo cual el desarrollo de un medio de bajo coste y la optimización de las condiciones de crecimiento se deben estudiar en primer término. El medio de cultivo debe estar constituido por materias primas baratas que suplan los requerimientos nutricionales del microorganismo para una máxima producción de biomasa y metabolitos en un volumen dado y en el menor tiempo posible (Riesenberg y Guthke 1999; Teixidó *et al.* 2011). Además, este medio debe permitir una fácil recuperación del producto microbiano, así como no interferir sobre su eficacia de biocontrol. Con esta base, este estudio se centró en el diseño de un medio de cultivo de bajo coste constituido por sustratos baratos que proporcionase una producción alta de la cepa CPA-8 y sus compuestos antifúngicos, manteniendo su eficacia de biocontrol. Todo este estudio supondría una base fiable para un posterior escalado de producción a nivel industrial (Capítulo 3).

3.1. Búsqueda de productos comerciales y subproductos agroalimentarios como fuentes de nitrógeno y carbono para la optimización de un medio de bajo coste

El primer paso para la optimización del medio de cultivo de bajo coste se centró en encontrar las mejores fuentes de nitrógeno y carbono entre productos comerciales y subproductos agroalimentarios baratos y de fácil obtención, que en combinación permitieran alcanzar una alta producción de la cepa CPA-8. Extracto de levadura, peptona, sacarosa y maltosa fueron ensayadas debido a que son fuentes de nitrógeno y carbono ampliamente descritas para la producción de microorganismos benéficos, incluyendo *B. subtilis* (Jacques *et al.* 1999; Costa *et al.* 2002a; Abadias *et al.* 2003). Tres productos de soja: harina de soja integral comercial “Luz de Vida”, harina de soja desengrasada 44 % y semillas de soja molidas fueron usados como fuentes de nitrógeno por ser considerados como excelentes sustratos económicos para la producción industrial de *B. subtilis* y sus metabolitos ya que contienen proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (Matsumoto *et al.* 2000). La melaza de caña, subproducto de la industria azucarera económico y ampliamente usada en la producción de alcohol y microorganismos benéficos (Costa *et al.* 2001; Kotzamanidis *et al.* 2002; Maheshwari y Dubey 2008) fue incluida como fuente de carbono debido a su elevado contenido de azúcar (aprox. 50 % w/w sacarosa, glucosa y fructosa), es una suspensión coloidal, que contiene además metales pesados, vitaminas y compuestos de nitrógeno. Debido a que el uso de suplementos minerales como oligoelementos ha sido referido como un factor importante en la producción de *B. subtilis* y sus metabolitos (Cooper *et al.* 1981), todos los medios ensayados para la

producción de la cepa CPA-8 se suplementaron con minerales a concentraciones bajas (mg L^{-1}).

Una vez definidos los componentes del medio, los primeros ensayos para la optimización del medio de cultivo de bajo coste se llevaron a cabo en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de cada medio de estudio. Los diferentes medios fueron inoculados con la cepa CPA-8 a 10^5 UFC mL^{-1} y se incubaron a 30°C y 150 rpm durante 72 h. El crecimiento de la bacteria (UFC mL^{-1}) se determinó a las 24, 48 y 72 h.

Los primeros medios de cultivo ensayados estuvieron compuestos por extracto de levadura, peptona o harina de soja integral comercial “Luz de Vida” como fuentes de nitrógeno en combinación con diferentes concentraciones de melaza como fuente de carbono. El máximo crecimiento de 2.4×10^9 CFU mL^{-1} fue obtenido en los medios constituidos por harina de soja integral comercial “Luz de Vida” (40 g L^{-1}) o por peptona (20 g L^{-1}) en combinación con melaza (10 g L^{-1}) comparados con los medios control. En los medios que combinaban harina de soja a 10, 20 o 40 g L^{-1} con melaza a 20 g L^{-1} , el crecimiento de CPA-8 fue entorno a $3.6\text{--}9.5 \times 10^8$ CFU mL^{-1} , y cuando la concentración de melaza se incrementó a 40 g L^{-1} el crecimiento disminuyó hasta $1.1\text{--}6.4 \times 10^7$ CFU mL^{-1} . Un crecimiento bajo (5.8×10^7 CFU mL^{-1}) fue obtenido con el medio compuesto por extracto de levadura (10 g L^{-1}) en combinación con melaza (10 g L^{-1}).

En general, en todos los medios con concentraciones altas de melaza (20 o 40 g L^{-1}) se observó un efecto negativo en el crecimiento de CPA-8. Aunque este sustrato ha sido citado por Younis *et al.* (2010) para la producción de *B. subtilis* aislado de la melaza de caña, las concentraciones usadas pudieron ser tóxicas para las células de la cepa CPA-8, de forma similar a los resultados descritos por Costa *et al.* (2001) para *P. agglomerans* CPA-2. En estos medios, especialmente en los compuestos por extracto de levadura o peptona se observó que el pH disminuyó incluso por debajo de 5.5. Según lo descrito por Ohara *et al.* (1992) el crecimiento microbiano puede promover una acumulación de productos ácidos en el medio que provocan una disminución del pH y la consiguiente inhibición del crecimiento. En los medios con concentraciones altas de harina de soja (20 o 40 g L^{-1}) y melaza pudo existir, sin embargo, un efecto tampón que contribuyó al crecimiento de CPA-8, como ha sido sugerido por Gaudreau *et al.* (1997) en medios con altas concentraciones de extracto de levadura en la fermentación de bacterias lácticas.

Las concentraciones altas de la cepa CPA-8 obtenidas en los medios con peptona o harina de soja integral comercial “Luz de Vida” a 40 g L^{-1} comparadas con extracto de levadura cuando la melaza se redujo a 10 g L^{-1} (2.4×10^9 CFU mL^{-1}), señalaron que esta fuente de carbono promueve el crecimiento bacteriano influenciada por la capacidad del microorganismo para utilizar la fuente de nitrógeno disponible de forma parecida a lo que observaron Costa *et al.* (2002a). Un nuevo ensayo usando medios constituidos por harina de soja integral comercial

“Luz de Vida” a 40 g L^{-1} y diferentes dosis de sacarosa o maltosa (10 o 20 g L^{-1}) confirmaron que ésta es una buena fuente de nitrógeno para el crecimiento de la cepa CPA-8. Ambos estudios sugirieron seleccionar a la harina de soja integral comercial “Luz de Vida” como fuente de nitrógeno de bajo coste para reemplazar la peptona comercial en combinación con melaza o sacarosa para la producción de *B. subtilis* CPA-8. Aunque el crecimiento máximo de la cepa CPA-8 se obtuvo cuando la concentración de harina de soja fue de 40 g L^{-1} , el bajo coste de este sustrato permite el uso de altas concentraciones sin reducir su idoneidad para la producción comercial.

El mayor crecimiento de la cepa CPA-8 obtenido en los diferentes medios de prueba suplementados con oligoelementos comparados con el medio control 863 sugirió que su uso puede ayudar a incrementar la multiplicación celular, similar a lo citado en otras especies de *Bacillus* donde se ha demostrado que iones como Mn^{2+} , Fe^{2+} y Mg^{2+} incrementan el crecimiento (Abdel-Mawgoud *et al.* 2008) y la producción de compuestos antifúngicos (Tabbene *et al.* 2009). Desde un punto de vista práctico la inclusión de estos elementos, no sería un problema en los escalados de producción a nivel comercial debido a las bajas concentraciones a las que son utilizados.

Con los datos obtenidos y con la finalidad de reducir el coste final del medio se realizaron nuevos ensayos incorporando el uso de dos productos de soja: harina de soja desengrasada 44 % y semillas molidas ambas a una concentración de 40 g L^{-1} en combinación con melaza (10 g L^{-1}) o sacarosa (20 g L^{-1}). La justificación para evaluar estos dos sustratos de soja fue que son más económicos que la harina de soja integral comercial “Luz de Vida”. Los resultados obtenidos demostraron que ambos productos fueron buenas fuentes de nitrógeno para el crecimiento de la cepa CPA-8 igual que la harina de soja integral comercial “Luz de Vida”. El máximo crecimiento alrededor de $3.3\text{--}3.5 \times 10^9 \text{ CFU mL}^{-1}$ fue obtenido en los medios constituidos por harina de soja desengrasada combinada con sacarosa o melaza. Desde un punto de vista práctico, la harina de soja desengrasada (44.5 % de proteínas, 6.7 % de grasa y otras sustancias biológicas) en combinación con melaza fue elegido como el medio de cultivo óptimo entre otros productos, debido a que proporcionó el crecimiento más alto de la cepa CPA-8 (alrededor de $3.5 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$).

En el paso final de optimización la concentración de melaza fue reducida de 10 g L^{-1} a 5 o 2 g L^{-1} en medios combinados con la harina de soja desengrasada 44 % a 40 g L^{-1} . Los resultados demostraron que la reducción de concentración de melaza en el medio de 10 g L^{-1} a 5 o 2 g L^{-1} no disminuyó la producción de la cepa CPA-8, obteniendo una producción final entorno a $2 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$. Para la selección de la concentración de melaza sin embargo se seleccionó la concentración de 5 g L^{-1} en lugar de 2 g L^{-1} porque esta fuente es barata y además porque 2 g L^{-1} presentaba una producción ligeramente inferior aunque no significativamente diferente. Estos resultados corroboraron la posibilidad de seleccionar la melaza como la fuente óptima de carbono para producción a bajo coste del agente de

biocontrol *B. subtilis* CPA-8. En ambos casos, para asegurar una buena producción y una eficacia constante se debe procurar la mayor estandarización posible de estos subproductos, evitando variaciones en función del origen de los lotes o la acumulación de impurezas que puedan disminuir el rendimiento de la producción (Stanbury *et al.* 1995).

Con estos resultados la producción de compuestos antifúngicos de CPA-8 en el medio de bajo coste compuesto por harina de soja desengrasada 44 % a 40 g L⁻¹ en combinación con melaza de caña a 5 g L⁻¹ y suplementado con minerales (DSF40MOL5) fue evaluada en comparación con el medio MOLP por bioautografía en TLC. Los resultados indicaron que los extractos de lipopéptidos obtenidos a partir de cultivos de CPA-8 en el medio de bajo coste tuvieron igual o mayor actividad antifúngica contra *Monilinia* spp. como se muestra en el ejemplo de la Figura 9 (con *M. fructicola*). Estos resultados demostraron que el medio de bajo coste puede mantener o incrementar la producción de compuestos antifúngicos.

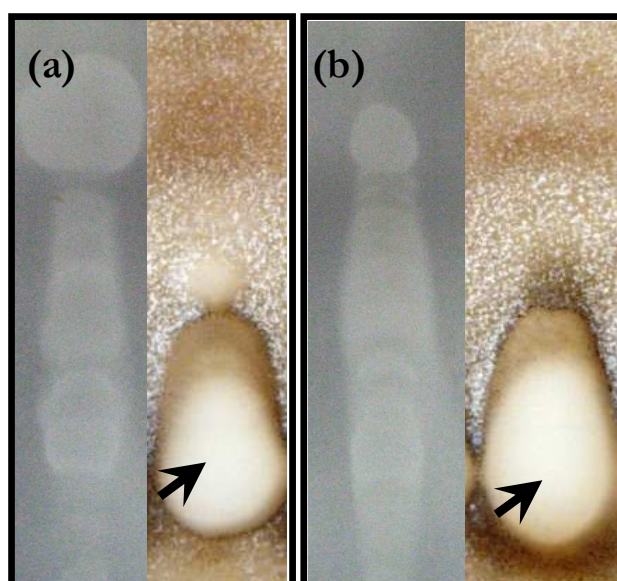


Figura 9. Actividad antifúngica de lipopéptidos producidos por CPA-8 en el medio optimizado de bajo coste de harina de soja desengrasada-melaza (DSF40MOL5) contra *M. fructicola* (2×10^5 conidias mL⁻¹) por bioautografía en TLC. En (a) los lipopéptidos antifúngicos producidos en medio MOLP y en (b) los producidos en DSF40MOL5. Las flechas señalan las zonas de inhibición de crecimiento del patógeno.

De este estudio preliminar se desprende, que el medio compuesto por harina de soja desengrasada 44 % a 40 g L⁻¹ en combinación con melaza de caña a 5 g L⁻¹ y suplementado con minerales (DSF40MOL5) cumplía con los requerimientos de proveer

una alta producción de la cepa CPA-8 a un bajo coste comparado con medios de laboratorio como 863. Además el medio optimizado de bajo coste ayudó a mantener o aumentar la actividad antifúngica de la cepa CPA-8 contra *Monilinia* spp. a través de la producción de lipopéptidos antifúngicos. En base a ambos hechos este medio fue seleccionado como óptimo para realizar el siguiente paso de escalado de producción a nivel de laboratorio.

Antes de realizar el escalado de producción se evaluó el efecto de la temperatura de incubación en el crecimiento de CPA-8 en el medio optimizado de bajo coste DSF40MOL5. Se evaluó el efecto de tres temperaturas: 30, 34 y 37 °C durante 24 h de crecimiento. Los resultados demostraron que las tres temperaturas ensayadas proporcionaban un buen crecimiento de CPA-8. Estos datos concuerdan con las descripciones realizadas por Jacques *et al.* (1999) para la producción de *B. subtilis* en fermentación líquida, que consideran los niveles óptimos de incubación entre 30 y 37 °C. Se eligió como temperatura de producción 30 °C por ser la más económica y energéticamente sostenible.

3.2. Producción de *B. subtilis* CPA-8 en bioreactor de laboratorio

Las pruebas de producción de la cepa CPA-8 en laboratorio a pequeña escala se realizaron en un bioreactor DCU-300 (Figura 10) conteniendo 5 L del medio optimizado DSF40-MOL5 y manteniendo la temperatura a 30 °C, una agitación de 200 rpm y una aireación de 100 L h⁻¹ durante 30 h. Estas pruebas permitieron realizar un estudio de la evolución del crecimiento de CPA-8, junto con la del pH y pO₂ a lo largo del proceso.

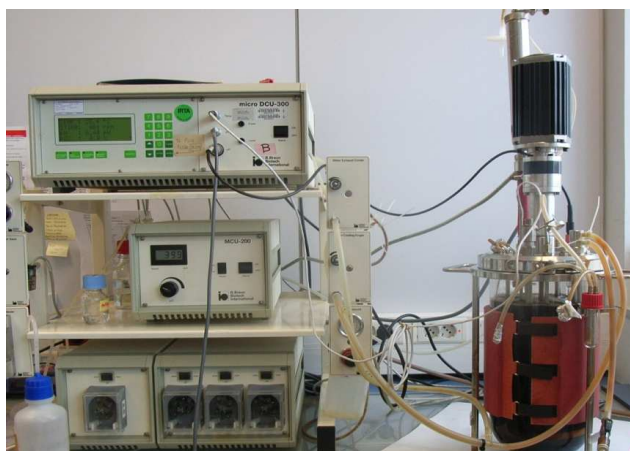


Figura 10. Vista general del fermentador BIostat-A (Braun Biotech International, Alemania) utilizado para las pruebas de producción de *B. subtilis* CPA-8 en medio optimizado de bajo coste a base de harina de soja desengrasada y melaza a escala de laboratorio.

Bajo las condiciones descritas los resultados obtenidos indicaron que hubo una fase de latencia de 4.9 h, después de la cual se produjo un crecimiento exponencial y a las 20 h se alcanzaron los niveles de producción más altos de aproximadamente 3.2×10^9 UFC mL⁻¹, que se mantuvieron constantes hasta el final del proceso después de 30 h. Este resultado demostró la posibilidad de producir cantidades adecuadas de CPA-8 en el medio optimizado de bajo coste y con una fase estacionaria larga que nos da una mayor flexibilidad en la duración del proceso.

En cuanto a la evolución del pH, los niveles se mantuvieron entre 6.0 y 6.8 durante todo el proceso. En general estos niveles son considerados adecuados para el crecimiento de bacterias (Waites *et al.* 2001); y particularmente en *B. subtilis*, estudios realizados por Jacques *et al.* (1999) demostraron que un pH de 7 provee la máxima producción de células, endosporas y lipopéptidos mediante fermentación líquida. Respecto a la concentración de oxígeno los resultados indicaron una caída de los niveles del 100 al 0 % pocas horas después del inicio del proceso (10 h). Sin embargo, el agotamiento del oxígeno pareció no influir en el crecimiento de la cepa CPA-8, lo que puede atribuirse a que esta bacteria, generalmente considerada aerobia estricta, es capaz de crecer en ausencia o escasez de oxígeno (Nakano y Zuber 2002). En relación a la formación de espuma, aún cuando durante el crecimiento de la cepa CPA-8 hasta las 30 h no se presentaron problemas de desbordamiento del bioreactor y pérdida de caldo de cultivo; éste es un factor importante a tenerse en cuenta especialmente cuando los tiempos de producción se amplían a 72 h para estimular la producción de endosporas y compuestos antifúngicos. El uso de antiespumantes o bioreactores con modificaciones para la recuperación de espuma (Coutte *et al.* 2010) y la producción continua (Davis *et al.* 2001; Guez *et al.* 2007; Manso *et al.* 2010) utilizados actualmente podrían ser estudiados en el futuro para controlar este problema y optimizar la producción. A pesar de que la producción de la cepa CPA-8 fue alta, sería necesario ensayar como se comportaría el cultivo si se modificasen las condiciones de O₂, temperatura, pH, agitación, antiespumante, etc. Estas variables podrían estudiarse mediante un diseño experimental como el de Plackett-Burman (Strobel y Sullivan 1999) que permitiera obtener datos sobre el efecto combinado de condiciones circundantes en la producción de células vegetativas, endosporas y metabolitos antifúngicos de la cepa CPA-8.

De este estudio se desprendió, que el medio optimizado DSF40-MOL5 en las condiciones de cultivo en el fermentador a escala de laboratorio proveyó la posibilidad de producir cantidades adecuadas de la cepa CPA-8 a un bajo coste y proporcionó una base fiable para el escalado de producción a nivel industrial. Sin embargo, a la hora de realizar el escalado de producción a nivel industrial sería necesario un estudio económico en profundidad, que tuviera en cuenta no sólo el coste de las materias primas que constituyen el medio sino también la capacidad de producción de biomasa y el

rendimiento del proceso fermentativo. A modo de aproximación, puesto que el precio puede oscilar en función del mercado y de las cantidades adquiridas, el valor en euros de los medios de mayor producción obtenidos en este estudio comparados con los medios de laboratorio usados para el crecimiento de *B. subtilis* se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Precio (euros L⁻¹) y producción en (UFC mL⁻¹) del agente de biocontrol *B. subtilis* CPA-8 en medios de cultivo de bajo coste comparados con medios de laboratorio

Medio	Coste euros L ⁻¹	Concentración UFC mL ⁻¹
Harina de soja desengrasada 44 % (40 g L ⁻¹); sacarosa (20 g L ⁻¹) y minerales	0.4	3.3×10 ⁹ UFC mL ⁻¹
Harina de soja desengrasada 44 % (40 g L ⁻¹), melaza (5 g L ⁻¹) y minerales	0.3	3.5×10 ⁹ UFC mL ⁻¹
Medio 863: peptona (10 g L ⁻¹), extracto de levadura (10 g L ⁻¹) y glucosa (20 g L ⁻¹)	4.1	3-4×10 ⁸ UFC mL ⁻¹
Medio MOLP: peptona (30 g L ⁻¹), sacarosa (20 g L ⁻¹), extracto de levadura (7 g L ⁻¹) y minerales	10.9	2×10 ⁹ UFC mL ⁻¹

Como puede verse el medio de producción considerado óptimo tiene un coste muy bajo y totalmente razonable para ser considerado adecuado en una producción a nivel comercial.

3.3. Efectividad de *B. subtilis* CPA-8 crecido en medio de cultivo de bajo coste para el control de *Monilinia* spp. en fruta de hueso

Los ensayos de efectividad de suspensiones de células y sobrenadantes libres de células de *B. subtilis* CPA-8 producidos en el medio optimizado de bajo coste DSF40MOL5 indicaron que la capacidad de biocontrol de la cepa CPA-8 para reducir la podredumbre marrón del melocotón causada por *M. fructicola* fue igual que la de suspensiones obtenidas a partir de la cepa CPA-8 crecida en los medios de laboratorio 863 y MOLP. Se alcanzaron reducciones de enfermedad de hasta el 95 % y 87.5 % después del almacenamiento a temperatura ambiente y conservación en frío, respectivamente (Figura 11).

El estudio de la dinámica de poblaciones demostró que la cepa CPA-8 crecida en el medio optimizado de bajo coste puede sobrevivir y colonizar los frutos del mismo modo que las células crecidas en medio MOLP. Ambos hechos sumados a los resultados de producción demuestran la posibilidad de obtener una producción de bajo coste de agente de biocontrol postcosecha *B. subtilis* CPA-8 y proporcionan una base fiable para el diseño de un proceso de producción a gran escala.

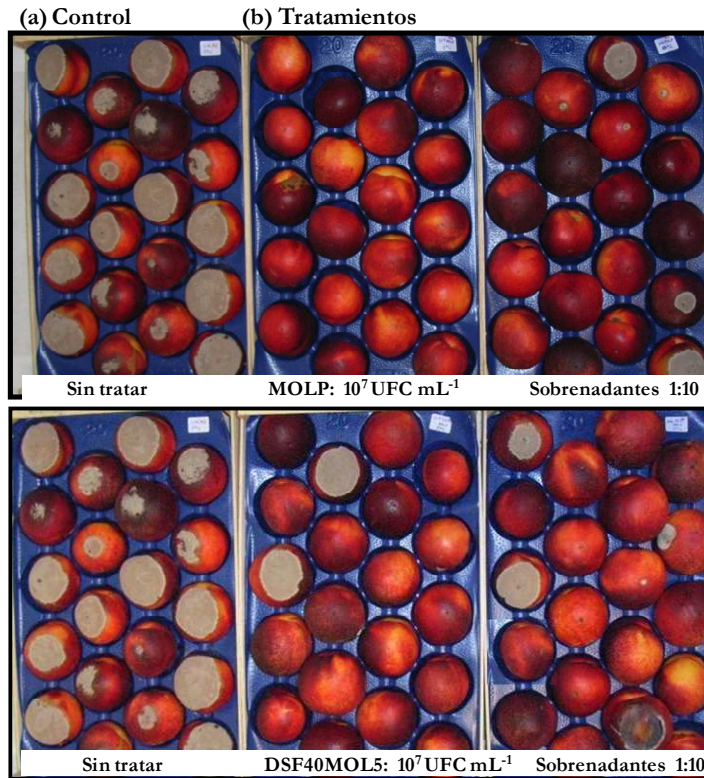
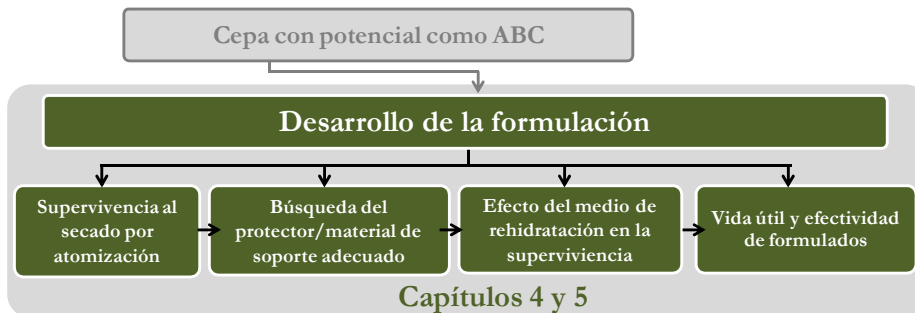


Figura 11. Efectividad de tratamientos de *B. subtilis* CPA-8 provenientes de cultivos en medio optimizado de bajo coste DSF40MOL5 y MOLP contra *M. fructicola* (10^3 conidias mL^{-1}) en nectarinas 'Big Top' después de 23 días a 0°C y 5 días 20°C . En (a) controles sin tratar y en (b) tratamientos.

4. Formulación de *B. subtilis* CPA-8 mediante secado por atomización



La atomización es un método de secado a través del cual se pueden obtener grandes cantidades de productos microbianos deshidratados rápidamente y a bajo coste. Existe

una gran cantidad de estudios sobre la aplicación de este método para el secado de bacterias ácido lácticas (Teixeira *et al.* 1995). Sin embargo, las altas temperaturas requeridas en el proceso de secado constituyen un importante limitante en la obtención de formulados microbianos mediante atomización. Los formulados obtenidos pueden presentar baja viabilidad después del secado debido al estrés térmico y falta de estabilidad durante el almacenado (Abadias *et al.* 2005; Ananta *et al.* 2005).

Para la formulación de agentes de biocontrol de enfermedades la atomización ha sido estudiada como método de secado sin resultados exitosos. Varios estudios han demostrado que los agentes de control biológico *P. agglomerans* (Costa *et al.* 2002b), *E. nigrum* (Larena *et al.* 2003a), *P. oxalicum* (Larena *et al.* 2003b), *P. frequentans* (Guijarro *et al.* 2006) y *C. sake* (Abadias *et al.* 2005) son sensibles al calor y la atomización ejerce un impacto extremadamente negativo sobre su viabilidad, llegando a la conclusión que este tipo de secado no es adecuado para su formulación.

Aun así, la atomización no deja de ser un método interesante para la formulación de microorganismos y en la actualidad ha sido citado como un buen método de secado para obtener productos a base de bacterias probióticas y de uso agrícola para control de plagas como la especie *B. thuringiensis* (Chávez y Ledebor 2007; Prabakaran y Hoti 2008; Golowczyk *et al.* 2010). En estos casos el éxito de la atomización se basó principalmente en la tolerancia o resistencia natural de las bacterias al calor. Particularmente en bacterias del género *Bacillus* la capacidad de formar endosporas resistentes a condiciones ambientales extremas, como altas temperaturas, ha sido descrita como una ventaja para el desarrollo de biopesticidas agrícolas (Ongena y Jacques 2008).

Considerando que en el estudio del capítulo 1 *B. subtilis* CPA-8 demostró tener la capacidad de resistir al calor a través de la producción de endosporas; las cuales además presentaron una buena actividad antifúngica contra patógenos de postcosecha de la fruta, se seleccionó el secado por atomización como un posible método de formulación interesante a estudiarse. La capacidad de CPA-8 para formar endosporas podría ser una forma atractiva para obtener un producto biológico mediante secado por atomización, ya que mejora la resistencia a las altas temperaturas involucradas en este proceso. La atención se centró en evaluar la atomización como método apropiado para la obtención de formulaciones de CPA-8; así como la estabilidad (viabilidad) y efectividad posterior de éstas durante el almacenado (Capítulos 4 y 5).

Las pruebas para la formulación de la cepa CPA-8 se realizaron en un atomizador de planta piloto (SD-05, Lab Plant, UK) que se muestra en la Figura 12. La temperatura de entrada fue fijada a 150 °C, resultando una temperatura de salida entorno a 80 °C y un flujo de entrada de muestra de 500 mL h⁻¹. Las gotas producidas por la aguja de 0.5 mm de diámetro eran evaporadas en una cámara de secado de 0.215 m de diámetro y 0.5 m de largo. El polvo resultante pasa a través del ciclón y se recolecta en botellas de 250 mL.



Figura 12. Vista general del atomizador (SD-05, Lab Plant, UK) utilizado para las pruebas de formulación de *B. subtilis* CPA-8 a escala de laboratorio.

4.1. Estudio comparativo del efecto de la atomización de *B. subtilis* CPA-8 y *P. agglomerans* CPA-2

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la atomización sobre la supervivencia de *B. subtilis* CPA-8 basado en su capacidad para producir endosporas resistentes al calor y mediante comparación con el agente de biocontrol *P. agglomerans* CPA-2, como modelo de microorganismo sensible al calor que no forma endosporas.

El primer paso fue evaluar la resistencia de la cepa CPA-8 al calor mediante tratamientos a 80 °C durante 12 min de cultivos de 24 y 72 h de crecimiento en el medio optimizado DSF40MOL5. Los resultados obtenidos demostraron que la cepa CPA-8 resistía el tratamiento térmico mediante la producción de endosporas y que esta capacidad dependía de la edad del cultivo, siendo el cultivo de 72 h más resistente que el de 24 h. El número de células viables en el cultivo de 72 h, sólo disminuyó 0.7 log (de 3.6×10^{10} a 8×10^9 UFC g⁻¹) comparado con la reducción en el cultivo de 24 h de 3.2 log (de 4.9×10^{10}

a 2.3×10^7 UFC g^{-1}). Las endosporas se producen en la naturaleza por especies de *Bacillus* como mecanismos para sobrevivir a calor extremo incluso de 100 °C (Nicholson *et al.* 2000). En este sentido, los resultados obtenidos indican que la capacidad de CPA-8 para sobrevivir al tratamiento con calor mediante producción de endosporas podría proporcionarle la resistencia necesaria para soportar las temperaturas empleadas en el proceso de atomización.

Una vez determinada la resistencia de la cepa CPA-8 al calor, se evaluó su supervivencia después del secado por atomización comparándola con *P. agglomerans* CPA-2. Cultivos de 24 y 72 h de ambos microorganismos en medios optimizados se atomizaron utilizando $MgSO_4$ 10 % como protector/material de soporte en base a los estudios realizados por Costa *et al.* (2002b) con la cepa CPA-2. Los resultados demostraron que en cultivos de 72 h la cepa CPA-8 tuvo la mejor supervivencia con un porcentaje del 32.3 % de viabilidad, con una concentración final de producto de 3.3×10^9 UFC g^{-1} . Mientras que la viabilidad de *P. agglomerans* CPA-2 fue inferior al 2 %. Esto confirmó la sensibilidad de la cepa CPA-2 al calor que había sido demostrado por Costa *et al.* (2002b) y su supervivencia a la atomización no mejoró utilizando cultivos de 72 h.

La supervivencia de la cepa CPA-8 a la atomización estuvo relacionada con la edad del cultivo. Los atomizados de 24 h presentaron una viabilidad baja en comparación con la supervivencia obtenida en los atomizados de 72 h. Varios estudios en bacterias probióticas han demostrado que su supervivencia a la atomización depende ampliamente de la fase de crecimiento y que éste es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta para obtener productos con altas concentraciones de células viables (Corcoran *et al.* 2004; Morgan *et al.* 2006; Peighambardoust *et al.* 2011). En este sentido, aún cuando ambos cultivos de la cepa CPA-8 estaban en fase estacionaria, la mayor supervivencia obtenida en los atomizados de 72 h comparados con los de 24 h podría estar estrechamente relacionada con la mayor concentración de endosporas (Figura 13). En el capítulo 1 ya se demostró que las concentraciones importantes de endosporas tenían lugar a partir de las 72 h. Este resultado junto con los de termotolerancia es un punto importante a tener en cuenta al seleccionar la fase óptima de crecimiento de los cultivos de CPA-8 previa al proceso de atomización.

Por último, debido a que uno de los requisitos más importantes de las formulaciones microbianas es que conserven la eficacia de control biológico se estudió el efecto del atomizado de la cepa CPA-8 en $MgSO_4$ 10 % en la germinación de conidias de *M. fructicola*. Los resultados demostraron que el atomizado de la cepa CPA-8 a 2×10^8 UFC mL^{-1} redujo la germinación de las conidias de *M. fructicola* hasta un 4.9 % de manera similar a un cultivo fresco de la bacteria (0 %) y comparados con el $MgSO_4$ 10 % atomizado sin bacteria y el control sin tratar cuyos porcentajes de germinación fueron 96.8 y 98.4 %, respectivamente. Estos hechos corroboran que el proceso de secado mediante atomización no tuvo un efecto negativo sobre la eficacia de biocontrol de CPA-8.

Los resultados del estudio demostraron que la producción de endosporas mejora la resistencia de *B. subtilis* CPA-8 a las temperaturas de secado requeridas en el proceso de atomización; y que esta cualidad podría ser utilizada para la formulación de esta bacteria mediante atomización.

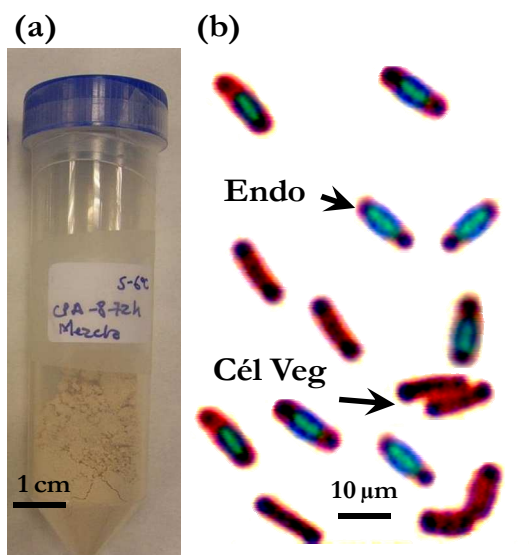


Figura 13. *B. subtilis* CPA-8 atomizado en MgSO_4 10 %. En (a) polvo atomizado y en (b) microfotografía de endosporas y células vegetativas rehidratadas con agua estéril a partir de atomizados de CPA-8 observados en el microscopio óptico de luz. Las flechas señalan a las endosporas en verde-azul y a las células vegetativas en rojo teñidas con verde de malaquita-fucsina básica.

4.2. Búsqueda de la sustancia protectora/material de soporte más adecuada

Otro de los puntos importantes en la atomización es el uso de sustancias protectoras/materiales de soporte ("carriers") adecuadas que ayuden a mejorar la resistencia del microorganismo al calor y la recuperación del producto atomizado. Para la selección del mejor protector/material de soporte se evaluó cuatro combinaciones de leche desnatada en polvo y MgSO_4 : leche 10 %, leche 10 %- MgSO_4 10 %, MgSO_4 10 % y MgSO_4 20 % para atomizar cultivos de la cepa CPA-8 de 24 y 72 h de crecimiento. Estas combinaciones fueron seleccionadas en base a los estudios realizados por Costa *et al.* (2002b) y Abadias *et al.* (2005) para la atomización de *P. agglomerans* y *C. sake*, respectivamente.

Los resultados demostraron que todas las sustancias usadas como protectores/transportadores para la atomización de la cepa CPA-8 proporcionaban una recuperación del producto entre 28-38 % y un contenido de humedad residual entre 7-13 %.

Estos porcentajes son considerados aceptables para productos biológicos obtenidos en atomizadores de laboratorio (Ananta *et al.* 2004). La supervivencia de la cepa CPA-8 varió considerablemente entre los atomizados que provenían de cultivos crecidos 24 h y los de 72 h. Las formulaciones de 72 h mostraron una mayor supervivencia (28–32 %) y concentraciones finales alrededor de $1.6\text{--}3.3 \times 10^9$ UFC g^{-1} , mientras que la viabilidad de los atomizados de 24 h fueron inferiores al 1 %.

En términos de la sustancia más adecuada para la atomización de la cepa CPA-8, aunque los cuatro diferentes medios protectores estudiados proveyeron una buena supervivencia de la bacteria, el MgSO_4 al 10 % resultó ser el mejor protector/material de soporte con un 32.3 % de viabilidad. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Costa *et al.* (2002b) para la atomización de *P. agglomerans*. A pesar de que el uso de MgSO_4 puede ser cuestionado por ser una sal que puede recrystalizar y causar daños celulares durante el proceso de secado, los resultados obtenidos demostraron que no afectó a la viabilidad de la cepa CPA-8. El uso de sales como el K_2SO_4 ha sido citado en otros estudios para atomización de bacterias benéficas (Hutter *et al.* 1995). Recientes estudios realizados por Vreeland *et al.* (2000) han demostrado que bacterias halotolerantes que sobrevivieron millones de años pudieron ser aisladas de sales que no recrystalizaron. En este sentido, los resultados obtenidos constituyen un importante hallazgo y sugieren que la supervivencia de la cepa CPA-8 en MgSO_4 podría estar relacionada con que esta sustancia no recrystaliza durante el proceso de atomización.

En base a los resultados obtenidos con las formulaciones de *B. subtilis* CPA-8 de 72 h en los cuatro diferentes protectores/materiales de soporte, éstas fueron seleccionadas para su evaluación posterior.

Considerando que uno de los requisitos más importantes de las formulaciones microbianas para uso comercial, además de que sean viables, es que conserven su eficacia de biocontrol, el siguiente objetivo luego de la atomización fue evaluar la efectividad de los formulados seleccionados de la cepa CPA-8 mediante ensayos de actividad antifúngica *in vitro*. Estos ensayos se llevaron a cabo con los atomizados sin conservación para tener la seguridad que éstos no habían perdido eficacia por el proceso de secado.

En los ensayos de actividad antifúngica *in vitro* se evaluó el efecto de diferentes suspensiones provenientes de los formulados de la cepa CPA-8 a 2×10^8 UFC mL^{-1} en la germinación de conidias de *M. fructicola* a 2×10^5 conidias mL^{-1} y se comparó con tratamientos de células frescas y protectores/materiales de soporte atomizados sin bacteria. Los resultados obtenidos demostraron que solo un 5 % de las conidias de *M. fructicola* germinaron en presencia de los formulados de CPA-8 en MgSO_4 10 y 20 %, siendo este resultado similar al efecto de las células sin formular. En cambio el 100 % de conidias germinaron en el control sin tratar y los protectores/materiales de soporte. En el caso de los formulados en leche 10 % y la mezcla leche 10 %– MgSO_4 10 % aún cuando los porcentajes de germinación de conidias fueron significativamente diferentes al control sin tratar, las conidias del patógeno germinaron. Sin embargo, observaciones adicionales del desarrollo en las placas de cultivo demostraron que el

patógeno perdió la capacidad de formar colonias viables a diferencia de las placas del control sin tratar o de los protectores/materiales de soporte sin bacteria demostrando un efecto de biocontrol. Una explicación podría deberse que la leche usada en ambos atomizados estimuló a la germinación de las conidias de *M. fructicola*, que después no fueron viables.

4.3. Efecto del medio de rehidratación en la recuperación de células de CPA-8 en productos atomizados

La rehidratación es considerado un paso fundamental en la recuperación de bacterias a partir de productos atomizados, debido a que el tipo de medio de rehidratación y las condiciones de rehidratación pueden afectar la tasa de supervivencia de las células secas. Las altas temperaturas usadas en el proceso de atomización pueden provocar daños que afectan a la pared celular (Ananta *et al.* 2005) y que aumentan la inestabilidad de los productos durante el almacenado, siendo el medio de rehidratación el vehículo para recuperar las células y permitir su crecimiento.

Para la rehidratación de los formulados de la cepa CPA-8 se evaluaron cinco diferentes medios: leche desnatada en polvo al 1 y 10 %, sacarosa 10 %, tampón fosfato y agua. Los resultados demostraron que el agua o el tampón fosfato proporcionaron una buena recuperación de las células de la cepa CPA-8 en las formulaciones (alrededor de 2×10^9 CFU g⁻¹, similares a las obtenidas en leche desnatada en polvo o sacarosa al 10 % (en la mayoría de los diferentes formulados sin diferencias significativas). Estos resultado fueron diferentes a los obtenidos en otros microorganismos como *P. agglomerans* (Costa *et al.* 2002b) y *C. sake* (Abadias *et al.* 2005) donde medios enriquecidos como leche descremada sola o más lactosa proveyeron una mejor recuperación que el agua o el tampón fosfato. En términos prácticos y teniendo en cuenta que los tratamientos con agentes de biocontrol se hacen en el campo o en centrales hortofrutícolas, el hecho de poder utilizar un medio simple como el agua para la rehidratación es un resultado de gran interés porque facilita el manejo de producto atomizado y su aplicación.

4.4. Vida útil y efectividad de formulados de CPA-8

Para que un producto biológico pueda ser comercializado y competitivo en el mercado tiene que presentar una vida útil de 6 meses como mínimo y preferiblemente de un año (Pusey 1994; Kinay y Yildiz 2008).

Las condiciones de almacenamiento y envasado afectan a la viabilidad de los productos formulados después de la atomización. Diferentes estudios han demostrado que la temperatura es un parámetro importante para la supervivencia bacteriana durante el almacenamiento (Peighamardoust *et al.* 2011). En cuanto al envasado, Wang *et al.* (2004) han demostrado que pueden usarse envases de plástico para mantener atomizados bacterianos (Wang *et al.* 2004). En este trabajo se evaluó la viabilidad de los formulados de la cepa CPA-8

crecida en medio optimizado durante 72 h y atomizada con leche desnatada en polvo 10 %, leche desnatada en polvo-MgSO₄ 10 %, MgSO₄ 10 % y MgSO₄ 20 %, conservándolos en tubos de polipropileno a frío (4 °C) y a temperatura ambiente (20 °C) durante 6 meses. En este período se determinó mensualmente las concentraciones de células viables.

Los resultados obtenidos demostraron que en todos los formulados de CPA-8 almacenados a frío y a temperatura ambiente las concentraciones de células viables se mantuvieron o disminuyeron ligeramente entorno a 0.2 – 0.3-log durante los 6 meses de almacenamiento. En general, en la bibliografía la estabilidad de las muestras atomizadas disminuye durante el almacenamiento a temperatura ambiente en comparación con las muestras almacenadas en frío que mantienen mayores tasas de supervivencia microbiana (Silva *et al.* 2002; Boza *et al.* 2004). En este estudio, en cambio los resultados indicaron que no existen diferencias entre las muestras conservadas a temperatura ambiente de las mantenidas en frío, lo cual es un hallazgo muy interesante desde el punto de vista práctico.

Para ser una buena alternativa a los fungicidas de síntesis, los agentes de biocontrol deberían ser capaces de conservar su supervivencia y efectividad a temperatura ambiente (Rhodes 1993) para poder ser distribuidos y manipulados por los mismos canales que los productos químicos. Sin embargo, cumplir esta premisa no es tan sencillo y en muchos casos no es posible. De ahí la importancia del resultado obtenido en el presente estudio.

Finalmente, se evaluó la efectividad de los diferentes formulados de *B. subtilis* CPA-8 conservados a frío y a temperatura ambiente durante 4 y 6 meses en el control de la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. en nectarinas y melocotones comparando con el cultivo fresco y los protectores/materiales de soporte atomizados sin bacteria a fin de comprobar que los protectores por sí mismos no tenían ningún efecto sobre el control de la podredumbre. Los formulados de CPA-8 fueron rehidratados en agua y aplicados a una concentración de 2×10^7 UFC mL⁻¹ en fruta previamente inoculada con *M. laxa* o *M. fructicola*.

Las formulaciones de la cepa CPA-8 después de 4 y 6 meses de almacenamiento a frío y a temperatura ambiente fueron eficaces para controlar la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. en nectarinas y melocotones con incidencias de la enfermedad de incluso el 0 % comparadas con los porcentajes altos de podredumbre observados en los controles sin tratar (100 % de incidencia) (Figura 14). El efecto de las formulaciones conservadas de CPA-8 fue igual al de los cultivos frescos de la bacteria. Los protectores/materiales de soporte atomizados sin bacteria no tuvieron ningún efecto de control por sí solos (100 % de incidencia).



Figura 14. Efectividad de formulados de *B. subtilis*: CPA-8 atomizados en leche desnatada en polvo y $MgSO_4$ contra *Monilinia* spp. en nectarinas 'Big Top' y melocotones 'Baby Gold 9' después 4 y 6 meses de conservación a 4 o 20 °C. Los formulados fueron rehidratados en agua. (a) Aspecto del polvo atomizado conservado en recipiente de polipropileno a 4 o 20 °C. (b) Efectividad contra *M. laxa* en nectarinas 'Big Top' y (c) efectividad contra *M. fructicola* en melocotones 'Baby Gold 9' después de 4 y 6 meses de almacenamiento, respectivamente. Los tratamientos corresponden a fruta inoculada con *M. laxa* o *M. fructicola* a 2×10^3 conidias mL^{-1} y tratada con agua (**Sin tratar**); con diferentes protectores/materiales de soporte atomizados sin bacteria; leche al 10% (**Leche10**); leche y $MgSO_4$ ambos al 10% (**Mezcla**); con diferentes (**Mg10**) y $MgSO_4$ al 20% (**Mg20**), cultivo fresco de CPA-8 de 72 h (**CPA-8 fresco**) y formulaciones de CPA-8 rehidratadas en los diferentes protectores/materiales de soporte a 2×10^7 UFC mL^{-1} .

Desde el punto de vista práctico, una recuperación de polvo entre el 28 y el 38 %, una humedad residual entre el 6 y el 13 %, viabilidades superiores al 30 % con concentraciones finales de producto entre 1.6 y 3.3×10^9 UFC g^{-1} obtenidos en este estudio para la cepa CPA-8 podrían ser considerados aceptables para productos biológicos comparando con productos comerciales como Serenade Max[®] cuya concentración final está entorno a 5.7×10^9 UFC g^{-1} . Aún cuanto todas las sustancias protectoras/materiales de soporte permitieron mantener una buena viabilidad y efectividad de CPA-8, las formulaciones en $MgSO_4$ proveyeron menos problemas de taponamiento, lo cual puede ser un aspecto para su selección. Otro aspecto importante es la formulación por atomización permitió la recuperación de células activas (células vegetativas y endosporas) junto con los metabolitos antifúngicos (lipopéptidos) producidos en el medio de cultivo durante la fermentación y que en otros métodos de secado se pierden durante la separación de la biomasa por centrifugación. Teniendo en cuenta que los atomizados de la cepa CPA-8 se obtuvieron sin un acondicionamiento previo del microorganismo y con un atomizador de planta piloto que son aparatos con rendimientos muy bajos, los resultados son muy prometedores y probablemente pueden ser mejorados fácilmente. Estudios realizados por Teixidó *et al.* (2006) y Cañamás *et al.* (2008) demostraron que la viabilidad de microorganismos utilizados como agentes de biocontrol durante el proceso de atomización puede mejorarse mediante la inducción de tolerancia a la desecación mediante cultivo de los mismos en medios con baja a_w o bajo condiciones subletales de estrés térmico. Otros investigadores han señalado que la optimización de formulados de *B. subtilis* puede ser inducida mediante incremento de la producción de endosporas usando tratamientos térmicos en la fase de crecimiento junto con protectores orgánicos e inorgánicos (Chung *et al.* 2007; Sorokulova *et al.* 2008).

Considerando que hasta el momento la atomización ha resultado un método poco adecuado para la preservación de numerosos agentes de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta, los resultados obtenidos aportan nueva e importante información para la obtención de formulaciones estables y efectivas de *B. subtilis* CPA-8. Además, estos resultados sientan las bases para un proceso de formulación a nivel comercial que permitan incorporar a esta bacteria en programas de control biológico de enfermedades de postcosecha de fruta.

A partir de la información que se aporta en esta tesis se abren otras líneas de trabajo que se deberían desarrollar con el fin de incorporar a *B. subtilis* CPA-8 en programas de control biológico de enfermedades de postcosecha de fruta. Por ejemplo, dado el importante rol que cumplen los lipopéptidos, en particular las fengicinas, en el potencial de biocontrol de esta cepa; y a que recientes investigaciones mencionan que este tipo de compuestos son alternativas interesantes al uso de productos químicos en agricultura por sus características de baja toxicidad, alta biodegradabilidad e inocuidad para el medio ambiente, el siguiente paso estaría enfocado a la caracterización y cuantificación mediante técnicas de HPLC de los diferentes tipos de isómeros de los lipopéptidos sintetizados por la cepa CPA-8 durante el proceso de producción e *in vivo* sobre la superficie de la fruta tratada. Esta información

ayudaría a entender mejor aspectos relacionados con la efectividad de la bacteria y a la optimización de producción de lipopéptidos durante el proceso de producción. Otro aspecto interesante sería estudiar la relación entre fengicinas y surfactinas que han sido mencionadas como moléculas con capacidad de producir “biofilms” que ayudan a incrementar la eficacia de biocontrol en bacterias de las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. En lo relacionado a la producción y formulación, con el medio optimizado de bajo coste compuesto de harina de soja desengrasada 44% y melaza se debería trabajar en mejorar las concentraciones de endosporas mediante la inducción de tolerancia a la desecación en medios con baja a_w o bajo condiciones subletales de estrés térmico y luego en aspectos relacionados con el escalado de producción en bioreactores de 80–90 L. Finalmente, en base a los resultados interesantes obtenidos en la formulación de la cepa CPA-8 mediante secado por atomización, se debería desarrollar formulaciones en atomizadores de mayor capacidad que permitan ampliar el volumen de producto, el rendimiento y mantener o mejorar la viabilidad, estabilidad y efectividad.

Referencias

- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I. (2003) Optimization of growth conditions of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in a lab-scale fermenter. *J Appl Microbiol* **95**, 301–309.
- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Solsona, C., Viñas, I. (2005) Survival of the postharvest biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 after dehydration by spray-drying. *Biocontrol Sci Technol* **15**, 835–846.
- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.H. (2008) Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Appl Biochem Biotechnol* **150**, 305–325.
- Ananta, E., Birkeland, S.E., Corcoran, B., Fitzgerald, G., Hinz, S., Klijn, A., Mättö, J., Mercernier, A. (2004) Processing effects on the nutritional advancement of probiotics and prebiotics. *Microb Ecol Health Dis* **16**, 113–124.
- Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D. (2005) Cellular injuries and storage stability of spray-dried. *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int Dairy J* **15**, 399–409.
- Arras, G. (1993) Inhibition of postharvest fungal pathogens by *Bacillus subtilis* strains isolated from citrus fruit. *Adv Horti Sci* **7**, 123–127.
- Arras, G., D'hallewin, G. (1994) *In vitro* and *in vivo* control of *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea* in citrus fruit by *Bacillus subtilis* strains. *Agricoltura Mediterranea* **124**, 56–61.
- Arrebola, E., Jacobs, R., Korsten, L. (2010) Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J Appl Microbiol* **108**, 386–395.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 495–508.
- Boza, Y., Barbin, D., Scamparini, A.R.P. (2004) Effect of spray drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. *Process Biochem* **39**, 1275–1284.
- Brannen, P.M., Kenney, D.S. (1997) Kodiak® A successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**, 169–171.
- Cañamás, T.P., Viñas, I., Usall, J., Magan, N., Solsona, C., Teixidó, N. (2008) Impact of mild heat treatments on induction of thermotolerance in the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 and viability after spray-drying. *J Appl Microbiol* **104**, 767–775.
- Casals, C., Elmer, P.A.G., Viñas, I., Teixidó, N., Sisquella, M., Usall, J. (2012) The combination of curing with either chitosan or *Bacillus subtilis* CPA-8 to control brown rot infections caused by *Monilinia fructicola*. *Postharvest Biol Technol* **64**, 126–132.

- Casals, C., Teixidó, N., Viñas, I., Silvera, E., Lamarca, N., Usall, J. (2010) Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *Eur J Plant Pathol* **128**, 51–63.
- Chávez, B.E., Ledebøer, A.M. (2007) Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Dry Technol* **25**, 1193–1201.
- Chen, H., Wang, L., Su, C.X., Gong, G.H., Wang, P., Yu, A.L. (2008) Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* **47**, 180–186.
- Chung, S., Lim, H.M., Kim, S.D. (2007) Formulation of stable *Bacillus subtilis* AH18 against temperature fluctuation with highly heat-resistant endospores and micropore inorganic carriers. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 217–224.
- Cooper, D.G., Mac Donald, C.R., Duff, S.J.B., Kosaric, N. (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl Environ Microbiol* **42**, 408–412.
- Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. (2004) Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J Appl Microbiol* **96**, 1024–1039.
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés, E., Viñas, I. (2001) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 367–371.
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés, E., Viñas, I. (2002a) The effect of nitrogen and carbon sources on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Lett Appl Microbiol* **35**, 117–120.
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Fons, E., Gimeno, V., Delgado, J., Viñas, I. (2002b) Survival of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 in a spray-drying process. *J Food Prot* **65**, 185–191.
- Coutte, F., Lecouturier, D., Yahia, S.A., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., Dhulster, P. (2010) Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 499–507.
- Cutting, S.M. (2011) *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* **28**, 214–220.
- Davis, D.A., Lynch, H.C., Varley, J. (2001) The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. *Enzyme Microb Tech* **28**, 346–354.
- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T. (2005) Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J Colloid Sci* **283**, 358–365.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol Technol* **52**, 137–145.

- Errington, J. (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **1**, 117–126.
- Fravel, D.R. (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 337–359.
- Gaudreau, H., Champagne, C.P., Goulet, J., Conway, J. (1997) Lactic fermentation of media containing high concentrations of yeast extracts. *J Food Sci* **62**, 1072–1075.
- Golowczyc, M., Silva, J., Abraham, A., De Antoni, G., Teixeira, P. (2010) Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray-drying. *Lett Appl Microbiol* **50**, 7–12.
- Gueldner, R.C., Reilly, C.C., Pusey, P.L., Costello, C.E., Arrendale, R.F., Cox, R.H., Himmelsbach, D., Crumley, F.G., Cutler, H.G. (1988) Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *J Agric Food Chem* **36**, 366–370.
- Guez, J.S., Chenikher, S., Cassar, J.P., Jacques, P. (2007) Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides. *J Biotechnol* **131**, 67–75.
- Guijarro, B., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2006) Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia* spp. *Biocontrol Sci Technol* **16**, 257–269.
- Hokeberg, M., Wright, S.A.I., Svensson, M., Lundgren, L.N., Gerhardson, B. (1998) Mutants of *Pseudomonas chlororaphis* defective in the production of an antifungal metabolite express reduced biocontrol activity (Paper presented at the 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh).
- Hutter, W., Werner, L., Peter, I., Hampel, W. (1995) Spray drying of the dehalogenating bacterium *Rhodococcus* sp. *Bioprocess Eng* **13**, 19–21.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P. (1999) Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett–Burman design. *Appl Biochem Biotech* **77**, 223–233.
- Janisiewicz, W., Korsten, L. (2002) Biological control of postharvest diseases of fruit. *Annu Rev Phytopathol* **40**, 411–441.
- Kinay, P., Yildiz, M. (2008) The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biol Control* **45**, 433–440
- Kotzamanidis, C., Roukas, T., Skaracis, G. (2002) Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB8130. *World J Microbiol Biotechnol* **18**, 441–448.

- Larena, I., De Cal, A., Liñán M., Melgarejo, P. (2003a) Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease. *J Appl Microbiol* **94**, 508–514.
- Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2003b) Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. *J Phytopathology* **151**, 600–606.
- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., Chuenchitt, S. (2008) Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biol Technol* **48**, 113–121.
- 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 fruticola*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**, 43–52.
- Magnet-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M. (1992) Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* **74**, 1047–1051.
- Maheshwari, D.K., Dubey, R.C. (2008) Potential microorganisms for sustainable agriculture: a techno-commercial perspective. I.K. International Pvt Ltd, Nueva Delhi, 498 pp.
- Manso, T., Nunes, C., Raposo, S., Lima-Costa, M.E. (2010) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* PBC-1 in a stirred tank reactor by batch and fed-batch cultures. *World J Microbiol Biotechnol* **26**, 725–735.
- Matsumoto, T., Sugiura, Y., Kondo, A., Fukuda H. (2000) Efficient production of protopectinases by *Bacillus subtilis* using medium based on soybean flour. *Biochem Eng J* **6**, 81–86.
- McKeen, C.D., Reilly, C.C., Pusey, P.L. (1986) Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fruticola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* **76**, 136–139.
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., Vesey, G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods* **66**, 183–193.
- Morikawa, M. (2006) Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *J Biosci Bioeng* **101**, 1–8.
- Nakano, M.M., Zuber P. (2002) Anareobiosis. En: Sonenshein, A.L., Hoch J.A., Losick, R.(Eds.) *Bacillus subtilis* and its clased relatives from genes to cell. American Society for Microbiology Press. Washington, pp. 393–404.
- Nicholson, W.J., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol Bio. Rev* **64**, 548–572.

- Ohara, H., Hiyama, K., Yoshida, T. (1992) Non-competitive product inhibition in lactic acid fermentation from glucose. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**, 773–776.
- Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommès, J., Thonart, P. (2005a) *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 692–698.
- Ongena, M., Henry, G., Thonart, P. (2009) The Roles of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. En: Gisi, U., Chet, L., Gullino, M.L (Eds.). *Recent Developments in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21st Century* Springer Verlag, Berlin, pp. 59–69.
- Ongena, M., Jacques, P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* **16**, 115–125.
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., Thonart, P. (2005b) Involvement of fengycin-type lipopeptides in multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**, 29–38.
- Peighambaroust, S.H., Golshan Tafti, A., Hesari, J. (2011) Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review *Trends Food Sci Technol* **22**, 215–224.
- Prabakaran, G., Hoti, S.I. (2008) Optimization of spray-drying conditions for the large-scale preparation of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis after downstream processing. *Biotechnol Bioeng* **100**, 103–107.
- Pryor, S.W., Gibson, D.M., Hay, A.G., Gossett, J.M., Walker, L.P. (2007) Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **143**, 63–79.
- Pusey, P.L., Hotchkiss, M.W., Dulmage, H.T., Baumgardner, R.A., Zehr, E.I., Reilly, C.C., Wilson, C. (1988) Pilot tests for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for post-harvest control of peach brown rot. *Plant Dis* **72**, 622–626.
- Pusey, P.L., Wilson, C. (1984) Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis* **68**, 753–756.
- Pusey, P.L., Wilson, C., Hotchkiss, M.W., Franklin, J.D. (1986) Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, Dicloran, and cold-storage conditions. *Plant Dis* **70**, 587–590.
- Pusey, P.L. (1994) Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies. En: Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (Eds.), *Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 77–88.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., de Souza, J.T. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Anton Leeuw Int J G* **81**, 537–547.

- Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Jacques, P., Destain, J., Thonart, P. (1993) Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr* **639**, 81–85.
- Rhodes, D.J. (1993) Formulation of biological control agents. En: Jones, D.G. (Ed.) Exploitation of microorganisms. Chapman & Hall, London, pp 411–439.
- Riesenberg, D., Guthke, R. (1999) High-cell-density cultivation of microorganism. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 422–430.
- Romero, D., de Vicente, A., Olmos, J.L., Dávila, J.C., Pérez-García, A. (2007a) Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *J Appl Microbiol* **103**, 969–976.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.V., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P. (2007b) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* towards *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 430–440.
- Romero, D., Pérez-García, A., Veening, J.W., de Vicente, A., Kuiper, O.P. (2006) Transformation of undomesticated strains of *Bacillus subtilis* by protoplast electroporation. *J Microbiol Methods* **66**, 556–559.
- Shoda, M. (2000) Bacterial control of plant diseases. *J Biosci Bioeng* **89**, 515–521.
- Silo-Suh, L.A., Lethbridge, B.J., Raffel, S.I., He, H.Y., Clardy, J., Handelsman, J. (1994) Biological-activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2023–2030.
- Silva, J., Carvalho, A.S., Teixeira, P., Gibbs, P.A. (2002) Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol* **34**, 77–81.
- Sorokulova, I.B., Krumnow, A.A., Pathirana, S., Mandell, A.J., Vodyanoy, V. (2008) Novel methods for storage stability and release of *Bacillus* Spores. *Biotechnol Prog* **24**, 1147–1153.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. (1995) Media for industrial fermentations. En: Whitaker, A., Hall, S.J. (Eds.) Principles of fermentation technology. Pergamon Press. Oxford, pp 93–121.
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., Jacques P., Thonart, P., Vaterl, J. (1999) Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chem Biol* **6**, 31–41.
- Strobel, R.J., Sullivan, G.R., (1999) Experimental design for improvement of fermentations. En: Demains, A.L., Davies, J.E. (Eds.) Manual of industrial microbiology and biotechnology. ASM Press. Washington, pp 80–93.

- Tabbene, O., Slimene, I.B., Djebali, K., Mangoni, M.L., Urdaci M.C., Limam F. (2009) Optimization of medium composition for the production of antimicrobial activity by *Bacillus subtilis* B38. *Biotechnol Prog* **25**, 1266–1274.
- Teixeira, P.C., Castro, M.H., Malcata, F.X., Kirby, R.M. (1995) Survival of *Lactobacillus-delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray–drying. *J Dairy Sci* **78**, 1025–1031.
- Teixidó, N., Cañamás, T.P., Abadías, M., Usall, J., Solsona, C., Casals, C., Viñas, I. (2006) Improving low water activity and desiccation tolerance of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA–2 by osmotic treatments. *J Appl Microbiol* **101**, 927–937.
- Teixidó, N., Torres, R., Viñas, I., Abadías, M., Usall, J. (2011) Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. En: Lacroix, C. (Ed.) Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 201. Cambridge, pp 364–402.
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P. (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol* **96**, 1151–1160.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch U., Jung, G. (1986) Fengycin–A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F–29–3. *J Antibiot* **39**, 888–901.
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D., Powers, D.W. (2000) Isolation of a 250 million–year–old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407**, 897–900.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higton, G. (2001) Industrial microbiology: an introduction Oxford, pp 293.
- Wang, Y.C., Yu, R.C., Chou, C.C. (2004) Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *Int J Food Microbiol* **93**, 209–217.
- Wilson, C., Pusey, P.L. (1985) Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Dis* **69**, 375–378.
- Wilson, C., Wisniewski, M. (1989) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu Rev Phytopathol* **27**, 425–441.
- Wisniewski, M., Wilson, C. (1992) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hortscience* **27**, 94–98.
- Younis, M.A.M., Hezayen F.F., Nour–Eldein, M.A., Shabeb M.S.A. (2010) Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. *American–Eurasian J Agric Environ Sci* **7**, 31–37.
- Zhang, J., Dou, H. (2002) Evaluation of *Bacillus subtilis* as potential biocontrol agent for postharvest green mold control on ‘Valencia’ Orange. *Proc Fla State Hort Soc* **115**, 60–64.

Conclusiones

Conclusiones

Las conclusiones se han redactado dentro de cada tema estudiado en esta tesis, diferenciando entre conclusiones parciales y conclusiones generales.

Estudio de *B. subtilis* cepa CPA-8 como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta

Basados en los resultados que demostraron que:

1. *B. subtilis* CPA-8 crecido en un medio convencional de laboratorio (863) produce células, endosporas resistentes al calor y compuestos que tienen una alta actividad antagónica *in vitro* contra los principales patógenos de postcosecha de fruta *B. cinerea*, *M. fructicola*, *M. laxa*, *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum*.
2. Los tratamientos de células, endosporas y sobrenadantes libres de células de *B. subtilis* CPA-8 muestran diferentes niveles de efectividad para el control de podredumbres en naranja, manzana y fruta de hueso, presentando una eficacia en la reducción de la podredumbre marrón causada por *M. laxa* y *M. fructicola* de hasta el 100 % en fruta de hueso.
3. Los tratamientos a base de cultivos, suspensiones celulares y sobrenadantes libres de células de CPA-8 aplicados en dosis usadas a nivel comercial para productos biológicos y comparados con el producto comercial Serenade Max® son eficaces contra la podredumbre marrón en fruta de hueso con reducciones de hasta el 100 %.

Se concluyó que *B. subtilis* CPA-8 tiene potencial para ser usado en el control de enfermedades de postcosecha de fruta, concretamente contra la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. en fruta de hueso y es un buen candidato para ser desarrollado como agente de biocontrol.

Estudio del mecanismo de acción de *B. subtilis* CPA-8

Basados en los resultados que demostraron que:

1. Los sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos líquidos de *B. subtilis* CPA-8 tienen una alta actividad antifúngica *in vitro* contra *M. laxa* y *M. fructicola* similar o igual a la observada con suspensiones celulares.
2. Los extractos butanólicos de lipopéptidos obtenidos a partir de los sobrenadantes de la cepa CPA-8 presentan las principales familias de lipopéptidos antifúngicos conocidos

en *Bacillus* (fengicinas, iturinas y surfactinas). De éstas, las fracciones correspondientes a las fengicinas son las responsables de la actividad inhibitoria frente a *Monilinia* spp.

3. Los mutantes de la cepa CPA-8 defectivos para la producción de fengicina obtenidos por el método de electroporación de protoplastos y analizados por PCR y bioautografía en TLC perdieron la capacidad antagónica contra *Monilinia* spp.
4. Los ensayos de efectividad en fruta utilizando tratamientos a base de células y sobrenadantes libres de células confirman que los mutantes de CPA-8 defectivos para la producción de fengicinas pierden su capacidad para controlar la podredumbre marrón presentando porcentajes de incidencia de la enfermedad similares a los observados en el testigo sin tratar y diferentes a la cepa parental y al producto comercial Serenade Max® que controlan la enfermedad.

Se concluyó que la producción de fengicinas juega un papel muy importante en la efectividad de *B. subtilis* CPA-8 para controlar la podredumbre parda del melocotón; y que éste resulta ser el principal mecanismo de acción implicado en su capacidad de biocontrol.

Estudio de la producción de *B. subtilis* CPA-8 en un medio de bajo coste

Basados en los resultados que demostraron que:

1. Mediante un estudio de diferentes productos comerciales y subproductos económicos provenientes de la industria agroalimentaria como fuentes de nitrógeno y carbono se obtuvo un medio de bajo coste compuesto por harina de soja desengrasada 44 % a 40 g L⁻¹ en combinación con melaza 5 g L⁻¹ y suplementado con minerales que proporcionó una alta producción de *B. subtilis* CPA-8 entorno a 3.5×10⁹ UFC mL⁻¹.
2. Al realizar el aumentar la producción a pequeña escala en el laboratorio en bioreactores de 5 L de capacidad, se obtuvieron altas concentraciones de la cepa CPA-8 (>3×10⁹ UFC mL⁻¹) después de 20 h de crecimiento que se mantuvieron estables hasta el final del proceso luego de 30 h.
3. Los tratamientos de células y sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos de la cepa CPA-8 crecidos en el medio optimizado de bajo coste mantuvieron una alta efectividad de biocontrol contra la podredumbre marrón del melocotón conservado a temperatura ambiente y frío.
4. La producción de lipopéptidos antifúngicos en el medio optimizado de bajo coste es igual o mayor a la obtenida en el medio MOLP de laboratorio.

Se concluyó que dos productos agroalimentarios baratos (harina de soja desengrasada 44% y melaza) pueden ser usados para diseñar un medio de bajo coste que permite obtener altas concentraciones de *B. subtilis* CPA-8 sin afectar a su capacidad de biocontrol de enfermedades de postcosecha de melocotón; lo cual proporciona además una base fiable para el escalado de producción a nivel industrial.

Estudio para la formulación de *B. subtilis* CPA-8 mediante secado por atomización

En base al estudio comparativo del efecto de la atomización de *B. subtilis* CPA-8 y *P. agglomerans* CPA-2:

1. *B. subtilis* CPA-8 fue capaz de sobrevivir al proceso de secado por atomización (32.3 %), comparado con *P. agglomerans* CPA-2 utilizada como modelo de bacteria sensible al secado por atomización y no formadora de endosporas.
2. La supervivencia de *B. subtilis* CPA-8 al proceso de atomización estuvo directamente relacionada con la capacidad del microorganismo para producir endosporas que resisten las altas temperaturas que se requiere en el proceso de secado.
3. La fase de crecimiento en la atomización de *B. subtilis* CPA-8 fue un parámetro importante resultando que productos atomizados a partir de cultivos de la cepa CPA-8 de 72 h de edad presentaron porcentajes de viabilidad altos comparados con los atomizados obtenidos a partir de cultivos de 24 h de edad, debido seguramente a la mayor producción de endosporas.
4. El producto atomizado de *B. subtilis* CPA-8 en MgSO₄ inhibió totalmente la germinación de conidias de *M. fructicola* hasta el 100 %, similar a la observada con cultivos frescos de la bacteria.

Se concluyó que la producción de endosporas mejora la resistencia de *B. subtilis* CPA-8 a las temperaturas de secado requeridas en el proceso de atomización; y que esta cualidad podría ser utilizada para la formulación de esta bacteria mediante atomización.

En base a la evaluación de sustancias transportadoras, medios de rehidratación, evaluación de vida útil y efectividad de formulados de *B. subtilis* CPA-8 obtenidos mediante atomización:

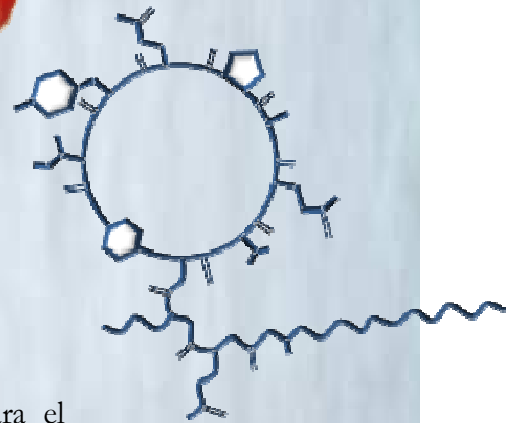
1. Las cuatro diferentes combinaciones de leche desnatada en polvo 10 %, leche desnatada en polvo 10 %-MgSO₄ 10 %, MgSO₄ 10 % y MgSO₄ 20 % usadas como protectores/transportadores para el secado de *B. subtilis* CPA-8 por atomización

proporcionaron porcentajes de recuperación del producto de alrededor del 28 – 38 % y humedades residuales entre 7–13 % lo cual es considerado aceptable para productos biológicos obtenidos en atomizadores de laboratorio.

2. Los cuatro diferentes atomizados de *B. subtilis* CPA-8 mantuvieron la viabilidad entorno a 28 – 30 % con concentraciones finales efectivas entorno a $1.6 - 3.3 \times 10^9$ UFC g⁻¹ similares a las de productos comerciales como el Serenade Max®.
3. Los rehidratantes como leche desnatada en polvo al 10 % o sacarosa al 10 % no mejoraron la recuperación de *B. subtilis* CPA-8 comparados con el tampón fosfato o el agua. Todos estos medios fueron adecuados para resuspender los atomizados de la cepa CPA-8, proporcionando una fácil redisolución del polvo y sin afectar la viabilidad de la bacteria y demostrando que los atomizados pueden rehidratarse en agua.
4. Los atomizados de *B. subtilis* CPA-8 envasados en tubos de plástico sellados y mantenidos a temperatura ambiente y frío durante un período de 6 meses mantuvieron o redujeron ligeramente la viabilidad de la bacteria entre 0.2 y 0.3-log comparados con las concentraciones de viables iniciales de los productos antes de almacenar.
5. Los atomizados de *B. subtilis* CPA-8 conservados durante 6 meses mantuvieron una alta eficacia para controlar la podredumbre marrón causada por *M. laxa* y *M. fructicola* en nectarinas y melocotones con valores de reducción entre 90 y 100 %, similares a lo observado con cultivos frescos de la bacteria. Además las sustancias usadas como protectores/transportadores no tuvieron ningún efecto por si solos.
6. Se obtuvo un formulado sólido de *B. subtilis* CPA-8 producido en un medio optimizado económico (harina de soja desengrasada 44% y melaza) durante 72 h, que no fue necesario centrifugar, al que se añade MgSO₄ como sustancia protectora y/o material de soporte y que puede ser conservado en envase plástico a frío o temperatura ambiente durante 6 meses sin perder viabilidad ni eficacia y con una concentración de $1-3 \times 10^9$ UFC g⁻¹.

Se concluyó que la atomización puede ser un método adecuado para la conservación de *B. subtilis* CPA-8 y proporciona una base para la formulación de esta bacteria como un producto comercial.

El control biológico microbiano de enfermedades de postcosecha de fruta representa en la actualidad una alternativa eficaz al uso de fungicidas químicos. La bacteria *Bacillus subtilis* cepa CPA-8 aislada y desarrollada en el Laboratorio de Patología de Postcosecha del Centro IRTA (Lleida) ha demostrado tener una importante capacidad de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta, particularmente de fruta de hueso.



En la presente tesis se estudiaron aspectos clave para el desarrollo de esta bacteria como agente eficaz de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta: efectividad, principal modo de acción, optimización de la producción y formulación mediante secado por atomización. Los estudios realizados demuestran que es posible obtener un producto formulado a base de *B. subtilis* CPA-8 efectivo en el control de la podredumbre parda de fruta de hueso, con una producción económica y una formulación que mantiene la efectividad y posee una buena vida útil.



Nombre de archivo: pdfudl
Directorio: C:\Documents and Settings\Windows\Mis documentos
Plantilla: C:\Documents and Settings\Windows\Datos de programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título:
Asunto:
Autor: Valued Acer Customer
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 26/01/2012 11:42:00
Cambio número: 16
Guardado el: 06/02/2012 5:59:00
Guardado por: Valued Acer Customer
Tiempo de edición: 204 minutos
Impreso el: 06/02/2012 6:00:00
Última impresión completa
Número de páginas: 155
Número de palabras: 40.807 (aprox.)
Número de caracteres: 224.440 (aprox.)