

**FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS
Y DE LOS ALIMENTOS**



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO**

TALLER DE TÍTULO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Potencial de *Bacillus subtilis* como control biológico de
Penicillium digitatum en postcosecha de limones variedad Eureka

IGNACIA CATALINA CASSIS CISTERNAS

QUILLOTA, CHILE

2018

Índice

1. Definición del problema u oportunidad.....	5
2. Hipótesis.....	7
3. Objetivos	7
3.1 Objetivo general	7
3.2 Objetivos específicos.....	7
4. Estado del arte	8
4.1 Datos de mercado	8
4.2 Índices de calidad en limón y problemas patológicos relacionados.....	8
4.3 Condiciones para la infección y propagación de la enfermedad en limón	8
4.4 Sintomatología de la enfermedad	9
4.5 Legislación de uso de plaguicidas en el mundo	9
4.6 Manejos preventivos para control de moho verde.....	9
4.7 Métodos de control de moho verde.....	10
4.7.1 Tratamientos químicos	10
4.7.2 Tratamientos físicos.....	11
4.7.3 Tratamientos físicos combinados con biológicos.....	12
4.7.4 Control biológico	12
5. Metodología.....	16
5.1. Aislamiento e identificación de bacterias	16
5.2 Patógeno y condiciones de crecimiento	16
5.3 Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	17
5.4 Actividad antifúngica <i>in vivo</i>	18
5.4.1 Preparación del material vegetal.....	18
5.4.2 Ensayo de antagonismo con fruto de limón	18
5.5 Identificación de compuestos antimicrobianos	19
5.5.1 Compuestos antimicrobianos de carácter enzimático	19
6. Análisis estadístico	20
7. Bibliografía.....	21
8. Plan de trabajo.....	26
9. Resultados esperados	27
10. Organización.....	28
10.1 Cargos y funciones.....	28

11 Presupuesto..... 29
11.1 PRESUPUESTO TOTAL POR CUENTA (\$) 29
11.2 PRESUPUESTO TOTAL POR AÑO (\$) 29

Resumen

El volumen de exportación de limones se incrementó un 126% durante los últimos 5 años. Los principales destinos son Estados Unidos, Europa y Japón. En condiciones determinadas de temperatura y humedad se puede extender su vida útil hasta 6 meses. Entre los índices de calidad la ausencia de podredumbres es la más relevante. Si no se toman las medidas necesarias los cargamentos pueden verse afectados por hongos patógenos, entre ellos *Penicillium digitatum* el cual puede generar pérdidas económicas graves (60 a 80%) al darle condiciones óptimas de crecimiento.

Si bien la forma tradicional corresponde a la aplicación de fungicidas sintéticos para el control de hongos, los mercados cada vez se toman más exigentes respecto a los límites máximos de residuos, así mismo la preocupación pública por los posibles daños a la salud de las personas provocado por dichos pesticidas y el impacto ambiental del mismo. Estos antecedentes han estimulado el estudio de nuevos agentes convirtiendo a las bacterias en una alternativa interesante para un control fúngico más eficiente y que cumplan las normas de inocuidad.

Por lo tanto, se plantea en esta propuesta como hipótesis que cepas de *Bacillus subtilis* son eficaces controladores biológicos de *Penicillium digitatum* durante la postcosecha de limón variedad Eureka. El objetivo general es determinar el potencial antifúngico de cepas de *Bacillus subtilis* contra *P. digitatum* en limón variedad Eureka.

Las bacterias serán aisladas desde una zona productora de limones variedad eureka ubicada en Melipilla, posteriormente será purificada e identificada. El patógeno será extraído de limones podridos adquiridos en el mercado local. Su identidad será confirmada a través de un análisis de identificación molecular. Una vez obtenidos los resultados, se evaluará la actividad antifúngica de las bacterias sobre una población del hongo en placa Petri. También, se calculará el porcentaje de inhibición y se seleccionarán las 3 mejores. Posteriormente, se evaluará el potencial antifúngico sobre frutos de limón recolectados durante los meses de junio y julio. A partir de ello, se calculará el porcentaje de incidencia de la enfermedad y se seleccionará la mejor cepa. A esta, se le analizará aquellos compuestos involucrados en el control del hongo.

El proyecto pretende generar impacto en los mecanismos de control de *P. digitatum* en limones, asegurando un adecuado control de la enfermedad, además contribuir a minimizar la dosis y empleo de productos sintéticos sobre la fruta. La idea es poder

generar un manejo de postcosecha más sustentable, más amigable con el medio ambiente y el consumidor.

1. Definición del problema u oportunidad

Los envíos de cítricos al extranjero han aumentado durante los últimos 5 años un 71,5% además, la mejora de los precios internacionales ha llevado a los productores a observar con buenos ojos el futuro del rubro (El Mercurio, 2018). Particularmente, el limonero (*Citrus x limón* L.) es un frutal que florece más de una vez, permitiendo tener producción más de una vez al año. El volumen de exportación de limón creció un 126,3% entre el año 2013 y 2017 donde los principales mercados fueron Estados Unidos, Japón y Holanda aumentando en un 260,1%; 38,2% y 95,9% respectivamente. Asimismo, las importaciones de limón aumentaron en un 64,7% donde los principales proveedores fueron Perú, Colombia y Estados Unidos (ODEPA, 2017).

La postcosecha es el momento más crítico en la producción de cítricos ya que la mayoría de las infecciones se producen a través de heridas o cortes en la fruta a lo largo de la línea de proceso, los cuales provocan una mayor incidencia de hongos llevándolo a la putrefacción, y a su vez al rechazo en los mercados de destino o una disminución del grado de calidad del producto y con ello un menor precio (El Mercurio, 2018). Los tiempos de viaje a los mercados de destino son extensos, por ejemplo, a Holanda cerca de 25 días vía marítima y Japón cerca de 45 días (MSC, 2018). Las condiciones de transporte y almacenamiento involucran temperaturas de 10°C a 13°C (durante la cosecha y postcosecha) y humedad relativa de 85% a 90% extendiendo la vida del producto entre 1 a 6 meses (Cantwell, 2002). Si no se toman las precauciones necesarias durante todo el proceso productivo los cargamentos podrían verse afectados por diversos patógenos. Entre ellos, el moho verde es una enfermedad que se puede originar durante las etapas previas a la cosecha y postcosecha, donde el agente causal es *Penicillium digitatum* (Pers) Sacc. el cual requiere de una herida para producir infección y proliferar alcanzando pérdidas económicas graves (entre un 60% a un 80%) cuando las condiciones ambientales son favorables para su proliferación (Ambrico y Trupo, 2017).

Si bien el uso de fungicidas sintéticos son la principal forma de control contra hongos en postcosecha (Di Francesco *et al.*, 2016), su uso frecuente ha generado preocupación pública ya que los residuos tóxicos en la fruta podrían provocar graves daños a la salud

de las personas y al medio ambiente (Lee y Kim, 2015). Actualmente el mercado es más exigente respecto a los niveles máximos de residuos en la fruta, por ejemplo, para la Comunidad Europea, el límite máximo del residuo de Azoxystrobina y Imazalil corresponde a 15 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente (European Commission, 2018) mientras que para Estados Unidos se establece el LMR para Imazalil y Tiabendazol en 10 mg/kg (USDA, 2018).

La etapa de postcosecha donde se aplican fungicidas (durante el encerado de los frutos), podría representar una etapa en la cual se incorpore un agente de control biológico como una alternativa a los fungicidas sintéticos, teniendo en cuenta la interacción entre el hongo patógeno, hospedero (o fruto) y el antagonista influenciado por parámetros como temperatura, humedad, etc. *Bacillus subtilis* como controlador biológico de *Penicillium digitatum* ha sido previamente reportado de manera exitosa en limones.

El sostenido crecimiento de la producción de limones caracterizada por variedades como Fino 49, Génova y Eureka lleva a nuestro país a destacar en las últimas temporadas en los mercados internacionales acentuando las producciones estacionales (en invierno y en verano) (El Mercurio, 2018). Este crecimiento lleva a la necesidad de innovar, desarrollar estrategias, manejos y prácticas que aseguren y mantengan la calidad de nuestros productos generando desafíos en las etapas de procesamiento y transporte con el objetivo de reducir las pérdidas provocadas por el hongo.

Sin embargo, los ensayos y proyectos son escasos en cítricos, más aún en limón. Es por esto que se requieren más estudios a largo plazo y con especies relevantes para nuestro país.

2. Hipótesis

Cepas de *Bacillus subtilis* son eficaces controladores biológicos de *Penicillium digitatum* durante la postcosecha de limón variedad Eureka.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar el potencial antifúngico de diferentes cepas de *Bacillus subtilis* como control biológico de *Penicillium digitatum* durante el almacenamiento prolongado de limón variedad Eureka.

3.2 Objetivos específicos

- I. Aislar e identificar cepas de *Bacillus subtilis* desde la rizósfera en una zona productora de limón variedad Eureka.
- II. Evaluar *in vitro* las cepas extraídas y seleccionar aquellas con potencial antifúngico sobre el hongo.
- III. Evaluar el potencial antifúngico de las 5 mejores cepas de *Bacillus subtilis* como control biológico de *Penicillium digitatum in vivo*, durante el almacenamiento prolongado sobre limón variedad Eureka.
- IV. Caracterizar e identificar los compuestos antimicrobianos involucrados en el control de *Bacillus subtilis* sobre *Penicillium digitatum* durante la postcosecha.

4. Estado del arte

4.1 Datos de mercado

La producción de cítricos es uno de los rubros más comercializados a nivel global. Chile exporta a una gran cantidad de países destacando Estados Unidos con un 81,3% del total de las exportaciones. A éste, se le suma Japón y la Unión Europea alcanzando 271.088 toneladas exportadas en 2017. El limón (*Citrus x limón* L.) es un producto exitoso dentro del rubro cítrico donde su volumen exportado aumentó en un 126% durante los últimos 5 años y el principal destino es USA elevando su importación en un 260% a partir del 2013. Así mismo, las importaciones de limón aumentaron en un 64,7% donde los principales proveedores son Perú, Colombia y USA (ODEPA, 2017). Entre las principales variedades que se cultivan en Chile destacan: Génova, Fino 49 y Eureka, esta última es la variedad más cultivada a nivel mundial y se destaca por su alto volumen productivo (Razeto, 2005).

4.2 Índices de calidad en limón y problemas patológicos relacionados

Según Arpaia y Kader, (1999) los índices de calidad más relevantes en limón son el color, tamaño y forma del hesperidio, la ausencia de podredumbres y defectos como heridas o decoloración. La formación de heridas sobre la fruta se genera principalmente por el manejo inadecuado de la misma durante la precosecha y cosecha, pero otros puntos de infección son los daños por helada y oleocelosis (Smith *et al.*, 1992).

Respecto a las enfermedades, el moho verde provocado por *Penicillium digitatum* (Pers: FR) Sacc. provoca daños y pérdidas económicas considerables durante el almacenamiento y transporte de cítricos, alcanzando entre 60% y 80% en variedades de naranjas (Moscoso-Ramirez y Palou, 2013).

4.3 Condiciones para la infección y propagación de la enfermedad en limón

Penicillium digitatum pertenece al género *Penicillium* y a la clase *Deuteromycetes*. Las esporas son livianas y se diseminan a través del aire, además pueden permanecer sobre la fruta, implementos o suelo y avanza a través de contacto de la fruta enferma con otros frutos sanos adyacentes en bins, capachos y cajones (Smith *et al.*, 1992). Puede hacerse visible en cosecha y/o postcosecha, se ve favorecido su crecimiento en ambientes de

humedad relativa alta y temperaturas entre 22°C a 24°C, siendo esta última la temperatura óptima para su crecimiento y desarrollo. Bajo condiciones ideales, en 2 días se genera la infección y los primeros síntomas se hacen visibles en 3 días. Por otro lado, si se mantiene la fruta entre 10°C a 15°C, los primeros síntomas aparecen a los 5 a 6 días y 10 a 12 días, respectivamente (Smith *et al.*, 1992). Estos factores son relevantes considerando que los tiempos de viaje a los diversos destinos varían entre 23 días a USA y 47 días a Japón vía marítima (Mediterranean Shipping Company, 2018).

4.4 Sintomatología de la enfermedad

Las pudriciones generadas por *Penicillium digitatum* en limón se manifiestan como una podredumbre acuosa y blanda. El primer síntoma es una mancha hidrópica, hundida y redonda sobre la superficie (Latorre, 2004). Luego si las condiciones son favorables se genera un moho superficial de color blanco que rápidamente pasa a color verde oliva al generar esporas (Eckert, 1978).

4.5 Legislación de uso de plaguicidas en el mundo

Los principales mercados son cada vez más exigentes respecto a la tolerancia de trazas que dejan los plaguicidas en los productos vegetales. Se establecen límites que varían según el vegetal y el ingrediente activo del pesticida. Particularmente para limones, la Unión Europea establece 5 mg/kg de Imazalil, 8 mg/kg como límite para Pirimetanil y 7 mg/kg de Tiabendazol (European Commission, 2018). Estados Unidos establece límites máximos de residuo que varían alcanzando 10 mg/kg para Imazalil y 10 mg/kg para Tiabendazol (USDA, 2018). Mutengwe *et al.*, (2016) sostienen que el 9% de los productos vegetales estudiados provenientes del mercado en Sudáfrica exceden el LMR o no están autorizados por dicho país. Imazalil e Iprodiona fueron considerados como los pesticidas más frecuentemente utilizados seguido por Azoxistrona siendo los fungicidas más importantes en la industria de cítricos.

4.6 Manejos preventivos para control de moho verde en limones

Uno de los principales manejos preventivos para moho verde se basa en el manejo cuidadoso de la fruta para minimizar heridas o daños sobre la fruta (Razeto, 2005). Por otro lado, limpiar y desinfectar los implementos y lugares utilizados durante la cosecha y

postcosecha, embalar en lugares frescos y libres de corrientes de aire para finalmente almacenar en frío los limones a la menor temperatura posible (Latorre, 2004).

4.7 Métodos de control de moho verde

4.7.1 Tratamientos químicos

El uso de fungicidas sintéticos son la manera habitual de combatir enfermedades en postcosecha pero el uso intensivo de ellos genera la proliferación de cepas resistentes. Por otro lado existe la preocupación pública respecto a las consecuencias en la salud humana y contaminación ambiental (Di Francesco *et al.*, 2016).

Imazalil es actualmente el de mayor confianza en el mercado (Erasmus, 2014), es un esterol que inhibe una enzima que depende del citocromo P-450 responsable de la desmetilación del ergosterol, afectando la permeabilidad celular del hongo. Asimismo, tiene actividad antiesporulante, reduce la germinación, inflamación de las esporas, tubos germinativos y pérdidas en citoplasma de conidios que germinan (Siegel *et al.*, 1977).

Respecto a la carga residual Kellerman *et al.* (2018) evaluaron la carga residual de Pirimetanil (PYR) en concentraciones que varían entre 0 y 1000 mg L⁻¹ en diversos cítricos. Como resultado para los ensayos de empapamiento (1000 mg L⁻¹ por 60 segundos a 22°C) con una carga de esporas alta (10⁶ esporas ml⁻¹) sobre limón variedad Eureka. El químico ejerció un control del 52,8%. Se evaluó la carga residual en los tratamientos por inmersión destacando la carga máxima de 1,64 a 1,99 mg kg⁻¹ para clementina y 1,18 mg kg⁻¹ para naranja variedad Satsuma.

La cera es una de las aplicaciones más importantes, se utiliza entre otras cosas para prevenir cambios indeseables, generar buena apariencia, brillo pero también se espera que sea un vehículo para fungicidas (Petracek *et al.*, 2000; Mannheim y Soffer, 1996). Respecto a los recubrimientos sobre cítricos, Njombolwana *et al.* (2013), evaluaron el control de moho verde y la preservación de la calidad de la fruta al aplicar dos tipos de recubrimiento, por un lado de carnauba y otro de polietileno suplementado con Imazalil sobre naranja (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) variedad Valencia (Midknight) y Navel (Robyn). En síntesis, el control sobre el hongo de forma curativa fue similar entre ambos tipos de recubrimiento, sin embargo el revestimiento de polietileno mostró un mejor control a baja tasa de recubrimiento (0,6L t⁻¹) alcanzando 27% para polietileno y 17% para carnauba. El control preventivo fue significativamente mejor a altas concentraciones (1,2

Lt⁻¹) alcanzando 94% de control del hongo para carnauba y 83% para el revestimiento de polietileno.

4.7.2 Tratamientos físicos

4.7.2.1 Control con radiación

Respecto a la radiación ultravioleta-B, Ruiz *et al.* (2017) afirmaron que la exposición a corto plazo de limones variedad Eureka a radiación artificial UV-B induce una respuesta de aclimatación a la radiación además impide la difusión de *Penicillium digitatum*. Del total de los frutos heridos y puestos en un medio con conidios controlado, el tratamiento logró controlar el 60% de la incidencia de moho verde. Tiryaki y Pazir (2013) evaluaron los efectos de la radiación UV-C ($7,92 \text{ kJ m}^{-2}$) sobre dos patógenos típicos de cítricos (*P. digitatum* y *P. italicum*), para ello los inocularon *in vitro* e *in vivo* en naranja variedad Washington Navel y mandarina. Los estudios *in vitro* mostraron que el crecimiento de la población se redujo en un 56,2% a 100% respecto a las placas sin tratar, mientras que el porcentaje de frutos infectados a través de herida disminuyó de un 45% a 15%, mostrando que al encontrarse las esporas en la superficie del fruto, el tratamiento UV-C con 7.92 kJm^{-2} es suficiente para inactivarlas.

4.7.2.2. Control térmico

Respecto al control térmico, Fatemi y Borje (2011), evaluaron el tratamiento con agua caliente en el control de *Penicillium digitatum* sobre naranja variedad Valencia durante el periodo de almacenamiento. Luego de 24 a 48 horas de la inoculación se realizó la inmersión de la fruta en agua caliente (a 45°C, 50°C, 55°C y 60°C) por 1, 2 y 3 minutos. Posteriormente se secaron, se separaron en bolsas de plástico y fueron almacenadas en una cámara a 6°C y 90% de HR. Se evaluaron diversos factores propios del hesperidio como el efecto del tratamiento en la pudrición del fruto causada por *P. digitatum*. El tratamiento térmico a 60°C por 3 minutos, redujo a sólo un 16% la pudrición. Se concluyó que parte de la eficiencia del uso de tratamientos térmicos es su potencial para eliminar esporas de las heridas y también el efecto directo de la alta temperatura en el agente causal.

4.7.3 Tratamientos físicos combinados con biológicos

Respecto a los tratamientos mixtos, Terao *et al.* (2017), revelaron que el tratamiento térmico aplicado (55°C por 30 segundos) seguido por tratamiento ultravioleta-C por 22 días de almacenamiento inhibió un 93% la germinación de conidios del hongo sometándolo a 2 KJ m⁻² sobre naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cultivar 'Pera' reduciendo el progreso de la enfermedad en un 70%. El tratamiento térmico de los cítricos orgánicos a 56°C durante 20 segundos con cepillado simultáneo redujo la incidencia de *P. digitatum* (Porat *et al.*, 2000). Así mismo, Benato *et al.*, (2017), reportaron una reducción significativa en el diámetro de la lesión cuando se realizó un tratamiento térmico (60°C durante 20 segundos). Cuando el tratamiento térmico fue combinado con aceites esenciales (hierba de limón, palmirosa y aceite de canela) en concentraciones de 0,5 gL⁻¹ y 0,12 gL⁻¹. Con ello, se demostró que el aceite de canela en concentración de 0,12 gL⁻¹ combinado con termoterapia redujo en un 40,5% el desarrollo de moho verde bajo refrigeración (10°C) durante el almacenamiento prolongado.

Por otro lado, Atrash *et al.*, (2018) evaluaron el efecto antifúngico del aceite esencial de ajedrea, goma arábica y agua caliente sobre frutos de limón mexicano. Los resultados relevaron que la inhibición en el crecimiento micelial *in vitro* del hongo en concentraciones 1000 y 1200 ml⁻² fue del 100%. Por otro lado, en el tratamiento *in vivo* se utilizaron las concentraciones más prometedoras, agua caliente (40 a 50°C) y recubrimiento de goma arábica (2,5% y 5%). Luego de 15 días se evaluaron los limones, concluyendo que los tratamientos más eficientes fueron los térmicos, seguidos por el uso del aceite de ajedrea y finalmente el recubrimiento alcanzando 0%, 30% y 50% de daño patológico, respectivamente.

4.7.4 Control biológico

4.7.4.1 Tratamiento con extractos de algas

Respecto al uso de extractos de algas, Kamel (2014), estudió el impacto de extractos de algas marinas (Cytolan Star[®]) sobre la calidad de la fruta de naranja variedad Valencia durante el almacenamiento en frío concluyendo como la calidad del fruto podría mejorar y/o mantenerse por más tiempo con la aplicación de dichas algas respecto a no utilizarse. Por otro lado, De Corato *et al.* (2017) evaluaron *in vitro* e *in vivo* la actividad de los extractos de dos algas pardas (*Laminaria digitata* y *Undaria pinnatifida*) y tres rojas

(*Porphyra umbilicalis*, *Eucheuma denticulatum* y *Gelidium pusillum*) contra tres patógenos característicos de poscosecha (*Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* y *Penicillium digitatum*) utilizando diferentes concentraciones de extracto (10, 20 y 30 g L⁻¹). Estas fueron extraídas a través del método SC-CO₂ el cual es una técnica de extracción que permite tener una mayor pureza en la extracción de compuestos bioactivos y sustancias antifúngicas. Particularmente, la aplicación de 30 g L⁻¹ de los extractos *L. digitata*, *U. pinnati* y *P. umbilicalis* en tratamiento preventivos redujo la supresión de la enfermedad en un 60%, 58% y 51% de *P. digitatum* sobre limones (*Citrus limon*) cultivar Sorrento.

4.7.4.2 Control biológico con levaduras

El control biológico es una posibilidad prometedora como parte de las estrategias para el control de moho verde (Pérez *et al.*, 2011). Diversos estudios entre ellos, Pérez *et al.*, (2017) evaluaron el control que ejercen ciertas levaduras como antagonistas al hongo. Este estudio concluyó que las levaduras *Clavispora lusitaniae* y *Pichia fermentans* fueron las más eficientes en el control al tener una alta compatibilidad con estos productos químicos, además de un alto porcentaje de protección (96,7% para *P. fermentans* a temperatura ambiente y cerca de 90% a bajas temperaturas, mientras que la cepa *Cl. lusitaniae* alcanzó el 95% de eficiencia protectora a bajas temperaturas).

4.7.4.3 Cubierta comestible junto a extracto de piel de granada y levadura

Kharchou *et al.*, (2018) evaluaron el potencial de dos cubiertas comestibles: quitosano y goma de algarrobo incorporando un extracto de piel de granada y una cepa B91 de levadura *Wickerhamomyces anomalus* para controlar el crecimiento de *Penicillium digitatum* en naranja y mandarina. El objetivo fue evaluar la formulación más eficiente para controlar el crecimiento del hongo y reducir la descomposición del fruto. Como resultado, la formulación más efectiva fue: “quitosano þ 0,361 g de extracto de cáscara de granada agua seca/mL”. Dicha formulación controló un 98% la incidencia de la enfermedad y más de un 95% en el diámetro de la lesión. Por otro lado, el recubrimiento fue efectivo a través del tratamiento: “goma de algarroba þ 0,304 de extracto de piel de granada/mL” reduciendo la incidencia de la enfermedad un 75% y diámetro de lesión un 98%.

4.7.4.4 Control con levadura junto a molibdato de amonio

El uso de sal y levadura en un solo tratamiento para controlar moho verde reduce el uso de químicos y con ello el riesgo potencialmente tóxico para los consumidores. Lu *et al.*, (2018) determinaron el potencial de un tratamiento que combina molibdato de amonio y *Rhodospordium paludigenum* sobre mandarina variedad Satsuma, el objetivo fue corroborar su efectividad en el control de moho verde de manera preventiva. En síntesis, el uso de dicha levadura redujo significativamente la incidencia de la enfermedad, disminuyendo en un 35% a las 72 horas mientras que a las 84 horas disminuyó un 86% utilizando 0,1 mmol / l combinado con 1×10^7 células L⁻¹ de *R. paludigenum*.

4.7.4.5 Control biológico con bacterias

El uso de bacterias como agentes biológicos se ha visto como una oportunidad viable para el control de *P. digitatum* en postcosecha de limones. El género *Bacillus* se destaca por varios métodos de acción como antagonista mostrando un potencial importante para desarrollar a futuro (Di Francesco *et al.*, 2016).

Diversos trabajos, entre ellos los de Ambrico y Trupo (2017) reconocen la eficacia de *B. subtilis* como controlador biológico de *P. digitatum* a través de ensayos realizados con el sobrenadante de *Bacillus subtilis* ET-1 *in vitro* e *in vivo* sobre fruto de limón variedad Zagara Bianca observando una disminución de 70% en la incidencia de la enfermedad, además de disminuir la germinación conidial y zona de inhibición. Por otro lado, Mohammadi *et al.* (2017) evaluaron la actividad antimicrobiana de 4 cepas de *Bacillus subtilis in vitro*, destacando la más prometedora como agente de control siendo evaluada en condiciones *in vivo* sobre frutos de limón variedad Meyer, mostrando una disminución en el diámetro de la lesión, crecimiento micelial y germinación o producción de esporas de *Penicillium digitatum*. Así mismo, Moretto *et al.*, (2014) determinaron el control que ejerce *Bacillus subtilis* (ABC-69 y ACB-84) en postcosecha sobre *Penicillium digitatum*. Este estudio utilizó diversos cultivares, entre ellos lima ácida variedad Tahití. Como resultados particularmente para lima ácida el tratamiento curativo generó un porcentaje bajísimo de frutos sanos con 5% y 2,22% para las cepas ACB84 y ACB69. Sin embargo, al utilizarlo como control preventivo el uso de controles biológicos se vuelve más eficiente generando

40% y 53% de frutos sanos utilizando ACB84 y ACB69, respectivamente. Por lo tanto, el uso de estas cepas bacterianas no es tan eficiente cuando ya ha infectado el hongo a la fruta, pero de forma preventiva otorga una mayor protección para *Penicillium digitatum*.

Previamente Kupper *et al.*, (2013) estimaron el efecto antagonista de los agentes biológicos y evaluó la influencia de 13 cepas de *Bacillus subtilis* (obtenidas a partir de flores y hojas) en el crecimiento micelial y germinación de *P. digitatum*. El efecto de los aislados en el crecimiento del hongo se evaluó a través del porcentaje de inhibición y el tamaño de la colonia de *P. digitatum*, rescatando a la cepa ACB-70 que inhibió un 31,7% el crecimiento y 1,40 cm el tamaño de la colonia del patógeno. Por otro lado, luego de 14 horas de incubación a 25°C, la cepa ACB-84 fue capaz de inhibir la germinación de *P. digitatum* un 72% seguida de ACB-69 con un 27% de inhibición.

Dando las primeras luces de la eficiencia de bacterias como controladores biológicos, Leelasuphakul *et al.* (2008) evaluaron *in vitro* la actividad antifúngica de cepas de *Bacillus subtilis*. Se aislaron doscientas cinco cepas desde la rizósfera de las cuales veintinueve cepas generaron zonas de inhibición claras inhibiendo más de 60% del crecimiento micelial de *P. digitatum* en medio PDA. Como resultado, las cepas 155 y 202 generaron una inhibición completa alcanzando un 99,95% de control en el crecimiento del hongo.

El género *Bacillus* se ha caracterizado por inhibir el crecimiento de diversos patógenos jugando un papel fundamental como antagonista biológico a través de múltiples métodos de acción. El primer modo es a través de la producción de compuestos antimicrobianos o antibióticos (lipopéptidos cíclicos) destacando la familia iturina, surfactina y fengycina (Pinchuk *et al.*, 2002). La más estudiada corresponde a iturina A, donde Ambrico y Trupo (2017) correlacionaron la concentración de este compuesto y la actividad antifúngica contra el moho, afirmando que la menor concentración analizada inhibió más de 98% de la formación de colonias de *P. digitatum* destacando que la concentración mínima inhibitoria de iturina A fue de 6,60 mg L⁻¹.

El segundo modo de acción del género *Bacillus* es a través de enzimas que son capaces de degradar componentes estructurales propios de hongos entre ellos quitinasas, glucanasas y proteasas afectando directamente la pared celular del hongo inhibiendo el crecimiento del mismo y causando defectos en la estructura de hifas y esporas.

Mohammadi *et al.*, (2017) analizaron la actividad enzimática a través del aislamiento de diversas cepas de *B. subtilis* concluyendo un efecto positivo en el control del crecimiento del micelio y la producción o germinación de esporas.

Finalmente, el último modo de acción reportado es a través de la producción de sustancias volátiles antifúngicas. Arrebola *et al.*, (2010) evaluaron el efecto de los compuestos volátiles generados por *B. subtilis* cepa PPCB001 sobre la germinación de esporas, crecimiento micelial y desarrollo de hifas de 3 especies del género *Penicillium*, entre ellos *Penicillium digitatum*. PPCB001 produjo veintiún tipos diferentes de compuestos volátiles, predominando las cetonas con un 45,98% seguido por diversos ácidos y ésteres.

5. Metodología

Los ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* serán realizados en la Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos ubicada en Calle San Francisco s/n, La Palma, Comuna de Quillota, Región de Valparaíso.

5.1. Aislamiento e identificación de bacterias

Las bacterias serán aisladas desde la rizósfera de limones tradicionalmente cultivados en la Región Metropolitana, específicamente en la comuna de Melipilla. Los cultivos bacterianos se cultivarán en agar nutritivo y se mantendrán en medio nutritivo con 15% de glicerol a -80°C. La identificación de los cultivos bacterianos se realizará mediante la secuenciación del gen 16 rRNA. Dicha herramienta se emplea dada su confiabilidad, rapidez y asertividad frente a agentes patógenos. Este análisis será realizado por el laboratorio de fitopatología, perteneciente a la Escuela de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

5.2 Patógeno y condiciones de crecimiento

El patógeno (*P. digitatum*) será extraído desde frutos de cítricos descompuestos obtenidos de un mercado local. La identificación del hongo se realizará a través de la secuenciación ITS (Internal Target Spacer). Este análisis será realizado por el laboratorio de fitopatología, perteneciente a la Escuela de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. El patógeno se mantendrá como cultivo de esporas en medio PDA a 20 °C y alta humedad relativa hasta su uso (10 días).

5.3 Actividad antifúngica *in vitro*

Para estudiar el efecto antagonista en placa como control biológico se utilizará la técnica de cultivo en placa Petri con medio PDA (90 mm) donde se dejarán crecer colonias de *P. digitatum* a 30°C en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, 7 días antes de la inoculación. El cultivo fresco del hongo será cortado con un perforador de corcho de 6 mm de diámetro y se colocará en el centro de la placa. Por otro lado, las cepas bacterianas serán cultivadas en matraces Erlenmeyer de 50 ml que contengan 20 ml de medio nutritivo en agitador rotatorio durante 24 horas a 28°C. La dilución será aproximadamente de $1 \cdot 10^8$ UFC/ml de suspensión bacteriana. Dichas suspensiones bacterianas se sembrarán de forma estriada individualmente. Luego, serán envueltas con parafilm e incubadas a 28°C hasta que el micelio micótico cubra la superficie de agar de la placa Petri control, los diámetros de colonias fúngicas se puntuarán y medirán en milímetros (mm).

La actividad antifúngica de los filtrados de bacterias cultivados en PDA se observarán usando el método de difusión (Mehmoog *et al.*, 1999). En matraces Erlenmeyer con 150 ml de medio nutritivo se inocularán 1.5 ml de suspensión bacteriana que contengan $1 \cdot 10^8$ UFC/ml y se incubarán en un sistema de agitación rotatoria (180 rpm) a 28°C durante 7 días. Posteriormente, el cultivo se centrifugará a 20.000 g por 15 minutos y se filtrará a través de una membrana (0,20 μ m; Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Luego 10 μ l de filtrado se gotearán en 14 ml de medio PDA el cual estará inoculado con 6 mm de *P. digitatum*. Después de 4-5 días de incubación, los diámetros de las colonias de hongos serán marcados y medidos en mm.

El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculará de acuerdo con Mari *et al.*, 1993 dada la siguiente formula:

$$\text{Inhibición de moho verde (\%)} = (C - T) \cdot 100 / (C - 6)$$

Donde:

C: Diámetro de la colonia del patógeno del grupo control.

6: Diámetro del disco patógeno.

T: Diámetro de la colonia del patógeno después de los tratamientos.

La evaluación se realizará a través de la medición del halo generado por las bacterias en placas con colonias de *P. digitatum*. Aquellas cepas con alta capacidad antifúngica deberán producir zonas claras de inhibición (> 60%) del crecimiento micelial del patógeno. Para cumplir con el segundo objetivo los factores a evaluar serán las cepas bacterianas y las concentraciones de cada una de ellas. Por lo tanto, se realizarán 4 tratamientos por cepa (5) con 3 concentraciones y 4 réplicas por tratamiento, evaluando finalmente cerca de 80 placas.

5.4 Actividad antifúngica *in vivo*

5.4.1 Preparación del material vegetal

Para evaluar el potencial antifúngico *in vivo* se utilizarán frutos de limón (*Citrus limón* L.) pertenecientes a la variedad Eureka. Estos deberán ser de tamaño, color, forma y madurez uniforme además de encontrarse libres de heridas. Luego de ser obtenidos desde el mercado local serán almacenados a 5 °C hasta su uso.

Los frutos serán desinfectados superficialmente a través de la inmersión en una solución diluida con 70% etanol durante dos minutos. Posteriormente se lavarán dos veces con agua destilada. Se dejarán secar para eliminar el exceso de humedad sobre la superficie del fruto hasta su uso. Se realizarán lesiones equidistantes en dos puntos de la región ecuatorial del fruto utilizando un lápiz o lanceta esterilizada a una profundidad de 3 milímetros.

5.4.2 Ensayo de antagonismo con fruto de limón

De acuerdo a los resultados del efecto inhibitor de los cultivos *in vitro* cada fruto de limón se sumergirá en las suspensiones bacterianas $1 \cdot 10^6$ UFC/ml. La suspensión de esporas del hongo contendrá $1 \cdot 10^5$ CFU/ml de caldo de glucosa de levadura preparada (BYB) suplementado con 1 ml de Tween 20 (Pimienta *et al.*, 2008). La aplicación del patógeno y control biológico se realizará de forma simultánea durante 4 momentos (a las 24, 48 y 72 horas) incubándolos a una temperatura entre 10-13°C y a una humedad relativa alta (80-90%).

Para cumplir con el tercer objetivo el factor a evaluar será el efecto antifúngico de una concentración variando la cepa bacteriana, la unidad experimental serán cajas de cartón

corrugado de limones calibre 75 de 17.2 kg con frutos que pesan entre 0.15 a 0.18 kg. Se realizarán 3 tratamientos con 4 réplicas por tratamiento. Por lo tanto, se requerirán 12 cajas de limones y 900 limones para la evaluación total. La incidencia de la enfermedad será calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia de la enfermedad (\%)} = (IW/W) \cdot 100$$

Donde:

W: número de heridas

IW: número de heridas infectadas

5.5 Identificación de compuestos antimicrobianos

La evaluación de los compuestos antimicrobianos involucrados se realizará sólo para la mejor cepa de acuerdo a los resultados obtenidos al ensayo de antagonismo sobre fruto de limón.

5.5.1 Compuestos antimicrobianos de carácter enzimático

La determinación de la enzima proteasa se llevará a cabo en placas de agar de leche descremada (SMA: 0,5 g de extracto de levadura, 9,13 g de agar, 15 g de leche descremada y 1 L de agua destilada). Las placas serán inoculadas con las bacterias e incubadas a 27°C por 24 horas (Atlas, 1997). La estimación de la enzima glucanasa será medida a través del método Teather y Wood (Teather y Wood, 1998) utilizando placas con medio de cultivo liguenina al 0,2%. Posteriormente, las placas se incubarán a 30°C durante 5 días y luego se cubrirán con una solución de tinción específica para glucanasa (0,3%). Se medirán los diámetros (en milímetros) de las zonas incoloras alrededor de las colonias bacterianas para determinar la capacidad de producción de proteasa y glucanasa.

La actividad de la enzima quitinasa se determinará a través del método descrito por Senol *et al.*, (2014). La solución de enzima (0,2 ml) obtenida a través del filtrado bacteriano y 0,5 ml de quitina coloidal al 0,5% p/v (preparada en tampón citrato 50 mM pH 6) se incubarán a 37°C por 30 minutos. Esta reacción se detendrá adicionando 0,75 ml de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DSN) (Miller, 1959), seguido por calentamiento a 80°C por 10 minutos. La actividad enzimática será determinada en U/ml (unidad de actividad enzimática por

mililitro) y se definirá como la cantidad de enzima catalizadora de 1 μmol / ml de sustrato por minuto bajo las condiciones mencionadas en el ensayo anterior.

2.- Compuestos antimicrobianos antibióticos

La iturina A se extraerá según el método señalado por Mizumoto *et al.*, 2006 con algunas modificaciones de cationes: 3 ml de sobrenadante libre de células (CFS) se suspenderán en un tubo que contendrá 12 ml de metanol y después dicha mezcla se agitará a temperatura ambiente por 90 minutos. La mezcla se centrifugará a 14.000 g por 20 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se filtrará a través de una membrana de politetrafluoroetileno hidrófobo (PTFE) de 0,2 μm de tamaño de poro (Ambrico y Trupo, 2017). El análisis de cromatografía líquida para la cuantificación de iturina junto al desarrollo de una metodología de análisis serán enviada al Laboratorio de Servicio de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

3.- Estimación de compuestos orgánicos volátiles (VOC's)

El análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) es el método que se utilizará para aislar compuestos volátiles de las cepas de *Bacillus subtilis* seleccionadas según el método descrito por Sivakumar *et al.*, 2008.

La identificación tentativa de compuestos orgánicos se realizará a través de una búsqueda de coincidencias basadas en la probabilidad del espectro de la base de datos de Wiley. Los índices de retención (RI) de los componentes también serán establecidos, la identificación de cada compuesto individual se realizará por comparación de sus tiempos de retención sobre los componentes puros (Arrebola *et al.*, 2010). El análisis y la identificación tentativa de los compuestos orgánicos será realizada en el Instituto de la Nutrición y de los Alimentos (INTA) perteneciente a la Universidad de Chile.

6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de este estudio serán analizados utilizando el sistema de análisis de varianza (ANOVA). La comparación de las medias se realizará utilizando el test de Tukey. Todos los análisis se realizaron mediante el software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) versión 9.1 para Windows.

7. Bibliografía

- Ambrico, A., and M. Trupo. 2017. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. *Postharvest Biology and Technology* 134: 5-10.
- Arpaia, M., and A. Kader. 1999. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. 4 p. University of California- Postharvest Technology Center, Davis, California, USA.
- Arrebola, E., D. Sivakumar, and L. Korsten. 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay. *Biological Control* 53: 122-128.
- Atlas, R.M. 1997. Handbook of Microbiological Media. Boca Raton, CRC Press.
- Atrash, S., A. Ramezani, and M. Rahemi. 2018. Antifungal Effects of Savory Essential Oil, Gum Arabic, and Hot Water in Mexican Lime Fruits. 2018. *HortScience* 53: 524–530.
- Benato, E., T. Belletti, D. Terao, e D. Siqueira. 2017. Óleos essenciais e tratamento térmico no controle pós-colheita de bolor verde em laranja. *Summa Phytopathologica* 44:65-71.
- Cantwell, M. 2002. Appendix: Summary Table of Optimal Handling conditions for Fresh Produce. p. 511-518. In A. Kader (ed.). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California, Oakland, California, USA.
- De Corato, U., R. Salimbeni, A. De Pretis, N. Avella, and G. Patruno. 2017. Antifungal activity of crude extracts from brown and red seaweeds by a supercritical carbon dioxide technique against fruit postharvest fungal diseases. *Postharvest Biology and Technology* 131: 16-30.
- Di Francesco, A., C. Martini, and, M. Mari. 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?. *European Journal of Plant Pathology* 145 (4) : 711-717.

- Eckert, J. 1978. Postharvest disease of citrus fruit. *Outlook Agriculture* 9(5): 225-232.
- El Mercurio. 2018. El buen presente de los limones en Chile. Disponible en <http://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Noticias/2018/01/29/El-buen-presente-de-los-limones-en-Chile.aspx> Leído el 28 de marzo del 2018.
- Erasmus, A. 2014. Optimization of imazalil application and green mold control in South African packhouses. 114 p. Dissertation Doctor of Plant Pathology.
- European Commission. 2018. EU- Pesticides database. Available in <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN> Accessed 9 April 2018.
- Fatemi, S., and H. Borji. 2011. The effect of physical treatments on control of *Penicillium digitatum* decay orange cv. Valencia during storage period. *African Journal of Agricultural Research* 26: 5757-5760.
- Holmes, B., M. Costas, M. Ganner, S. On, and M. Stevens. 1994. Evaluation of Biolog system for identification of some gram negative bacteria of clinical importance. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 1970–1975.
- Kamel, H.M. 2014. Impact of garlic oil, seaweed extract and imazalil on keeping quality of Valencia orange fruits during cold storage. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants* 6:116-125.
- Kellerman, M., E. Liegenberg, N. Njombolwana, A. Erasmus, and P. Fouriea. 2018. Postharvest dip, drench and wax coating application of pyrimethanil on citrus fruit: Residue loading and green mould control. *Crop Protection* 103:115-129.
- Kharchoufi, S., L. Parafati, F. Licciardello, G. Muratore, M. Hamdi, G. Cirvilleri, and C. Restuccia. 2018. Edible coatings incorporating pomegranate peel extract and biocontrol yeast to reduce *Penicillium digitatum* postharvest decay of oranges. *Food Microbiology* 74:107-112.
- Kupper, K., A. Cervantes, M. Klein, e A. Da Silva. 2013. Avaliação de microrganismos antagonistas, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal* 35: 424-436.
- Latorre, B. 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. 638 p. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

- Lee, D.W., and B.S. Kim. 2015. Antimicrobial cyclic peptides for the control of diseases in plants. *European Journal of Plant Pathology* 31: 1-11.
- Leelasuphakul, W., P. Hemmanee, and S. Chuenchitt. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the Green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 48:113-121.
- Lu, L., L. Ji, L. Qiao, Z. Yali, M. Chen, Ch. Wang, Ch, Haitao, and X. Zheng. 2018. Combined treatment with *Rhodosporidium paludigenum* and ammonium molybdate for the management of green mold in satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Postharvest Biology and Technology* 140:93-99.
- Mannheim, C., and T. Soffer. 1996. Permeability of different wax coatings and their effect on citrus fruit quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 919–923.
- Mediterranean Shipping Company. 2018. Transit Times. Available at <https://www.msc.com/chl> Accessed 10 April 2018.
- Mehmood, Z., I. Ahmed, F. Mohammad, S. Ahmed. 1999. Indian medicinal plants: a potential source of anticandidal drug. *Pharmaceutical Biology* 37: 237–242.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426–428.
- Miller, L. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology* 16: 584–586.
- Mizumoto, S., M. Hirai, and M. Shoda. 2006. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 869.
- Mohammadi, P., E. Tozlu, R. Kotan, and M. Senol Kotan. 2017. Potential of some bacteria for biological control of postharvest citrus Green mould caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Protection Science* 53:134-143.
- Moretto, C., A. Lima, A. Batista, and K. Kupper. 2014. Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. *Scientia Horticulturae* 165: 433-438.
- Moscoso-Ramirez, P., and LI. Palou. 2013. Evaluation of postharvest treatments with chemical resistance inducers to control green and blue molds on orange fruit.

- Postharvest Biology and Technology 85: 132-135.
- Mutengwe, M., L. Chidamba, and L. Korsen. 2016. Monitoring pesticide residues in fruit and vegetables at two of biggest fresh produce markets in Africa. *Journal of Food Protection* 11: 1938-1945.
 - Njombolwana, N., A. Erasmus, J. Gideon van Zyl, W. Du Plooy, P. Cronje, and P. Fourie. 2013. Effects of citrus wax coating and brush type on imazalil residue loading, green mould control and fruit quality retention of sweet oranges. *Postharvest Biology and Technology* 86: 362–371.
 - ODEPA. 2017. Boletín fruta fresca: Diciembre 2017. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/contenidos-rubro/boletines-del-rubro/boletin-fruta-fresca-diciembre-de-2017> Leído el 27 de marzo del 2018.
 - Ortner, E.K., and E.R. Rohwer. 1996. Trace analysis of semi-volatile organic air pollutants using thick film silicone rubber traps with capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* 19: 339–343.
 - Pérez, M. I., O. Blanco, C. Barreta, I. Dol, and J. Lado. 2011. Imazalil concentration for in vitro monitoring of imazalil resistant isolates of *Penicillium digitatum* in citrus packinghouses. *Postharvest Biology and Technology* 60: 258-262.
 - Pérez, M.F., J. Ibarreche, A. Isas, M. Sepulveda, J. Ramallo, and J. Dib. 2017. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. *Biological Control* 115: 135–140.
 - Petracek, P.D., H. Dou, J. Mourer, and C. Davis, 2000. Measurement of gas exchange characteristics of waxes applied to citrus fruit. *Acta Horticulturae* 527:73-84.
 - Pimenta, R., F. Silva, J. Silva, P. Morais, D.Braga, C.Rosa and A. Correa. 2008. Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomyopsis schoenii* on oranges. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 85–90.
 - Pinchuk, I., P. Bressollier, I. Sorokulova, B. Berneuli, and M.Urdaci. 2002. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Reserch in Microbiology* 153: 268-273.
 - Porat, R., A. Daus, B. Weiss, L. Cohen, E. Fallik, and S. Droby. 2000. Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment.

Postharvest Biology and Technology 18:151–157.

- Razeto, B. 2005. El limonero. 235 p. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Ruiz, V., L. Cerioni, I. Zampini, S. Cuello, M. Isla, M. Hilal, and V. Rapisarda. 2017. UV-B radiation on lemons enhances antifungal activity of flavedo extracts against *Penicillium digitatum*. LWT - Food Science and Technology 85: 96-103.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: Klement Z., Rudolph K., Sands D. (eds): Methods in Phytobacteriology. Budapest, Academia Kiado 199–204.
- Schirra, M., D'. Salvatore, S. Marceddu, A. Angioni, P. Cabras, B. Scherm, and Q. Migheli. 2005. Residue level, persistence and storage performance of citrus fruit treated with fludioxonil. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 6718–6724.
- Senol, M., H. Nadaroglu, N. Dikbas, and R. Kotan. 2014. Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 13, 35.
- Siegel, M., A. Kerkenaar, and A. Kaars. 1977. Antifungal activity of the systemic fungicide imazalil. European Journal of Plant Pathology 83:121-133.
- Sivakumar, D., Y. Naudé, E. Rohwer, and L. Korsten. 2008. Volatile compounds, quality attributes, mineral composition and pericarp structure of South African litchis export cultivars Mauritius and McLean's Red. Journal of the Science of Food and Agriculture 88: 1074–1081.
- Smith, M., J. Dunez, R. Lelliott, D. Phillips, and S. Archer. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. 671 p. Mundi-Prensa, Madrid, España. Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa.
- Teather, R, and P. Wood. 1998. Use of Congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Applied and Environmental Microbiology and Biotechnology 43: 777–780.
- Terao, D., K. Necheta, M. Silva Ponte, A. Nunes, V. Delgado, and B. Halfeld-Vieira. 2017. Physical postharvest treatments combined with antagonistic yeast on the control of orange green mold. Scientia Horticulturae 224: 317-323.
- Tiryaki, G, and F. Pazir. 2013. Inactivation of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* under *In Vitro* and *In Vivo* Conditions by Using UV-C Light. Journal of Food Protection 10:1761–1766.

- USDA. 2018. Maximum Residue Limits (MRL) Database. Available in <https://www.fas.usda.gov/maximum-residue-limits-mrl-database> Accessed 23 May 2018.

8. Plan de trabajo

<p>Evaluar <i>in vitro</i> las cepas aisladas y seleccionar aquellas con potencial antifúngico sobre el hongo.</p>	<p>Se espera determinar la capacidad antifúngica de cada cepa bacteriana y la concentración a través del porcentaje de inhibición en placa Petri.</p>
<p>Evaluar el potencial antifúngico de las 2 mejores cepas de <i>Bacillus subtilis</i> como control biológico de <i>Penicillium digitatum</i> <i>in vivo</i>, durante el almacenamiento prolongado sobre limón variedad Eureka.</p>	<p>Se espera señalar la capacidad antifúngica de las diferentes cepas estandarizando la concentración a utilizar (1×10^6 UFC/ml).</p>
<p>Caracterizar e identificar los compuestos antimicrobianos involucrados en el control de <i>Bacillus subtilis</i> sobre <i>Penicillium digitatum</i> durante la postcosecha.</p>	<p>Se espera encontrar una gran variedad de compuestos obtenidos de la mejor cepa, destacando aquellos de origen antibiótico como iturina A, de origen enzimático como quitinasa, proteasa y glucanasa para finalmente considerar los VOC's.</p>

Cuadro 1. Resultados esperados de cada objetivo específico.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

10. Organización

10.1 Cargos y funciones

Nombre del profesional	Formación/grado académico	Cargo en el proyecto	Costo del personal (MM\$)
Ignacia Cassis	Ing. Agrónomo	Directora	700.000
Por confirmar	Técnico agrícola	Apoyo técnico	350.000
Por confirmar	Ing. Bioquímico	Analista de laboratorio	500.000

11 Presupuesto

11.1 PRESUPUESTO TOTAL PO CUENTA (MM\$)

	Cuenta	FONDO CONCURSABLE	APORTE EMPRESA		Total(MM\$)
			Pecuniario	No pecuniario	
A.	Total Recursos Humanos		\$ 37.300.000		\$ 37.300.000
B.	Total Subcontratos		\$ 8.623.260		\$ 8.623.260
C.	Total Gastos de Inversión		\$ 6.455.000	\$ 7.000.000	\$ 13.455.000
D.	Total Gastos de Operación		\$ 9.589.941	\$ 324.000	\$ 9.913.941
E.	Total viajes y viáticos		\$ 600.000		\$ 600.000
F.	Total Gastos de Administración			\$ 21.833.940	\$ 21.833.940
	Porcentaje de Aporte (%)	70%			
TOTAL(MM\$)		\$ 64.208.299	\$ 62.568.201	\$ 29.157.940	\$ 91.726.141

11.2 PRESUPUESTO TOTAL POR AÑO (MM\$)

	Cuenta	Año 1	Año 2	Año 3	Total(MM\$)
A.	Total Recursos Humanos	\$ 13.500.000	\$ 12.400.000	\$ 11.400.000	\$ 37.300.000
	<i>Pecuniario</i>	\$ 13.500.000	\$ 12.400.000	\$ 11.400.000	\$ 37.300.000
	<i>No Pecuniario</i>				
B.	Total Subcontratos	\$ 2.874.420	\$ 2.874.420	\$ 2.874.420	\$ 8.623.260
	<i>Pecuniario</i>	\$ 2.874.420	\$ 2.874.420	\$ 2.874.420	\$ 8.623.260
	<i>No Pecuniario</i>				
E.	Total viajes y viático	\$ 200.000	\$ 200.000	\$ 200.000	\$ 600.000
	<i>Pecuniario</i>	\$ 200.000	\$ 200.000	\$ 200.000	\$ 600.000
	<i>No Pecuniario</i>				
F.	Total Gastos de Inversión	\$ 13.455.000	\$ -	\$ -	\$ 13.455.000
	<i>Pecuniario</i>	\$ 6.455.000	\$ -	\$ -	\$ 6.455.000
	<i>No Pecuniario</i>	\$ 7.000.000	\$ -	\$ -	\$ 7.000.000
G.	Total Gastos de Operación	\$ 3.304.647	\$ 3.304.647	\$ 3.304.647	\$ 9.913.941
	<i>Pecuniario</i>	\$ 3.196.647	\$ 3.196.647	\$ 3.196.647	\$ 9.589.941
	<i>No Pecuniario</i>	\$ 108.000	\$ 108.000	\$ 108.000	\$ 324.000
H.	Total Gastos de Administración	\$ 8.677.980	\$ 6.577.980	\$ 6.577.980	\$ 21.833.940
	<i>Pecuniario</i>				
	<i>No Pecuniario</i>	\$ 8.677.980	\$ 6.577.980	\$ 6.577.980	\$ 21.833.940
	Total(MM\$)	\$ 42.012.047	\$ 25.357.047	\$ 24.357.047	\$ 91.726.141
	<i>Pecuniario</i>	\$ 26.226.067	\$ 18.671.067	\$ 17.671.067	\$ 62.568.201
	<i>No Pecuniario</i>	\$ 15.785.980	\$ 6.685.980	\$ 6.685.980	\$ 29.157.940