



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magíster en Ciencias con
Mención en Microbiología

**Perfil de propiedades antagónicas de bacterias ácido lácticas hacia
Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* y *Diplodia mutila* asociados a
enfermedades en cultivos de nogal**



Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias mención Microbiología

KARIN ALEJANDRA JARAMILLO CEBALLOS

Profesor Guía: Dr. Rodrigo Bórquez
Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería
Universidad de Concepción

Profesor Co Guía: Dr. Homero Urrutia
Departamento Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Concepción, Chile 2022

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería, Universidad de Concepción.

Profesor Guía:

Dr. Rodrigo Bórquez
Facultad de Ingeniería
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía:

Dr. Homero Urrutia
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión evaluadora:



Dra. Erica Castro
Facultad de Ciencias para la Salud
Universidad de Atacama

Dr. Andrés Opazo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Ernesto Moya
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Director de Programa:

Dr. Gerardo González
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Si bien el camino profesional que decidí transitar a través de la realización de este postgrado es personal y el término del mismo depende del esfuerzo y trabajo individual, existen personas que contribuyeron a la realización del mismo y que sin lugar a dudas no hubiera sido posible sin su apoyo.

Agradezco a mi familia, madre, padre y hermano que durante toda mi vida me han brindado su amor incondicional, otorgándome herramientas fundamentales para enfrentar de la mejor manera etapas y desafíos como lo fue el desarrollo del magister durante estos años. Por su cariño, consejos y palabras de aliento en momentos difíciles de mi pasar por el postgrado. A Daniel por su amor sincero e incondicional, apoyo y compañía. Agradecer al laboratorio de Bioprocesos que me abrió las puertas durante un momento crítico de pandemia. Al profesor Rodrigo Bórquez, que me permitió integrar su equipo de trabajo, por ser un excelente docente y profesor guía, por estar siempre presente, por su empatía y apoyo. Estaré siempre agradecida de él. A sus integrantes Alexandra, por brindarme su conocimiento y apoyo. A la profesora Erica Castro por su buena disposición, consejos y asesoría, al igual que al profesor Diego Nascimento y Gabriel Merino. Agradezco también a la Facultad de Ciencias Biológicas, por abrirme las puertas al programa de magister, ya que además de entregarme un conocimiento completo en el área de la microbiología me incentivó a continuar este desafiante camino de la investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cultivo de nogal (<i>Juglans regia</i> L.).....	1
1.2 Nogal en Chile	2
1.3 Principales enfermedades fitosanitarias en el nogal.....	4
1.4 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> y peste negra	6
1.5 <i>Botryosphaeraceae</i> (<i>Diplodia mutila</i>) y cancro de la madera	11
1.6. Manejo integral de enfermedades fitopatógenas.....	15
1.7 Biopesticidas antimicrobianos	17
1.8. Bacterias ácido lácticas	22
1.8.1. Usos potenciales.....	22
1.8.2. Adaptabilidad de BAL al nicho e interacción ecológica con plantas. Ventajas adaptativas.....	26
1.8.3. Rol como agentes de control biológico (ACB) en la agricultura y mecanismos antagónicos.....	30

2. HIPÓTESIS.....	44
3. OBJETIVOS.....	45
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
4.1. Materiales.....	46
4.1.1 Microorganismos.....	46
4.1.2. Medios de activación y cultivo.....	48
4.2. Metodologías.....	53
4.2.1. Crecimiento cepas BAL.....	53
4.2.2. Condiciones de crecimiento e inóculo de fitopatógenos.....	56
4.2.3 Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	57
4.2.4. Perfil de metabolitos.....	60
4.2.5. Ensayos de eficacia de biocontrol <i>in vivo</i>	61
4.2.6. Diseño experimental y análisis de datos.....	65
5. RESULTADOS.....	66
5.1. Actividad antagónica <i>in vitro</i>	66
5.1.1 Métodos de difusión en agar.....	66
5.1.2. Dilución en caldo.....	70
5.1.3 Cultivo dual.....	74
5.2 Perfil de metabolitos.....	77
5.2.1 Ensayos de neutralización y tratamientos enzimáticos.....	77
5.3 Ensayo de eficacia de biocontrol <i>in vivo</i>	81

5.3.1. Implementación de tratamientos preventivos/curativos además de técnica de liofilizado y uso de medio convencional MRS	81
6. DISCUSIÓN	95
7. CONCLUSIONES	118
8. PROYECCIONES	120
9. ANEXOS	122
10. REFERENCIAS	128



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de peste negra en nogal.	8
Figura 2. Síntomas de <i>Botryosphaeraeaceae</i> en nogal.	13
Figura 3. Vías metabólicas de bacterias ácido lácticas homofermentativas (línea continua) y heterofermentativas (línea punteada).	23
Figura 4. Mecanismos de compuestos inhibitorios de BAL.....	37
Figura 5. Modo de acción de bacteriocinas producidas por BAL.	40
Figura 6. Diferentes interacciones de aflatoxina B1 (AFB1) y los componentes de la pared celular de BAL.	42
Figura 7. Colonias de BAL.	47
Figura 8. Colonias fitopatógeno bacteriano y fúngico	48
Figura 9. Representación esquemática de los cuatro pasos específicos para el crecimiento de cepas BAL.....	54
Figura 10. Representación esquemática de ensayo de biocontrol in vivo en base a frutos de nogal.....	63
Figura 11. Actividad antibacteriana de especies BAL contra Xaj, a través de cuatro métodos de difusión	67
Figura 12. Halos de inhibición contra Xaj obtenidos a través de método de difusión con discos de agar de MRS y lactosuero de especies BAL.	68
Figura 13. Halos de inhibición contra Xaj, obtenidos a través de método de difusión en pocillo en base al SLC de LAPTg de especies BAL.....	69

Figura 14. Absorbancia obtenida desde diluciones del SLC de especies BAL sobre Xaj.	71
Figura 15. Dilución en caldo en medio LAPTg en base a distintas diluciones del SLC de <i>P. acidilactici</i>	72
Figura 16. Efecto antibacteriano del SLC de <i>P.acidilactici</i> sobre Xaj.....	73
Figura 17. Actividad antifúngica de especies BAL contra <i>D. mutila</i> a través de método similar al cultivo dual.	75
Figura 18. Colonias de <i>D. mutila</i> obtenidas luego de la aplicación de especies BAL a través de método similar al cultivo dual, luego de 7 días.....	77
Figura 19. Efecto del SLC de cepas <i>Weisella</i> sp. sobre Xaj.....	80
Figura 20. Efecto de SLC de <i>L. kunkeei</i> y <i>P. acidilactici</i> sobre Xaj.....	80
Figura 21. Evolución de infección causada por <i>D. mutila</i> en frutos de nuez.....	83
Figura 22. Síntomas de frutos de nuez generados por <i>D. mutila</i>	86
Figura 23. Diferencia de síntomas en frutos de nuez generados por <i>D. mutila</i> y control de infección por parte de especie probiótica liofilizada a los 21 días	87
Figura 24. Evolución de infección causada por Xaj en frutos de nuez.....	89
Figura 25. Síntomas en frutos de nuez generados por Xaj.	93
Figura 26. Diferencias de síntomas en frutos de nuez generado por Xaj y control de infección por parte de especie probiótica liofilizada a los 21 días	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Otros estudios de BAL como agentes de biocontrol en la agricultura.	34
Tabla 2. Especies BAL que se ensayaron en la investigación.....	46
Tabla 3. Composición de MRS	49
Tabla 4. Composición LAPTg	50
Tabla 5. Composición LB.....	50
Tabla 6. Composición PDA.....	51
Tabla 7. Lista de sustancias y reactivos utilizados en los experimentos.....	51
Tabla 8. Lista de equipos e instrumentos implementados en experimentos....	52
Tabla 9. Actividad inhibitoria de especies BAL contra Xaj.	70
Tabla 10. Inhibición de Xaj, en base a la absorbancia obtenida a partir de distintas diluciones del SLC de especies BAL.....	73
Tabla 11. Reducción del tamaño de colonia fúngica generado por <i>P. acidilactici</i> y <i>L. kunkeei</i> desarrolladas en tres medios de crecimiento.....	76
Tabla 12. Valor de pH del SLC del cultivo de cada especie BAL.....	78
Tabla 13. Actividad antimicrobiana del SLC de cepas BAL contra Xaj, aplicando tratamientos de neutralización y enzimas proteolíticas.	78
Tabla 14. Distribución de diámetros de infección (cm) en frutos de nuez en tratamientos preventivos-curativos en base al uso de bacterias lácticas contra <i>D. mutila</i>	84
Tabla 15. Diámetros de infección (cm) en frutos de nuez generada por <i>D. mutila</i> , a través del tiempo	84

Tabla 16. Distribución de diámetros de infección (cm) en frutos de nuez en tratamientos preventivos-curativos en base al uso de bacterias lácticas contra Xaj.....	91
Tabla 17. Diámetros de infección (cm) en frutos de nuez generada por Xaj, a través del tiempo.....	92
Tabla 18. Estimación de los efectos explicativos de la configuración de la experimentación dilución en caldo.	122
Tabla 19. Estimación de los efectos explicativos de la configuración de la experimentación cultivo dual.	123
Tabla 20. Estimación de los efectos explicativos de la configuración de la experimentación eficacia biocontrol <i>D.mutilla</i>	124
Tabla 21. Estimación de los efectos explicativos de la configuración de la experimentación eficacia biocontrol Xaj.	126

RESUMEN

Las Bacterias ácido lácticas (BAL), constituyen un amplio grupo de microorganismos ubicuos presentes en la naturaleza, las que se han caracterizado por presentar entre otras, propiedades antimicrobianas, lo que ha llevado a implementarlas como agentes de control biológico contra fitopatógenos, constituyendo una herramienta útil para una agricultura sostenible. En Chile, el nogal (*Juglans regia* L.), representa uno de los cultivos de mayor importancia económica, cuya producción se ha visto afectada dada la presencia de enfermedades como la peste negra y el cancro de la madera, causado por la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* y especies fúngicas de la familia *Botryosphaeraceae* como *Diplodia mutila* respectivamente, y cuyo manejo requiere de estrategias más sostenibles en la protección del cultivo. El objetivo de esta investigación fue estudiar las propiedades antagónicas de cepas BAL *in vitro* e *in vivo* hacia *Xaj* y *D. mutila* de nogal, relacionando los hallazgos con los compuestos antimicrobianos pesquisados. La actividad antagónica de cepas BAL, se evaluó a través de métodos de difusión en agar *in vitro*, implementando MRS, lactosuero y LAPTg para el desarrollo del pellet, cultivo directo y sobrenadante libre de células (SLC) de cada cepa láctica. Luego, para realizar un perfil de metabolitos se implementaron ensayos de neutralización y tratamientos enzimáticos del sobrenadante de aquellas cepas que generaron inhibición de su sobrenadante. Finalmente, los ensayos *in vivo* en frutos de nuez de las cepas que

mostraron antagonismo *in vitro* se evaluaron en base a tratamientos preventivos y curativos con el pellet de cepas desarrolladas en medio convencional MRS y lactosuero liofilizado. Los resultados evidenciaron que todas las cepas probadas, inhibieron *in vitro*, a Xaj y *D. mutila*, con una actividad de amplio espectro, destacando para este último, al pellet de *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus kunkeei*, en MRS y LAPTg, mientras que para Xaj no hubo significancias entre los parámetros evaluados. Se identificó a LAPTg como el medio óptimo para el desarrollo del SLC de todas las cepas BAL contra Xaj, destacando a *P. acidilactici*, cuya inhibición fue atribuida a la presencia de ácidos orgánicos y bacteriocinas. Con respecto a *L. kunkeei*, además de las anteriores, se debió a la presencia de peróxido de hidrogeno. Mientras que bacteriocinas y peróxido de hidrogeno caracterizó a las dos cepas de *Weisella* sp. Los ensayos *in vivo*, demostraron que el tratamiento preventivo en base al liofilizado de *P. acidilactici* generó una disminución de la infección a través del tiempo, ocasionada por *D. mutila*, mientras que tratamientos preventivos y curativos en base a liofilizado de una de las cepas de *Weisella* sp, demostró ser eficiente contra la infección de Xaj. Se concluye que cepas BAL presentan acción antagónica contra fitopatógenos de nogal, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, lo que se atribuye en parte a la presencia de variados metabolitos extracelulares contra Xaj, además de la posibilidad de estructuras o mecanismos presentes en la célula bacteriana que pudieron haber generado esta respuesta, al igual que contra *D. mutila*.

ABSTRACT

Lactic acid bacterias (LABs) constitute a broad group of ubiquitous microorganisms present in the nature, which have been characterized by presenting, among others, antimicrobial properties, which has led to their implementation as biological control agents against phytopathogens, constituting a useful tool for sustainable agriculture. In Chile, the walnut (*Juglans regia* L.), represents one of the most economically important crops, whose production has been affected by the presence of diseases such as, bacterial blight and wood canker caused by the bacterium *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and fungal species of the *Botryosphaeraceae* family such as *Diplodia mutila* respectively, and whose management requires more sustainable strategies in crop protection. The objective of this research was to study the antagonistic properties of BAL strains *in vitro* and *in vivo* towards Xaj and *D. mutila* from walnut, relating the findings to the antimicrobial compounds investigated. The antagonistic activity of BAL strains was evaluated through *in vitro* agar diffusion methods, implementing MRS, whey and LAPTg for the development of the pellet, direct culture and cell-free supernatant (CFS) of each lactic strain. Then, to perform a metabolite profile were implemented, neutralization tests and enzymatic treatments of the supernatant of those strains that generated inhibition of their supernatant. Finally, the *in vivo* tests on walnut fruits of the strains that showed *in vitro* antagonism, were evaluated based on preventive and curative treatments with the pellet of strains grown in

conventional MRS medium and lyophilized whey. The results showed that all the tested strains inhibited Xaj and *D. munita* *in vitro*, with a broad-spectrum activity, highlighting for the fungi the pellet of *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus kunkeei* in MRS and LAPTg, while for Xaj there were no significances between the parameters evaluated. LAPTg was identified as the optimal medium for the development of the CFS of all BAL strains against Xaj, highlighting *P. acidilactici*, whose inhibition was attributed to the presence of organic acids and bacteriocins. For *L. kunkeei*, in addition to the above, it was due to the presence of hydrogen peroxide. While bacteriocins and hydrogen peroxide characterized the two strains of *Weisella* sp. The *in vivo* essays showed that the preventive treatment based on lyophilisate of *P. acidilactici* generated a decrease in the infection over time, caused by *D. munita*, while preventive and curative treatments based on lyophilisate of one of the strains of *Weisella* sp, proved to be efficient against Xaj infection. It is concluded that BAL strains present antagonistic action against walnut phytopathogens, both in *in vitro* and *in vivo* essays, which is attributed in part to the presence of various extracellular metabolites against Xaj, in addition to the possibility of structures or mechanisms present in the bacterial cell that could have generated this response, as well as against *D. munita*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cultivo de nogal (*Juglans regia* L.)

La nuez persa (*Juglans regia* L.), es una especie arbórea perteneciente al género *Juglans* y a la familia *Juglandaceae*, clasificada en 21 especies que producen nueces comestibles. Se distribuye en Europa, Asia y América, en una amplia gama de condiciones geográficas. Es originaria de la península balcánica hacia el este, hasta la cadena occidental del Himalaya (Khan *et al.* 2020).

Es uno de los cultivos mayormente consumidos en el mundo, ha sido valorada por el ser humano desde tiempos antiguos dado su valor maderero, culinario y medicinal protagonizado estos últimos, por la alta composición de ácido alfa-linoleico (AAL), vitaminas, proteínas y minerales que han demostrado reducir el riesgo de enfermedades diabéticas y cardiovasculares entre otras, lo que ha determinado su reconocimiento como el “pan del futuro” (Božovic, *et al.* 2014, Hayes *et al.* 2016).

En los últimos diez años, la producción del fruto a nivel global, ha experimentado un alza de un 37%. Específicamente el continente asiático representa la mayor región productora del mundo con un 68,4%, seguida de América con el 19,1% del total de producción anual. China, Estados Unidos, Chile e Irán son los principales países productores de nueces con un 46, 27, 7 y 5% respectivamente (INC 2020). Solo para el año 2016, se estimó una producción anual mundial de

nueces de 3.763.725 toneladas métricas (TM), equivalentes a más de 14.000 millones de dólares estadounidenses (Shigaeva & Darr 2020).

A nivel mundial, el nogal presenta un gran número de variedades como Chandler, Serr, Tulare, Howard entre otras, las que se diferencian en tamaño, color y peso de su fruto, contenido de ácidos grasos y aceites del mismo, así como la floración, vigor y crecimiento del árbol. Específicamente, la variedad Chandler es la más conocida y apreciada en todo el mundo, el 90% de sus ramas son productivas, ofreciendo además rendimientos muy elevados. Su fruto se destaca por ser de gran tamaño, color claro y cascara fina, características apreciadas en el mercado que elevan su precio al más alto (Martínez *et al.* 2010).



1.2 Nogal en Chile

La nuez es uno de cultivos frutícolas más plantados en Chile, con una producción anual de 100.000 toneladas y una superficie total de 37.826 hectáreas (ha), solo es superada por la uva de mesa con 48.202 ha, pero es más alta que otros cultivos tradicionales como la cereza (25.109 ha), palta (30.078 ha) y manzana roja (29.052 ha) (Velasco Cruz 2018).

Se posiciona en el tercer lugar a nivel mundial, como los mayores productores del fruto. Solo para el periodo 2019/20 se estimó una producción de 70.000 toneladas métricas (TM), superando las 45.000 ha de plantación, la que va aumentando a un ritmo de 1.500 ha por año (INC 2020, USDA 2019).

La mayor concentración de área plantada se encuentra en la zona centro, específicamente en la región Metropolitana y O'Higgins con 19.647 ha, representando al 52% de la superficie, seguida por Coquimbo y Valparaíso con 11.815 ha equivalentes al 31%. Finalmente le sigue la zona sur integrada por las regiones del Maule, Biobío y la Araucanía con 6.364 ha equivalentes a un 17% de terreno plantado. Estas cifras, representan plantaciones que corresponden principalmente a las variedades Chandler, con 27.235 ha (72%), seguidas por la variedad Serr con 9.078 ha (24%) y el resto con 1.513 ha (4%), a otras variedades (Velasco Cruz 2018).

En cuanto a la producción del fruto, solo el 2% es destinado al consumo interno, principalmente en la industria de la confitería y como parte de la dieta dado los variados beneficios en la salud que presenta (Holscher *et al.* 2018). El resto, porcentaje mayoritario, corresponde a la exportación del fruto con 25.434 TM estimadas para el periodo 2019/20. Turquía y la Unión europea (Alemania), son los principales países de destino, con un 19,7% (23,94 TM) y un 14,5% (17,87 TM) respectivamente, estimados para el periodo 2017/18 (INC 2020, ODEPA 2017).

El gran crecimiento que ha experimentado la industria chilena de la nuez ha generado grandes expectativas a futuro, teniendo como objetivo una producción de 200 mil toneladas entre los años 2023 y 2025, el doble de la producción actual (Lemus & Osorio 2019). Sin embargo, esta gran expectativa no está exenta de grandes desafíos, ya que se ha observado que el precio actual, representa

alrededor del 50% del obtenido hace cuatro o cinco años atrás, lo que se debe a la competencia con otros productores, pero también a la existencia cada vez más notoria de enfermedades fitosanitarias que pueden llegar a alterar tales proyecciones, y en las que se debe poner cada vez más atención para asegurar una industria activa (Lemus & Osorio 2019).

1.3 Principales enfermedades fitosanitarias en el nogal

Durante el proceso de cultivo, los nogales a menudo se ven sometidos al ataque de varios patógenos que llevan al desarrollo de enfermedades que constituyen una real amenaza para la especie. Entre ellas se encuentra, la pudrición del cuello y la raíz provocada por especies del género *Phytophthora*, patógeno del suelo que ocasiona daños a nivel radicular, tejidos conductores (floema y xilema), además de daños en la región aérea como necrosis foliar, defoliación y clorosis, lo que eventualmente puede provocar la muerte del árbol (FIA & ChileNut 2010). Presenta una amplia extensión a nivel mundial, y en Chile predomina en regiones centrales del país (Guajardo *et al.* 2018).

Por otro lado, se encuentra la enfermedad de la peste negra, generado por el patógeno *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj). Es la enfermedad más grave en las principales áreas de producción a nivel mundial, llegando a pérdidas de un 80%, y una reducción del rendimiento de hasta un 70% ya que el patógeno invade órganos específicos de la planta, como hojas, ramas, tallos y principalmente frutos inmaduros (Lamichhane 2014). En Chile la incidencia de la

peste negra aumenta desde el norte al sur del país, favorecida por una mayor frecuencia de lluvias primaverales que influyen de manera importante en la enfermedad (Moya *et al.* 2018).

Varios estudios han identificado que la presencia de esta bacteria, estaría asociada con muchos otros hongos y bacterias patógenas, provocando enfermedades como la necrosis apical parda (BAN; en inglés Brown Apical Necrosis), a causa de hongos como *Fusarium* spp o *Alternaria* spp que afectan a frutos inmaduros principalmente. El cancro exudativo vertical (VOC; en inglés Vertical Oozing Canker) descubierto recientemente, donde se ha sugerido que su causa se debe a un linaje genético distinto dentro del patovar *juglandis*, caracterizándose por canchros verticales en troncos y ramas junto a la presencia de exudados en esa zona (Hajri *et al.* 2010). También se ha identificado por otro lado la enfermedad del cancro de la madera, donde estudios realizados en huertos de nogal en California, han identificado desde lesiones necróticas en frutos de nuez generados por la bacteria patógena, la presencia de especies de hongos pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae*, lo que ha sugerido que la bacteria puede ingresar por el extremo estilar del fruto, causar necrosis y favorecer posteriormente la entrada del hongo (Michailides *et al.* 2014).

Botryosphaeriaceae es una extensa familia que abarca diecisiete géneros, de los cuales seis afectan al nogal, provocando la enfermedad del cancro de la madera (Moral *et al.* 2019). Ésta, se caracteriza por presentar canchros en el tronco y ramas de árboles jóvenes, además de afectar brotes y cáscara de frutos, la cual es muy

susceptible al ataque de esta clase de hongos (Moral *et al.* 2019). A su vez este patógeno suele asociarse con otras especies de hongos que causan la enfermedad llamada Phomopsis provocadas por *Phomopsis* spp, que también afectan a brotes, ramas y tronco del nogal (Michailides *et al.* 2014, Moral *et al.* 2019).

Específicamente la peste negra, es la enfermedad más recurrente en el nogal, tanto a nivel mundial como nacional. En Chile, su incidencia aumenta desde el norte al sur del país donde condiciones climáticas de precipitaciones primaverales, favorecen el desarrollo de la enfermedad, y como se mencionó anteriormente, su presencia favorece la aparición de hongos como los de la familia *Botryosphaeriaceae*, la cual se considera de creciente y reciente aparición, distribuyéndose desde el valle de Aconcagua al sur del país (Moya *et al.* 2018, Lemus & Osorio 2019).

Dado estos antecedentes, la presente investigación se centrará en los dos fitopatógenos, bacteriano y fúngico antes mencionados.

1.4 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y peste negra

En Chile, la presencia de esta bacteria puede originar pérdidas por sobre 50% de la producción frente a la triada ambiental: lluvias frecuentes, alta humedad y amplio rango de temperaturas (Buchner *et al.* 2014). Sólo el 2014 se estimaron para la región del Biobío, pérdidas de 60% de la producción por esta causa

(Velasco-Cruz 2018). Para cuantificar el impacto económico de esta enfermedad se estima que con una producción de nueces de 5000 kg/ha a un valor de 4 dólares/kg (\$790/US\$) y una merma de sólo 10%, se traducen en \$1.580.000 de pérdidas (Velasco-Cruz 2018).

Xaj es una bacteria perteneciente al género *Xanthomonas* y a la subdivisión *Gammaproteobacteria* de tipo Gram negativa, bacilo aerobio obligado, móvil con un solo flagelo polar (Katuzna *et al.* 2021, Vauterin *et al.* 1995). La especie, junto a las que conforman al género, se caracterizan por generar un pigmento amarillo, la xanthomonadina que las protegería del daño fotobiológico causado a la hora de invadir su hospedero común, las plantas. Sus colonias son comúnmente pequeñas, redondas, brillantes y de aspecto mucoso, producto de la producción de xantano (Vauterin *et al.* 1995, An *et al.* 2019).

Como especie *X. arboricola*, se divide en siete patovares, algunos de los cuales son considerados como organismos de cuarentena en varios países, y son responsables de enfermedades en árboles de nueces y frutos de hueso presentes a nivel mundial, siendo específicamente *corylina*, *pruni* y *juglandis*, los más virulentos y económicamente más relevantes (Fisher-Le Saux *et al.* 2015, Hajri *et al.* 2012). Estudios recientes, indican que específicamente el patovar *juglandis* se asocia frecuentemente con necrosis apical y la causa más frecuente de infecciones en frutos inmaduros de nuez con síntomas visibles, siendo la producción de ácido gálico y sustancia de coloración oscura, lo que la diferencia del resto de los patovares, constituyendo la enfermedad de la peste negra,

(Moragrega & Özaktan, 2010). La enfermedad se presenta como manchas irregulares translúcidas que luego de un tiempo se tornan amarillo verdoso para finalmente necrosarse tanto en frutos principalmente, así como también en brotes, tallos y amentos, tal como se grafica en la figura 1 (Katuzna *et al.* 2021). Comúnmente la infección se presenta en un estado inmaduro del fruto, antes que su cascara se endurezca, así el fruto se marchita, mientras que, si ocurre tiempo después, se genera decoloración de la piel, y la infección no alcanza su interior (Giovanardi *et al.* 2016). La infección y colonización se da por medio de hidátodos en hojas, a través de estigmas en flores y en frutos a través de lenticelas, favorecido por condiciones de temperatura de moderada a elevada y alta humedad relativa (Buchner *et al.* 2014).



Figura 1. Síntomas de peste negra en nogal. A) lesión necrótica en fruto. B) necrosis en ramas y amentos. C) necrosis/cancro en tejido leñoso. Tomado de Katuzna *et al.* 2021.

La biología de las interacciones huésped-patógeno y los mecanismos que median los procesos de virulencia, aumento de susceptibilidad y/o la resistencia

que pueda generar el huésped, no están bien caracterizados aun, lo que conlleva a la aplicación de medidas poco eficientes a la hora de controlar la enfermedad, ya que la epidemiología de ésta, junto con el conocimiento del fitopatógeno es aún limitado (Kim *et al.* 2021, Sagawa *et al.* 2020). Sin embargo, de manera general, se ha documentado que la bacteria ha desarrollado mecanismos de virulencia que le han permitido inactivar los mecanismos de defensa del huésped presentes en el apoplasto, desencadenando la degradación y detención de su metabolismo biosintético (Kim *et al.* 2021). Específicamente para el género *Xanthomonas* se conocen estrategias como la secreción coordinada de exoenzimas que degradan la pared celular vegetal, como isoenzimas, proteasas, celulasas, poligalacturonasas y xilanasas, vinculadas al sistema de secreción tipo II (T2SS) (Szczesny, *et al.* 2010). Específicamente para Xaj, además de las anteriormente mencionadas, se han identificado otras como, esterasas, biotina carboxilasas, aminopeptidasas, hidrolasas, alfa xilosidasas y fosfolipasas además de oxidorreductasas y enzimas involucradas en el metabolismo energético y las vías de interconversión de aminoácidos, las que se asocian a la capacidad del patógeno para adaptarse al microambiente del huésped, además de contribuir a la virulencia bacteriana, trasladar factores de virulencia a las células vegetales y facilitar la adquisición de nutrientes. Además de los efectores tipo II, Xaj también emplea efectores de tipo III, como HopQ (XopQ), XopN y XopX que suprimen la respuesta inmunitaria del huésped (Sagawa *et al.* 2020).

Estas proteínas asociadas con diferentes sistemas de secreción, en conjunto con la estructura de pilus tipo IV y la capacidad de internalizar metabolitos e iones del tejido vegetal, denota la capacidad de *Xaj* para adaptarse a las condiciones adversas impuestas por el huésped, caracterizándolo como un patógeno bien adaptado y versátil (Sagawa *et al.* 2020).

Este patógeno bacteriano desencadena en el cultivo de nogal, una de las enfermedades más graves a nivel mundial, con un gran impacto económico debido a la posibilidad de infección de todos los órganos aéreos del árbol como hojas, tallos y frutos inmaduros principalmente, disminuyendo la efectividad de la producción del vivero, reducción de la calidad y rendimiento de la cosecha dado la caída prematura del fruto, además de generar manchas en la cascara y pardeamiento del grano de las nueces que están por caer, dificultando finalmente su comercio (Katuzna *et al.* 2021, Lamichhane 2014). A pesar de la gran problemática, existe escases de información en algunas áreas acerca de su presencia y efectos, lo que puede deberse a que no represente una problemática real entre los horticultores, escases de información científica o que ocurra solo en brotes locales y esporádico, tomando en cuenta que la enfermedad no se presenta de manera uniforme en el espacio y tiempo y es posible que no ocurra con regularidad ni con la misma gravedad en un área en distintos años (Katuzna *et al.* 2021).

El control de esta enfermedad es de carácter preventivo basado principalmente en el uso de agroquímicos utilizando principalmente cobre en conjunto a

ditiocarbamatos, específicamente el mancozeb, demostrándose altamente eficaz contra Xaj, ya que el cobre por sí solo genera resistencia por parte del patógeno dada la presencia de genes específicos que lo controlan, los llamados copLAB, requiriendo de su acción conjunta (Adaskaveg *et al.* 2010). En cuanto a manejo en base al método de control biológico, se han realizado pruebas en base a cocteles de bacteriófagos que son líticos contra Xaj, sin embargo, el efecto solo ha sido demostrado a través de ensayos *in vitro* (Domotor *et al.* 2016, Retamales *et al.* 2016). También se ha estudiado el uso de nanopartículas de plata y zinc donde se evidenció inhibición *in vitro* contra el patógeno, sin embargo, no se ha llegado a pruebas de campo, requiriéndose a su vez, de pruebas que evalúen las interacciones entre las nanopartículas con las plantas, el medio ambiente y un mejor desarrollo de estrategia, si es que fuera necesario (Ghadamgahi *et al.* 2014).

1.5 Botryosphaeraceae (*Diplodia mutila*) y cancro de la madera

Existen alrededor de veinte especies de hongos pertenecientes a la familia *Botryosphaeraceae* que se asocian a cultivos como almendros, olivo, pistacho y nocedales alrededor del mundo. Muchas de estas especies de la familia son predominantes en el cultivo, mientras que otras son de tipo secundaria (Moral *et al.* 2019). Varias de ellas pueden sobrevivir como endófitas en tejido asintomáticos y volverse patógenas cuando el huésped se encuentra bajo condiciones de estrés (Valencia *et al.* 2019).

Específicamente los géneros, *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, y *Neoscytalidium* afectan al nogal, siendo característicos en países o regiones específicas. En Chile, por ejemplo, se ha asociado recientemente a la enfermedad con el género *Diplodia*, específicamente la especie *Diplodia mutila* (Diaz *et al.* 2018). Ésta, pertenece a la división *Ascomycota* y son hongos de tipo filamentosos con abundante micelio aéreo, algodonoso de color oscuro con presencia de picnidios. Sus conidios o morfos asexuales son hialinos, septados o no septados, lisos de paredes gruesas, ambos extremos ampliamente redondeados, rara vez se vuelven de color marrón pálido. A su vez, presentan ascosporas o morfos sexuales, hialinos a pigmentados, lisos septados o no septados. (Phillips *et al.* 2013).

Las esporas son la principal fuente de inóculo de esta gran familia, donde recientemente se identificó que pueden pasar el invierno en tejidos sintomáticos (ramas, brotes, yemas, corteza de tronco y cascara de frutos) o en ramas caídas e infectadas en el suelo. Después de la infección del huésped, la mayoría de los síntomas aparecen en primavera y principios del verano cuando la temperatura aumenta. Los síntomas se observan como lesiones necróticas y hendiduras en tejidos lignificados en los que aparecen exudados de manera gradual a medida que las condiciones ambientales así lo favorezcan. Los troncos de árboles jóvenes y ramas de árboles maduros se ven importantemente afectados, además de evidenciarse una muerte regresiva de espolones, resultado de la infección que se

mueve desde el fruto. Las cascarras de nuez son muy susceptibles a la infección por esta familia de hongos, los cuales generan infecciones latentes en frutos en desarrollo y lesiones de color negrozco- marrón en frutos maduros. Las lesiones avanzan rápidamente llegando a consumir el fruto por completo. Por lo general las lesiones se limitan a la cascara, pero algunas especies pueden llegar a colonizar el grano (Moral *et al.* 2019, Gusella *et al.* 2020). Estos síntomas se muestran a continuación en la figura 2.

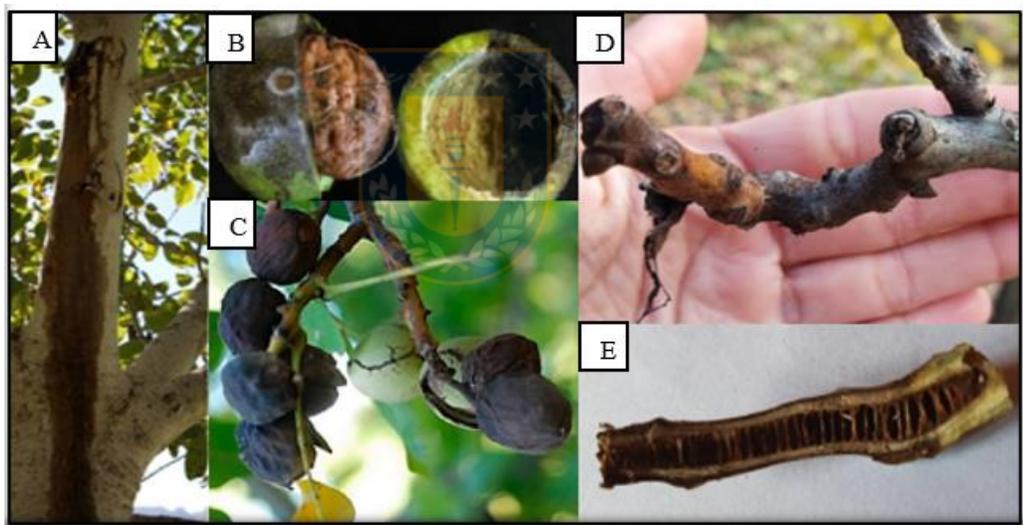


Figura 2. Síntomas de *Botryosphaeraceae* en nogal. En el panel A, se muestra la exudación en corteza. En el panel B y C se muestra pudrición interna y externa en frutos de nuez. En D y E canchros en la cara externa e interna de brotes. Tomada de Gusella *et al.* 2020 (A y B), Moral *et al.* 2019 (C) y fotografías propias (D y E).

La patogenicidad de algunas especies del género *Diplodia* está determinada por proteínas como la glucosidasas y peptidasas que degradan los polisacáridos y proteínas de la pared celular vegetal, permitiendo su entrada en la célula, además

de estar asociadas en la inactivación de la respuesta de defensa de la planta y el establecimiento de la infección. Proteínas NEP (Necrosis and Ethylene inducing Protein) o inductores necróticos por su lado, son las que se vinculan con los síntomas de necrosis en diferentes órganos de la planta, garantizando la supervivencia del hongo, además de generar en ésta una respiración celular alterada y muerte celular localizada (Chethana *et al.* 2016). Por otro lado, para *D. mutila* se ha determinado la producción de metabolitos fitotóxicos como tirosol y R-(-)-mellein (dihidroisocumarina), a los que se le atribuyen altos niveles de toxicidad que pueden generar necrosis severa y marchitamiento en distintos órganos de su huésped (Reveglia *et al.* 2018).

Dada la asociación que se genera entre esta enfermedad y otros patógenos, se ha generado un problema aun mayor a la hora de estimar las pérdidas económicas de esta enfermedad, ya que por un lado es difícil separar los daños causados por especies de *Botryosphaeriaceae*, de la causada por Phomopsis, por ejemplo, y por otro lado la primera se asocia frecuentemente con nueces que muestran un deterioro debido a causas naturales o presencia de plagas en nucedales bien mantenidos, dificultando importantemente dilucidar su etiología (Michailides *et al.* 2014, Moral *et al.* 2019).

El manejo de esta enfermedad, suele controlarse con premezclas de fungicidas sintéticos como estrobilurinas y carboxamidas resultando altamente eficaces, seguido de dicarboximidas, acompañado de métodos culturales (Adaskaveg *et al.* 2017). Estrategias de control biológico apenas se han estudiado para especies

de la familia, sin embargo, cabe mencionar estudios realizados en base al uso de hongos microparásitos del género *Trichoderma* en almendro, como método de control biológico, obteniéndose resultados ineficientes contra los patógenos analizados (Michailides *et al.* 2006).

1.6. Manejo integral de enfermedades fitopatógenas

Es un gran desafío lograr una gestión eficaz de enfermedades tanto bacterianas como fúngicas en plantas, requiriendo de una comprensión completa de sus patosistemas. Reportes han indicado que tratamientos preventivos de cultivos, es una estrategia recomendada para evitar la llegada y propagación de patógenos a las plantas hospederas, en sustitución a la falta de tratamientos curativos (Daranas *et al.* 2018, Mewa-Ngongang *et al.* 2021). El manejo integrado de plagas (MIP), es definido según la FAO como la cuidadosa consideración de todas las técnicas de control de plagas disponibles y la posterior integración de medidas apropiadas que disminuyan el desarrollo de poblaciones de plagas, manteniendo plaguicidas y otras intervenciones a niveles económicamente justificados de manera de reducir o minimizar los riesgos para la salud humana y el entorno. Da énfasis al crecimiento de cultivos saludables con la menor alteración posible de los agroecosistemas, fomentando el uso de mecanismos naturales de control, integrando acciones tanto preventivas como curativas (FAO 2019, Green *et al.* 2020).

Es uno de los enfoques deseables al momento de tratar enfermedades fitopatógenas, lo que incluye prácticas culturales y la intervención de control químico y/o biológico junto al apoyo de modelos de predicción de enfermedades en plantas, representando en conjunto, la mejor estrategia para el manejo de ellas de manera eficaz y sostenible (Barzman *et al.* 2015).

Dentro de las prácticas culturales, cuyo objetivo es reducir el riesgo de infección, el inóculo del patógeno, gravedad e incidencia de la infección y el control de la propagación de la enfermedad, se encuentran las practicas adecuadas de riego y fertilización, poda, rotación de cultivos y eliminación de plantas infectadas aplicado en algunas especies de la familia *Botryosphaeraceae* (Moral *et al.* 2019, Khoury & Makkouk 2010).

En cuanto a estrategias de control químico, las más utilizadas han sido en base a formulaciones de cobre (oxicloruro de cobre, sulfato de cobre e hidróxido de cobre) en algunas especies de genero *Xanthomonas* y *Pseudomonas* además de antibióticos (estreptomycin y oxitetraciclina) a objeto de eliminar eficazmente poblaciones epifitas de bacterias (Lamichhane 2014, Cameron & Sarojini 2013). Sin embargo, su uso genera problemas de fitotoxicidad, contaminación ambiental y alimentaria además de generar poblaciones resistentes, provocando incluso que muchas de ellas mantengan la patogenicidad como estrategia de supervivencia en condiciones ambientales adversas. El uso de antibióticos por su lado, pueden generar también resistencia. La preocupación por los efectos nocivos que tienen gran parte de los plaguicidas químicos, ha incentivado a la

búsqueda de herramientas efectivas, sostenibles y más seguras para gestionar estas enfermedades en cultivos de gran importancia económica (Raymaekers *et al.* 2020, Lamont *et al.* 2017).

El control biológico por su parte, o también denominado biocontrol, es un método valioso a través del uso de bioplaguicidas en el manejo integrado de enfermedades en plantas. Estos bioplaguicidas contienen agentes de control biológico (ACB), que generalmente incluyen microorganismos benéficos, compuestos derivados de su metabolismo, así como productos naturales, subproductos o extractos de plantas, como ingredientes activos, que suprimen finalmente el patógeno o la plaga (Harman & Kubicek 2014).

En cuanto a los modelos de predicción suelen ser específicos para una enfermedad en particular, basándose en información acerca del clima, cultivo y patógeno en sí, a objeto de orientar aplicaciones de bioplaguicidas o productos alternativos de la manera más eficaz, evitando así, pulverizaciones de bactericidas innecesarias, reduciendo costos del cultivo, lo que beneficiaría la sustentabilidad económica y ambiental del sistema (Bombelli *et al.* 2012).

1.7 Biopesticidas antimicrobianos

Los biopesticidas se elaboran a partir de ACB, lo que son capaces de reducir la densidad de la población o el impacto de la plaga o patógeno en específico (Glare *et al.* 2012).

Tomando en cuenta el uso de ACB en base a microorganismos benéficos, diversos estudios han demostrado que aquellos microorganismos filogenéticamente diversos, pueden actuar como antagonistas exitosos de varios fitopatógenos, entre los cuales se destacan los géneros bacterianos de *Bacillus*, *Pseudomonas*, amplio grupo de bacterias ácido lácticas (BAL), rizobacterias, hongos del género *Trichoderma* y levaduras como *Candida* y *Saccharomyces* entre otras (Raymaekers *et al.* 2020).

Es importante considerar a la hora de seleccionar un microorganismo antagonista algunas características generales como, la capacidad de colonizar la superficie de la planta y persistir de manera efectiva, capacidad de sobrevivir en diferentes condiciones ambientales y superar la capacidad que tenga el patógeno para obtener nutrientes, y por otro lado, de manera más específica influye la estabilidad genética que presente, que no requiera elementos nutricionales específicos, que pueda crecer en grandes cantidades en un medio económico, permanencia de viabilidad por largo periodo de tiempo, fácil de aplicar y que no genere compuestos secundarios que causen daño a la salud humana (Ulloa-Ogaz *et al.* 2015).

Los microorganismos antagonistas pueden mantenerse mediante interacciones directas e indirectas con el patógeno. Las interacciones directas incluyen; a) competencia por nutrientes o espacio, b) antagonismo a través de la producción de compuestos antimicrobianos o enzimas líticas (antibiosis), c) parasitismo o d) efectos anti Quorum Sensing (Andrew 1992, Helman & Chernin 2015). De forma

indirecta, el agente de control puede actuar mediante el mejoramiento de los mecanismos de defensa del huésped, desencadenando una resistencia sistémica inducida (RSI) generada por bacterias que promueven el crecimiento, y potencian el sistema inmune y de defensa del hospedero, realizada en varias ocasiones por las llamadas plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPRs), pero también lo realizan hongos de los géneros *Trichoderma* y de tipo arbusculares simbióticos (Raymaekers *et al.* 2020). Se destacan como estrategias emergentes de biocontrol contra fitopatógenos, el uso de ACB seleccionados o la ingeniería del microbioma (Foo *et al.* 2017).

Para lograr el desarrollo de biopesticidas antimicrobianos, es necesario realizar bioensayos primarios que consisten en aislar y seleccionar microorganismos antagonistas capaces de suprimir los patógenos objetivos y reducir los niveles de enfermedad, para esto se requiere implementar ensayos *in vitro*, que sean simples, rápidos y reproducibles como métodos de cultivo dual, difusión en agar, o métodos en medio líquido (Raymaekers *et al.* 2020, Cesa-Luna *et al.* 2019, Daranas *et al.* 2018). Estos permiten seleccionar una cantidad reducida de candidatos prometedores que puedan ser implementados para su posterior análisis en ensayos de campo, el cual es antecedido en varios estudios por ensayos *in vivo* bajo condiciones controladas. Éstos, pueden realizarse utilizando plantas o bien órganos de éstas, lo que requiere de menos espacio y tiempo, y es recomendado cuando el patógeno a evaluar infecta de manera importante a órganos específicos en el hospedero (Raymaekers *et al.* 2020). Una vez

seleccionadas las cepas candidatas se procede a la caracterización de ellas aun a nivel de laboratorio, por medio de su identificación además de un nivel fenotípico, también a uno genotípico, conocer además sus mecanismos de acción, y luego proceder a realizar ensayos piloto (campo e invernadero) en diferentes condiciones ambientales (Montesinos 2003). Posteriormente, para consolidar el producto de manera comercial, se debe generar la producción de masa adecuada y formulación del producto (sólido-líquido), realizar ensayos de bioseguridad e impacto ambiental e implementación de métodos específicos de monitoreo que logren identificar la dinámica poblacional del microorganismo liberado y su persistencia en el tiempo (Segarra *et al.* 2015, Daranas 2018). Finalmente, para comercializar el producto se deben adaptar reglamentos y autorizaciones de acuerdo al país correspondiente. En Chile de acuerdo a Resolución Exenta n°9074, que establece condiciones y requisitos para autorizar plaguicidas microbianos para comercialización (SAG 2018).

El uso de biocontrol como método alternativo a la implementación de productos químicos, requiere de consideraciones naturales y económicas para el manejo eficiente de enfermedades en plantas como lo son la eficacia de su uso, el cual está altamente asociado con el modo de acción del agente, además de propiedades naturales como especificidad y persistencia en entornos con diversas condicionantes ambientales (Compant *et al.* 2019). También es importante considerar su durabilidad, sustentabilidad ecológica y la consideración de incentivos económicos y prácticos a la hora de su aplicación, es decir, que

constituya una tecnología fácil de evaluar y lista para usar, conduciendo a ventajas económicas en relación con otras, en términos de relación de oferta, demanda y rentabilidad (He *et al.* 2021).

Al caracterizar al método, constituye una herramienta de aplicación prometedora dentro del sector agrícola, ya que presenta ventajas en termino de sostenibilidad, toxicidad, modos de acción y costos en comparación a los químicos. Específicamente se descomponen rápido en el medio ambiente y son menos tóxicos para aquellos patógenos no blanco, además, debido a que presenta modos de acción distintos a los productos químicos, contribuyen a suprimir aquellos patógenos resistentes, además de evitar posibles problemas de fitotoxicidad en el hospedero. Los costos son más bajos en comparación a los plaguicidas químicos ya que estos requieren de estudios ecotoxicológicos estrictos como parte del proceso de registro (Raymaekers *et al.* 2020, Daranas *et al.* 2018). Sin embargo, algunos de sus limitantes radican a que el proceso es más lento por parte de los ACB para suprimir la enfermedad que los productos sintéticos o la inconsistencia en la eficacia de los ensayos en condiciones de campos por factores bióticos y abióticos también es considerado un inconveniente (Bhattacharyya *et al.* 2016, Daranas *et al.* 2018, Bale *et al.* 2008). En Chile el uso de biocontroladores forma parte de un mercado que incluye varios tipos de productos aceptados por la agricultura orgánica, destacando a extractos de origen vegetal, aceites minerales y microorganismos (bactericidas y fungicidas), entre los que destacan los géneros *Bacillus*, *Trichoderma*, y

Agrobacterium, los cuales son aprobados como sustancias activas en el manejo de enfermedades en cultivos agrícolas (SAG, 2021).

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, existen algunos grupos bacterianos como potenciales antagonistas exitosos, dentro de los cuales destacan bacterias ácido lácticas, las cuales se describen a continuación.

1.8. Bacterias ácido lácticas

1.8.1. Usos potenciales.

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son un diverso y amplio grupo de bacterias reconocidas por su uso en áreas como la biorrefinería integrada (Mazzoli *et al.* 2014). La mayoría pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli* y orden *Lactobacilales*. Este último incluye seis familias, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Streptococcaceae* y *Aerococcaceae*, más de 30 géneros y más de 300 especies, número que ha ido en aumento ya que se han identificado otras nuevas. El género *Bifidobacterium* (familia *Bifidobacteriaceae*), también se incluye en el grupo de BAL, aunque pertenece al filo *Actinobacteria* (Rodríguez *et al.* 2019).

Son cocos o bacilos Gram positivos, anaerobios, aerotolerantes, ácido tolerantes y catalasa negativos. Una característica distintiva es la producción de ácido láctico como producto principal de su metabolismo fermentativo a partir de

carbohidratos (figura 3). Dado la falta de un sistema respiratorio funcional, estas bacterias obtienen energía desde la fosforilación a nivel de sustrato siguiendo dos rutas metabólicas principales, la homofermentativa y heterofermentativa, las que se diferencian principalmente por el producto generado, la primera se basa en la producción de ácido láctico y la segunda genera CO₂, acetato, etanol además de ácido láctico (Von Wright & Axelsson *et al.* 2019).

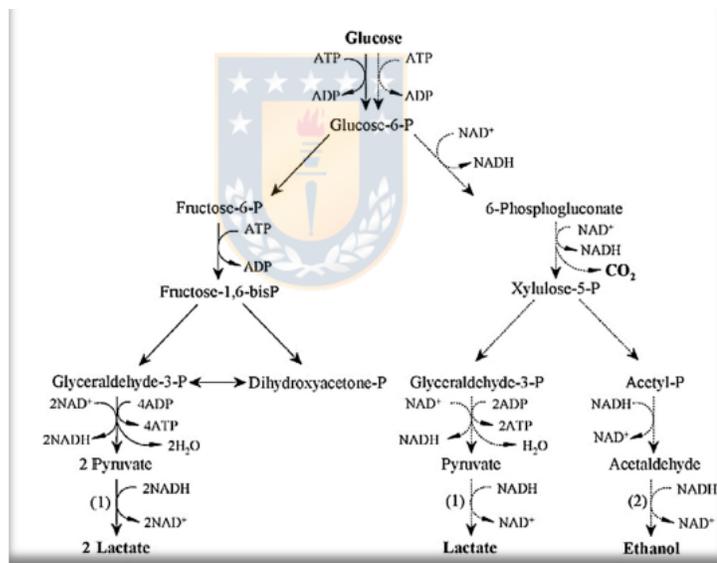


Figura 3. Vías metabólicas de bacterias ácido lácticas homofermentativas (línea continua) y heterofermentativas (línea punteada). P, fosfato; ADP, adenosina 5'-difosfato; ATP, adenosina 5'-trifosfato; NAD⁺, dinucleótido de nicotinamida y adenina; NADH, dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida); (1), lactato deshidrogenasa; (2), alcohol deshidrogenasa. Tomado de Wee *et al.* 2006.

Estas bacterias son ubicuas y están muy extendidas en la naturaleza donde habitan una gran diversidad de nichos ricos en nutrientes, como alimentos, plantas, suelos, humanos, animales entre otros (George *et al.* 2018). Debido a su metabolismo versátil y su capacidad para sintetizar metabolitos beneficiosos, además de ácido láctico, BAL se utilizan ampliamente en biotecnología, alimentos, productos terapéuticos además de ser utilizados como agentes antifúngicos, antibacterianos, antimicotoxigénicos, productores de nutraceúticos y probióticos. Tales características han llevado a considerar a algunas cepas como Generally Recognized as Safe (GRAS) por la United States Food and Drug Administration (FDA) y Qualified Presumption of Safety (QPS) por la European Food Safety Agency (EFSA), eximiéndolo de los costosos y prolongados procesos de aprobación regulatoria (Daranas *et al.* 2018, Lutz *et al.* 2012).

Uno de los usos mayormente utilizados de estas bacterias es en sistemas de fermentación cuyo objetivo principal es la obtención de ácidos orgánicos (ej., ácido láctico), péptidos bioactivos, entre otros, los cuales son uno de los variados metabolitos extracelulares que se generan como subproducto de la actividad metabólica microbiana, cuya producción depende en gran medida de condiciones ambientales como pH, temperatura, nutrientes y sustratos simples. Estos productos presentes en el sobrenadante libre de células (SLC), se pueden separar fácilmente por técnicas como centrifugación y posterior filtración (Mora-Villalobos *et al.* 2020). Son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, como conservantes de alimentos, potenciador del sabor, antioxidante y agentes

antimicrobianos, también en la industria de la cosmética en la elaboración de productos para la piel y en la industria de medicina y farmacia como comprimidos, inmunoestimulantes y productos de higiene y estética entre otros (Mora-Villalobos *et al.* 2020, Abedi & Bagher Hashemi 2020).

Además de los productos del sobrenadante, parte de la biomasa de BAL es considerado con alto potencial probiótico, lo que le otorga un mayor valor agregado al producto que se quiera generar, como lo es el ácido lipoteicoico (LTA; Lipoteichoic Acid), que posee propiedades anti biofilm con el potencial de tratar o prevenir enfermedades infecciosas (Ryu *et al.* 2009). De acuerdo a la Food and Nutrition Security Foundation (FAO) y a la World Health Organization (WHO), los probióticos son “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped” (Cuevas-González *et al.* 2020, Barros *et al.* 2020, Hill *et al.* 2014). Recientemente se sugirió el termino de “probiótico verdadero” para referirse a aquellos microorganismos activos y viables que muestran efectos tanto *in vitro* como *in vivo* (Zendeboodi *et al.* 2020). Varias especies del genero *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* entre otros, han sido reconocidos como tal (Khaneghah *et al.* 2020). Este concepto no solo es aplicable a la salud humana, sino que también a la salud de las plantas o cultivos agrícolas de gran importancia donde también estas bacterias han sido ampliamente evaluadas para su posterior implementación. En este sentido, BAL son miembros ubicuos en un gran número de microbiomas vegetales, sin

embargo, existe poca información acerca de la interacción existente entre ellos y su huésped, lo que contrasta con el amplio conocimiento que existe acerca del rol de estas bacterias en el procesamiento de alimentos (Lamont *et al.* 2017).

1.8.2. Adaptabilidad de BAL al nicho e interacción ecológica con plantas.

Ventajas adaptativas.

Es importante destacar la importancia de comprender la relación ecológica entre las plantas y BAL, incluyendo los nichos ecológicos que ocupan en la naturaleza, de manera de aprovechar los beneficios que entregan este tipo de bacterias, para mejorar la producción agrícola (Lamont *et al.* 2017).

Estudios genómicos en miembros de BAL han confirmado una amplia diversidad fenotípica y genética, caracterizado esta última, por una tendencia general en la reducción de genes que estaría relacionado estrechamente con la transición a entornos ricos en nutrientes, sin embargo, existen familias de genes que se expandieron por medio de la duplicación de ellos o la adquisición de genes parálogos a través de la transferencia horizontal de genes (THG), factores que determinarían la extraordinaria adaptabilidad a nichos con variadas condiciones ambientales contrastantes (temperatura, pH, microorganismos competidores y nutrientes disponibles), imponiendo una diseminación generalizada de BAL en diferentes entornos como el medio ambiente, lácteos, tracto gastrointestinal humano como animal entre otros (Stefanovic *et al.* 2017, Makarova *et al.* 2006).

Recientemente se ha identificado como modelo evolutivo, una clasificación de BAL en aquellas de tipo generalistas y especialistas, las que difieren principalmente en un mayor y menor tamaño de su genoma y rutas metabólicas respectivamente, lo que les permite adaptarse a diferentes o a mayor o menor números de nichos de acuerdo a las modificaciones experimentadas a nivel genético (Zheng *et al.* 2015, Molenaar *et al.* 2005, Duar *et al.* 2017, Yu *et al.* 2020). En plantas, por ejemplo, BAL de tipo generalistas, se pueden encontrar los géneros de *Lactobacillus*, *Weisella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, mientras que de tipo especialista se encuentran algunas especies del género *Weisella*, *Lactobacillus* y *Fructobacillus*. Varias especies de estos dos últimos géneros se clasifican como BAL fructófilo, conocidas por su metabolismo fructófilo en oposición al glucófilo, el cual se puede dar, sin embargo, su crecimiento es muy pobre. Se destaca en este grupo a *L. kunkeei* y *L. apinorum* (Endo *et al.* 2018).

Las plantas interactúan con una gran variedad de comunidades de microorganismos benéficos, benignos y patógenos en el medio ambiente, por lo que deben poder distinguir entre los miembros de dichas comunidades para lograr optimizar su crecimiento. Si la relación entre la planta y el microorganismo es benéfica para la primera, dicha relación puede ser promovida a objeto de mejorar la producción agrícola (Lamont *et al.* 2017). BAL han sido encontradas ampliamente en la filosfera, caulosfera, antosfera, carposfera, rizosfera y endosfera de una gran variedad de plantas, identificándose especies de los

géneros anteriormente mencionados, además de *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*, como los más frecuentes en tejidos de plantas, cuya concentración varía entre 10^3 - 10^8 células g^{-1} en porciones aéreas (Rastogi *et al.* 2012, Remus-Emsermann *et al.* 2014) y hasta 10^{11} células g^{-1} en la rizosfera (Berendsen *et al.* 2012). Las plantas son consideradas como entornos desafiantes para gran parte de los microorganismos, debido a la baja disponibilidad de nutrientes, agua, exposición a radiación ultravioleta, temperatura, estrés oxidativo, además de la morfología, composición química y microorganismos presentes en el huésped, debiendo las bacterias asociadas a ellas, poseer adaptaciones específicas que les permitan su crecimiento y sobrevivencia (Wagner *et al.* 2016, Muller *et al.* 2016).

BAL, son consideradas exitosas colonizadoras de plantas, ya que las principales fuentes de carbono utilizadas por estas bacterias, como la fructosa, glucosa y sacarosa son abundantes en áreas como la filosfera y néctar floral oscilando en valores de $12,5 \mu g^{-1}$ en hojas o $38 g/100 mL$ respectivamente (Mercier & Lindow 2000, Canto & Herrera 2012). Además, se encontró que varias especies de BAL son capaces de descomponer azúcares solubles como la xilosa, arabinosa y hemicelulosa presentes en tejido vegetal (Ganzle 2015).

Por otro lado, se ha identificado que, si bien BAL dependen del metabolismo fermentativo para sobrevivir, algunas especies pueden realizar respiración aeróbica permitiéndoles desarrollarse en tejidos vegetales externos. Hasta la

fecha queda por demostrar la importancia del metabolismo respiratorio en el crecimiento de BAL sobre tejidos vegetales (Filannino *et al.* 2018).

También se destacan para algunos géneros como *Lactobacillus* y *Weissella* la capacidad de tolerar altos niveles de compuestos fenólicos vegetales antimicrobianos debido probablemente a la conversión de éstos, en metabolitos menos tóxicos por la acción de compuestos específicos, utilizándolos finalmente como aceptores de electrones externos (Filannino *et al.* 2014)

Además de esta capacidad, se ha identificado la producción de compuestos similares a hormonas vegetales (ej. 2,3-butanodiol y acetoína) así como también la producción neta de ácido indol acético (AIA), por algunas especies de *Lactobacillus*, que influirían en la fisiología de las plantas, categorizándolos como bioestimulantes de varios cultivos agrícolas de importancia (Goffin *et al.* 2010, Mohite 2013, Shrestha *et al.* 2014).

Varias especies de BAL también son osmotolerantes, permitiéndoles adaptarse a entornos con baja disponibilidad de agua, como los encontrados sobre la superficie de las hojas, lo que se asocia al aumento en el transporte de solutos compatibles (trehalosa o betaína entre otros), además de la síntesis de proteasas, chaperonas y peptidoglicano (Papadimitriou *et al.* 2016, Nwodo *et al.* 2012).

Finalmente, la acción antimicrobiana que presentan BAL, también podría contribuir a la colonización de hábitat en plantas, identificándose en géneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*,

Weisella y *Enterococcus* la producción de compuestos inhibitorios e inducción de defensa del huésped, lo que tendría acción contra fitopatógenos bacterianos y fúngicos, protagonistas de graves enfermedades en cultivos agrícolas, otorgándoles la capacidad de un potencial uso como ACB (Alvarez-Sieiro *et al.* 2016, Gajbhiye & Kapadnis 2016).

1.8.3. Rol como agentes de control biológico (ACB) en la agricultura y mecanismos antagónicos.

Como se mencionó anteriormente uno de los principales mecanismos de acción antimicrobiano identificados para potenciales antagonistas sobre patógenos en plantas, son de tipo directo e indirecto, en base a antibiosis y RSI respectivamente (Andrew 1992, Helman & Chernin 2015, Raymaekers *et al.* 2020). Los compuestos antimicrobianos principales identificados en BAL, incluyen, ácidos orgánicos (ácido láctico, acético, cítrico, málico y fumárico), peróxido de hidrogeno, etanol, CO₂, bacteriocinas, sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas y otros metabolitos con importante actividad antagónica contra patógenos de tipo bacteriano y fúngico, siendo la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico y acético) el principal mecanismo de control (Mani-López *et al.* 2022, Ouwehand & Vesterlund 2004). Dada esta gran diversidad de compuestos encontrados en el sobrenadante de BAL, la contribución individual de cada uno de ellos, además de sus mecanismos de

acción, han sido difíciles de comprender, debido a los posibles efectos aditivos y sinérgicos entre ellos (Siedler *et al.* 2019, Stoyanova *et al.* 2012, Gupta & Srivastava 2014). La RSI en cambio, tiene relación con la capacidad defensiva y resistencia contra una gran variedad de patógenos por parte de la planta, identificándose en algunos estudios que la acción de BAL, puede potenciar la actividad de enzimas como fenilalanina amonio liasa (PAL), peroxidasa (POX) y polifenol oxidasa (PPO) por parte de la planta, y que estarían relacionadas con la síntesis de compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana, reduciendo la enfermedad sobre un 50% (Chen *et al.* 2000, Konappa *et al.* 2016). Por otro lado, además de la actividad antibacteriana, BAL posee acción antifúngica contra un amplio espectro de hongos, el cual no solo se limita a inhibir su crecimiento, sino que algunas cepas BAL, además, interactúan con las micotoxinas fúngicas, lo que provoca su inactivación o eliminación a través de la unión a la pared celular (Ahlberg *et al.* 2015, Blagojev *et al.* 2012).

Esta capacidad ha permitido el amplio uso de estas bacterias en la agricultura, cuyo rubro se ha visto importantemente afectado desde el año 2015 por efectos del cambio climático y presencia de plagas, esta última según la FAO es responsable de un 40% de pérdidas anuales a nivel mundial, constituyendo una real amenaza para la continuidad en la disponibilidad de recursos indispensables para el ser humano, siendo fundamental dar soluciones eficientes a ello (Holtappels *et al.* 2021). Dado esto, numerosas investigaciones en base al uso de BAL se han llevado a cabo como una prometedora alternativa efectiva y

segura para enfrentar enfermedades fitopatógenas, disminuyendo así el uso de agroquímicos.

Shrestha, *et al.* (2014), estudiaron la eficacia de tres cepas BAL, contra el patógeno de la mancha bacteriana *X. campestris* pv. *vesicatoria* en *Capsicum annuum* L. var. *annuum* (pimiento). Los resultados mostraron que las tres cepas tuvieron una alta capacidad antagónica *in vitro* con halos de inhibición mayores a los 10 mm. En condiciones de invernadero la mejor cepa redujo en un 73.9% la enfermedad y en campo lo hizo en un 94.5%, mientras que las demás tuvieron un desempeño sobre el 50 y 70 % de reducción de la enfermedad en invernadero y campo respectivamente.

Daranas *et al.* (2018), analizaron 55 cepas BAL para evaluar el efecto antagónico tanto *in vitro* como *in vivo* en condiciones de invernadero, vivero y campo, frente a los fitopatógenos *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) que afecta al kiwi, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap) en almendro y *Xanthomonas fragariae* (Xf) en fresa. Los resultados *in vitro* demostraron que *Lactobacillus plantarum* cepas CC100, PM411 y TC92, y *Leuconostoc mesenteroides* CM160 y CM209, generaron halos de inhibición mayor a 10 mm en los tres patógenos, atribuyendo su efecto antagónico a la acción de ácidos orgánicos. En condiciones controladas de invernadero, al evaluar la capacidad de estas cepas para prevenir la acción de los patógenos, se demostró una alta eficacia, específicamente para las cepas de *L. plantarum* las que redujeron consistentemente la enfermedad de los tres patógenos en sus respectivas plantas variando de 35.4 a 96.3%. En vivero,

destacó la acción de la cepa PM411 que redujo de 63.6 a 75% la acción de Xf en fresa y en cultivo comercial de kiwi, su acción redujo en 50.5% la aparición de la enfermedad.

Por otra parte, Zakaria *et al.* (2018), aislaron e identificaron especies de BAL de bagre fermentado, identificando principalmente especies del género *Lactobacillus*, de las cuales se determinó su actividad antifúngica *in vitro* contra *Sclerotium rolfsii*, patógeno fúngico presente en suelo de plantas de pimiento. Los resultados mostraron que 4/9 aislados de *L. plantarum* tuvieron actividad inhibitoria de 60 a 64.7%, la que se asoció a la presencia de bacteriocinas, específicamente proteínas de unión a quitina.

Chen *et al.* (2020), realizaron evaluación *in vitro* e *in vivo* de la actividad de biocontrol de BAL endófitos, aislados de la fresa contra *Botrytis cinerea*, que causa infección principalmente durante el almacenamiento post cosecha del fruto. Los resultados *in vitro* mostraron que *L. plantarum* CM-3 redujo el crecimiento micelial de *B. cinérea* de 55 a cerca del 80%, mientras que los ensayos *in vivo* demostraron que a concentraciones de 1×10^9 UFC/ml de *L. plantrum* se redujo 75% la presencia del hongo en estas plantaciones.

De Simone *et al.* (2021), identificaron a nivel molecular 300 cepas BAL previamente aisladas de masa madre tradicional para luego evaluar su acción antagónica *in vitro* e *in vivo* contra *B. cinérea* que afecta también a frutos de kiwi durante el almacenamiento. Los resultados evidenciaron que el 2% de cepas BAL pertenecientes a *Lactiplantibacillus plantarum* ejercieron un fuerte antagonismo

contra el hongo con halos de inhibición sobre los 10 mm en ensayos *in vitro* además de identificar parcialmente que la inhibición se debía a la presencia de ácido láctico presente en el sobrenadante libre de células, el que además demostró un retraso del crecimiento del hongo de hasta un 80% a las 24 h, en pruebas *in vivo* de kiwis infectados.

Estos estudios evidencian que BAL han sido un amplio foco de investigación en la agricultura. En la tabla 1 se incorporan otros reportes de BAL autóctonas aisladas de cultivos agrícolas y productos lácteos y su acción sobre fitopatógenos.

Tabla 1. Otros estudios de BAL como agentes de biocontrol en la agricultura.

Especie BAL	Cepa	Aislada de	Patógeno <i>in vitro</i>	Cultivo/ patógeno	Mecanismo propuesto	Referencia
<i>Ln. mesenteroides</i>	PM456	Frutos y vegetales	<i>B. cinerea,</i>	Manzana/ <i>P. expansum</i>	Ácidos orgánicos y peróxido de hidrogeno	Trias <i>et al.</i> 2008b
<i>W.cibaria,</i>	TM128		<i>Monilina laxa,</i>			
<i>E. mundtii,</i>	MC6		<i>Erwina carotovora,</i>			
<i>L. plantarum</i>	TC110		X. <i>campestris,</i> <i>Penicillium expansum</i>			
<i>L. plantarum</i>	AF1	-	<i>Aspergillus flavus.</i> <i>A. fumigatus</i>	Frijol/ <i>A. flavus</i>	Péptidos	Yang & Chang, 2010

<i>Lactobacillus spp.</i>	-	Productos lácteos	<i>F. oxysporum</i>	Tomate/ <i>F.oxysporum</i>	SAR/ metabolitos anti fúngicos	Hamed <i>et al.</i> 2011
<i>L. paracasei</i>	-	-	no realizado	Tomate/ <i>Ralstonia solanacearum</i>	SAR	Konappa <i>et al.</i> 2016

-: desconocido

La capacidad antagónica de BAL está determinada por mecanismos específicos, los cuales aún no son comprendidos completamente (Gao *et al.* 2019). Se considera que la producción de metabolitos como los ácidos orgánicos son el mecanismo más importante por el cual BAL inhibe a patógenos microbianos asociados a fitopatógenos, las bacterias se inactivan gradualmente a medida que el pH desciende (Guo *et al.* 2017). La teoría del ácido débil explicaría esta acción. (Gao *et al.* 2019). Los ácidos débiles son lipofílicos cuando no se encuentran disociados, lo que les permite ingresar en la célula bacteriana por medio de la membrana plasmática, descomponiéndose en iones y en consecuencia generan la acidificación del citoplasma. Esto trae como consecuencia una alteración del metabolismo al dañar las enzimas, inhibir la síntesis de proteínas, destruir el material genético, interrumpir la absorción de nutrientes y dañar la subestructura y la función de la pared celular y membranas, además de generar una acumulación intracelular de aniones que aumentan la presión osmótica intracelular, el cual es un determinante importante en la acción antibacteriana de los ácidos orgánicos (Li *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2011). Se destaca que tanto el

ácido acético y propiónico generados por la vía heterofermentativa, son más efectivos que el ácido láctico dado los altos valores del logaritmo negativo de la constante de disociación ácida (pKa), donde el ácido láctico presenta un valor de 3.08, el ácido propiónico 4.87 y ácido acético 4.75, permitiéndole a estos últimos un mayor efecto contra hongos, levaduras y bacterias (Yang, 2000). En el caso del dióxido de carbono (CO₂), se desconoce su mecanismo de acción antimicrobiano, sin embargo, se ha identificado que puede crear un ambiente anaerobio, el cual inhibe el proceso de descarboxilación enzimática y su acumulación en la bicapa lipídica de la membrana genera problemas de permeabilidad. Concentraciones de 10 a 50% poseen efecto inhibitorio contra bacterias y hongos (Yang 2000). Ver figura 4.

Por otra parte, como se observa en la figura 4 (B) y (C), BAL puede generar también peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en presencia de oxígeno y flavoproteína oxidasa y dada la falta de catalasa, estas bacterias no pueden degradar el H₂O₂ que se acumula, oxidando los lípidos y proteínas de la membrana de organismos sensibles, como los del tipo psicrótrofos en alimentos. Su mecanismo no se conoce lo suficiente, pero se ha observado que además tiene efecto sobre hongos patógenos, al igual que ácidos grasos cuya actividad antifúngica sería similar a la de los detergentes, interrumpiendo la membrana celular, aumentando su permeabilidad liberándose electrolitos y proteínas intracelulares de la célula fúngica provocando lisis de la célula (Gajbhiye & Kapadnis 2016).

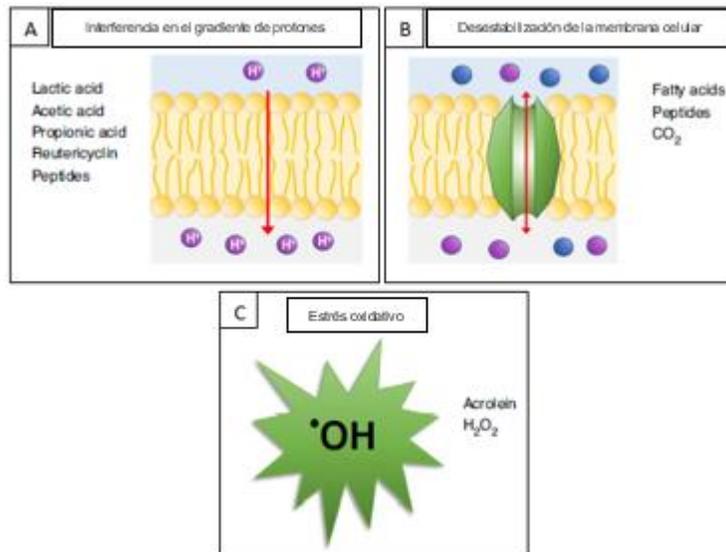


Figura 4. Mecanismos de compuestos inhibitorios de BAL. (A) Interferencia en el gradiente de protones; (B) Destabilización de la membrana celular; (C) Producción de especies reactivas de oxígeno. Tomado de Siedler *et al.* (2019).

Por otro lado, otro de los productos generados por BAL son las bacteriocinas, polipéptidos con actividad antimicrobiana producidas tanto por bacterias Gram positivas, negativas y *Archaea* durante la síntesis ribosómica (Gao *et al.* 2019). Los genes implicados para su síntesis se organizan en grupos de operones y se pueden ubicar en elementos como el cromosoma en asociación con transposones o en plásmidos (Deegan *et al.* 2006). El proceso biosintético y la cepa bacteriana involucrados, son diferentes para cada bacteriocina, siendo para el caso de BAL activas contra bacterias relacionadas filogenéticamente, sin embargo, existen excepciones donde muchas de ellas presentan un espectro más amplio, que incluye actividad antimicrobiana contra bacterias más distantes filogenéticamente (Meade *et al.* 2020). Se caracterizan por sufrir modificaciones postraduccionales

y mostrar sensibilidad por enzimas proteolíticas, especialmente a las proteasas como pepsinas, tripsinas, lipasas y α -amilasas (Kaur & Nehra 2019, Voidarou *et al.* 2020).

Hasta la fecha existen factores inexplorados en cuanto su producción y célula objetivo, destacándose además que no existe una clasificación común y universalmente aceptada, sin embargo, se ha logrado hacer una clasificación específica reciente para BAL, cuyo modo de acción está relacionado con la interacción péptido-célula objetivo, siendo tres las principales clases (Alvarez-Sieiro *et al.* 2016). La clase I consta de bacteriocinas de bajo peso molecular (≤ 10 kD) que llevan una modificación postraduccional caracterizada por la presencia de aminoácidos (lantionina). Éstas, presentan un modo de acción dual. Inhiben la biosíntesis de la pared celular bacteriana mediante la unión al lípido II, portador hidrófobo de monómeros de peptidoglicano desde el citoplasma hacia la pared celular, provocando la inhibición en la formación de la misma y por lo tanto en la viabilidad celular. Por otro lado, el lípido II puede ser utilizado como molécula de acoplamiento, permitiendo su inserción en la membrana con la consiguiente formación de poro en la membrana bacteriana (Pérez-Ramos *et al.* 2021). La clase II está formada por otras cuatro bacteriocinas de bajo peso molecular (≤ 10 kD) que no presentan modificación postraduccional. Se encuentran las de tipo pediocina y no pediocina (clase IIa y IIb respectivamente), las cuales se unen a subunidades MptC y MptD de la permeasa fosfotransferasa (Man-PTS). Su inserción en la membrana celular diana, conduce a una apertura irreversible de

un canal intrínseco que conduce a una difusión de iones a través de la membrana provocando la muerte de la célula diana (Bédard & Biron 2018). Las de clase IIb permeabilizan la membrana bacteriana y forman poros, los cuales tienen especificidad por cationes monovalentes (K^+ , Na^+ , Li^+ , Rb^+ y Cs^+). Las de tipo IIc presentan carga neta positiva, de manera que interactúan directamente con la membrana bacteriana cargada negativamente, sin la ayuda de moléculas receptoras, formando poros que facilitan la salida de iones y disipación del potencial de membrana, conduciendo a la muerte celular (Mora-Villalobos *et al.* 2020, Gabrielsen *et al.* 2014). La clase III, está representada por bacteriocinas de alto peso molecular (10kD) constituida principalmente por bacteriolisinas (IIIa), que catalizan la hidrólisis de la pared celular generando lisis celular, mientras que las no líticas (IIIb), presentan un mecanismo de acción que altera la captación de glucosa por las células, privándolas de fuentes de energía y alterando el potencial de membrana, además de lograr translocarse al espacio intracelular inhibiendo la biosíntesis de proteínas junto a la replicación del ADN (Pérez-Ramos *et al.* 2021, Hernández-González *et al.* 2021, Mora-Villalobos *et al.* 2020). Ver figura 5.

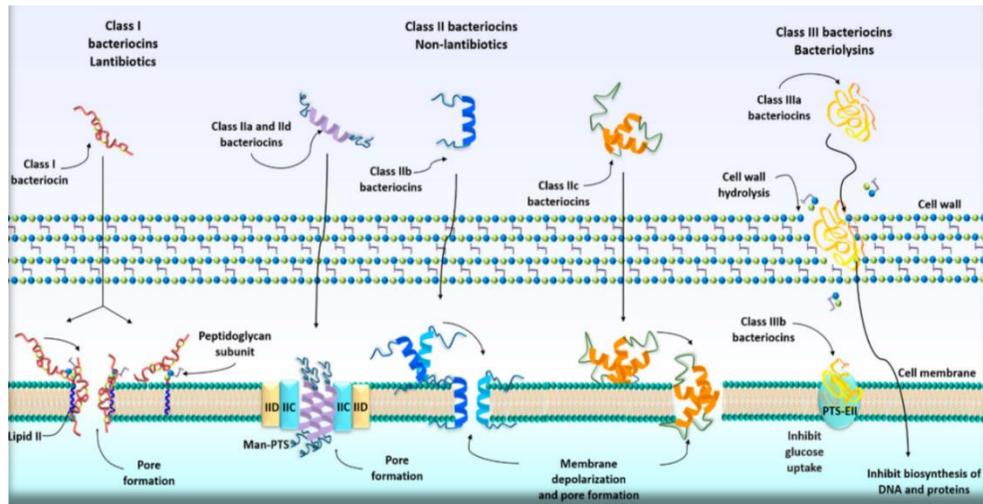


Figura 5. Modo de acción de bacteriocinas producidas por BAL. Las bacteriocinas actúan directamente sobre la membrana o bien a través de un receptor específico de la célula diana, formando poros en la membrana bacteriana, lo que conduce a la muerte celular. Tomado de Hernández-González *et al.* 2021.

Las bacteriocinas de clase IV se especifican por su estructura, la cual contiene partes de lípidos o carbohidratos, como la leuconocina S o plantaricina S que alteran la membrana celular bacteriana. Esta característica estructural hace que estas moléculas sean sensibles a varias enzimas, es decir, enzimas glucolíticas o lipolíticas (Savadogo *et al.* 2006, Simons *et al.* 2020).

Los mecanismos descritos anteriormente, están relacionados principalmente en casos que bacterias de tipo Gram- positivas son el blanco, y existen solo unos pocos estudios donde bacteriocinas desde bacterias Gram-positivas pueden inhibir a las de tipo Gram-negativas como *E. coli*, evidenciándose en estos casos, que el uso de altas concentraciones de bacteriocinas de tipo I (nisina), puede

provocar la deformación de la membrana celular, incluso en ausencia del receptor específico, lípido II. En este mismo sentido existen informes donde se evidencia la inhibición por parte de bacteriocinas de tipo II y III hacia bacterias Gram-negativas, pero no se han dilucidado los mecanismos involucrados (Venegas-Ortega *et al.* 2019).

BAL también puede emplear enzimas secretoras, a través de mecanismos enzimáticos capaces de hidrolizar toxinas tipo bacterianas, modificar receptores de ellas e inhibir enfermedades que puedan causar (Álvarez-Olmos & Oberhelman, 2001).

Para el caso de hongos, la acción de bacteriocinas y ácidos de BAL también se han evidenciado, sin embargo, el detalle de los mecanismos de acción involucrados no está bien esclarecido (Venegas-Ortega *et al.* 2019). Se ha determinado que varias especies BAL modulan el entorno de crecimiento de los hongos, afectando la capacidad de producir micotoxinas, reduciendo o degradando su contenido, a través de conversiones metabólicas, degradación química/enzimática y procesos de adsorción. Se destaca que este último, es uno de los mecanismos más comunes de eliminación de micotoxinas por parte de BAL, las que adsorben estos compuestos en los grupos funcionales de su pared celular como proteínas, ácido teicoico, ácido lipoteicoico, polisacáridos o peptidoglicanos, siendo estos últimos los principales componentes de BAL para la eliminación de estos compuestos (figura 6). Esto, está influenciado además por tipos y número de sitios de unión presentes en la pared, condiciones ambientales, propiedades

fisicoquímicas y procesos de mutagénesis/manipulación genética o mediante la suplementación de algunos compuestos que promueven la unión de estas micotoxinas a BAL (Sadiq *et al.* 2019, De Ambrosini *et al.* 1996).

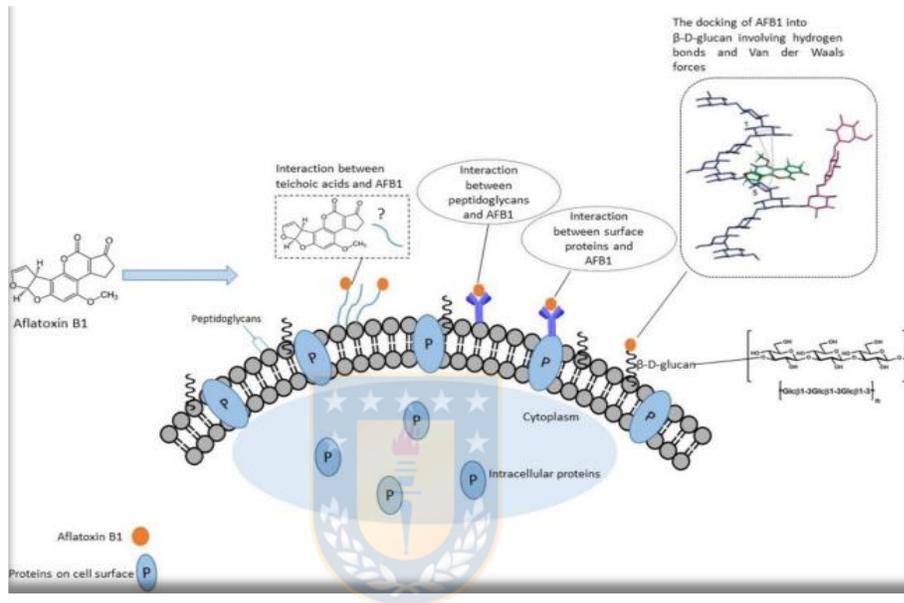


Figura 6. Diferentes interacciones de aflatoxina B1 (AFB1) y los componentes de la pared celular de BAL. AFB1 interactúa con estructuras bacterianas de peptidoglicano, ácido teicoico de la superficie celular y proteínas. También puede unirse a los β -D glucanos de la pared celular bacteriana mediante enlaces de hidrógeno e interacciones de Van der Waals. Tomado de Sadiq *et al.* 2019.

La diferencia en los mecanismos antimicrobianos mencionados en BAL anteriormente, se atribuyen a la diversidad en la expresión génica o en estructuras moleculares presentes en las cepas lácticas estudiadas, lo que resulta en diferencias en la tolerancia a ácidos orgánicos, H_2O_2 y sensibilidad a bacteriocinas en la célula blanco (Gao *et al.* 2019, Sadiq *et al.* 2019).

En la presente investigación se trabajará con bacterias ácido lácticas aisladas de distintos nichos naturales, por lo tanto, en base a los antecedentes expuestos surgen algunas interrogantes, ¿Poseen cepas BAL autóctonas, aisladas de insectos y plantas, actividad antagónica *in vitro* e *in vivo* frente a *Xanthomonas arborícola* pv *juglandis* y *Diplodia mutila* asociadas al nogal?, ¿Poseen los ácidos orgánicos de cepas BAL, mejores índices de acción antagónica frente a *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* y *Diplodia mutila* respecto a otros metabolitos ensayados?



2. HIPÓTESIS

1. Cepas BAL autóctonas aisladas de insectos y plantas poseen actividad antagónica *in vitro* e *in vivo* frente a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Diplodia mutila* de nogal.
2. La acción antagónica que presentan cepas BAL frente a estos patógenos está relacionada a la presencia principal de ácidos orgánicos de estos microorganismos.



3. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar las propiedades antagónicas de cepas BAL *in vitro* e *in vivo* hacia *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Diplodia mutila* de nogal, relacionando los hallazgos con los compuestos antimicrobianos pesquisados.

Objetivos específicos

- 
1. Determinar la actividad antagónica *in vitro* de cepas BAL contra *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Diplodia mutila*.
 2. Identificar un perfil de metabolitos de cepas BAL seleccionadas con propiedades antagónicas *in vitro* hacia los patógenos de nogal investigados.
 3. Determinar la eficacia de biocontrol *in vivo* de cepas BAL seleccionadas, según respuesta *in vitro* para inhibir *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Diplodia mutila* en frutos de nogal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1 Microorganismos

Las cepas BAL que se probaron en esta investigación, se muestran en la tabla 2. Éstas fueron facilitadas por el equipo de trabajo del laboratorio de Bioprocesos de la Universidad de Concepción.

Tabla 2. Especies BAL que se ensayaron en la investigación



Especie	Cepa	Origen
<i>Weisella</i> sp.	DSM33455	Planta de papa
<i>Weisella</i> sp.	DSM33454	Lombriz de tierra
<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSM32954	Abeja
<i>Lactobacillus kunkeii</i>	DSM32669	Abeja

Colonias de una de las especies, específicamente de *P. acidilactici* y *Weisella* sp (aislada de lombriz), se muestra en figura 7.

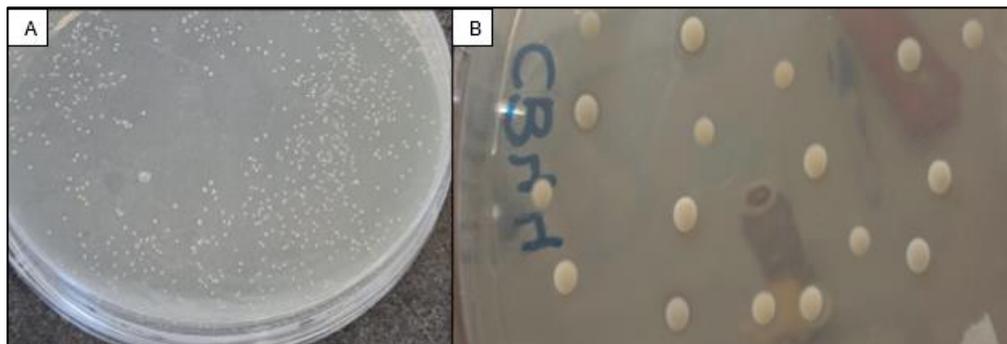


Figura 7. Colonias de BAL. En A. colonias de *P. acidilactici* en medio MRS. En B. colonias de *Weisella* sp en medio MRS. Fuente propia.

Fitopatógenos bacterianos y fúngicos de nogal; Xaj y *D. mutila* respectivamente, fueron facilitados por el laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Concepción, sede Chillán, como microorganismos objetivos en las pruebas de antagonismo *in vitro* y en los ensayos de eficacia de biocontrol *in vivo* (Figura 8 A y B). Estos fueron obtenidos desde muestras de nogal, cuya presencia se confirmó molecularmente. En el caso de Xaj, se realizó por medio de la amplificación del ADNr 16S utilizando los partidores 27F y 1492R (Kim *et al.* 2021). Mientras que para *D. mutila*, la amplificación del gen de la subunidad 2 de ITS1-5.8S-ITS2 y B-tubulina, se realizó utilizando los partidores ITS1/ ITS4 y Bt2a y Bt2b, respectivamente (Besoain *et al.* 2017).

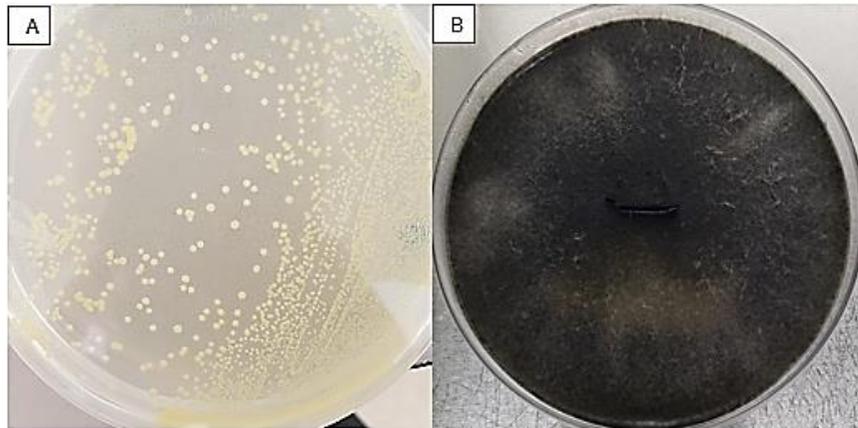


Figura 8. Colonias fitopatógeno bacteriano y fúngico. En A, colonias de Xaj crecida en agar Luria Bertani (LB). En B, colonia *D. mutila* crecida en agar papa dextrosa (APD). Fuente propia.



4.1.2. Medios de activación y cultivo

4.1.2.1 De Man, Rogosa y Sharpe (MRS)

Medio utilizado para la activación y crecimiento de cada una de las cepas lácticas evaluadas. Se utilizo para evaluar su potencial de inhibición contra fitopatógenos, en ensayos *in vitro* e *in vivo*. En la siguiente tabla se informa su composición.

Tabla 3. Composición de MRS

	Concentración (g/L)
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Peptona de caseína	10
Acetato de sodio	5
D (+)-glucosa	20
Dipotasio hidrogeno fosfato	2
Diamonio hidrogeno citrato	2
Sulfato de magnesio	0,2
Sulfato de manganeso	0,04
Agar-agar	17,5 (ensayos antagonismo)
Tween 80	1

4.1.2.2 Medio lactosuero



Medio utilizado para la activación y crecimiento de cada una de las cepas lácticas evaluadas. Se utilizo para evaluar su potencial de inhibición contra fitopatógenos en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Este medio de cultivo esta enriquecido con peptona, extracto de levadura y minerales. Desarrollado en un proyecto FONDEF patente N°1940-2005.

4.1.2.3 LAPTg

Medio empleado para la activación y crecimiento de cada una de las cepas lácticas. Se utilizo para evaluar su potencial de inhibición contra fitopatógenos en ensayos *in vitro* y producción de compuestos inhibitorios.

Tabla 4. Composición LAPTg

	Concentración (g/L)
Peptona de caseína	10
Peptona de carne	15
Extracto de levadura	10
D (+)-glucosa	10
Tween 80	1 mL
Agar-agar	17,5 (ensayos antagonismo)

4.1.2.4. Luria Bertani (LB)

Medio empleado para el crecimiento de la bacteria patógena Xaj. Utilizado para ensayos *in vitro* e *in vivo*.



Tabla 5. Composición LB

	Concentración (g/L)
Triptona	10
Cloruro de sodio	10
Extracto de levadura	5
Agar-agar	17,5 (ensayos antagonismo)

4.1.2.5 Potato Dextrose Agar (PDA)

Medio empleado para el crecimiento de hongo fitopatógeno *D. mutila*. Utilizado en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Tabla 6. Composición PDA

	Concentración (g/L)
Extracto de papa	4
Dextrosa	20
Agar	15

4.1.2.6 Otras sustancias y reactivos

Tabla 7. Lista de sustancias y reactivos utilizados en los experimentos

Sustancia	Proveedor	Sustancia	Proveedor
Acetato de sodio	Merck	Peptona de caseína	Merck
Agar	Merck	Potasio dihidrógeno fosfato	Merck
Hipoclorito de sodio	Clorinda	Suero fisiológico	Merck
α -amilasa	Sigma	Sulfato de magnesio	Merck
Caldo MRS	Merck	Sulfato de manganeso	Merck
Caldo LB	Difco	Sulfito de sodio	Merck
Cloruro de sodio	Merck	Tween 80	Merck
D-glucosa	Merck	Suero de queso	Lactín
Diamonio hidrogeno citrato	Merck	PDA	Difco
Extracto de levadura	Merck	Pepsina	Arquimed
Hidróxido de sodio	Merck	Peptona de carne	Merck

4.1.2.7 Equipos e instrumentos

Tabla 8. Lista de equipos e instrumentos implementados en experimentos.

Equipo	Marca /Modelo/ País	Características
Autoclave	MRC / UTKBS-50LV / Israel	Acero inoxidable. Bloqueo de seguridad de presión.
Espectrofotómetro	Unico/ S-2150/ EE.UU	
Estufa incubadora	Thermo/ Heraeus B12/ Alemania	Con ventilación
Estufa incubadora con agitación	WISD / WIS-30/ Corea	Acero inoxidable. Velocidad máx. 250 rpm.
Campana de flujo laminar	Thermo/ Forma II A2 1285/ EE.UU	
Campana de flujo laminar	ESCO/ Airstream Horizontal Laminar Flow Cabinet / Singapur	
pH metro	OAKTON/ pH Ion 510/ Singapur	
Vortex	Vortex Mixer/ VM 300/ Taiwan	
Balanza analítica	Precisa/ XB 220A/ Suiza	Sensibilidad de 0.0001 g. Máx. 220 g
Agitador	Wisd/ SHO-2D / Corea	
Centrifuga refrigerada	Sigma/ 2-16 PK / Alemania	Capacidad de 4 tubos de 120 mL, o 16 tubos de 15 mL, o 4 tubos Falcon de 50 ml. Velocidad máxima hasta 15300 rpm.

Centrifuga	Labofuge Ae / Heraeus Sepatech 2502 / Alemania
Cámara ambiental de humedad	Thermo/ Lab line-Barnstead 685A/ EE.UU Humedad de 10-95%. Temperatura; 5-60°C
Filtros de membrana hidrofílica	Advantec / Dismic 25 _{AS} / Japón Poros de 0,20 um
Jeringas	Nipro / /Japón
Bisturís	HTI Brand/ 271-100BLD22/ EE.UU

4.1.2.8 Material vegetal

Se utilizaron 400 frutos de nuez de temporada en estado inmaduro, aparentemente sanos, en periodo de primeras cosechas. Estos frutos fueron obtenidos desde un huerto particular de nocedales variedad Chandler, ubicado en la comuna de Quillón, Región de Ñuble.

4.2. Metodologías

4.2.1. Crecimiento cepas BAL

Para el crecimiento de cada una de las especies BAL evaluadas en esta investigación, se siguieron cuatro pasos específicos que se describen en el esquema a continuación. Posteriormente se ofrece un detalle de cada una de las actividades del trabajo experimental.



Figura 9. Representación esquemática de los cuatro pasos específicos para el crecimiento de cepas BAL.

4.2.1.1 Activación

Cada una de las cepas se encuentran almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en leche descremada ($0,1\text{ g/mL}$), extracto de levadura ($0,005\text{g/mL}$), glucosa ($0,01\text{g/mL}$). Desde esta, se traspasaron $100\text{ }\mu\text{L}$ de cada cepa a tubos con 4 mL de medio MRS, lactosuero o LAPTg estéril según corresponda, llevando a la estufa a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h sin agitación.

Cumplido el tiempo se realiza un nuevo traspaso de $100\text{ }\mu\text{L}$ del tubo anterior a un nuevo tubo con 4 mL de los medios antes mencionados, llevando a la estufa a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 h (*P. acidilactici* y cepas de *Weisella* sp.). Para el caso de *L. kunkeei*, el proceso de activación es más lento, requiriendo 24 h en vez de 12 h , tras el segundo traspaso.

4.2.1.2. Preparación medio de cultivo

Como se mencionó anteriormente se probaron tres medios de cultivo diferentes, cuya preparación fue realizada de acuerdo a la composición descrita anteriormente para luego ser esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.2.1.3. Preparación inóculo

Cada uno de los tubos con la cepa activada se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 500 uL de suero fisiológico (NaCl). Desde ésta, se tomaron 40 uL aproximadamente y se traspasan a un tubo con 4 mL de suero fisiológico estéril de manera de alcanzar una densidad óptica a 625 nm (DO_{625}) entre 0,5-0,6 unidades de absorbancia, lo cual genera un inóculo $\sim 10^9$ UFC/mL, concentración que fue utilizada para ensayos *in vitro*.

4.2.1.4. Cultivo cepas

Una vez esterilizados los medios de cultivo, estos son inoculados con 350 uL de inóculo por cada 200 mL de medio de cultivo (MRS, LAPTg, lactosuero) el que luego es llevado a estufa a 32.5°C en agitación constante durante 15-16 h.

4.2.2. Condiciones de crecimiento e inóculo de fitopatógenos

4.2.2.1 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

El crecimiento de Xaj se realizó en placas de agar LB durante 48 h a 25 ± 2 °C. Una vez crecidas las colonias, se transfirió un pequeño trozo de células a 20 mL de caldo LB, el cual fue mantenido 15-16 h a la misma temperatura en agitación a 200 rpm (Sagawa *et al.* 2020).

El cultivo de 15-16 h fue centrifugado a 5000 rpm por 10 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 300 uL de suero fisiológico. Desde ésta, se tomaron 50 uL y se traspasaron a un tubo con 4 mL de suero fisiológico estéril de manera de alcanzar una DO_{600} entre 0,5-0,6 unidades de absorbancia, lo que genera un inóculo de $\sim 10^8$ UFC/mL, concentración utilizada para ensayo *in vitro* como *in vivo* (Sagawa *et al.* 2020).

4.2.2.2 *Diplodia mutila*

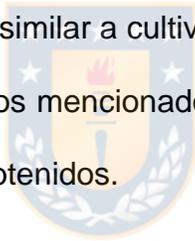
El hongo fitopatógeno se sembró en medio PDA durante 5-7 días a 25 ± 2 °C (Díaz *et al.* 2018).

Pasado los días de crecimiento, se utilizó como inóculo un fragmento o discos de micelio, extraído con la ayuda de una punta de micropipeta y bisturí estéril, cuyas medidas fueron de ~ 5 mm de diámetro, tanto para ensayos *in vitro* como *in vivo* (Sohrabi *et al.* 2020, Díaz *et al.* 2018).

4.2.3 Actividad antimicrobiana *in vitro*

La actividad antagónica de las cuatro cepas BAL se ensayó *in vitro* contra Xaj y *D. mutila*. Los experimentos se realizaron por triplicado, evaluando la actividad a través de tres métodos en el caso de Xaj; Difusión en agar, Difusión en pocillo y Dilución en caldo (Daranas *et al.* 2018, Arena *et al.* 2016). En cada uno de los métodos de difusión, se evaluó el cultivo directo, pellet y SLC de cada BAL además de tres medios de cultivo en el que se hicieron crecer, MRS, lactosuero y LAPTg. Mientras que para *D. mutila*, se evaluaron los mismos métodos de difusión, además de método similar a cultivo dual (Chen *et al.* 2016).

Para cada uno de los ensayos mencionados se elaboraron tablas resumen con los resultados estadísticos obtenidos.



4.2.3.1 Difusión en agar con discos

Xaj se cultivó durante 16 h en caldo LB a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se ajustó a una concentración de 10^8 UFC/mL (Sagawa *et al.* 2020). Posteriormente se sembró homogéneamente sobre agar LB y luego se dispusieron discos de agar (5 mm) de cepas BAL crecidas en MRS, LAPTg o lactosuero por 24 h. Se incluyeron discos de agar de los medios antes mencionados sin crecimiento de cepas BAL como control. Luego, se incubaron las placas entre 24-48 h a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ para luego medir el diámetro de los halos de inhibición formados (mm) indicativos de bioactividad (Daranas *et al.* 2018).

4.2.3.2 Difusión en pocillo

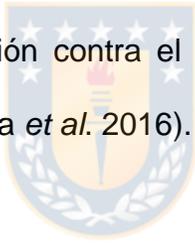
Xaj se cultivó durante 16 h en caldo LB a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se ajustó a una concentración de 10^8 UFC/mL (Sagawa *et al.* 2020). Posteriormente se sembró homogéneamente sobre agar LB donde se realizaron tres pocillos con un sacabocado estéril, en los cuales fue evaluado el SLC, pellet y cultivo directo de cada una de las cepas BAL, crecidas en los tres medios de cultivos mencionados (120 μl en cada pocillo). Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento (punto 4.2.1.4), se obtiene el cultivo directo. Para la obtención del SLC, los cultivos fueron centrifugados (5000 rpm, por 10 min, a 4°C). Éste fue recuperado y esterilizado por medio de filtros de membrana hidrofílica de 0,20 μm (Dismic-25AS Mixed cellulose Ester, Advantec, Tokyo, Japón). Mientras que el pellet obtenido, para la concentración de las bacterias lácticas fue resuspendido en suero fisiológico en razón de 1:1 a objeto de mantener la misma concentración de bacterias/mL inicial. Se incluyeron pocillos inoculados con agua como control. Luego, se incubaron las placas entre 24-48 h a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ para luego medir el diámetro de los halos de inhibición en mm formados alrededor del pocillo (Arena *et al.* 2016).

4.2.3.3. Dilución en caldo

Xaj se cultivó durante 16 h en caldo LB a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se ajustó a una concentración de 10^8 UFC/mL (Sagawa *et al.* 2020). Esta concentración fue inoculada en tubos

de espectrofotómetro junto a un volumen igual de SLC, filtrado y esterilizado de cada cepa láctica crecida en los tres medios de cultivos probados. Cada una de los SLC se diluyeron en solución fisiológica (NaCl 8,5 g/L) y se usaron en diferentes concentraciones, es decir, 5%, 10%, 25%, 40%, 50%, 75% y 100% (sin diluir), en el volumen final (4 mL), con el fin de determinar la concentración mínima de SLC, capaz de inhibir el crecimiento del patógeno. Los tubos fueron incubados a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h y se evaluaron midiendo posteriormente a una DO_{600} . El ensayo fue realizado por triplicado (Arena *et al.* 2016).

La actividad antimicrobiana se determinó de acuerdo a la reducción logarítmica que generó la mínima dilución contra el patógeno, expresada en UFC/ml en comparación al control (Arena *et al.* 2016).



4.2.3.4. Cultivo dual

La actividad antifúngica de cepas BAL contra *D. munita*, fue realizada a través de técnica similar a cultivo dual. Se analizó la acción de cultivo directo y pellet de cepas BAL crecidas en los tres medios de cultivo evaluados. Para esto, se utilizaron 100 uL del contenido, el cual fue sembrado homogéneamente sobre placas de PDA, para luego disponer en el centro de la placa un disco de micelio fúngico de crecimiento activo de 5 mm. Los diámetros de la colonia del hongo se midieron después de 7 días de incubación a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Díaz *et al.* 2018). El ensayo fue realizado por triplicado, realizando tres experimentos independientes. La

actividad antifúngica se calculó midiendo el diámetro (cm) de la colonia fúngica en relación al control, el cual no tenía acción alguna de cepas BAL (Chen *et al.* 2016)

4.2.4. Perfil de metabolitos

El perfil de metabolitos fue realizado para aquellos SLC de cepas BAL que evidenciaron actividad antagónica contra los fitopatógenos a través de métodos antes mencionados.

Luego, para conocer la naturaleza química de las sustancias potencialmente inhibidoras secretadas por cada cepa BAL, los SLC filtrados fueron sometidos a distintos tratamientos de neutralización y de tipo enzimático; a) Neutralización del SLC con 1mol/L de NaOH (pH:6.0), a objeto de excluir que la inhibición fue debida a la producción de ácidos orgánicos. Esto fue antecedido por la medición de pH sin ajustar, de cada SLC.

Luego, para excluir la acción antimicrobiana de bacteriocinas, el SLC neutralizado fue expuesto durante 1h a 37°C a la acción de diferentes proteasas como; b) proteinasa K, c) pepsina y d) α -amilasa. Todas a una concentración final de 0,1 mg/mL del sobrenadante (Arenas *et al.* 2016, Daranas *et al.* 2018, Voidarou *et al.* 2020). Por otro lado, para excluir la acción antimicrobiana del peróxido de hidrogeno e) fue utilizado sulfito de sodio (Na_2SO_3), a una concentración final de 0,1 mg/mL del sobrenadante (Cornacchione *et al.* 2019).

Como control se utilizó el SLC sin la acción de ninguno de los tratamientos antes mencionados.

El ensayo fue realizado por triplicado y los resultados fueron expresados en base a presencia de la zona de inhibición (+) y ausencia de la zona de inhibición (-), las que fueron representadas por la presencia de un halo nítido y ausencia de halo respectivamente (Voidarou *et al.* 2020, Del Campo *et al.* 2008).

4.2.5. Ensayos de eficacia de biocontrol *in vivo*

Las mejores especies BAL que evidenciaron acción antimicrobiana contra fitopatógenos en ensayos *in vitro*, fueron utilizados para análisis en frutos de nogal. Éstos, inmaduros y asintomáticos, fueron lavados con agua destilada estéril (ADE), para eliminar cualquier tipo de suciedad, seguido de una desinfección superficial en base a hipoclorito de sodio al 5% de ingrediente activo (i.a) durante 5 min, para luego ser nuevamente lavados con ADE y secados a temperatura ambiente antes del proceso de inoculación (Moya *et al.* 2018, Ozaktan *et al.* 2012).

El ensayo constó de tratamientos preventivos como curativos para ambos fitopatógenos, por un lado, en base a la aplicación del pellet de cepas BAL desarrolladas en medio MRS (punto 4.2.1.3) y por otro, la aplicación del pellet de cepas BAL o probióticas, liofilizadas, basadas en medio lactosuero (1 g/L) desarrollado en laboratorio, con objeto de simular la aplicación de estas bacterias

en campo, con una tecnología ya desarrollada. En ambos casos se obtuvo una concentración $\sim 10^7$ UFC/mL. El ensayo se realizó por duplicado con 5 frutos, para cada una de las cepas probióticas, tipo de tratamiento y técnica utilizada, implementando un total de 400 frutos. Considerando perforaciones por triplicado en cada fruto, se analizó un total de 1.241 datos en el caso del hongo, y 1.405 datos para el caso de Xaj, no considerando mediciones de frutos completamente necrosados.

Los resultados se analizaron en base a la evolución de la enfermedad (bacteriana y fúngica) a través de mediciones de diámetro de infección en frutos (cm), durante los días 5, 7, 14 y 21. Tal evolución se analizó en base a la combinación de los tratamientos, preventivos y curativos, combinados con dos tipos de técnicas (MRS y liofilizado) y cepas lácticas seleccionadas. También se analizó la evolución de grupos de control (frutos tratados con agua), por tipo de tratamiento, técnica y fitopatógenos analizado (Sagawa *et al.* 2020, Kim *et al.* 2021, Gusella *et al.* 2020, Mewa-Ngongang *et al.* 2021).

En los resultados se incluyen tablas resumen de las gráficas estadísticas. A continuación, un esquema de tratamientos aplicados y luego un detalle de cada una de las actividades del trabajo experimental (figura 10).

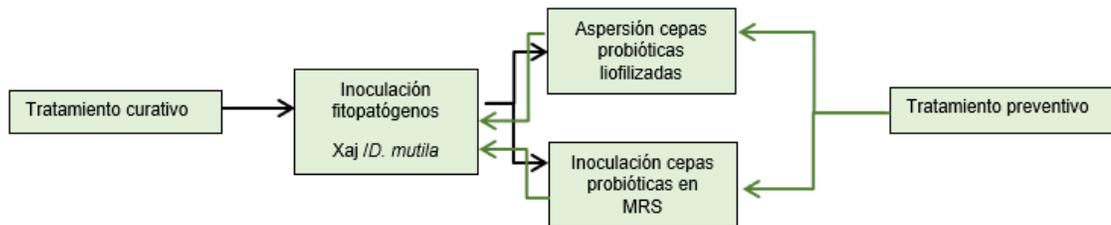


Figura 10. Representación esquemática de ensayo de biocontrol *in vivo* en base a frutos de nogal.

4.2.5.1. Tratamiento preventivo

Este tratamiento se realizó posterior a la desinfección de los frutos, los que se dividieron en dos grupos. En el primer grupo de frutos fue aplicado diariamente durante cinco días, cepas probióticas liofilizadas en forma de aspersion, cubriendo el fruto completo, con la ayuda de pulverizadores estériles. Al sexto día (24 h después), fueron inoculados los fitopatógenos en perforaciones (3) generadas en los frutos, de aproximadamente 5 mm de diámetro y 3 mm de profundidad con la ayuda de puntas de micropipetas estériles. Para el caso de Xaj se inocularon en cada perforación, 30 μ L de una concentración de 10^8 UFC/mL utilizando una micropipeta. En el caso de *D. mutila* se inocularon discos de agar de las mismas dimensiones antes mencionadas (Daranas *et al.* 2018, Mewa-Ngongang *et al.* 2021, Díaz *et al.* 2018).

En el segundo grupo de frutos, se realizaron perforaciones en ellos con las dimensiones antes mencionadas para luego inocularlas con 30 ul de bacterias lácticas en MRS, con la ayuda de una micropipeta. Pasado una hora se inocularon los fitopatógenos de la manera anteriormente mencionada (Daranas *et al.* 2018, Ozaktan *et al.* 2012).

A continuación, los frutos fueron puestos en bandejas de plumavit cubiertas con bolsas plásticas, a objeto de alcanzar condiciones de alta humedad relativa (HR), y a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ al interior de una cámara climática (Daranas *et al.* 2018, Ozaktan *et al.* 2012).

4.2.5.2 Tratamiento curativo



En este tratamiento los frutos fueron inoculados en una primera instancia por la acción de ambos fitopatógenos, con la metodología antes mencionadas. A continuación, en ambos grupos de frutos fueron aplicados la aspersion con cepas probióticas y la inoculación de estas mismas cepas crecidas en MRS.

A continuación, los frutos fueron puestos en bandejas de plumavit cubiertas con bolsas plásticas, a objeto de alcanzar condiciones de alta humedad relativa (HR), y a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ al interior de una cámara climática (Daranas *et al.* 2018, Ozaktan *et al.* 2012).

4.2.6. Diseño experimental y análisis de datos

El análisis de datos de esta investigación, se realizó a través de Software R versión 4.10, donde fueron adoptados un conjunto de modelos estadísticos (R core Team. 2021). Para todos los análisis se adoptó un nivel de significancia estadística de 5% ($\alpha=0,05$). Para las comparaciones, la prueba adoptada fue la clase de modelos lineales mixto (Linear Mixed Model, LMM), considerando como efectos fijos las variables; especie láctica, medio de cultivo, o dilución (ensayo *in vitro*), como variables explicativas a la variable respuesta en la concentración de agentes patógenos, considerando como características individuales las especies lácticas (variable latente del intercepto). Para los ensayos *in vivo*, se adoptó el modelo aditivo generalizado (Generalized additive model, GAM), para el análisis de inferencias que combina similares variables fijas como especie láctica, tratamiento, técnica y sus interacciones con la variable tiempo, pero con una flexibilidad mayor en acomodar variables non-lineales como el nivel de concentraciones de agentes patógenos.

5. RESULTADOS

5.1. Actividad antagónica *in vitro*

5.1.1 Métodos de difusión en agar

Se evaluó la capacidad antagónica de cuatro especies BAL crecidas en los medios MRS, suero y LAPTg contra Xaj a través de cuatro métodos de difusión. Los resultados de nuestra investigación evidenciaron que, en el método de difusión a través de discos de agar, al evaluar los tres medios de cultivo y especies BAL, la inhibición generada superó los 5 mm, destacando a los medios en base a lactosuero y MRS, sin embargo, no existieron diferencias significativas entre ellas (figura 11A). La especie *P.acidilactici* desarrollada en medio en base a lactosuero, destaca aunque no de manera significativa, con halos de inhibición que fluctuaron entre los 15-17 mm, seguida de su crecimiento en MRS entre 10-12 mm (figura 12A y B). Se observa también, a pesar de no existir significancia, que *Weisella* sp. también desarrollado en lactosuero y MRS, generó altos valores de inhibición entre los 10-15 mm y 9-12 mm respectivamente (figura 12C y D), además de *L. kunkeei* en MRS con una actividad entre 10-13 mm (figura 12E).

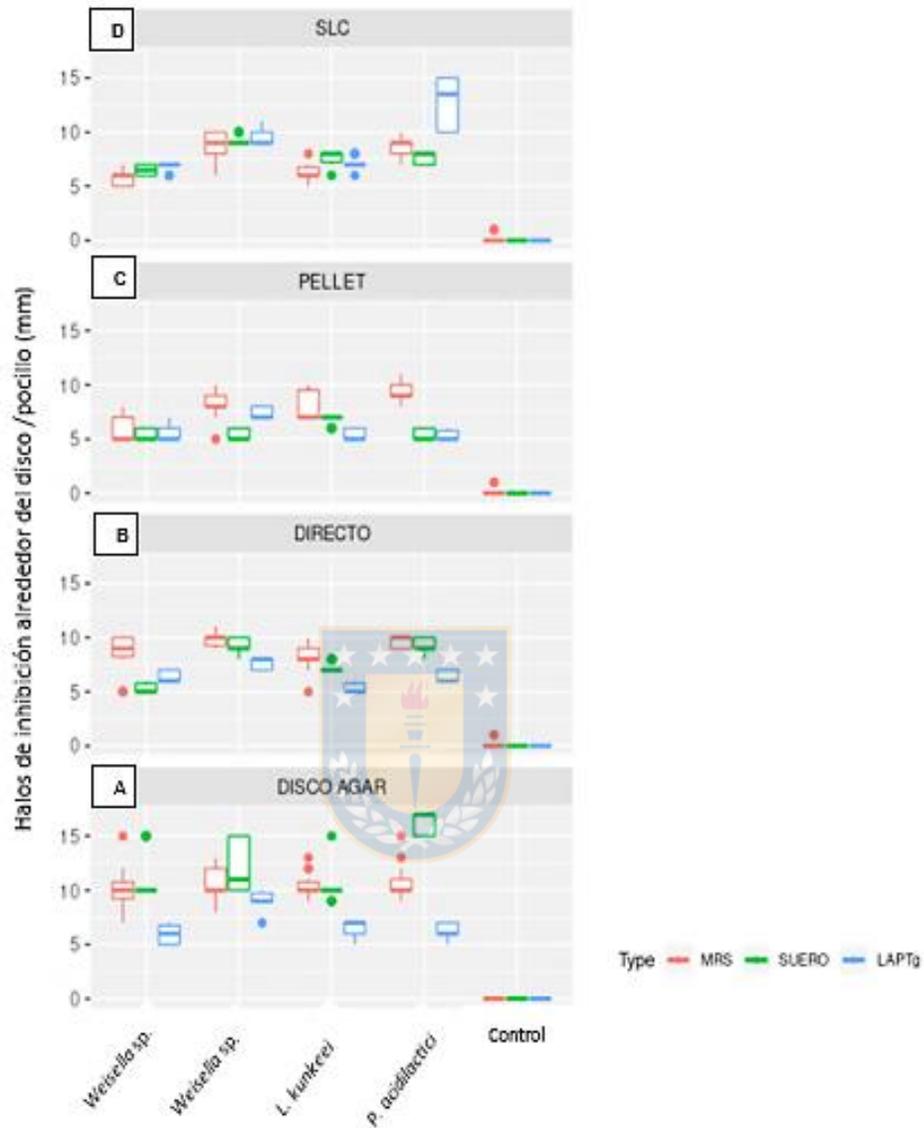


Figura 11. Actividad antibacteriana de especies BAL contra Xaj, a través de cuatro métodos de difusión. En A, resultados por métodos de difusión con discos de agar. En B, C y D, difusión en pocillo implementando, cultivo directo, pellet y sobrenadante de cepas lácticas respectivamente, desarrolladas en tres medios de cultivo distintos. Los cuadros, muestran rangos intercuartílicos en los que se distribuye la zona de inhibición (mm) y las barras | representan los valores más altos y más bajos.

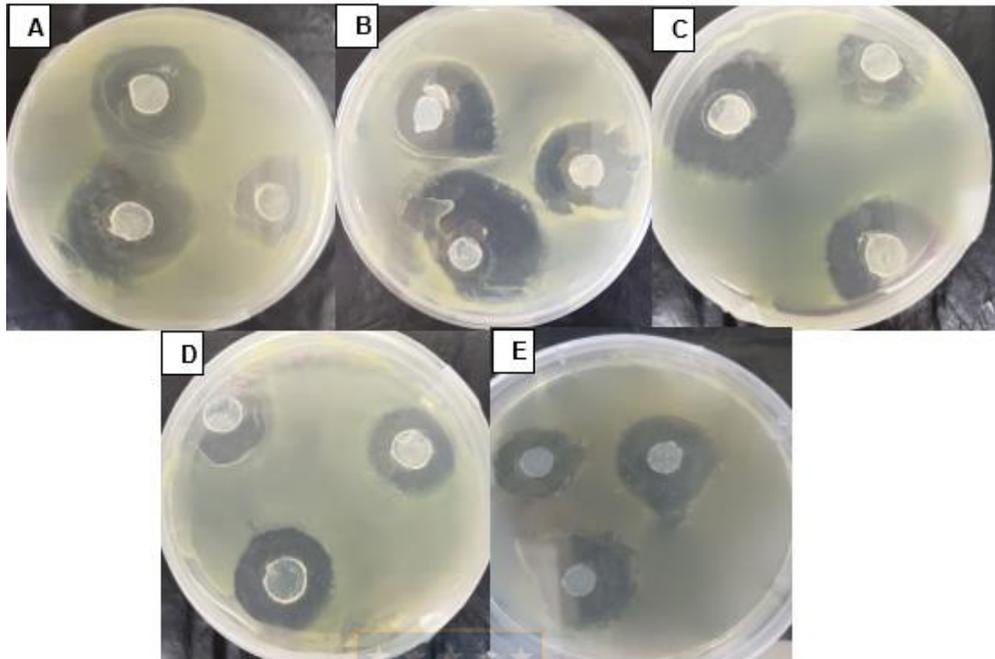


Figura 12. Halos de inhibición contra Xaj obtenidos a través de método de difusión con discos de agar de MRS y lactosuero de especies BAL. En A y B, discos de *P. acidilactici* en suero y MRS respectivamente. En C y D, una de las cepas de *Weisella* sp. en suero y MRS respectivamente. En E *L. kuneei* en MRS.

Por otro lado, el método de difusión en pocillo, al igual que el método anterior no genero diferencias significativas entre especies BAL y medio de cultivo, sin embargo, se destacan algunas observaciones. En primer lugar, para el cultivo directo y el pellet de bacterias lácticas, los halos de inhibición fluctuaron entre los 5-10 mm para las cuatro bacterias en los tres medios de cultivos, destacando principalmente a MRS, seguida de lactosuero (figura 11B y C). Sin embargo, para el SLC, se observó un leve aumento de la inhibición al utilizar medio LAPTg, específicamente para *P. acidilactici*, con halos de inhibición que fluctuaron entre

los 10-15 mm. Le sigue una de las cepas de *Weisella*. sp, en LAPTg, con halos de inhibición entre los 9- 11 mm, sin embargo, no fue significativa (figura 11D). Los resultados del SLC, se evidencian en fotografías en placa a continuación (Figura 13 A y B).

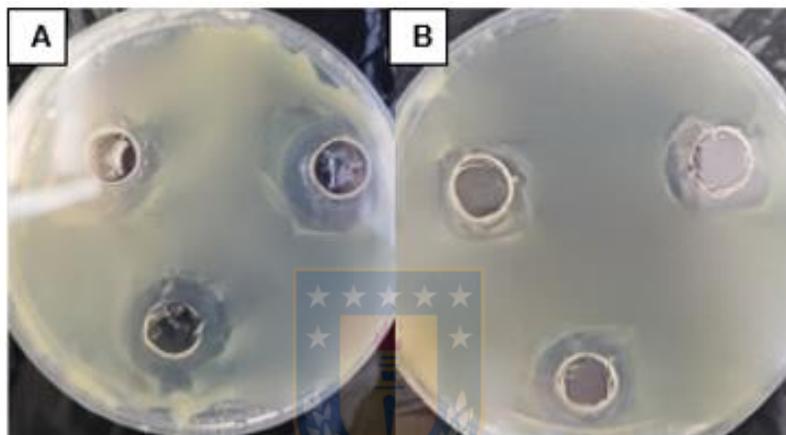


Figura 13. Halos de inhibición contra Xaj, obtenidos a través de método de difusión en pocillo en base al SLC de LAPTg de especies BAL. En A y B halos de inhibición generados por SLC de *P. acidilactici* y *Weisella* respectivamente.

A través de los cuatro métodos de difusión ya mostrados, principalmente en el método con discos de agar, se logró evidenciar que las cuatro especies lácticas generaron una alta inhibición contra Xaj (inhibición ≥ 10 mm, lactosuero y MRS). Se destaca, aunque no de manera significativa a *P. acidilactici* desarrollada en suero (discos agar) y en LAPTg (SLC) con halos que fueron ≥ 15 mm y ≥ 10 mm respectivamente. En la tabla a continuación, un resumen de estos resultados (tabla 9).

Tabla 9. Actividad inhibitoria de especies BAL contra Xaj. Los valores informados corresponden a halos de inhibición (mm) generados por bacterias lácticas en cuatro métodos de difusión, evaluando tres medios de crecimiento distintos.

Especie BAL	Halos de inhibición (mm)											
	Discos de agar			Pocillo								
	M	S	L	Pellet			Cultivo directo			SLC		
				M	S	L	M	S	L	M	S	L
<i>P. acidilactici</i>	≥10	≥15	<10	≤10	<10	<10	≤10	≤10	<10	≤10	<10	≥10
<i>L. kunkeei</i>	≥10	≥10	<10	≤10	<10	<10	≤10	<10	<10	<10	<10	<10
<i>Weisella</i> sp	≥10	≥10	<10	≤10	<10	<10	≤10	≤10	<10	≤10	≤10	≤10
<i>Weisella</i> sp	≥10	≥10	<10	<10	<10	<10	≤10	<10	<10	<10	<10	<10

M: MRS, S: Lactosuero L: LAPTg

5.1.2. Dilución en caldo



En este ensayo se evaluaron distintas concentraciones del SLC de BAL bajo el desarrollo de tres medios de cultivo, cuyo mínimo fuera capaz de inhibir a Xaj.

Los resultados de esto, se muestran en el grafico a continuación (figura 14).

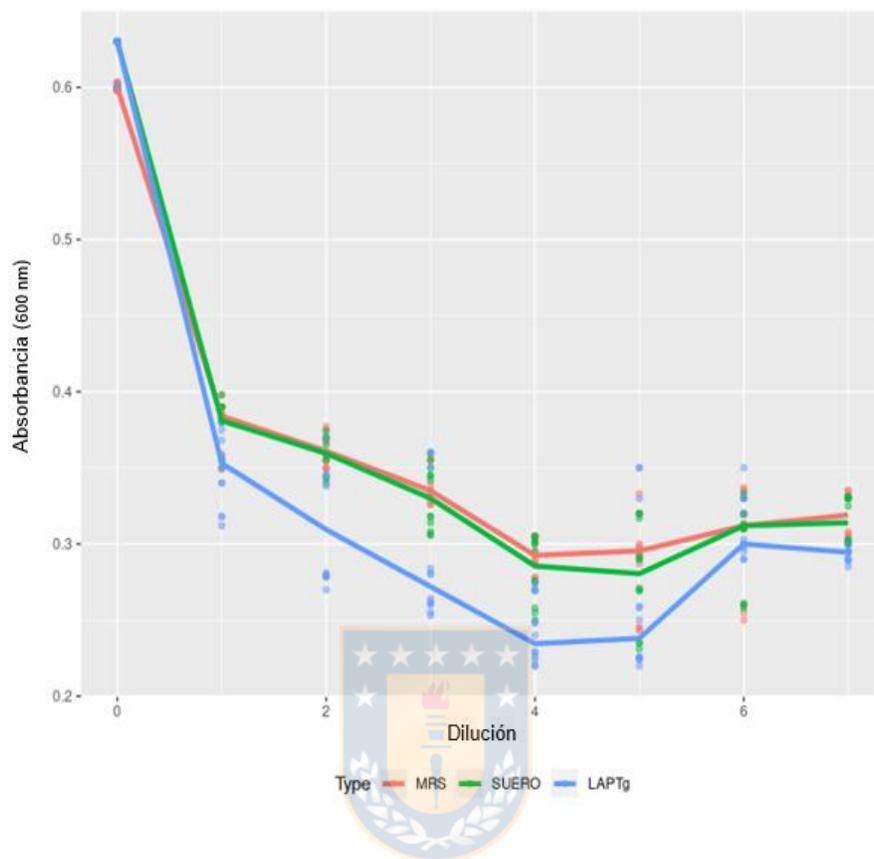


Figura 14. Absorbancia obtenida desde diluciones del SLC de especies BAL sobre Xaj. Evaluado a través de una DO_{600} . Las líneas de tendencia de los tres medios de cultivo corresponden a la media (\bar{X}) de las cuatro BAL, para cada dilución. En diluciones; 0=control, Xaj sin SLC, 1= 5%, 2= 10%, 3=25%, 4=40%, 5=50%, 6=75%, 7= Sin diluir, 100%.

Los resultados evidenciaron que el medio de cultivo LAPTg generó la mayor inhibición significativa contra Xaj, con una absorbancia que descendió de manera importante ya desde la dilución a un 5% para las cuatro cepas. Entre el medio MRS y suero no existió diferencia significativa.

Específicamente, la dilución del 40 % del SLC en LAPTg de *P. acidilactici* (figura 15), fue la mínima concentración que inhibió significativamente a Xaj, equivalente

a una absorbancia de 0,22 (datos no mostrados). La significancia de esta especie en LAPTg se muestra en el anexo, tabla 18.



Figura 15. Dilución en caldo en medio LAPTg en base a distintas diluciones del SLC de *P. acidilactici*. Las letras corresponden a diluciones del SLC. A: Control: Xaj sin SLC, B= 5%, C=10%, D=25%, E=40%, F=50%, G=75%, H=Sin diluir, 100%.

La absorbancia obtenida desde la mínima dilución antes mencionada, fue equivalente a 1×10^7 UFC/mL luego de realizar el conteo bacteriano. Lo que equivale a la reducción de una unidad logarítmica en comparación al control, equivalente a 1×10^8 UFC/mL (figura 16).

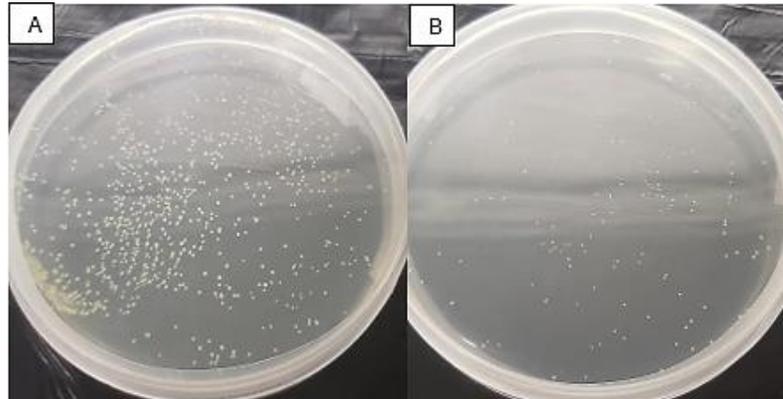


Figura 16. Efecto antibacteriano del SLC de *P.acidilactici* sobre Xaj. En A= control, Xaj sin la aplicación de SLC, equivalente a una concentración de 1×10^8 UFC/ml. En B=40% del SLC de *P. acidilactici* sobre Xaj equivalente a 1×10^7 UFC/ml.

Los valores de absorbancia que permitieron determinar el mejor medio cultivo que inhibió a Xaj en base a la mínima concentración del SLC de bacterias lácticas, se muestra en el resumen de la tabla 10 a continuación.

Tabla 10. Inhibición de Xaj, en base a la absorbancia obtenida a partir de distintas diluciones del SLC de especies BAL. Los valores informados corresponden a la media (\bar{X}) de la absorbancia de las cuatro bacterias lácticas para cada dilución.

Medio crecimiento BAL	Absorbancia							
	Control (Xaj)	Diluciones del SLC de especies BAL						
		1	2	3	4	5	6	7
MRS	0,60	0,38	0,36	0,34	0,29	0,29	0,31	0,32
Lactosuero	0,62	0,38	0,36	0,33	0,28	0,28	0,31	0,32
LAPTg	0,60	0,35	0,32	0,29	0,24	0,26	0,30	0,29

1: 5% SLC, 2: 10% SLC, 3: 25% SLC, 4: 40% SLC, 5: 50%, 6: 75%, 7: 100%

5.1.3 Cultivo dual

Para evaluar la acción de especies BAL contra *D. mutila* se utilizó un método similar al cultivo dual en vista a que los métodos mencionados anteriormente para Xaj, no fueron efectivos para el hongo, así como tampoco la acción del SLC (datos no mostrados).

Los resultados evidenciaron una significativa disminución del diámetro de la colonia del hongo por parte de especies BAL. Específicamente el medio MRS, fue el que generó menor diámetro de colonia, tanto para cultivo directo como pellet de las cuatro especies BAL, no existiendo diferencias significativas entre ellas. Se observa que *P. acidilactici* y *L. kunkeei* redujeron el diámetro de la colonia del hongo, no superando los 5 cm. Por otro lado, para el medio de cultivo LAPTg todas las especies BAL generaron resultados estadísticamente significantes al comparar el cultivo directo del pellet, siendo este último el que generó menores diámetros para las especies *P. acidilactici* y *L. kunkeei*, no superando los 5,5 cm y 4 cm de diámetro de colonia respectivamente en los tres experimentos (figura 17). La significancia del pellet de ambas especies se muestra en el anexo, tabla 19.

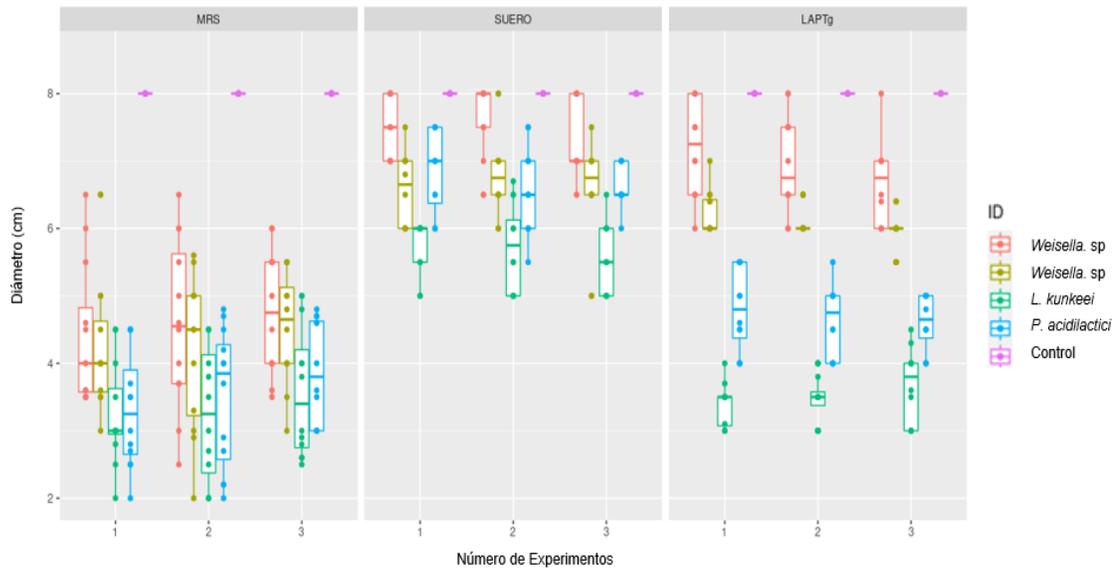


Figura 17. Actividad antifúngica de especies BAL contra *D. mutila* a través de método similar al cultivo dual. Se realizaron tres experimentos independientes en el que se evaluó el cultivo directo y pellet de especies BAL crecidas en tres medios de cultivo diferentes. Los cuadros muestran rangos intercuartílicos en los que se distribuye el diámetro de colonia (cm) y las barras | representan los valores más altos y más bajos.

Tal como ya se había mencionado, las especies *L. kunkeei* y *P. acidilactici* fueron las mejores especies lácticas inhibitorias contras el hongo. En el resumen de la tabla 11, se muestra la inhibición de estas dos cepas, luego de su crecimiento en tres medios diferentes.

Tabla 11. Reducción del tamaño de colonia fúngica generado por *P. acidilactici* y *L. kunkeei* desarrolladas en tres medios de crecimiento. Los valores informados corresponden al rango intercuartílico en cm correspondiente al tamaño de la colonia del hongo. Se incluyen las tres replicas, y no se consideran los valores más altos y bajos.

Especie BAL / Control	Rango de tamaño de colonia (cm) <i>D. mutila</i>		
	MRS	Lactosuero	LAPTg
Control	8	8	8
<i>P. acidilactici</i>	~2,5-4,5	6-7	4-5,5
<i>L. kunkeei</i>	~2,5-4,5	5-6	3-4



Las colonias de *D. mutila* desarrolladas luego de la aplicación de especies BAL, específicamente de *L. kunkeei* y *P. acidilactici*, experimentaron una notable disminución de su diámetro, además de observar colonias de color oscuro en el centro, rodeado de un micelio de color blanquecino (figura 18).

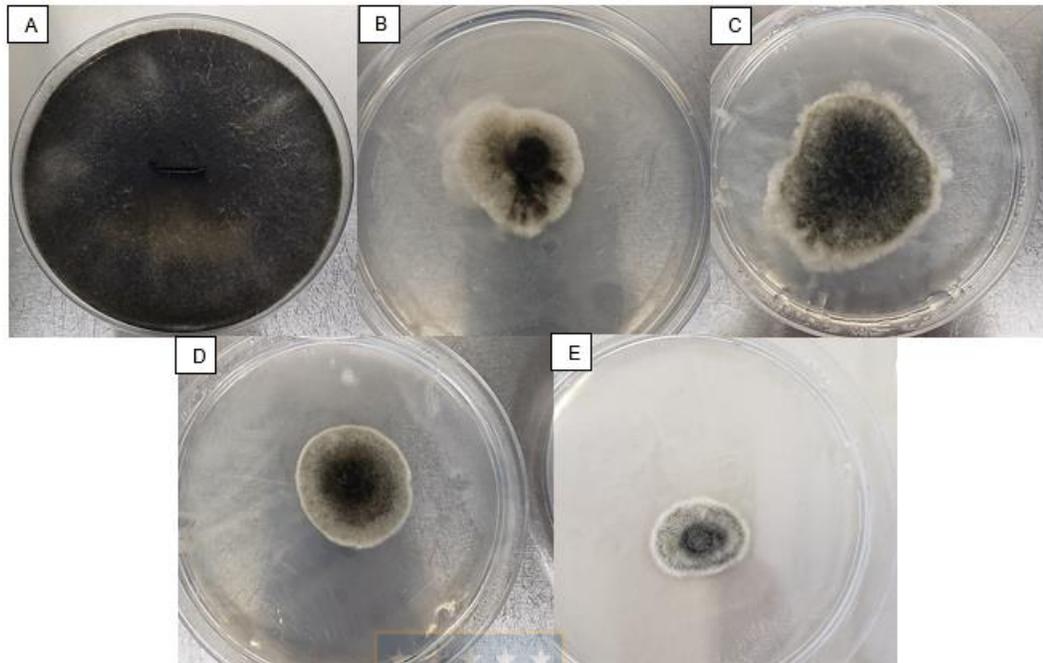


Figura 18. Colonias de *D. munita* obtenidas luego de la aplicación de especies BAL a través de método similar al cultivo dual, luego de 7 días. En A= control, *D. munita*. B y C= Colonia *D. munita* luego de la aplicación de *P. acidilactici* en MRS y LAPTg respectivamente. D y E= Colonia *D. munita* luego de la aplicación de *L. kunkeei* en MRS y LAPTg respectivamente.

5.2 Perfil de metabolitos

5.2.1 Ensayos de neutralización y tratamientos enzimáticos

Se realizaron ensayos de neutralización y tratamientos enzimáticos seleccionados, a objeto de conocer la naturaleza química de las sustancias potencialmente inhibidoras o metabolitos presentes en el SLC de cada una de las especies BAL contra Xaj.

El medio de cultivo para el crecimiento de las bacterias lácticas en este ensayo fue LAPTg, debido a que, al implementar los métodos anteriores, tanto en agar como en caldo, se evidenció mayor inhibición contra Xaj, a diferencia del MRS o lactosuero.

Los resultados de medición de pH sin ajustar y aplicación de los diferentes tratamientos en el SLC de cada cepa, se muestran en la tabla 12 y 13 respectivamente.

Tabla 12. Valor de pH del SLC del cultivo de cada especie BAL.

Especie BAL	pH
<i>Weisella</i> sp.	4,4
<i>Weisella</i> sp.	4,3
<i>P. acidilactici</i>	4,5
<i>L. kunkeei</i>	5,1

Tabla 13. Actividad antimicrobiana del SLC de cepas BAL contra Xaj, aplicando tratamientos de neutralización y enzimas proteolíticas. Se evalúan halos de inhibición generados.

Especie BAL	Xaj				
	NaOH (pH:6.0)	Proteinasa K	Pepsina	α -amilasa	Na ₂ SO ₃
<i>Weisella</i> sp.	+	-	-	-	-
<i>Weisella</i> sp.	+	-	-	-	+
<i>P. acidilactici</i>	-	+	+	-	-
<i>L. kunkeei</i>	-	+	-	+	-

+: Presencia de halo, -: Ausencia de halo

Como se muestra en la tabla 12, el pH de cada uno de los sobrenadantes obtenidos desde el cultivo de cepas BAL se encuentra entre los valores 4.3 como el más bajo, correspondiente a una de las cepas de *Weissella* sp., mientras que el valor más alto de 5.1, fue para la cepa de *L. kunkeei*. Estos resultados son un indicativo que la acidez por sí misma ya genera acción antimicrobiana en este caso, para Xaj, lo que se vio evidenciado en los ensayos anteriores de difusión en pocillo y dilución en caldo.

Por otro lado, la tabla 13 muestra el efecto de inhibición en base a los distintos tratamientos aplicados al sobrenadante. Los resultados evidencian que para las dos cepas de *Weissella* sp., la acción inhibitoria contra el patógeno bacteriano, se debe a la presencia de bacteriocinas, dado la susceptibilidad y no formación de halo de inhibición luego de la acción de las tres enzimas proteolíticas sobre el SLC. También se observó que, en una de ellas, no se generó halo de inhibición después de la aplicación de Na_2SO_3 , lo que representa presencia y acción antimicrobiana por parte del peróxido de hidrogeno (figura 19). Por otro lado, las cepas de *P. acidilactici* y *L. kunkeei* fueron susceptibles y no se evidenciaron zonas de inhibición luego de la neutralización del SLC con NaOH y Na_2SO_3 , lo que sugiere que la acción antibacteriana se debe a la presencia de ácidos orgánicos y peróxido de hidrogeno respectivamente. Además, se observa la susceptibilidad a dos de las tres enzimas proteolíticas, pepsina y α -amilasa por parte de *L. kunkeei* y *P. acidilactici* respectivamente, lo que determina acción antimicrobiana además de origen proteico (figura 20).

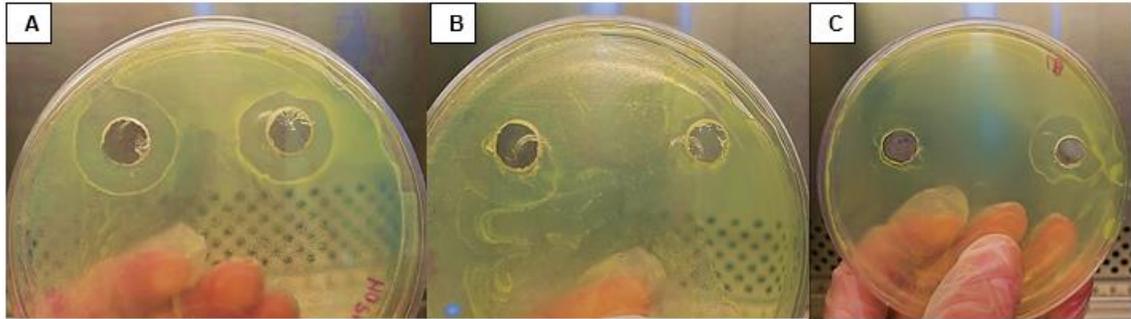


Figura 19. Efecto del SLC de cepas *Weissella* sp. sobre Xaj. En A= acción del SLC neutralizado con NaOH. En B= acción del SLC tratado con enzimas proteolíticas. En C= acción del SLC tratado con Na₂SO₃.

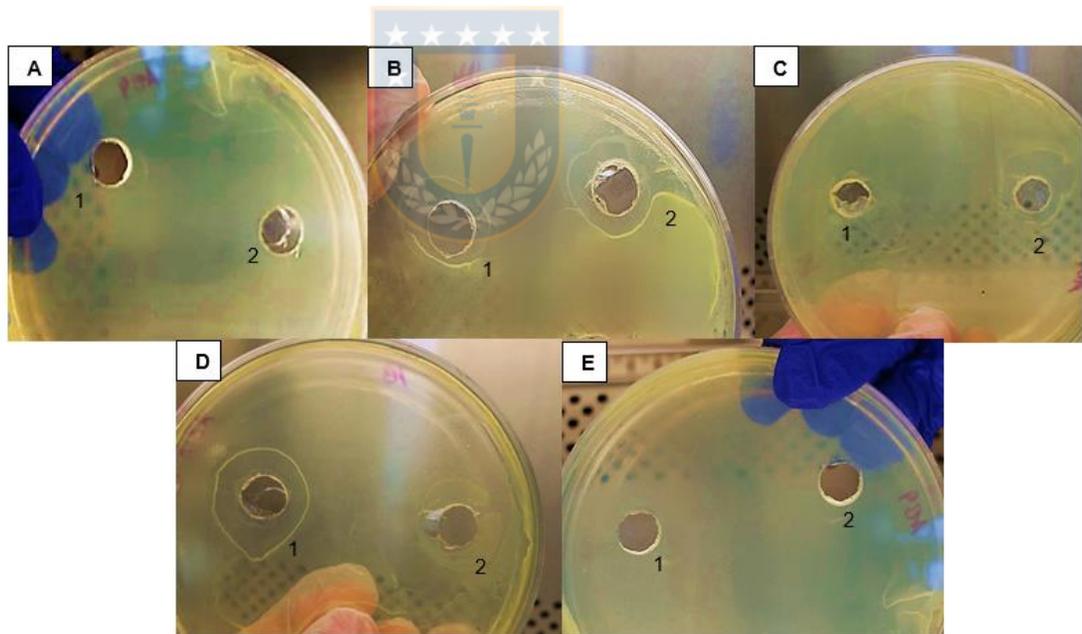


Figura 20. Efecto de SLC de *L. kunkeei* y *P. acidilactici* sobre Xaj. 1=*L. kunkeei* y 2= *P. acidilactici*. En A= acción del SLC neutralizado con NaOH. En B= acción del SLC tratado con proteinasa K. En C= acción del SLC tratado con pepsina. En D= acción del SLC tratado con α -amilasa. En E= acción del SLC tratado con Na₂SO₃.

5.3 Ensayo de eficacia de biocontrol *in vivo*

5.3.1. Implementación de tratamientos preventivos/curativos además de técnica de liofilizado y uso de medio convencional MRS

Las cuatro cepas BAL evaluadas, fueron seleccionadas para ensayos de eficacia en condiciones controladas de laboratorio gracias a su amplio y alto antagonismo *in vitro* contra *D. mutila* y Xaj. Se optó por evaluar la acción del pellet de BAL, en vista a que no hubo acción por parte del SLC contra el hongo, además de evidenciar una eficacia levemente mayor en los métodos *in vitro* anteriormente mencionados.

Para el caso de *D. mutila*, los resultados obtenidos permitieron determinar diferencias significativas en el diámetro de infección, al comparar tratamientos curativos de los preventivos, siendo los primeros, los que ocasionaron mayor enfermedad en el fruto. En los de tipo curativo, se observó que los valores de infección presentaron un amplio rango de distribución, los que a pesar que en su mayoría se concentraron en valores menores o igual a 1 cm, un grupo importante de ellos, fluctuaron entre 3-5 cm para algunas especies lácticas, como en *P. acidilactici* y *L. kunkeei*, bajo la técnica de liofilizado. Situación contraria ocurrió para el tratamiento preventivo, el cual muestra una notable baja en la distribución de los valores de infección para la mayoría de las bacterias lácticas, tanto en MRS, como para el liofilizado. Específicamente en este último para la especie *P.*

acidilactici, se observó una significativa baja en la distribución de los valores, centrándose la mayoría de ellos, en diámetros que no superaron los 2 cm (figura 21A). Luego, se obtuvieron una serie de estimaciones y su significancia estadística al combinar las variables (tratamiento, técnica y cepa láctica) y sus interacciones con la variable tiempo (día), destacándose la significancia de este último factor (figura 21B). Este análisis, evidenció resultados más específicos, siguiendo la línea de lo obtenido en el grafico anterior, éstos, demostraron que la aplicación de tratamientos curativos, generaron una evolución de la enfermedad a través del tiempo, implementando la mayoría de las cepas lácticas, destacando significativamente a *P. acidilactici* en base a la técnica de liofilizado, cuya infección aumentó luego del día 7 alcanzando un promedio de infección de 4,6 cm a los 21 días. El tratamiento preventivo por su lado, generó una reducción aparente de la infección, implementando 3/4 bacterias lácticas en MRS, sin embargo, no fue significativa, además de observar una tendencia al alza de la infección posterior a los 7 días, excepto en *Weisella* sp, la que alcanzó un promedio máximo de infección, cercano a los 3 cm a los 14 días, el que luego al término del ensayo disminuyó a los 2,1 cm, sin embargo, no fue significativo. Por otro lado, *P. acidilactici*, en base a tratamiento preventivo y técnica de liofilizado, fue la más eficiente, ya que generó la menor evolución de la infección de manera significativa con respecto al control, alcanzando un diámetro máximo promedio de 2,3 cm a los 14 días, el que luego disminuyó a la mitad, en los últimos días de evaluación.

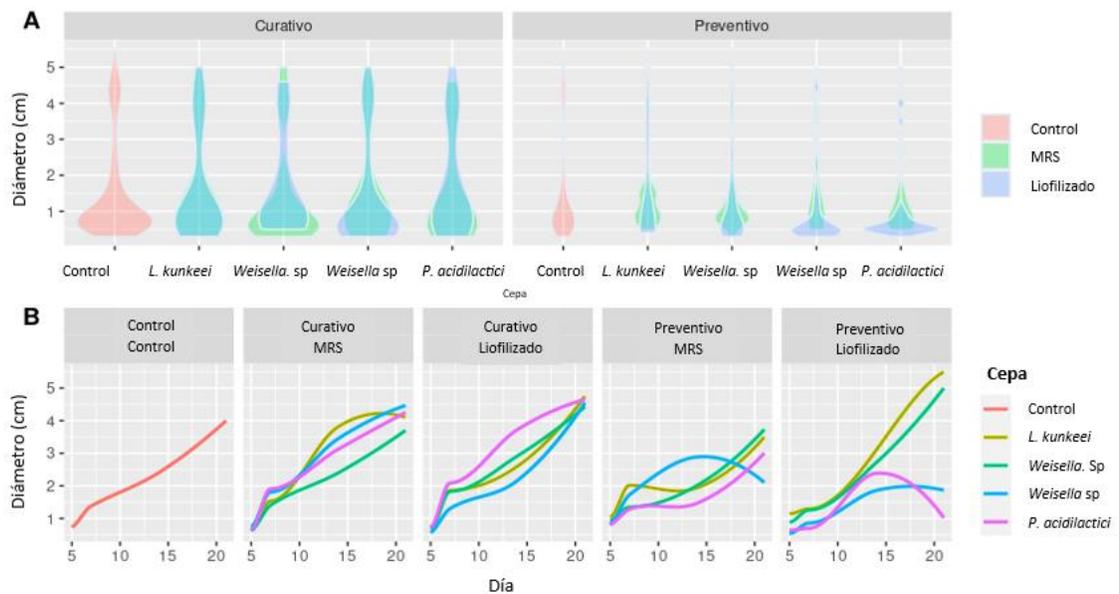


Figura 21. Evolución de infección causada por *D. muthi* en frutos de nuez. En el panel A, se muestra la distribución empírica en los diámetros de infección de cada grupo de tratamiento, curativo-preventivo. En el panel B, se muestra la evolución la infección evaluando el uso de cada cepa láctica en función de los diferentes tratamientos y técnicas a través del tiempo. Las líneas de tendencia corresponden a la media (\bar{X}) para cada BAL, tratamiento y técnica analizado.

La significancia de las variables evaluadas se da a conocer en el anexo, tabla 20. De manera complementaria, se muestra un resumen (tabla 14 y 15), de los resultados de las gráficas estadísticas anteriores. La primera, en base a la distribución empírica de los diámetros de infección, muestra los valores en porcentajes (%) pertenecientes a tres rangos de infección distintos y la segunda tabla, muestra los valores promedios de cada BAL para cada tratamiento y técnica a través del tiempo.

Tabla 14. Distribución de diámetros de infección (cm) en frutos de nuez en tratamientos preventivos-curativos en base al uso de bacterias lácticas contra *D. munita*. Los valores informados corresponden al porcentaje (%) del total de datos analizados.

BAL	Rango infección (cm)	Tratamiento curativo		Tratamiento preventivo	
		M	L	M	L
Control	0 < d ≤ 1	60%	59%	62%	61 %
	1 < d ≤ 3	21%	21%	24%	25 %
	3 < d ≤ 6	19%	20%	14%	14 %
<i>P. acidilactici</i>	0 < d ≤ 1	57 %	49 %	59 %	86 %
	1 < d ≤ 3	25 %	25 %	30 %	4 %
	3 < d ≤ 6	18 %	26 %	11 %	10 %
<i>L. kunkeei</i>	0 < d ≤ 1	49 %	58 %	53 %	65 %
	1 < d ≤ 3	26 %	17 %	32 %	15 %
	3 < d ≤ 6	21 %	25 %	15 %	20 %
<i>Weisella sp</i>	0 < d ≤ 1	52 %	64 %	52 %	77 %
	1 < d ≤ 3	27 %	16 %	30 %	15 %
	3 < d ≤ 6	22 %	20 %	18 %	8 %
<i>Weisella sp</i>	0 < d ≤ 1	64 %	52 %	57 %	62 %
	1 < d ≤ 3	19 %	26 %	29 %	25 %
	3 < d ≤ 6	18 %	22 %	13 %	13 %

M: MRS, L: Liofilizado

Tabla 15. Diámetros de infección (cm) en frutos de nuez generada por *D. munita*, a través del tiempo. Los valores informados corresponden a la media (\bar{X}) para cada BAL, tratamiento y técnica en el tiempo (5, 7, 14 y 21 días).

Infección en frutos de nuez (cm)																
BAL	Curativo								Preventivo							
	MRS				Liofilizado				MRS				Liofilizado			
	5	7	14	21	5	7	14	21	5	7	14	21	5	7	14	21
C	0,6	1,6	2,4	5	0,7	1,7	2,3	4,5	0,7	2	2,7	4	0,6	1,7	3	4
1	0,6	1,9	3,1	4,2	0,7	2,1	3,7	4,6	0,8	1,2	1,4	3,1	0,6	0,6	2,3	1
2	0,6	1,5	3,8	4,1	0,6	1,8	2,6	4,8	1	2	1,9	3,5	1,1	1,2	3,8	5,5
3	0,7	1,8	3,4	4,4	0,5	1,3	2,1	4,5	0,8	1,7	2,8	2,1	0,5	0,8	1,8	1,8
4	0,6	1,4	2,3	3,7	0,7	1,8	2,9	4	0,9	1,3	2	3,7	0,8	1,2	2,7	5

C: control, **1:** *P. acidilactici*, **2:** *L. kunkeei*, **3:** *Weisella* sp., **4:** *Weisella* sp.

Las muestras de frutos estudiadas presentaron síntomas característicos de la enfermedad, las que un comienzo se basaron en lesiones de forma circular o irregular, de color negro con hendiduras leves. Los frutos permanecieron turgentes, aun con la aparición de los primeros síntomas, los que se observaron a los 5 días desde su inoculación (figura 22).



Figura 22. Síntomas de frutos de nuez generados por *D. mutila*. Infección desarrollada a los 5 días.

Luego, en un estado más avanzado de la infección sin la aplicación de BAL (control), se pudo observar la presencia de lesiones negro-marrones de formas irregulares, que en algunos casos abarcaron completamente el fruto volviéndolos necróticos, de turgencia blanda y con apariencia de pudrición (figura 23A). Por otro lado, en aquellos frutos en los que se aplicaron tratamientos de tipo preventivo en base a liofilizado de BAL como *P. acidilactici* se evidenciaron lesiones pequeñas de color oscuro y forma irregular sin hendiduras, conservando un fruto turgente (figura 23B). De manera contraria, la misma tecnología y especie lácticas, pero como tratamiento curativo evidencio lesiones más avanzadas, similares a las descritas para el control y una cubierta fácil de romper (figura 23C).

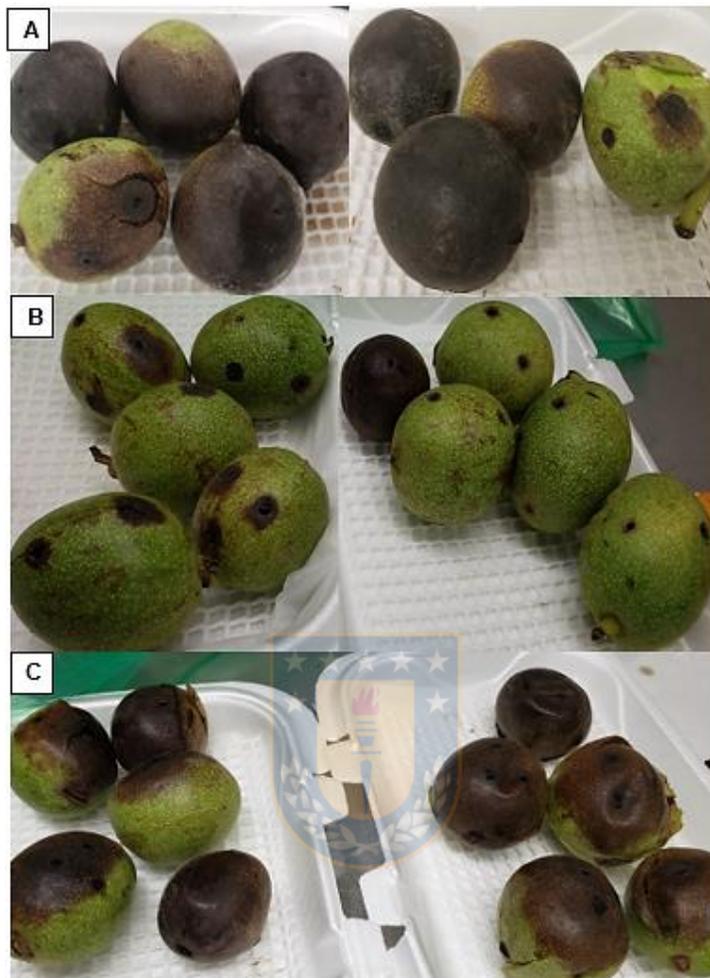


Figura 23. Diferencia de síntomas en frutos de nuez generados por *D. mutila* y control de infección por parte de especie probiótica liofilizada a los 21 días. En A=Control, *D. mutila*. En B y C=Aplicación liofilizado de *P. acidilactici* como tratamiento preventivo y curativo respectivamente.

Para el caso de Xaj, los resultados obtenidos permitieron determinar que tanto tratamientos curativos como preventivos en base a técnica de liofilizado y MRS, disminuyeron la infección del fruto de manera significativa con respecto al control.

En el tipo curativo, se observó que los valores de infección, presentaron un bajo rango de distribución al utilizar todas las bacterias lácticas en MRS y liofilizado, las cuales se centraron en su mayoría en valores menores o igual a 1 cm y solo un grupo menor alcanzó de 3-6 cm de infección. Se destaca en este tratamiento, a *Weisella* sp. y *L. kunkeei* bajo la técnica de liofilizado. El tratamiento preventivo por su parte, destaca significativamente a todas las bacterias lácticas en MRS con una baja distribución de valores de infección, en los que solo una mínima concentración de ellos alcanzó valores cercanos a los 5 cm, al igual que el liofilizado de *Weisella* sp., misma especie que destacó su desempeño a través del tratamiento curativo (figura 24A). Luego, al incorporar el factor tiempo (día) y analizar su interacción con las variables antes mencionadas, se observaron resultados más específicos y siguiendo la línea de lo destacado anteriormente. En el tratamiento curativo, la mejor tecnología fue la de tipo liofilizado, en la que se observa una reducción aparente de la infección, específicamente en *L. kunkeei* con diámetros de infección que no superaron los 2 cm durante todo el periodo de evaluación (21 días), situación similar ocurrió para *Weisella* sp. y *P. acidilactici*, sin embargo, para esta última se observó una rápida evolución de la enfermedad a partir del día 14, alcanzando un diámetro de infección promedio de 3,6 cm al término de la evaluación, a los 21 días. Por otro lado, en el tratamiento preventivo, la mejor tecnología fue la de tipo MRS para las cuatro cepas lácticas, las que no superaron los 2 cm de infección a los 21 días. En esta misma línea, a pesar que la tecnología de liofilizado no supero a MRS, si generó una disminución

de infección significativa. En este sentido, se destaca a *Weisella* sp. (color celeste figura 24 B), cuya aplicación demostró que si bien, el diámetro de infección alcanzado a los 7 días, fue de un promedio de 1,5 cm (antes que las demás especies en MRS), fue la única, en la que se observó una disminución paulatina de la infección después de los 7 días, alcanzando un diámetro de infección promedio de 1,2 cm a los 21 días (figura 24 B).

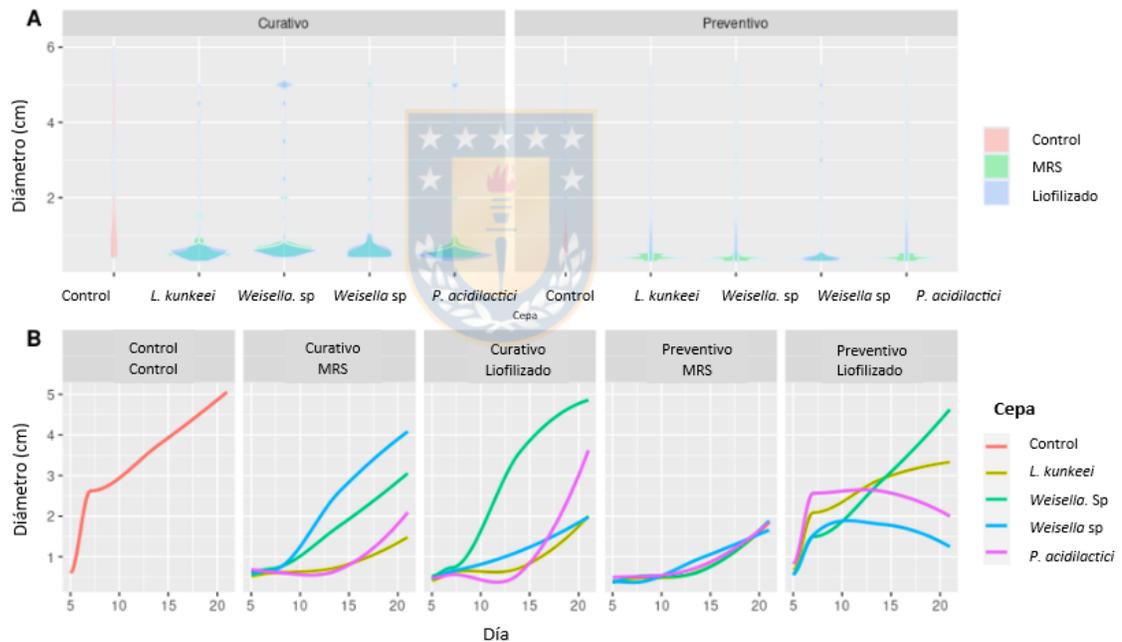


Figura 24. Evolución de infección causada por Xaj en frutos de nuez. En el panel A, se muestra la distribución empírica en los diámetros de infección de cada grupo de tratamiento, curativo o preventivo. En el panel B, se muestra la evolución de cada cepa láctica en función de los diferentes tratamientos (curativo-preventivo) y tecnologías, MRS o liofilizado a través del tiempo.

La significancia de las variables evaluadas se da a conocer en el anexo, tabla 21. Los resultados obtenidos en base a la enfermedad generada por Xaj en frutos de nuez, permitieron concluir que el tratamiento curativo y preventivo en base a liofilizado de *Weisella* sp. aislada de lombriz, demostró ser una alternativa eficiente para el control de la bacteria patógena. A continuación, un resumen de los resultados obtenidos en las graficas anteriormente expuestas (tabla 16 y 17). La primera en base a la distribución empírica de los diámetros de infección, muestra los valores en porcentajes (%), pertenecientes a tres rangos diferentes de infección, y la segunda tabla, muestra los valores promedios de cada BAL, tratamiento y técnica en el tiempo.



Tabla 16. Distribución de diámetros de infección (cm) en frutos de nuez en tratamientos preventivos-curativos en base al uso de bacterias lácticas contra Xaj. Los valores informados corresponden al porcentaje (%) del total de datos analizados.

BAL	Rango infección (cm)	Tratamiento curativo		Tratamiento preventivo	
		M	L	M	L
Control	0 < d ≤ 1	63 %	60 %	63 %	62 %
	1 < d ≤ 3	10 %	12 %	15 %	16 %
	3 < d ≤ 6	27 %	28 %	22 %	22 %
<i>P. acidilactici</i>	0 < d ≤ 1	88 %	89 %	86 %	63 %
	1 < d ≤ 3	8 %	3 %	11 %	12 %
	3 < d ≤ 6	4 %	7 %	3 %	24 %
<i>L. kunkeei</i>	0 < d ≤ 1	88 %	90 %	93 %	68 %
	1 < d ≤ 3	9 %	5 %	3 %	5 %
	3 < d ≤ 6	3 %	5 %	4 %	27 %
<i>Weisella sp</i>	0 < d ≤ 1	79 %	91 %	89 %	77 %
	1 < d ≤ 3	11 %	4 %	5 %	8 %
	3 < d ≤ 6	10 %	5 %	6 %	15 %
<i>Weisella sp</i>	0 < d ≤ 1	84 %	78 %	91 %	69 %
	1 < d ≤ 3	4 %	4 %	4 %	9 %
	3 < d ≤ 6	12 %	18 %	5 %	22 %

M: MRS, L: Liofilizado

Tabla 17. Diámetros de infección (cm) en frutos de nuez generada por Xaj, a través del tiempo. Los valores informados corresponden a la media (\bar{X}) para cada BAL, tratamiento y técnica en el tiempo (5, 7, 14 y 21 días).

Infección en frutos de nuez (cm)																
BAL	Curativo								Preventivo							
	MRS				Liofilizado				MRS				Liofilizado			
	5	7	14	21	5	7	14	21	5	7	14	21	5	7	14	21
C	0,5	3,1	3,8	5,2	0,6	3,2	3,5	5,1	0,6	2,2	3,6	4,9	0,6	2,1	3,7	5,1
1	0,6	0,6	0,6	2,1	0,4	0,5	0,6	3,6	0,5	0,5	0,7	1,8	0,8	2,6	2,6	2
2	0,5	0,6	0,7	1,4	0,4	0,6	0,7	2	0,3	0,4	0,6	1,8	0,6	2,1	2,9	3,3
3	0,5	0,6	2,6	4,1	0,4	0,6	1,1	1,9	0,3	0,3	0,9	1,6	0,5	1,5	1,8	1,2
4	0,6	0,7	1,7	3,1	0,5	0,7	3,5	4,8	0,3	0,5	0,6	1,8	0,5	1,4	2,8	4,6

C: control, 1: *P. acidilactici*, 2: *L. kunkeei*, 3: *Weisella. sp.*, 4: *Weisella. sp*

Las muestras de frutos estudiadas presentaron síntomas característicos de la enfermedad de la peste negra. En los primeros días de infección fue posible observar frutos con lesiones de color oscuro, con aparente halo acuoso alrededor del punto de inoculación, a los 5 días (figura 25).



Figura 25. Síntomas en frutos de nuez generados por Xaj. Infección desarrollada a los 5 días, luego de la inoculación.

Luego, en un estado más avanzado de la infección sin la aplicación de BAL (control), se pudo observar lesiones con hendiduras a medida que aumentaban de tamaño, las que se tornaron blandas de color marrón oscuro a negro para finalmente abrirse. Se observó en algunos ejemplares la exudación de una sustancia de color negro (figura 26 A). Situación contraria ocurrió en aquellos frutos en los que se aplicaron tratamientos en base a BAL. Tratamientos curativos como preventivos en base a liofilizados de *Weisella* sp, generaron un control eficiente contra Xaj, donde se evidenciaron frutos turgentes con pequeñas lesiones que no avanzaron en cuanto a su tamaño, además de no evidenciar hendiduras en el área de inoculación (figura 26 B y C).

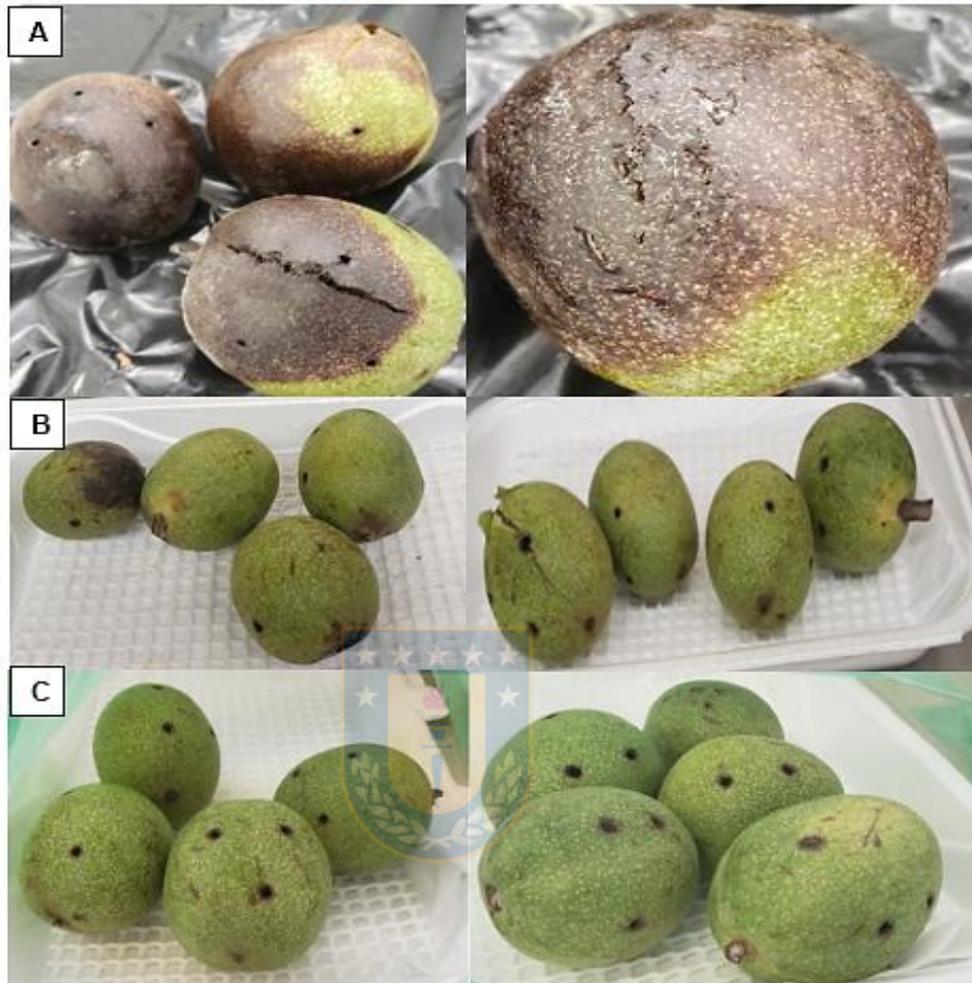


Figura 26. Diferencias de síntomas en frutos de nuez generado por Xaj y control de infección por parte de especie probiótica liofilizada a los 21 días. En A=Control, Xaj. En B y C= Aplicación de liofilizado de *Weisella* sp. como tratamiento curativo y preventivo respectivamente.

6. DISCUSIÓN

Objetivo específico 1. Determinar la actividad antagónica *in vitro* de cepas BAL contra *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Diplodia mutila*.

Métodos de difusión en agar

La literatura científica sugiere que, en ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro*, el tamaño de la zona de inhibición depende del tipo de BAL, el método de prueba y la concentración de esa bacteria, además de factores fisicoquímicos que incluyen la composición del medio de cultivo, lo que influiría en la producción de ciertos metabolitos y biomasa bacteriana que tienen relación directa con la actividad antimicrobiana y son los componentes con mayor potencial para aplicaciones biotecnológicas (Soleimani *et al.* 2010, Vinusha *et al.* 2018).

Dado estos antecedentes, los ensayos *in vitro* fueron realizados evaluando cuatro métodos de difusión distintos, además del SLC, pellet, cultivo directo de especies BAL y medio de crecimiento en el que se desarrollaron. Los resultados de nuestra investigación evidenciaron que, para el método de difusión con discos de agar, si bien no existieron diferencias significativas, en cuanto a cepa y medio de cultivo, se destaca el medio MRS y lactosuero en las cuatro especies, con rangos de inhibición que fluctuaron entre los 10-15 mm, destacando a *P. acidilactici* en suero. Si bien, investigaciones en base a la acción de BAL contra fitopatógenos a través de esta técnica, está documentada, los ensayos se centran mayormente

en el género *Lactobacillus* y medio de cultivo estándar, el que al igual que nuestra investigación ha demostrado una eficiente acción antibacteriana contra especies del género *Xanthomonas*, como lo expuesto por Daranas *et al.* (2018), en el que varias cepas de la especie *L. plantarum*, crecidas en medio MRS ($\sim 1 \times 10^9$ UFC/mL), evidenciaron halos de inhibición mayores a 10 mm a través de esta técnica contra *X. arboricola* pv. *pruni* y *X. fragariae*.

Por otro lado, en los métodos de difusión en pocillo (pellet y cultivo directo), fue posible observar que al igual que el método anterior, no existieron significancias entre las especies y medios de cultivo, liderando MRS y suero, lo que coincide con investigaciones realizadas por Shrestha *et al.* (2014), en el que se demostró una fuerte inhibición por parte del cultivo directo de tres cepas BAL, KLF01, KLC02 y KPD03 obtenido del medio MRS, contra *X. campestris* pv. *visicatoria*, generando halos de inhibición que superaron los 10 mm.

Si bien las cepas BAL son microorganismos exigentes que demandan medios ricos en cultivo con un alto contenido de minerales, vitaminas y nitrógeno, cuentan con un sistema proteolítico que les permite adquirir aminoácidos esenciales necesarios para su crecimiento, permitiéndoles crecer de manera óptima en alimentos ricos en proteínas (Mathias *et al.* 2017, Veeravalli & Mathews 2018). Uno de los medios de cultivo formulado para el crecimiento de BAL, es el MRS, sin embargo, a pesar de ser un medio eficiente, varios de sus componentes son caros, por lo que se ha buscado la sustitución más económica en algunos de

ellos, por ejemplo, residuos agroindustriales proteicos, como desecho de pescado y lactosuero, los que han demostrado mantener la actividad antimicrobiana de BAL incluso mejorarla (Vásquez *et al.* 2019, Worsztynowicz *et al.* 2020). Los componentes del medio lactosuero son principalmente lactosa y proteínas de suero, además de aminoácidos, vitaminas y sales de calcio, potasio, sodio y magnesio demostrándose que es un medio adecuado para el crecimiento de BAL y producción de péptidos antimicrobianos (Sabo *et al.* 2019), lo cual demuestra que, para el caso de nuestros resultados, al no evidenciar diferencias con el medio MRS, en cuanto a eficiencia antimicrobiana por parte de las especies BAL evaluadas, sugiere una alternativa prometedora de sustitución a menores costos e igual eficiencia.

Con respecto al SLC de especies BAL empleando el mismo método de difusión en pocillo, se pudo observar algunos aspectos destacables. Sin embargo, cabe mencionar antes, que la producción de metabolitos depende de la fase de crecimiento del microorganismo ya que la actividad metabólica varía durante el crecimiento microbiano. En general se recomiendan o se prefieren las fases de crecimiento exponencial o estacionario temprano para evaluar la actividad antimicrobiana del SLC ya que en esta etapa las bacterias son metabólicamente activas (Mani-López *et al.* 2022). Otro de los aspectos a mencionar es que la respuesta antimicrobiana del SLC dependerá de la especie como también del medio de crecimiento y condiciones en la que se desarrolle. Específicamente los medios de crecimiento LAPTg, junto a MRS y M17, son uno de los más utilizados

para cultivar BAL y obtener SLC, donde se ha evidenciado notablemente la mayor producción de metabolitos antimicrobianos (Mokoena 2017).

En nuestros resultados, se pudo observar que el SLC para todas las cepas y tipos de medios de crecimiento, se generó inhibición contra Xaj. Esto coincide con los estudios de Daranas *et al.* (2018), en el que el SLC en MRS de especies BAL, inhibió a *X. arboricola* pv. *pruni* y *X. fragariae* a través del método de difusión en pocillo. Este estudio es el más reciente y único en el que se realizan pruebas en base al sobrenadante de bacterias lácticas contra fitopatógenos pertenecientes al género *Xanthomonas* (Pellegrini *et al.* 2020).

Otro de los aspectos destacados en nuestros resultados es que el medio LAPTg, evidenció un leve aumento no significativo, de la actividad antibacteriana contra Xaj, principalmente para *P. acidilactici*. No existen reportes en donde evalúen el desarrollo del SLC en especies del género en este medio, sin embargo, se han llevado a cabo investigaciones en otras especies BAL, como los realizados por Espeche *et al.* (2013), donde evaluaron entre los medios LAPTg, MRS y M17 el más óptimo para el desarrollo del SLC de *Enterococcus mundtii* CRL 1656. Los resultados evidenciaron una mayor producción de metabolitos de tipo proteico en medio LAPTg, mencionando la mayor concentración total de fuentes de nitrógeno presentes (35 g/L), en comparación a MRS (25 g/L) y M17(17,5 g/L), además de la presencia de glucosa como fuente de carbono para los dos primeros medios, versus la lactosa presente en M17, como posibles factores que podrían influir en

una mayor producción de metabolitos, sin embargo, se requieren más estudios que puedan esclarecer y comprobar esta hipótesis. También se encuentra lo realizado por Juárez Tomas *et al.* (2002) donde al igual que en el estudio anterior, identifican que el SLC de *L. salivarius* CRL 1328 desarrollado en LAPTg fue el que permitió desarrollar mayor actividad de metabolitos, específicamente de bacteriocinas en comparación al MRS, el cual permitió un mayor desarrollo de biomasa.

Estos estudios son uno de los pocos en los que evalúan la producción de metabolitos y biomasa de bacterias lácticas en distintos medios. Otros, como los realizados por Bajpai *et al.* (2016) y Husejnagic *et al.* (2016), solo evalúan actividad antibacteriana por parte del SLC de *Pediococcus* y distintas especies del género *Lactobacillus* respectivamente en medio MRS, a través del método de difusión en pocillo, sin embargo, no se hace comparación con otros medios, lo cual es de real importancia a la hora de otorgar las mejores condiciones en las que en este caso los metabolitos presentes en el SLC, puedan ejercer de manera óptima su acción antimicrobiana.

Dilución en caldo

Dado a que no se logró evidenciar de manera significativa, el mejor medio de cultivo para el SLC de especies BAL en el método anterior y tomando en cuenta que posteriormente de acuerdo a estos resultados se implementaría el mejor medio de cultivo para el ensayo de perfil de metabolitos, y con el fin de poder

implementar (si era posible) un medio de cultivo estándar para las cuatro especies BAL en el que se potenciara el desarrollo del sobrenadante, se evaluó a través del método de dilución en caldo, la acción de SLC de las cuatro bacterias lácticas, y a la vez se determinó la mínima concentración que pudiera inhibir a Xaj.

En este ensayo se evidenció que el medio LAPTg inhibió significativamente a Xaj para todas las bacterias lácticas, destacando al igual que el método de difusión en pocillo a *P. acidilactici*. Específicamente la aplicación del 40% del SLC de esta bacteria fue la mínima concentración que inhibió significativamente a Xaj, en aproximadamente una unidad logarítmica con respecto al control. LAPTg es considerado un medio de crecimiento relativamente simple y económico, aspectos que resultan de suma importancia para proyectar la producción industrial en este caso del SLC sobre cultivos agrícolas de interés (Juarez Tomás *et al.* 2002). Sin embargo, los datos sobre el uso del SLC en la agricultura son limitados para BAL y su aplicación en ella ha sido completamente ignorada en las últimas décadas, no existiendo ningún estudio en el que se haya investigado la formulación y la vida útil de los SLC, aspecto limitante que se relaciona directamente con los procesos posteriores para su producción (Pellegrini *et al.* 2020). Esta situación se refleja en que investigaciones disponibles como las realizadas por Arena *et al.* (2016), Poppi *et al.* (2015) y Xie *et al.* (2016) entre otros, si bien evalúan la acción del SLC de BAL contra bacterias patógenos, no se evalúan condiciones propicias para el desarrollo del sobrenadante como

tampoco van dirigidos a la inhibición de fitopatógenos importantes en la agricultura, sino más bien hacia patógenos que generan afecciones tanto en humanos como animales (Mani-López *et al.* 2022)

Nuestros resultados, constituyen uno de los pocos estudios en los que se evalúan la acción del SLC de especies BAL contra fitopatógenos y algunos factores que pudieran influir en su potencial antimicrobiano, complementando de cierta manera al estudio realizado por Daranas *et al.* (2018), requiriendo indudablemente más pruebas que permitan conocer los beneficios de su implementación, los que podrían llegar a ser un gran aporte para la protección y salud de agroecosistemas.



Cultivo dual

Para probar la capacidad antagonica de las bacterias lácticas, se utilizó el método de cultivo dual, con algunas modificaciones (Chen *et al.* 2016, Yoshida *et al.* 2001). Los resultados obtenidos, evidenciaron una notable acción inhibitoria de las cuatro especies BAL contra *D. mutila*, destacando el medio MRS y LAPTg en base al pellet de *L. kunkeei* y *P. acidilactici* principalmente, lo que indica que la acción antifúngica de estas especies contra el hongo, se encuentra en algún componente de la célula bacteriana y no en metabolitos extracelulares, lo que requiere de estudios más específicos para lograr identificarlos.

No existen reportes en los que evalúan la inhibición contra *D. mutila* o contra hongos de la familia o género, constituyendo a esta investigación como el primer

reporte, sin embargo, se ha estudiado la acción de BAL contra hongos pertenecientes a la división, Ascomycota, a la cual pertenece *D. munita*. Investigaciones llevadas a cabo por Chen *et al.* (2020), evaluaron la actividad antifúngica por parte del pellet de BAL en MRS, contra *B. cinérea*, a través del método de cultivo dual con algunas modificaciones (Zhou *et al.* 2011). Los resultados demostraron que *L. plantarum* CM-3 redujo el crecimiento micelial del hongo alcanzando un 79,80%, eficacia que se correlacionó positivamente con la concentración de la solución bacteriana (1×10^9 UFC/mL). Otra de las investigaciones fueron las realizadas por Chen *et al.* (2021), en los que evaluaron la acción antifúngica a partir del cultivo directo en MRS de *P. acidilactici* y *L. kefir* contra cinco cepas de *Penicillium expansum* a través del método de superposición con algunas modificaciones (Magnusson & Schnurer 2001). Los resultados demostraron una fuerte inhibición contra 4/5 cepas del hongo, lo que fue atribuible a la presencia en una de ellas a enzimas líticas posiblemente presentes en peptidoglicano de la bacteria, las que podrían haber actuado, además, en conjunto con la presencia de ácidos orgánicos presentes en el SLC de ambas bacterias.

Objetivo específico 2. Identificar un perfil de metabolitos de cepas BAL seleccionadas con propiedades antagónicas *in vitro* hacia los patógenos de nogal investigados.

Se ha determinado que el uso del SLC como antimicrobiano, tiene ventajas sobre el uso de compuestos purificados o aislados presentes en él, los que van desde ácidos orgánicos simples y productos metabólicos primarios hasta compuestos más complejos derivados de bioconversiones o síntesis de péptidos, así como de la escisión de proteínas. Este material líquido, es una mezcla de metabolitos con actividad antimicrobiana de amplio espectro y que entre ellos se genera una bioactividad sinérgica o aditiva que puede mejorar de manera importante la acción inhibitoria de patógenos tanto bacterianos como fúngicos. (Mani-López *et al.* 2022). Esto fue corroborado en estudios realizados por Le Lay *et al.* (2016), donde analizaron los compuestos producidos por diferentes especies BAL, e identificaron variados ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrogeno como los principales componentes inhibitorios, identificando que para los ácidos orgánicos su acción en el sobrenadante, era mayor que cada uno de los ácidos de forma independiente al igual que el peróxido de hidrogeno, requiriendo además, en algunos casos, la acción conjunta de metabolitos de distinta naturaleza para ejercer su efecto antimicrobiano. A pesar de ello, los estudios se enfocan solo en el mecanismo de los compuestos individuales descuidando los efectos sinérgicos y/o aditivos.

En primer lugar, nuestros resultados evidenciaron bajos valores de pH de cada una de las cepas evaluadas, principalmente en cepas de *Weissella* sp., lo que sugiere la presencia de ácidos orgánicos de tipo débil como una de las principales vías de acción antimicrobiana, los que reducen el pH circundante que estresa a las células de patógenos. Igualmente, estos ácidos, permeabilizan la membrana celular y entran al citoplasma donde se disocian y bajan el pH interno, desencadenando la inhibición celular (Tashiro *et al.* 2010). Para el caso de las cepas de *L.kunkeei* y *P.acidilactici*, los valores de pH fueron algo superiores, lo que sugiere que su actividad metabólica, puede deberse a la acción de péptidos bioactivos, o peróxido de hidrogeno entre otros metabolitos, lo cual se evidenció en los análisis de neutralización y tratamientos enzimáticos que a continuación se discuten. Al respecto, los resultados demostraron una situación similar a los antecedentes antes mencionados por Le Lay *et al.* (2016). ya que en las cuatro cepas lácticas la acción inhibitoria contra Xaj, se debió a la acción conjunta de metabolitos de distinta naturaleza, presentes en el sobrenadante, y en ningún caso a la participación única de un tipo de metabolito.

Luego del tratamiento enzimático del SLC en las dos cepas de *Weissella* sp., se sugiere fuertemente que el factor que causó las zonas inhibitoras observadas en estos ensayos es de origen principalmente proteico, seguido de la acción de peróxido de hidrogeno en una de ellas. Datos similares fueron informados por Garzón *et al.* (2017) quienes observaron en el SLC de *Weissella confusa*, la inactivación de la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas de

tipo alimentario, luego del tratamiento con enzimas proteolíticas como proteinasa K y pepsina, concluyendo que este hallazgo, era un indicativo de la naturaleza proteica de sustancias similares a bacteriocinas y cuyo modo de acción para esta cepa se atribuyen en algunos casos a péptidos de clase II, que generan la disrupción de la membrana celular, permitiendo la liberación de moléculas de ADN y ARN provocando finalmente una muerte celular rápida (Tenea & Lara 2019). Adicionalmente la eliminación de la zona de inhibición promovida por la α -amilasa de nuestros resultados, indica que estas sustancias similares a bacteriocinas pueden ser glicoproteínas, que pertenecen al grupo IV de su clasificación, el cual contiene carbohidratos y lípidos en la estructura molecular. Sin embargo, este hecho debe confirmarse después de la purificación de la bacteriocina y la determinación de su estructura (Todorov *et al.* 2011). La presencia de este tipo de proteínas se ha reportado para la especie *W. paramesenteroides* que produce leuconocina S, glicoproteína estable al calor que altera la membrana celular bacteriana, generando un efecto antibacteriano (Papagianni 2012, Simons *et al.* 2020). Se ha identificado que el impacto de los péptidos antimicrobianos en la célula bacteriana podría depender de la cepa bacteriana objetivo, el tipo de péptido y su concentración en el SLC, lo que requiere de estudios más exhaustivos para lograr resultados más eficientes a la hora de tratar un patógeno (Tenea & Lara 2019).

Por otro lado, la eliminación de la zona inhibitoria generada luego del tratamiento con Na_2SO_3 , sugiere la acción del H_2O_2 como metabolito antibacteriano en una

de las cepas de *Weissella* sp. Se han reportado pocos estudios que determinen la acción del peróxido de hidrogeno de este género frente a fitopatógenos. Uno de los pocos, es el realizado por Trias *et al.* (2008b) en el cual determinaron la acción antibacteriana de *Weissella cibaria* TM 128 en base a la presencia de H₂O₂ y ácidos orgánicos como inhibidores del crecimiento de bacterias fitopatógenas deteriorantes de frutas y hortalizas como *Erwinia carotovora* de tipo Gram negativa. Por otro lado, estudios recientes en área de higiene bucal de Lim *et al.* (2018) también en *Weissella cibaria*, determinaron que la acción antibacteriana contra bacterias periodontopatógena de tipo Gram negativo fue promovida por la acción de H₂O₂ y ácidos. Se ha reportado que la acción de este compuesto, depende principalmente de la concentración aplicada y factores como temperatura y pH. Actúa como mecanismo de protección de los colonizadores iniciales frente a especies competidoras (Lim *et al.* 2018).

En cuanto a las especies *L. kunkeei* y *P. acidilactici*, presentaron resultados similares. Nuestros ensayos evidenciaron la eliminación de la zona de inhibición luego de la neutralización del SLC con NaOH, lo que indica la presencia de ácidos orgánicos como agentes antibacterianos, seguida de la acción del H₂O₂ después del tratamiento con Na₂SO₃ en ambas especies ácido lácticas. También se evidenció la actividad proteica del SLC de ambas especies, en respuesta al tratamiento con enzimas proteolíticas como pepsina en *L. kunkeei* y α -amilasa en *P. acidilactici*, demostrando este último, naturaleza glicoprotéica.

Un gran número de estudios, evidencian que los ácidos orgánicos son uno de los principales componentes responsables de la actividad antimicrobiana *in vitro* en especies del género *Lactobacillus* (Mani-López *et al.* 2022). Su producción depende del género, especie, medio de cultivo para su crecimiento, fuente de carbono y condiciones de cultivo generadas (Mani-López *et al.* 2022). Además, es el mecanismo más importante a través del cual varias especies de BAL inactivan los patógenos gradualmente a medida que el pH desciende, son los principales metabolitos de la fermentación láctea, seguida de la actividad proteica de bacteriocinas (Hladíková *et al.* 2012, Gao *et al.* 2019).

Específicamente para *L. kunkeei*, son escasos los estudios en los que evalúen la presencia de metabolitos antimicrobianos contra fitopatógenos, sin embargo, para su género, investigaciones realizadas por Daranas *et al.* (2018), específicamente en *L. plantarum* PM411 y TC92 determinaron que la producción de ácidos orgánicos como ácido láctico, fue la principal responsable de la actividad antibacteriana contra fitopatógenos de *Xanthomonas* como *X. fragariae*, *X. arboricola* pv. *pruni* y *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, responsables del daño en cultivos de fresa, almendro y kiwi respectivamente. Adicionalmente investigaciones realizado por Scillato *et al.* (2021) evaluaron la acción antibacteriana presente en el SLC, de distintas cepas de *Lactobacillus* contra patógenos Gram negativos de tipo urogenital, resultando en la acción conjunta de ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas en algunas de ellas, lo que demuestra la acción sinérgica que potencia la actividad antagónica de

BAL. Se adicionan además los antecedentes, por un lado, que las cargas netas inducidas por el pH podrían facilitar la translocación de algunas moléculas específicas de bacteriocinas por medio de la pared celular, y por otro, el ambiente ácido podría influir en la producción y actividad antibacteriana de ciertas bacteriocinas (Oliveira *et al.* 2017, Yang *et al.* 2018).

Par el caso del género *Pediococcus*, estudios realizados por Fugaban *et al.* (2021), identificaron a través de ensayos metabolómicos en *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, como buenos productores tanto de ácidos orgánicos como de tipo graso, lo que fue también corroborado por investigaciones realizadas por Bajpai *et al.* (2016), en la especie *P. pentosaceus* 4I1, donde identificaron la inhibición contra bacterias Gram negativas de tipo alimentaria debido a la presencia de compuestos ácidos de tipo grasos, orgánicos, aminoácidos y además sustancias similares a bacteriocina. Este último estudio se asemeja a los resultados de nuestra investigación, sin embargo, no existen reportes de estudios donde se identifique la acción del H₂O₂ como uno de los agentes antibacterianos de este género o especie. Este hecho puede deberse a que, para el patógeno blanco, en este caso Xaj, la especie *P. acidilactici* requiera la acción sinérgica de los tres tipos de metabolitos para lograr su inhibición. Estudios realizados por Gi-Seong *et al.* (2002), evidenciaron que en *P. acidilactici* K10, los ácidos orgánicos son los primeros en romper la membrana externa de bacterias de tipo Gram negativa, permitiéndoles y facilitando posteriormente la entrada a bacteriocinas, logrando que ejerzan su acción inhibitoria de manera sinérgica, ya

que estas por sí sola no lo lograban. En cuanto al mecanismo del H₂O₂, se han realizado investigaciones de Zhang *et al.* (2019), en la que se evidencia la acción conjunta con ácidos orgánicos como el ácido láctico de BAL (*Lactobacillus* sp), cuyo accionar sinérgico se manifestaría al penetrar ambos a través de la membrana por libre difusión. Al ingresar en la célula, cuyo ambiente es casi neutro, el ácido láctico se disocia en iones de hidrogeno como iones de lactato, estos últimos en conjunto con iones de hierro intracelulares, forman complejos que catalizan la producción de OH[·] a partir de H₂O₂. Este OH[·], podría atacar al ADN celular junto a lípidos y a otras sustancias vitales importantes, además de generar cambios en la permeabilidad celular y extravasación del contenido celular, provocando finalmente muerte celular. En nuestros resultados, se requieren de más estudios que permitan dilucidar esta asociación, sin embargo, se infiere que, para estos géneros, la acción de los ácidos orgánicos sería fundamental para permitir la entrada de un segundo o tercer metabolito de distinta naturaleza, o bien accionar en conjunto para ejercer el efecto antibacteriano.

Objetivo específico 3. Determinar la eficacia de biocontrol *in vivo* de cepas BAL seleccionadas, según respuesta *in vitro* para inhibir *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *Diplodia mutila* en frutos de nogal.

Un gran número de BAL son ampliamente reconocidas por su actividad antimicrobiana, tanto contra bacterias como hongos fitopatógenos responsables del deterioro de cultivos de gran importancia económica en la agricultura. Esto es

corroborado por estudios realizados por Ma *et al.* (2019), donde identificaron que de las sesenta y ocho BAL evaluadas en base al SLC, tres, específicamente *L. sucicola*, *W. paramesenteroides* y *P. acidilactici* presentaron la más alta actividad antifúngica contra *Penicillium digitatum*, patógeno característico de cítricos en postcosecha. Los resultados demostraron que en ensayo *in vitro* como *in vivo* generaron una excelente inhibición contra el hongo. En ensayos con frutos se identificó una reducción de la enfermedad para *L. sucicola* de un 73%, en *W. paramesenteroides* de un 42% y para *P. acidilactici* un 23%, y cuyos diámetros de lesión fueron de 33, 38 y 37 mm respectivamente. Esta inhibición en las tres cepas se debió a la presencia de componentes de naturaleza proteica. También se destaca el estudio realizado por Chen *et al.* (2020), en el que el pellet bacteriano de *L. plantarum* CM-3, presentó una reducción significativa de la enfermedad del moho gris en fresa, desarrollada por *B. cinerea* alcanzando una disminución del 75% representada en ensayos *in vivo* en base a frutos.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación destacan a *P. acidilactici*, como método preventivo utilizando técnica de liofilizado, como el tratamiento más eficiente contra el hongo, alcanzando un diámetro de infección máximo de 2,5 cm, equivalente a una reducción del 50% en comparación al control. En este sentido, nuestros resultados se asimilan a los realizados por Ma y colaboradores, en el que la especie destaca como una de las más eficientes a la hora de reducir la infección en frutos contra hongos. Si bien nuestra investigación no fue realizada en base al SLC, sino más bien en base al pellet bacteriano, es un indicativo que

además de la acción de bacteriocinas frente a fitopatógenos fúngicos, el pellet de esta bacteria en sí, presenta otros posibles compuestos o mecanismos capaces de degradar o reducir, por ejemplo, el contenido de metabolitos tóxicos que deterioran órganos en plantas generados por hongos como *D. munita*. Estudios realizados por Ma *et al.* (2017), identificaron que *P. acidilactici* tiene la capacidad de remover la presencia de micotoxinas (AFB1) en un 59.6%, a través del mecanismo de adsorción por medio de componentes de la pared celular bacteriana. Mientras que estudios realizados por Abrunhosa *et al.* 2014, en otras especies del género como *P. parvulus*, generó una remoción de la micotoxina, ocratoxina A (OTA), del 100% a través de mecanismos de degradación, el que fue evidenciado por medio de la hidrólisis (mediada por peptidasas), del enlace amida de OTA, resultando en la liberación de OT α y fenilalanina, los productos no tóxicos de la reacción. Este último mecanismo podría asemejarse a lo ocurrido en nuestros resultados ya que la ocratoxina, presenta en su estructura molecular una dihidroisocumarina, tipo de metabolito fitotóxico producido por *D. munita*, responsable del necrosamiento y marchitamiento de órganos, sin embargo, se requieren más estudios que permitan corroborar el mecanismo de remoción generado entre la bacteria y el metabolito tóxico de *D. munita* (Reveglia *et al.* 2018).

Por otro lado, el tratamiento preventivo fue el que generó un menor desarrollo de infección en los frutos de nuez, en comparación a los de tipo curativo, indicativo que éstos, requieren de una protección previa para evitar daños y pérdidas

irreversibles en el fruto, en este caso en base a la utilización de BAL contra *D. mutila*, evitando de esta manera la aplicación de pesticidas sintéticos que son catalogados frecuentemente como acciones de tipo curativas, y son precisamente métodos que se requieren reducir lo máximo posible, para lograr un manejo integral de enfermedades (Green *et al.* 2020). Esto es corroborado por el reporte de Mewa-Ngongang *et al.* (2021), en el que ensayos en frutos contra hongos de *B. cinerea* y *Monilinia laxa* evidencian la importancia de prevenir antes que curar la enfermedad, representado en un 95% y 58% respectivamente en la reducción de la enfermedad por parte de un tipo de levadura. Se destacan además investigaciones realizada por Chen *et al.* (2020), Trias *et al.* (2008a) y Trias *et al.* (2008b) en los que implementan tratamientos de tipo preventivo en base a BAL contra hongos en frutos, sin embargo, no realizan ensayos de tipo curativos que permitan realizar la comparación.

Otro de los resultados destacables en nuestra investigación es que la técnica de liofilizado (generada en nuestro laboratorio) dentro del tratamiento preventivo, contribuyó a una mejora en la reducción de lesiones en frutos, evidenciándose una disminución importante en el tamaño de la lesión a través del tiempo para la especie *P. acidilactici* en comparación al uso de MRS. A partir de un concentrado de BAL obtenido por centrifugación y posterior resuspensión del pellet obtenido en agua destilada, se aplica el proceso de liofilización. Ésta es una técnica que se basa en el principio de sublimar el hielo de un producto congelado. El agua del producto pasa del estado sólido (hielo) al estado vapor, sin pasar por estado

líquido (Sandhya & Disha 2020). Se adicionan crioprotectores para facilitar el flujo de agua a través de la membrana celular, protegiendo tanto estructuras moleculares como supra- moleculares a través de diferentes formas de acción, además de compensar la diferencia de presión osmótica que se genera cuando comienza la etapa de congelación en la superficie celular, incrementándose la concentración de solutos evitando deshidratación y muerte celular (Dhingra & Sinclair 1985).

La tendencia en la disminución del diámetro de infección evidenciada en los resultados de nuestra investigación, puede atribuirse además de la especie y tratamiento, a algunas características propias del liofilizado que podrían haber influido en este excelente resultado, como por ejemplo, una alta estabilidad de esta tecnología al no dejar agua libre (eliminación del 95-99.5%), no hay riesgo de hidrolisis y contaminación por otros microorganismos, es decir, se mantiene la esterilidad fácilmente y la duración de su conservación es larga. Al trabajar a baja temperatura, los productos termolábiles no se alteran y, por otro lado, al evaporarse el hielo quedan poros que permiten una rehidratación o reconstitución rápida (Sandhya & Disha 2020, Casp & Abril 1999).

En general las bacterias probióticas liofilizadas, se han utilizado ampliamente en aplicaciones farmacéuticas (Saez-Lara *et al.* 2015), snacks (Li *et al.* 2018), barras de soja (Chen & Mustapha 2012) y productos lácteos (Dimitrellou *et al.* 2019, Gadhiya *et al.* 2018), sin embargo, no se ha informado sobre BAL y su efecto

antifúngico en cultivos frutales, solo se encuentra el estudio de Halttunen *et al.* (2008), donde evidencian la acción de *Bifidobacterium breve* como biomasa liofilizada, sobre la remoción de la micotoxina AFB1 en un 21,4% a través de mecanismos de adsorción, sin embargo, no se realiza una comparación con otras tecnologías y desempeño en ensayos *in vivo*. Esto indica la necesidad e importancia de generar más estudios que permitan comprobar las variadas ventajas de esta técnica, en conjunto con bacterias ácido lácticas sobre cultivos frutales de importancia económica como el nogal.

En el caso de los efectos de BAL sobre Xaj, existen reportes mencionados anteriormente en esta investigación, que evidencian los potentes efectos inhibitorios contra algunas especies del género *Xanthomonas* en ensayos *in vivo*. Estudios realizados por Daranas *et al.* (2018), determinaron que la aplicación de tratamientos preventivos en base al pellet bacteriano de BAL, específicamente cepas PM411 y TC92 de *L. plantarum*, causaron una reducción de la enfermedad en plantas de almendro y fresa generadas por *X. arboricola* pv. *pruni* y *X. fragariae* respectivamente, evidenciando valores entre un 59,1-69,3% (TC92) y un 45,5-65,5% (PM411) contra la primera bacteria patógena, mientras que un rango de 35,4-69,2% (TC92) y un 45,8-92,3% (PM411) se observó para el segundo fitopatógeno en condiciones controladas de invernadero. Otro de los estudios destacables es el realizado por Shrestha *et al.* (2014) en el que tratamientos preventivos en base al pellet bacteriano de BAL, redujeron de manera importante la infección en plantas de pimiento causada por *X. campestris*

pv. *vesicatoria* en condiciones de invernadero, alcanzando una de ellas un 73,9% de reducción de enfermedad en invernadero y un 94,5% en campo.

Las investigaciones antes mencionadas, tienen relación a los obtenidos en nuestra investigación, específicamente en donde se evidencia a BAL como excelentes agentes antibacterianos de especies del género *Xanthomonas* en ensayos *in vivo* bajo condiciones controladas.

En nuestros resultados, se destaca que cepas BAL evaluadas son una excelente alternativa como tratamientos curativos y preventivo, específicamente en base a liofilizados de especies de *L. kunkeei*, *Weisella* sp (aislada de lombriz) y *P. acidilactici*, para curativo, mientras que para el preventivo destaca liofilizado de *Weisella* sp (aislada de lombriz), catalogándose como el mejor tratamiento, ya que fue el único en el que se evidenció una disminución de la infección, alcanzando un máximo de 2 cm de diámetro del tamaño de lesión, después de 7 días. Investigaciones han demostrado que cepas bacterianas individuales presentan propiedades biológicas intrínsecas y un espectro inhibitor contra patógenos a través de mecanismos específicos, que también influyen en esta respuesta y que, si bien existen pocos estudios acerca de mecanismos no relacionados a sus metabolitos, si algunos de ellos han permitido conocer estructuras celulares que permitirían su acción antibacteriana (Bagad *et al.* 2017). Estudios realizados por Martin *et al.* (2019), determinaron que la proteína de la capa superficial (proteína de la capa S), presente en la envoltura exterior de la

pared celular bacteriana de *L. acidophilus*, y que participa en la adherencia de las bacterias en la célula huésped, al interactuar con macromoléculas como el LPS de bacterias Gram negativas, ocasionó muerte celular en especies como *Pseudomonas aeruginosa*, demostrando su actividad antibacteriana al identificar que la parte C terminal de la proteína de la capa S, presentaba actividad similar a la lectina. Otras investigaciones, como las realizadas por García-Cano *et al.* (2011) y Gandhi *et al.* (2020), han identificado que el peptidoglicano de *P. acidilactici*, alberga al menos dos enzimas líticas, una de ellas reconocidas como peptidoglucano hidrolasa (PGH), específicamente una N-acetilmuramidasa la que mostró acción antibacteriana contra bacterias patógenas Gram negativas y positivas, en al menos dos unidades logarítmicas de crecimiento.

Por otro lado, al igual que para los efectos contra *D. mutila*, los resultados obtenidos contra Xaj, pueden atribuirse además de la especie, a las ventajas ya mencionadas de la técnica de liofilizado, la que, si bien fue superada en eficiencia al uso de MRS, demostró una tendencia al aumento a través del tiempo. Esto demuestra que la aplicación de esta técnica promete ser una alternativa eficiente, sin embargo, al igual que para *D. mutila*, se requiere comprobar sus efectos a través estudios más exhaustivos que permitan evidenciar sus efectos sobre fitopatógenos en condiciones de campo.

En resumen, nuestros resultados en frutos de nuez, demostraron que el liofilizado de bacterias probióticas en base a *P. acidilactici* y *Weisella* sp (aislada de lombriz), combatieron de manera eficiente a *D. mutila* y Xaj respectivamente.

Para efectos de una aplicación a gran escala, hay que tomar en cuenta que, para la eficacia de la formulación probiótica, depende de la cepa empleada y principalmente de su viabilidad (Coeuret *et al.* 2004). Tomando en cuenta que la viabilidad del liofilizado en base a los probióticos antes mencionados, fue de $\sim 10^{10}$ UFC/g, la dosis aplicada en nuestro ensayo de frutos, fue de $\sim 10^7$ UFC/mL (1g/L), concentración mínima recomendada para ser considerada una bacteria probiótica, asegurando así, que sus beneficios se acumularán de manera sostenida (Peres *et al.* 2012). Esta viabilidad y dosis permitió reducir la infección en frutos de nuez para ambos fitopatógenos en más de un 50%, en ensayos bajo condiciones controladas, dando indicios de lo que podría ser eficiente si se proyecta su uso como bioplaguicida microbiano a escala industrial, sin embargo, para ello, es necesario realizar previamente con estos antecedentes, además de otros ensayos en laboratorio, pruebas piloto (campo e invernadero) en varios patosistemas y en diversas condiciones ambientales, para así, garantizar una amplia gama de aplicabilidad, así como la consistencia en la eficacia de condiciones reales (Montesinos 2003).

7. CONCLUSIONES

A partir del desarrollo de esta tesis es posible concluir los siguiente;

- Especies BAL autóctonas provenientes de plantas e insectos, poseen actividad antagónica *in vitro*, contra fitopatógenos de nogal, Xaj y *D. mutila*, demostrado a través de métodos de difusión, dilución y técnica similar al cultivo dual respectivamente. La implementación de métodos de difusión, demostraron que todas las cepas lácticas evaluadas inhibieron a la bacteria patógena, mientras que se destacan a dos de las cuatro bacterias lácticas, *L. kunkeei* y *P. acidilactici*, como principales inhibidoras contra el hongo.
- El perfil de metabolitos a partir de ensayos de neutralización y tratamiento enzimático, permitieron determinar que la actividad inhibitoria contra Xaj, se debe parcialmente a la acción de ácidos orgánicos, ya que se identificó solo para las especies de *L. kunkeei* y *P. acidilactici*, en conjunto con bacteriocinas y peróxido de hidrogeno. Mientras que para las dos cepas de *Weisella* sp, los metabolitos fueron de naturaleza proteica y peróxido de hidrogeno en una de ellas.
- Los ensayos *in vivo* en frutos de nuez, demostraron que cepas BAL fueron eficaces en el biocontrol contra ambos fitopatógenos. Específicamente el más eficiente tratamiento contra *D. mutila*, fue el de tipo preventivo en base a liofilizado de *P. acidilactici*. Mientras que los de tipo preventivo y curativo demostraron ser eficientes contra Xaj, destacando al liofilizado de *Weisella*

sp (aislada de lombriz). A través de estos tratamientos, se observó la disminución de la infección en el tiempo contra ambos fitopatógenos.



8. PROYECCIONES

El presente trabajo, constituye el primer estudio en el que se logró demostrar la eficacia de especies BAL contra fitopatógenos causales de importantes enfermedades en el nogal, constituyendo un interesante recurso desde un punto de vista científico y comercial. El mercado de los bicontroladores está en constante crecimiento, por lo que la formulación de nuevos productos podría ser una inversión financiera válida en un mercado muy lucrativo, sin embargo, estos productos para ser comercializados requieren de varios estudios científicos en laboratorio, para llegar a proyectar su uso a escala industrial. Actualmente esta investigación se posiciona en un nivel de madurez tecnológica o Technology Readiness Levels (TRL) de tipo TRL4, aun en entorno de laboratorio, en el cual se requieren incorporar otros ensayos que permitan, por ejemplo, caracterizar a las bacterias antagonistas seleccionadas, de manera no tan solo fenotípica sino que también genotípicamente, conocer además sus mecanismos de acción específicos y analizar la eficacia de biocontrol en pruebas piloto (invernadero y campo), para luego llegar a formular y elaborar el biopesticida microbiano, el cual requiere a su vez de otras etapas específicas que permitan finalmente comercializar el producto.

Si bien estos aspectos no son fáciles de abordar, creemos que la formulación de productos naturales para la agricultura, no solo es importante a nivel científico,

sino que también para el planeta, haciendo frente a una demanda de alimentos que actualmente sustenta su producción en base al uso excesivo de químicos.



9. ANEXOS

Tabla 18. Estimación de los efectos explicativos de la configuración de la experimentación dilución en caldo.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	3.93e-01	2.19e-02	3.41e-09	17.97 1.0000
ID9F	-3.44e-02	3.10e-02	3.41e-09	-1.11 1.0000
IDAB1B	-2.58e-02	3.10e-02	3.41e-09	-0.83 1.0000
IDAB9	-9.67e-03	3.10e-02	3.41e-09	-0.31 1.0000
IDControl	2.07e-01	2.80e-02	2.28e-09	7.40 1.0000
Dilucion	-1.81e-02	3.31e-03	2.88e+02	-5.46 1e-07 ***
TypeSUERO	-5.57e-03	2.09e-02	2.88e+02	-0.27 0.7900
TypeLAPTg	-1.88e-02	2.09e-02	2.88e+02	-0.90 0.3690
ID9F:Dilucion	8.77e-03	4.67e-03	2.88e+02	1.88 0.0615 .
IDAB1B:Dilución	8.82e-03	4.67e-03	2.88e+02	1.89 0.0601 .
IDAB9:Dilucion	5.04e-03	4.67e-03	2.88e+02	1.08 0.2822
ID9F:TypeSUERO	-5.14e-03	2.96e-02	2.88e+02	-0.17 0.8620
IDAB1B:TypeSUERO	4.00e-03	2.96e-02	2.88e+02	0.14 0.8925
IDAB9:TypeSUERO	2.62e-03	2.96e-02	2.88e+02	0.09 0.9295
IDControl:TypeSUERO	2.52e-02	2.29e-02	2.88e+02	1.10 0.2713
ID9F:TypeLAPTg	-7.05e-03	2.96e-02	2.88e+02	-0.24 0.8117
IDAB1B:TypeLAPTg	-4.45e-02	2.96e-02	2.88e+02	-1.51 0.1331
IDAB9:TypeLAPTg	-7.97e-02	2.96e-02	2.88e+02	-2.70 0.0074 **
IDControl:TypeLAPTg	3.85e-02	2.29e-02	2.88e+02	1.68 0.0940
Dilucion:TypeSUERO	6.19e-04	4.67e-03	2.88e+02	0.13 0.8947
Dilucion:TypeLAPTg	1.76e-03	4.67e-03	2.88e+02	0.38 0.7065
ID9F:Dilucion:TypeSUERO	-1.07e-04	6.61e-03	2.88e+02	-0.02 0.9871
IDAB1B:Dilucion:TypeSUERO	-1.08e-03	6.61e-03	2.88e+02	-0.16 0.8699
IDAB9:Dilucion:TypeSUERO	-1.31e-03	6.61e-03	2.88e+02	-0.20 0.8431
ID9F:Dilucion:TypeLAPTg	2.50e-03	6.61e-03	2.88e+02	0.38 0.7056
IDAB1B:Dilucion:TypeLAPTg	8.33e-04	6.61e-03	2.88e+02	0.13 0.8998
IDAB9:Dilucion:TypeLAPTg	9.07e-03	6.61e-03	2.88e+02	1.37 0.1710

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 AB1B: *L. kunkeei*, AB9: *P. acidilactici*, 9F, 31F: *Weisella* sp.

Tabla 19. Estimación de los efectos explicativos de la configuración de la experimentación cultivo dual.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	3.70e+00	4.31e-01	5.08e-09	8.57 1.00000
Replica2	5.00e-03	4.45e-02	5.08e+02	0.11 0.91057
Replica3	2.50e-02	4.45e-02	5.08e+02	0.56 0.57446
ID9F	-1.33e-01	6.09e-01	5.04e-09	-0.22 1.00000
IDAB1B	-1.10e+00	6.09e-01	5.04e-09	-1.81 1.00000
IDAB9	-9.11e-01	6.09e-01	5.04e-09	-1.50 1.00000
IDControl	4.29e+00	6.09e-01	5.04e-09	7.06 1.00000
`Cultivo dual`2	1.75e+00	1.41e-01	5.08e+02	12.44 <2e-16 ***
TypeSUERO	3.61e+00	1.41e-01	5.08e+02	25.62 <2e-16 ***
TypeLAPTg	2.65e+00	1.41e-01	5.08e+02	18.83 <2e-16 ***
ID9F:`Cultivo dual`2	-2.72e-01	1.99e-01	5.08e+02	-1.37 0.17191
IDAB1B:`Cultivo dual`2	-2.50e-01	1.99e-01	5.08e+02	-1.26 0.20957
IDAB9:`Cultivo dual`2	-2.22e-01	1.99e-01	5.08e+02	-1.12 0.26463
IDControl:`Cultivo dual`2	-1.75e+00	1.99e-01	5.08e+02	-8.79 <2e-16 ***
ID9F:TypeSUERO	-7.06e-01	1.99e-01	5.08e+02	-3.55 0.00043 ***
IDAB1B:TypeSUERO	-6.17e-01	1.99e-01	5.08e+02	-3.10 0.00205 **
IDAB9:TypeSUERO	-1.11e-02	1.99e-01	5.08e+02	-0.06 0.95549
IDControl:TypeSUERO	-3.61e+00	1.99e-01	5.08e+02	-18.12 < 2e-16 ***
ID9F:TypeLAPTg	-1.39e-01	1.99e-01	5.08e+02	-0.70 0.48552
IDAB1B:TypeLAPTg	-1.46e+00	1.99e-01	5.08e+02	-7.31 1.0e-12 ***
IDAB9:TypeLAPTg	-3.17e-01	1.99e-01	5.08e+02	-1.59 0.11215
IDControl:TypeLAPTg	-2.65e+00	1.99e-01	5.08e+02	-13.32 < 2e-16 ***
`Cultivo dual`2:TypeSUERO	-1.28e+00	1.99e-01	5.08e+02	-6.45 2.6e-10 ***
`Cultivo dual`2:TypeLAPTg	-5.78e-01	1.99e-01	5.08e+02	-2.90 0.00385 **
ID9F:`Cultivo dual`2:TypeSUERO	1.83e-01	2.81e-01	5.08e+02	0.65 0.51504
IDAB1B:`Cultivo dual`2:TypeSUERO	-3.33e-02	2.81e-01	5.08e+02	-0.12 0.90576
IDAB9:`Cultivo dual`2:TypeSUERO	3.39e-01	2.81e-01	5.08e+02	1.20 0.22906
IDControl:`Cultivodual`2:TypeSUERO	1.28e+00	2.81e-0	5.08e+02	4.56 6.4e-06
ID9F:`Cultivo dual`2:TypeLAPTg	-8.89e-01	2.81e-01	5.08e+02	-3.16 0.00168 **
IDAB1B:`Cultivo dual`2:TypeLAPTg	-1.49e+00	2.81e-01	5.08e+02	-5.31 1.6e-07 ***
IDAB9:`Cultivo dual`2:TypeLAPTg	-1.85e+00	2.81e-01	5.08e+02	-6.57 1.2e-10 ***
IDControl:`Cultivo dual`2:TypeLAPTg	5.78e-01	2.81e-01	5.08e+02	2.05 0.04057 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 AB1B: *L. kunkeei*, AB9: *P. acidilactici*, 9F, 31F: *Weisella* sp

Tabla 20. Estimación de los efectos explicativos de la configuración de la experimentación eficacia biocontrol *D.mutila*.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	-0.070	0.207	-0.337	0.736	
TreatCurativo	0.078	0.038	2.067	0.039	*
TreatPreventivo	-0.040	0.038	-1.055	0.292	
CepaABIB	0.082	0.029	2.803	0.005	**
Cepa31F	0.006	0.028	0.212	0.832	
Cepa9F	-0.030	0.028	-1.077	0.281	
CepaAB9	-0.020	0.028	-0.709	0.478	
TecMRS	0.047	0.034	1.375	0.169	
TecP,T	-0.009	0.034	-0.251	0.802	
Day	0.183	0.023	7.892	0.000	***
TreatCurativo:CepaABIB	-0.038	0.039	-0.972	0.331	
TreatPreventivo:CepaABIB	0.120	0.042	2.862	0.004	**
TreatCurativo:Cepa31F	-0.050	0.038	-1.305	0.192	
TreatPreventivo:Cepa31F	0.055	0.039	1.435	0.152	
TreatCurativo:Cepa9F	-0.002	0.038	-0.066	0.947	
TreatPreventivo:Cepa9F	-0.027	0.038	-0.719	0.472	
TreatCurativo:CepaAB9	0.168	0.039	4.330	0.000	***
TreatPreventivo:CepaAB9	-0.188	0.037	-5.108	0.000	***
TreatCurativo:TecMRS	0.012	0.032	0.364	0.716	
TreatPreventivo:TecMRS	0.035	0.032	1.115	0.265	
TreatCurativo:TecP,T	0.067	0.032	2.086	0.037	*
TreatPreventivo:TecP,T	-0.075	0.033	-2.287	0.022	*
CepaABIB:TecMRS	0.013	0.039	0.328	0.743	

Cepa31F:TecMRS	-0.097	0.037	-2.612	0.009	**
Cepa9F:TecMRS	0.157	0.038	4.164	0.000	***
CepaAB9:TecMRS	-0.026	0.037	-0.689	0.491	
CepaABIB:TecP,T	0.069	0.041	1.674	0.094	.
Cepa31F:TecP,T	0.103	0.039	2.662	0.008	**
Cepa9F:TecP,T	-0.187	0.038	-4.965	0.000	***
CepaAB9:TecP,T	0.006	0.038	0.161	0.872	
TreatCurativo:CepaABIB:TecMRS	0.033	0.060	0.550	0.582	
TreatPreventivo:CepaABIB:TecMRS	-0.020	0.062	-0.322	0.747	
TreatCurativo:Cepa31F:TecMRS	-0.092	0.058	-1.585	0.113	
TreatPreventivo:Cepa31F:TecMRS	-0.006	0.058	-0.096	0.923	
TreatCurativo:Cepa9F:TecMRS	0.071	0.059	1.194	0.233	
TreatPreventivo:Cepa9F:TecMRS	0.086	0.058	1.491	0.136	
TreatCurativo:CepaAB9:TecMRS	0.000	0.060	-0.005	0.996	
TreatPreventivo:CepaAB9:TecMRS	-0.025	0.055	-0.457	0.648	
TreatCurativo:CepaABIB:TecP,T	-0.071	0.061	-1.160	0.246	
TreatPreventivo:CepaABIB:TecP,T	0.140	0.067	2.087	0.037	*
TreatCurativo:Cepa31F:TecP,T	0.042	0.059	0.713	0.476	
TreatPreventivo:Cepa31F:TecP,T	0.061	0.061	0.994	0.320	
TreatCurativo:Cepa9F:TecP,T	-0.073	0.057	-1.279	0.201	
TreatPreventivo:Cepa9F:TecP,T	-0.113	0.060	-1.902	0.057	.
TreatCurativo:CepaAB9:TecP,T	0.169	0.060	2.816	0.005	**
TreatPreventivo:CepaAB9:TecP,T	-0.163	0.057	-2.832	0.005	**

---Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 AB1B: *L. kunkeei*, AB9: *P. acidilactici*, 9F, 31F: *Weissella* sp

Tabla 21. Estimación de los efectos explicativos de la configuración de la experimentación eficacia biocontrol Xaj.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
(Intercept)	0.855	0.561	1.523	0.128	
TreatCurativo	-0.395	0.034	-11.758	< 2e-16	***
TreatPreventivo	-0.316	0.035	-9.144	< 2e-16	***
TecMRS	-0.480	0.034	-14.331	< 2e-16	***
TecP,T	-0.231	0.035	-6.659	0.000	***
CepaABIB	-0.231	0.027	-8.660	< 2e-16	***
Cepa31F	-0.092	0.028	-3.343	0.001	***
Cepa9F	-0.209	0.027	-7.839	0.000	***
CepaAB9	-0.178	0.028	-6.456	0.000	***
Day	0.159	0.061	2.592	0.010	**
TreatCurativo:TecMRS	-0.079	0.029	-2.756	0.006	**
TreatPreventivo:TecMRS	-0.401	0.029	-13.752	< 2e-16	***
TreatCurativo:TecP,T	-0.316	0.029	-10.767	< 2e-16	***
TreatPreventivo:TecP,T	0.085	0.033	2.586	0.010	**
TreatCurativo:CepaABIB	-0.252	0.034	-7.315	0.000	***
TreatPreventivo:CepaABIB	0.021	0.037	0.574	0.566	
TreatCurativo:Cepa31F	0.058	0.036	1.604	0.109	
TreatPreventivo:Cepa31F	-0.150	0.038	-3.917	0.000	***
TreatCurativo:Cepa9F	-0.004	0.035	-0.126	0.899	
TreatPreventivo:Cepa9F	-0.205	0.036	-5.629	0.000	***
TreatCurativo:CepaAB9	-0.196	0.035	-5.636	0.000	***
TreatPreventivo:CepaAB9	0.018	0.040	0.450	0.653	
TecMRS:CepaABIB	-0.191	0.034	-5.555	0.000	***

TecP,T:CepaABIB	-0.040	0.037	-1.070	0.285	
TecMRS:Cepa31F	-0.146	0.035	-4.131	0.000	***
TecP,T:Cepa31F	0.054	0.039	1.374	0.170	
TecMRS:Cepa9F	0.015	0.035	0.439	0.660	
TecP,T:Cepa9F	-0.225	0.037	-6.155	0.000	***
TecMRS:CepaAB9	-0.158	0.035	-4.555	0.000	***
TecP,T:CepaAB9	-0.020	0.040	-0.501	0.616	
TreatCurativo:TecMRS:CepaABIB	-0.096	0.052	-1.833	0.067	.
TreatPreventivo:TecMRS:CepaABIB	-0.095	0.054	-1.758	0.079	.
TreatCurativo:TecP,T:CepaABIB	-0.156	0.054	-2.894	0.004	**
TreatPreventivo:TecP,T:CepaABIB	0.117	0.061	1.919	0.055	.
TreatCurativo:TecMRS:Cepa31F	-0.039	0.055	-0.722	0.470	
TreatPreventivo:TecMRS:Cepa31F	-0.107	0.055	-1.939	0.053	.
TreatCurativo:TecP,T:Cepa31F	0.098	0.058	1.692	0.091	.
TreatPreventivo:TecP,T:Cepa31F	-0.044	0.064	-0.684	0.494	
TreatCurativo:TecMRS:Cepa9F	0.112	0.055	2.031	0.042	*
TreatPreventivo:TecMRS:Cepa9F	-0.096	0.054	-1.789	0.074	.
TreatCurativo:TecP,T:Cepa9F	-0.116	0.055	-2.136	0.033	*
TreatPreventivo:TecP,T:Cepa9F	-0.108	0.059	-1.842	0.066	.
TreatCurativo:TecMRS:CepaAB9	-0.056	0.052	-1.073	0.283	
TreatPreventivo:TecMRS:CepaAB9	-0.103	0.056	-1.840	0.066	.
TreatCurativo:TecP,T:CepaAB9	-0.141	0.056	-2.524	0.012	*
TreatPreventivo:TecP,T:CepaAB9	0.121	0.068	1.780	0.075	.

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 AB1B: *L. kunkeei*, AB9: *P. acidilactici*, 9F, 31F: *Weisella* sp

10. REFERENCIAS

Abedi E & Bagher Hashemi S. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. (2020). *Heliyon* 6 e04974.

Abrunhosa L, Ines A, Rodrigues A.I, Guimaraes A, Pereira V.L, Parpot P & Venancio A. (2014). Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 45-52.

Adaskaveg, J.E., Forster, H. & Wade, L. (2010). Re-discovery of kasugamycin for managing fire blight and other bacterial diseases of plants in the United States. *Phytopathology*, 100, 166.

Adaskaveg, J. E., Gubler, W. D., and Michailides, T. J. (2017). Fungicides, Bactericides, and Biologicals for Deciduous Tree Fruit, Nut, Strawberry, and Vine Crops. University of California Online Statewide IPM Program.

Ahlberg, S. H, Joutsjoki, V, & Korhonen, H. J. (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 87–102.

Álvarez-Sieiro P, Montalbán-López, M., Mu, D, & Kuipers, O.P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology Biotechnology* 100: 2939–2951.

Álvarez-Olmos, M. I., & Oberhelman, R. A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 32, 1567- 1576.

An S, Potnis N, Dow M, Vorholter F, He Y, Becker A, Teper D, Wang N, Bleris L & Liang J. (2019). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *Fems Microbiology Reviews* 1:1-32.

Andrew J. (1992) Biological control in the phyllosphere. *Annual Review Phytopathology*. 30, 603-635.

Arena M.P, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G & Fiocco D.(2016). Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 7: 464

Bale J.S, Van Lenteren J.C, Bigler F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Science* 363:761–776.

Barros C. P, Guimarães J. T, Esmerino, E. A, Duarte M. C. K, Silva M. C, Silva, R, Ferreira, B. M, Sant'Ana, A. S, Freitas, M. Q. & Cruz, A. G. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: Concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 1-8.

Barzman, M, Barberi, P, Birch, A.N.E., Boonekamp, P, Dachbrodt-Saaydeh, S, Graf. B, Hommel, B, Jensen. J.E. Kiss, J, Lamichhane. J.R., Messean. A, Besoain X, Guajardo J & Campos R. (2017). First report of *Diplodia mutila* causing gummy canker in *Araucaria araucana* in Chile. *Plant Disease* 101(7), 1328.

Bagad M, Pande R, Dubey V & Ranjan A. (2017). Survivability of freeze-dried probiotic *Pediococcus pentosaceus* strains GS4, GS17 and *Lactobacillus gasseri* (ATCC 19992) during storage with commonly used pharmaceutical excipients within a period of 120 days. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.doi: 10.1016/j.apjtb.2017.09.005.

Bajpai V.K, Han J-H, Rather I.A, Park C, Lim J, Paek W.K, Lee J.S, Yoon J.I, & Park Y-H. (2016). Characterization and Antibacterial Potential of Lactic Acid Bacterium *Pediococcus pentosaceus* 4I1 Isolated from Freshwater Fish *Zacco koreanus*. *Frontiers in Microbiology* 7, 2037.

Bédard F & Biron E. (2018). Recent Progress in the Chemical Synthesis of Class II and S-Glycosylated Bacteriocins. *Frontiers in Microbiology*, 9,1048



Berendsen, R.L, Pieterse, C.M.J., & Bakker, P.A.H.M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17: 478–486.

Besoain X, Guajardo J & Camps R. First Report of *Diplodia mutila* causing gummy canker in *Araucaria araucana* in Chile. *Plant Disease* 101: 1328.

Bhattacharyya P.N, Goswami M.P, Bhattacharyya L.H. (2016). Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: a review. *Journal of Phytotherapy* 8:26–41.

Blagojev. N, Škrinjar. M, Vesković-Moračanin. S, Šošo. V. (2012). Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Romanian Biotechnological Letters*. 17, 7219–7226.

Bombelli E, Wright E, Moschini R, Lopez M, Del Carmen M, Barberis J & Rivera M. (2012). Modelado computacional de datos epidemiológicos para predecir enfermedades de cultivos con base meteorológica. 10° Simposio sobre la Sociedad de la Información. 322-337.

Božović, D; Jacimovic, V & Lazovic, B. (2014). Following Walnut Footprints in Montenegro. In Following Walnut Footprints (*Juglans regia* L.) Cultivation and Culture, Folklore and History, Traditions and Uses; Monographs Scripta 17; International Society of Horticultural: Leuven, Belgium, pp. 259–268. ISBN 978-94-6261-003-3.

Buchner, R.P, Gilles C., Olson, W.H., & Adaskaveg, J.E. (2014). Walnut blight Management Using *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* Dormant bud Population Sampling. Proceedings of the 7th Intern. Walnut Symposium, Acta Horticulturae 1050, 331–338.

Cameron A & Sarojini V. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives. Plant Pathology 63: 1-11.

Canto, A., & Herrera, C.M. (2012). Micro-organisms behind the pollination scenes: microbial imprint on floral nectar sugar variation in a tropical plant community. Annals of Botany 110: 1173–1183.

Casp A & Abril J. (1999). Procesos de conservación de alimentos. Tecnología de alimentos. Editorial AMV. Ediciones y Mundi-Prensa. Madrid. 494pp.

Cesa-Luna C, Baez A, Quintero-Hernandez V, De la Cruz-Enriquez J, Castañeda-Antonio M & Muñoz-Rojas J. (2019). The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Acta Biológica Colombiana*. 25 (1):140-154.

Chen C, Belanger R, Benhamou N & Paulitz T. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 56:13-23.

Chen C, Cao Z, Li J, Tao C, Feng C & Hang Y. (2020). A novel endophytic strain of *Lactobacillus plantarum* CM-3 with antagonistic activity against *Botrytis cinerea* on strawberry fruit. *Biological control* 148, 104306.

Chen H, Hongmei Ju, Yuwei W, Du G, Yan X, Cui Y, Yuan Y & Yue T. (2021). Antifungal activity and mode of action of lactic acid bacteria isolated from kefir against *Penicillium expansum*. *Food Control* 130, 108274.

Chen M & Mustapha A. (2012). Survival of freeze-dried microcapsules of α -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. *Food Microbiology* 30, 68-73.

Chen X, Zhan Y, Fu X, Li Y, Wang Q. (2016). Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biology and Technology*. 115: 113-121.

Coeuret, V., Gueguen, M., Vernoux, J.P. (2004). *In vitro* screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *Journal of Dairy Research*, 71(4), 451-60.

Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advance Research*, 19:29-37.

Cuevas-González, P. F, Liceaga, A. M & Aguilar-Toalá, J. E. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, 136, 109502.

Deegan L, Cotter P, Hill C & Ross P. (2006). Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf- life extension. *International Dairy Journal* 16(9):1058-1071.

De Ambrosini, V. M., Gonzalez, S., Perdigon G., Holgado A. P. D & Oliver, G. (1996). Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 44(12), 2263–2267.

De Simone N, Capozzi V, Chiara M, Amodio M, Brahimí S, Colelli G, Drider D, Spano G & Russo P. (2021). Screening of Lactic Acid Bacteria for the Bio-Control of *Botrytis cinerea* and the Potential of *Lactiplantibacillus plantarum* for Eco-Friendly Preservation of Fresh-Cut Kiwifruit. *Microorganisms* 9, 773.

Daranas N. (2018). Biological control of quarantine bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains. Improvement of fitness and monitoring. Tesis Doctoral. Universidad de Girona.

Daranas N, Roselló G, Cabrefiga J, Donati I, Francés J, Badosa E, Spinelli F, Montesinos E & Bonaterra A. (2018). Biological control of bacterial plant diseases

with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. *Annals of Applied Biology* 1-14.

Dhingra O.D & Sinclair J.B. (1985). *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 355p.

Díaz G, Ferrada E, Latorre B, Bravo F, Lolas M y Gutiérrez M. (2018). First Report of *Diplodia mutila* Causing Branch Die Back of English Walnut cv Chandler in the Maule Region. *Plant Disease* 102:1451-1452.

Dimitrellou D, Kandyli P & Kourkoutas Y. (2019). Assessment of freeze-dried immobilized *Lactobacillus casei* as probiotic adjunct culture in yogurts. *Foods*. 8, 374.

Domotor D, Frank T, R'ákhely G, Doffkay Z, Gyorgy S & Kovacs T. (2016). Comparative analysis of two bacteriophages of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Infection genetic and evolution*. doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.011.

Duar, R.M, Lin, X.B, Zheng, J, Martino, M.E, Grenier, T & Pérez-Muñoz, M.E. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Review* 41: S27–S48.

Einarsson H & Lauzon H. (1995). Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (2): 669-676.

Endo A, Maenos S, Tanizawa Y, Kneifel W, Arita M, Dicks L & Salmien S. (2018). Fructophilic lactic acid bacteria, a unique group of fructose-fermenting microbes. *Applied Environmental Microbiology* 84 e01290–e01218.

Espeche M.C, Juárez Tomas M.S, Wiese B, Bru E & Nader Macías M.E.F. (2013). Physicochemical factors differentially affect the biomass and bacteriocin production by bovine *Enterococcus mundtii* CRL1656. *Journal of Dairy Science*, 97(2):789-797.

FAO. 2019. Plant Production and Protection Division: Integrated Pest Management. URL <https://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/ipm/en/>. Acceso: 5.01.2022.

Fernandes de Sousa D, Rodrigues S, Veras de Lima H & Torres Chaga L. (2019). R software packages as a tool for evaluating soil physical and hydraulic properties. *Computers and Electronics in Agriculture*. doi.org/10.1016/j.compag.2019.105077.

FIA & Chile Nut. (2010). Fundación para la Innovación Agraria y Asociación Gremial de Productores y Exportadores de Nueces de Chile. 2010. Producción de nueces de nogal. Disponible en: <http://bibliotecadigital.fia.cl/>. Revisado el 30 de mayo 2022.

Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Essakhi, S., Manceau, C., & Jacques, M.-A. (2015). Aggressive emerging pathovars of *Xanthomonas arboricola* represent widespread epidemic clones that are distinct from poorly pathogenic strains, as revealed by multilocus sequence typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4651–4668.

Filannino. P, Gobbetti. M, Angelis. M.D & Cagno. R.D. (2014). Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: an energetic advantage for strictly

heterofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 7574–7582.

Filannino. P, Di Cagno. R & Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Current Opinion in Biotechnology*. 49: 64–72

Foo J, Ling H, Lee Y & Chang M. (2017). Microbiome engineering: Current applications and its future. *Biotechnology Journal*. 12(3) 1600099.

Fugaban J, Vazquez J, Jin Y, Ho D, Sung E, Gombossy B, Vitanova I & Heinrich W, Dimitrov S. (2021). Antimicrobial properties of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from silage. *Journal of Applied Microbiology* 00: 1-20.

Gabrielsen C, Brede D.A, Nes I.F, Diep D.B. (2014). Circular Bacteriocins: Biosynthesis and Mode of Action. *Applied Microbiology Journal*, 80 (22):6854-6862.

Gadhiya D, Shah N.P, Patel A.R & Prajapati J.B, (2018). Preparation and shelf-life study of probiotic chocolate manufactured using *Lactobacillus helveticus* MTCC 5463. *Acta alimentaria*. 47 (3): 350-358.

Gajbhiye. M.H & Kapadnis. B.P. (2016). Antifungal-activity- producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants. *Biocontrol Science and Technology*. 26: 1451–1470.

Gandhi D, Chanalia P, Bansal P & Dhanda. (2020). Peptidoglycan Hydrolases of Probiotic *Pediococcus acidilactici* NCDC 252: Isolation, Physicochemical

and In Silico Characterization. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 26: 2119-2127.

Gänzle, M.G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. Current Opinion in Food Science 2: 106–117.

García-Cano I, Velasco-Pérez L, Rodríguez- Sanoja R, Sánchez S, Mendoza-Hernández G, Llorente-Bousquets A & Farrés A. (2011). Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Journal of Applied Microbiology 111 (3):607-615.

Garzón K, Ortega C, & Tenea G. (2017). Characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from native fruits of Ecuadorian Amazon. Polish Journal of Microbiology, 66(4), 473–481.

Gao Z, Banan-Mwine E, Wang J, Liu D, Chen S, Ye X & Ding T. (2019). Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria on Foodborne Pathogens: A Review. Journal of Food Protection. Vol 82. 3; 441-453.

George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A.& Tessier, F.J. (2018). Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. Frontiers in Microbiology 9: 2899.

Ghadamgahi F, Mehraban Sang Atash M & Shahidi Bonjar G. (2014). Comparison of Inhibitory Effects of Silver and Zinc Oxide Nanoparticles on the Growth of Plant Pathogenic Bacteria. International journal of Advanced Biological and Biomedical Research. 2(4): 1163-1167.

Gi-Seong M, June Kim W & Kim M. (2002). Synergistic Effects of Bacteriocin-Producing *Pediococcus acidilactici* K10 and Organic Acids on Inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 and Applications in Ground Beef. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 12 (6): 936-942.

Giovanardi, D, Bonneau, S, Gironde, S., Fischer-Le Saux, M., Manceau, C. & Stefani, E. (2016). Morphological and genotypic features of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* populations from walnut groves in Romagna region, Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 145, 1–16.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Rgen J, HI K, Marrone P, Morin L, Stewart A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30, 250–258.

Goffin, P., van de Bunt, B., Giovane, M., Leveau, J.H.J., Höppener-Ogawa, S., Teusink, B., and Hugenholtz, J. (2010). Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. *Molecular System Biology*, 6: 413.

Green K, Stenberg J & Lankinen A. (2020). Making sense of Integrated Pest Management (IPM) in the light of evolution. *Evolutionary Applications*. 00: 1-15.

Guo L, He Y.M, Li M, Chen D.W, Chen X, Huang Y.J & Gu R.X. (2017). Inhibitory effects of single and mixed lactic acid bacteria on intestinal pathogens. *Food Science and Technology*, 42:26–30.

Gupta R.& Srivastava S. (2014). Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiology* 42:1–7.

Gusella G, Giambra S, Conigliaro G, Burruano S & Polizzi G. (2020). Botryosphaeriaceae species causing canker and dieback of English walnut (*Juglans regia*) in Italy. *Forest Pathology*. 00:e12661

Hamed, H.A., Moustafa, Y.A. & Abdel-Aziz, S.M., (2011). In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. *Life Science Journal* 8 (4), 462e468.

Hajri A, Meyer D, Delort F, Guillaumes J, Brin C & Manceau C. (2010). Identification of a genetic lineage within *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* as the causal agent of vertical oozing canker of Persian (English) walnut in France. *Plant Pathology* 59, 1014-1022.

Hajri, A., Pothier, J.F., Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Poussier, S., Boureau, T. (2012). Type III effector gene distribution and sequence analysis provide new insights into the pathogenicity of plant-pathogenic *Xanthomonas arboricola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 371–384.

Halttunen T, Collado M.C, El-Nezami H, Meriluoto J & Salminen S. (2008). Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology* 46 (2):160-165.

Harman GE, Kubicek CP. (2014). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2, Enzymes, biological control and commercial applications. CRC, Boca Raton, FL.

Hayes, D.; Angove, M.J.; Tucci, J.; Dennis, C. (2016). Walnuts (*Juglans regia*) chemical composition and research in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56, 1231–1241.

He D.C, Hang He M, Amalin D.M, Liu W, Alvindia D.G & Zhan J. (2021). Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Eco-Economic Consideration. *Pathogens* 10 (10), 1311.

Helman Y & Chernin L. (2015). Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Molecular Plant Pathology*. 16: 316-329.

Hladíková Z, Smetanková J, Greif G y Greifová M. (2012). Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. *Acta Chimica Slovaca*. 5 (1):80-85.



Hernández-González J.C, Martínez-Tapia A, Lazcano-Hernández G, García-Pérez B.E and Castrejón-Jiménez N.S. (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals* 11, 979.

Hill C, Guarner F, Reid, G, Gibson, G. R, Merenstein, D. J, Pot, B, Morelli, L, Canani, R.B, Flint, H.J, Salminen, S.,Calder, P.C. y Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506-514.

Holtappels D, Fortuna K, Lavigne R and Jeroen W. (2021). The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production. *Current Opinion in Biotechnology* 68:60-71.

Husejnagic D, Hodzic S, Avdic A, Siranovic S & Vilusic M. (2016). Antimicrobial activity of the cell free supernatants of the lactic acid bacteria isolated from fresh cow cheese produced in Tezla region. *Acta tecnológica* 9(2):49-55

INC. (2020). Nuts and Dried Fruits Statistical Yearbook 2019/2020. In: International Nut and Dried Fruit Council Foundation. pp 46-48.

Jawan R, Abbasiliasi S, Shun J, Rizal M, Mustafa S, Halim M y Ariff A. (2021). Influence of type and concentration of lyoprotectants, storage temperature and storage duration on cell viability and antibacterial activity of freeze-dried lactic acid bacterium, *Lactococcus lactis* Gh1. *Drying Technology. An international Journal*. DOI: 10.1080/07373937.2021.1874968.

Juarez Tomás M.S, Bru E, Wiese B, de Ruiz Holgado A.A.P, & Nader-Macías M.E. (2002). Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *Journal of Applied Microbiology*. 93(4): 714-724

Katuzna M, Fisher-Le Saux M, Pothier J, Jacques M, Obradovic A, Tavares F y Stefani E. (2021). *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and pv. *corylina*: Brothers or distant relatives? Genetic clues, epidemiology, and insights for disease management. *Molecular Plant Pathology*. 00:1-19.

Kaur P & Nehra K. (2019). Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. *Jornal of King Saud University-Science*. 31:758-767.

Khan W, Hussain M, Ali K, Ali M y Nisar M. (2020). Distribution and phenotypic variation in *Juglans regia* L. growing in Hindu Kush ranges of Pakistan. *Acta Ecologica Sinica*. 40(5):363-372.

Khaneghah, A. M, Abhari, K, Eş, I, Soares, M. B, Oliveira, R. B, Hosseini, H., Rezaei, M., Balthazar, C. F, Silva, R. & Cruz, A. G. (2020). Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 205-218.

Khoury W & Makkouk.(2010). Integrated plant disease management in developing countries. *Journal of Plant Pathology*. 92: 4, Supplement. S4.35-S4.42.

Kim H, Cheon W, Lee Y, Kwon H, Seo S, Balaraju K y Jean Y. (2021). Identification and Characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* Causing Bacterial Blight of Walnuts in Korea. *The Plant Pathology Journal* 37(2):137-151

Konappa, N.M., Maria, M., Uzma, F., Krishnamurthy, S., Nayaka, S.C., Niranjana, S.R., Chowdappa, S., (2016). Lactic acid bacteria mediated induction of defense enzymes to enhance the resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt. *Scientia Horticulturae* 207, 183e192.

Lamichhane, J. R. (2014). *Xanthomonas arboricola* diseases of stone Fruit, almond, and walnut trees: Progress toward understanding and management. *Plant Disease*, 98, 1600–1610. <https://doi.org/10.1094/ PDIS-08-14-0831-FE>

Lamont J, Wilkins O, Bywater M, Smith D. (2017). From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology & Biochemistry* 111: 1-9.

Le Lay C, Coton E, Le Blay G, Marc Chobert J, Haertle T, Choiset Y, Nguyen N, Meslet L, Mounier J. (2016). Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 239: 79-85.

Lemus G & Osorio V. 2019. Enfermedades y déficit hídrico. Los desafíos para el nogal en Chile. En: *Revista Red Agrícola. Especial Uva de Mesa*. Edición diciembre 2019. pp 68-70.

Li C.U.I, Niu L.Y, Li. D.J, Liu C.Q, Liu Y.P, Liu C.J, Song J.F. (2018). Effects of different drying methods on quality, bacterial viability and storage stability of probiotic enriched apple snacks. *Journal of Integrative Agriculture*. 17 (1): 247-255.

Li, S. J., Gao M.X , Cui C.B , Liu C.C , Mou H, Zhao X, and Wang Z.D. (2014). Effects of irradiation on antimicrobial activity of weak organic acid preservatives. *Food Science*. 35:58–62.

Lim H, Yeu J, Hong S y Kang M. (2018). Characterization of Antibacterial Cell-Free Supernatant from Oral Care Probiotic *Weissella cibaria*, CMU. *Molecules* 9; 23 (8):1984.

Lutz, M.P, Michel, V, Martinez, C, Camps, C., (2012). Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-borne pathogens. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens, IOBC-WPRS Bulletin* 78, 285e288.

Ma J, Hong Y, Deng L, Yi L, Zeng K. (2019). Screening and characterization of lactic acid bacteria with antifungal activity against *Penicillium digitatum* on citrus. *Biological Control*. 138.104044.

Ma Z.X, Amaro F.X, Romero J.J, Pereira O.G, Jeong K.C y Adesogan A.T. (2017). The capacity of silage inoculant bacteria to bind aflatoxin B1 in vitro and in artificially contaminated corn silage. *Journal of Dairy Science* 100 (9):7198-7210.

Magnusson J & Schnurer J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 1–5.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (42): 15611–15616.

Mani-López E, Arrijoa-Breton D y López-Malo A. (2022). The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 21; 604-641.

Martin J.F, Palomino M.M, Cutine A.M, Modenutti C.P, Fernandez Do Porto D.A, Allievi M.C, Zanini S.H, Mariño K.V, Barquero A & Ruzal S.M. (2019). Exploring lectin-like activity of the S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:4839-4857.

Martínez M, Labuckas D, Lamarque A & Maestri D. (2010). Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *Journal of the science of food and agriculture*. 90: 1959-1967.

Mazzoli, R, Bosco. F, Mizrahi, I, Bayer, E.A.; Pessione, E. (2014) .Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*. 32, 1216–1236.

Meade E, Slattery MA & Garvey M. (2020). Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics* 9(1): 32

Mercier, J & Lindow, S.E. (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 369–374.

Mewa-Ngongang M, Wilbur du Plessis H, Silas Chidi B, Faith Hutchinson U, Seteno Obed Ntwampe K, Ifeanyi Okudoh V, Paul Jolly N. (2020). Physiological and Antagonistic Properties of *Pichia kluyveri* for Curative and Preventive Treatments Against Post-Harvest Fruit Fungi. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 71(3):245-253.

Michailides, T.J , Morgan. D, Felts. D, Reyes. H, Connell. J, Duncan. R, Krueger. B, Edstrom. J, Viveros. M , Adaskaveg. J, McCoy. D, Puget. B, Castle. D, Elam. D, Post. J. (2006). Chemical and cultural control of band canker of almond caused by *Botryosphaeria dothidea*. In: *Proceedings of Almond Board*. Almond Board of California, Modesto, pp. 157–165.

Michailides, T. J., Morgan, D. P., Felts, D., Hasey, J., Puckett, R. D., Luo, Y., Nouri, M. T., Luna, M., Anderson, K., Buchener, R., Fichtner, E., and Coates, W. (2014). Managing *Botryosphaeria/Phomopsis* canker and blight and anthracnose blight of walnut in California. pp: 299-317. In: *Walnut Research Reports*. California Walnut Board, Folsom, CA.

Mohite B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13 (3), 638e649.

Montesinos E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology* 6, 245-252.

Molenaar D, Bringel F, Schuren F.H, de Vos W.M, Siezen R.J, y Kleerebezem M. (2005). Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *Journal Bacteriology* 187: 6119–6127.

Moonen. A.-C, Ratnadass. A, Ricci. P, Sarah, J.L, Sattin. M. (2015). Eight principles of integrated pest management. *Agronomy for Sustainable Development* 35: 1199–1215.

Mora-Villalobos J, Montero-Zamora J, Barboza N, Rojas-Garbanzo C, Usaga J, Redondo-Solano M, Schroedter L, Olszewska-Widdrat A y López-Gómez J. J. (2020). Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation* 6, 23.

Moral J, Morgan D and Michailides T.J. (2019). Management of *Botryosphaeria* canker and blight diseases of temperate zone nut crops. *Crop Protection* 126, 104927.

Moragrega, C. & Özaktan, H. (2010). Apical necrosis of Persian (English) walnut (*Juglans regia*): an update. *Journal of Plant Pathology*, 92 (1 supplement) S1.67–S1.71.

Moya E, Auil P, Oyarzúa P & Gerding M. (2018). Resistencia al ion cobre de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nocedales de la región del Biobío. Chilean Journal of Agricultural & Anima Science 34(1): 3-11.

Müller, D.B., Vogel, C., Bai, Y., and Vorholt, J.A. (2016). The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. Annual Review of Genetics. 50: 211–234.

Nwodo. U.U, Green. E & Okoh, A.I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. International Journal of Molecular Sciences. 13: 14002–14015.

Ouwehand A & Vesterlund S. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In Salminen S, von Wright A and Ouwehand (eds). Lactic acid bacteria, microbiological and functional aspect. 3rd ed. pp 375-396.

Oliveira L, Silveira A, Monteiro M, Dos Santos V, Nicoli J, Azevedo V, Soares S, Dias-Souza M y Nardi R. (2017). In silico Prediction, in vitro antibacterial spectrum, and physicochemical properties of a putative bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain L156.4. Frontiers in Microbiology, 8, 876.

Papadimitriou. K, Alegría. A, Bron. P.A, De Angelis. M, Gobbetti. M, Kleerebezem. M. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 80: 837–890.

Papagianni M. (2012). Effects of dissolved oxygen and pH levels on weissellin A production by *Weissella paramesenteroides* DX in fermentation. Bioprocess and Biosystems Engineering 35: 1035-1041.

Peng R.D. (2015). R programming for data science. Leanpulo books ISBN/ASIN:n/a.

Peres C.M, Peres C, Hernández-Mendoza, A, Malcata, F.X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria—With an emphasis on table olives. Trends in Food Science and Technology. 26, 31–42.

Pérez-Ramos A, Madi-Moussa D, Coucheney F & Drider D. (2021). Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins. Microorganisms. 9 (10):2107.

Phillips A, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield M, Groenewald J, y Crous P. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. Studies in Mycology 76: 51–167.

Poppi L.B, Rivaldi J.D, Coutinho T.S, Astolfi-Ferreira C.S, Ferrerira A.J.P & Mnacilha I.M. (2015). Effect of *Lactobacillus* sp. isolates supernatant on *Echerichia coli* O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. Pesquisa Veterinária Brasileira 35(4):353-359.

Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J.J., Suslow, T.V., Coaker, G. L., y Leveau, J.H.J. (2012). Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. The ISME Journal 6: 1812–1822

Raymaekers K, Ponet L, Holtappels D, Berckmans B, Cammue B. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. Biological Control. 144: 104240.

Remus-Emsermann, M.N.P, Lücker, S., Müller, D.B, Potthoff, E., Daims, H, and Vorholt, J.A. (2014). Spatial distribution analyses of natural phyllosphere-colonizing bacteria on *Arabidopsis thaliana* revealed by fluorescence in situ hybridization. *Environmental Microbiology* 16: 2329–2340.

Retamales, J., Vasquez, I., Santos, L., Segovia, C., Ayala, M., Alvarado, R. (2016). Complete genome sequences of lytic bacteriophages of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Genome Announcements*, 4, (3): e00336-16.

Reveglia P, Savocchia S, Billones-Baaijens R, Masi M, Cimmino A & Evidente A. (2018). Phytotoxic metabolites by nine species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in Australia and identification of those produced by *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum australe* and *Neofusicoccum luteum*. *Natural Product Research*. 33 (15):2223-2229

Ruiz Rodríguez, L.G.; Mohamed, F.; Bleckwedel, J.; Medina, R.; De Vuyst, L.; Hebert, E.M.; Mozzi, F. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina. *Frontiers. Microbiology.*, 10, doi:10.3389/fmicb.2019.01091.

Ryu Y, Baik J, Yang J, Kang S, Im J, Yun C, Kim D, Lee K, Chung D, Ju H. (2009). Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *International. Immunopharmacology* 9, 127–133.

Saez- Lara M, Gomez-Liorente C, Plaza-Diaz J, Gil A. 2015. The role of probiotic lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: A systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed Research International*. 505878.

Sadiq F, Yan B, Tian F, Zhao J, Zhang H, Chen W. (2019). Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 18 (5): 1403-1436.

SAG. (2021). Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. Control de plaguicidas, fertilizantes e inocuidad.

SAG. (2018). Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. Resolución Exenta n° 9074. Establece condiciones y requisitos para autorizar plaguicidas microbianos para comercialización.

Sagawa C, Assis R, Zaini P, Wilmarth P, Phinney B, Moreira L, Dandekar A. (2020). Proteome Analysis of Walnut Bacterial Blight Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 21(20): 7453.

Sandhya M y Disha K. 2020. Expansion in the field of Freeze-drying: An Advanced Review. *Research Journal Pharmacy and Technology*. 13 (5): 2468-2474.

Savadogo A, Outtara A, Bassole H and Traore S. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria-A minireview. *African Journal of Biotechnology*. 5 (9):678-683.

Scillato M, Spitale A, Mongelli G, Privitera G, Mangano K, Cianci A, Stefani S, Santagati M (2021). Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free Supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *Microbiology Open*. 10 (2):e1173.

Segarra G, Puopolo G, Giovannini O & Pertot I. (2015). Stepwise flow diagram for the development of formulations of non-spore-forming bacteria against foliar

pathogens: the case of *Lysobacter capsici* AZ78. *Journal of Biotechnology*, 216, 56–64.

Shigaeva J & Darr D. (2020). On the socio-economic importance of natural and planted walnut (*Juglans regia* L.) forests in the Silk Road countries: A systematic review. *Forest Policy and Economics*. Vol 118. 102233.

Shrestha A, Kim B & Park D. (2014). Biological control of bacterial spot disease and plant growth-promoting effects of lactic acid bacteria on pepper. *Biocontrol Science and Technology* 24 (7): 763-779.

Siedler S, Balti R & Rute Neves A. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology* 56: 138-146.

Simons A, Alhanout K & Duval R. (2020). Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug- Resistant Bacteria. *Microorganisms* 8 (5): 639.

Stefanovic E, Fitzgerald G & McAuliffe O. (2017). Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiology* 61: 33-49.

Stoyanova L.G, Ustyugova E.A, & Netrusov A.I. (2012). Antibacterial Metabolites of Lactic Acid Bacteria: Their Diversity and Properties. *Applied Biochemistry and Microbiology* 48 (3): 229-243.

Szczesny R, Buttner D, Escolar L, Schulze S, Seiferth A and Bonas U. (2010). Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector

homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytologist*, 187: 1058-1074.

Tashiro Y, Ichikawa S, Shimizu M, Toyofuku M, Takaya N & Nakajima-Kambe T. (2010). Variation of physiochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:3732–3739.

Tenea G & Lara M. (2019). Antimicrobial compounds produced by *Weissella confusa* Cys2-2 strain inhibit Gram-negative bacteria growth. *Cyta Journal of Food*. 17 (1): 105-111.

Todorov S, Prevost, H. Lebois, M. Dousset, X. LeBlanc J & Franco B. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)—From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*. 44:1351–1363.

Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., & Montesinos, E. (2008a). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 50–60.

Trias, R., Bañeras, L., Montesinos, E., & Badosa, E. (2008b). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*, 11, 231–236.

Ulloa-Ogaz A.L, Muñoz-Castellanos L & Nevarez-Moorillon G.V. (2015). Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control. In:

Méndez-Vila A (ed). The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs. 1nd edn. pp 305-309.

USDA. 2019. Tree Nuts Annual. Chile. Washington, DC: United states Department of Agriculture.

Valencia A, Gil P, Latorre B & Rosales M. (2019). Characterization and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Obtained from Avocado Trees with Branch Canker and Dieback, and from Avocado Fruit with Stem End Rot in Chile. *Plant Disease* 103 (5):996-1005.

Vauterin, L., Hoste B, Kersters K, and Swings J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45: 472-489.

Velasco Cruz J. 2018. Como llegar a las 200 mil toneladas de nueces. En: *Revista Red Agrícola*. Nogales y otros frutales de nuez. Edición abril 2018. pp 19-31.

Venegas-Ortega M, Flores-Gallegos A, Martínez-Hernandez J, Aguilar C, & Nevarez-Moorillon G. (2019). Production of Bioactive Peptides from Lactic Acid Bacteria: A Sustainable Approach for Healthier Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol 18.

Voidarou C, Alexopoulos A, Tsinas A, Rozos G, Tzora A, Skoufos I, Varzakas T & Bezirtzoglou E. (2020). Effectiveness of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacterium* Isolated from Honeycombs against Spoilage Microorganisms and Pathogens Isolated from Fruits and Vegetables. *Applied Science* 10:7309.

Von Wright A & Axelsson L. (2019). Lactic Acid Bacteria. An introduction. In Vinderola G, Ouwehand A, Seppo S, Von Wright A (eds). Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. Boca Raton EE.UU. 5nd edn pp 1-16.

Wagner, M.R., Lundberg, D.S., del Rio, T.G., Tringe, S.G., Dangl, J.L., & Mitchell-Olds, T. (2016). Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nature Communications* 7: 12151.

Wee Y, Kim J & Ryu H. (2006). Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*. 44 (2):163-172.

Xie C, Wang H.H, Deng S.L & Xu X.L. (2016). The inhibition of cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* on production of putrescine and cadaverine by four amine-positive bacteria in vitro. *LWT-Food Science and Technology* 67, 106-111.

Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties University of Helsinki. Department of Food Technology pp. 9-13.

Yang E.J & Chang H.C. (2010). Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology* 139 (1), 56e63.

Yang E, Fan L, Yan J, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S & Walker B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express* 8 (1), 10.

- Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, Hatakeda K, Shirata A. (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* JBC36. *Biocontrol Science and Technology* 22, 1181-1197.
- Yu A, Leveau J & Marco M. (2020). Abundance, diversity and plant-specific adaptations of plant-associated lactic acid bacteria. *Society for Applied Microbiology. Mini review.* 12 (1):16-29.
- Zakaria S, Lani M, Seng C, Ahmad F, Ahmad K and Hassan Z. (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from fermented catfish (*Clarias gariepinus*) as biocontrol of *Sclerotium rolfsii* infecting Chili plants. *Malaysian Applied Biology*, 47 (4): 117-126.
- Zhang C, Zhang S, Liu W, Guo T, Gu R and Kong J. (2019). Potential Application and Bactericidal Mechanism of Lactic Acid–Hydrogen Peroxide Consortium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 189 (3): 822-833.
- Zhang, J., Tian Z.G, Wang J.H, and Wang A.R. (2011). Advances in antimicrobial molecular mechanism of organic acids. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Science*, 42:323–328.
- Zheng, J, Ruan, L, Sun, M & Gänzle, M. (2015). A genomic view of lactobacilli and pediococci remonstrates that phylogeny matches ecology and physiology. *Applied Environmental Microbiology* 81: 7233–7243.
- Zhou X, Lu Z, Lv F, Zhao H, Wang Y, Bie X. (2011). Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain fmbj on the postharvest pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Food Science* 76, M254-M259.