

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE BIOPELÍCULAS PARA EL CONTROL DE *FUSARIUM* spp.**IN VITRO BIOFILMS EVALUATION FOR CONTROL OF *Fusarium* spp.**

Guadalupe Oyoque-Salcedo^{1,3}; Ernesto Oregel-Zamudio¹; Alicia Alejandra Núñez-Picazo²; César Leobardo Aguirre-Mancilla^{3*}

Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Mich. Justo Sierra # 28, C.P. 59510, Jiquilpan de Juárez Michoacán, México.

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Jiquilpan, Av. Carr. Nacional s/n Km. 202, C.P. 59510, Jiquilpan de Juárez, Michoacán, México.

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Roque. Carretera Celaya - Juventino Rosas Km. 8, C.P. 38110, Celaya, Guanajuato, México

Correspondencia: cesar.am@roque.tecnm.mx

Artículo de investigación

Recibido 3 marzo 2023, aceptado 15 junio 2023

RESUMEN

En formulaciones de películas comestibles, se han incorporado antimicrobianos, también conocidos como biopelículas, como complemento a su funcionalidad. Se ha observado que la adición de *B. subtilis* en estas formulaciones extiende la vida útil de frutos y controla hongos como *Fusarium oxysporum*. Sin embargo, se ha investigado poco sobre los efectos de esta incorporación hasta el momento. Se evaluaron 16 biopelículas que contenían goma guar, cera de candelilla, glicerol y *B. subtilis* en el control de cepas de *Fusarium* spp. Se diseñaron estas biopelículas con un diseño factorial 2⁴, con dos concentraciones para cada uno de los ingredientes. Previamente a la incorporación de la suspensión de *B. subtilis*, las biopelículas se prepararon y esterilizaron adecuadamente. Las biopelículas se confrontaron en emulsión y en forma preformada con dos cepas de *Fusarium* (FIR y FIA) en medio PDA, con un cultivo dual e incubación a 37 °C durante 4 días. Se calculó el porcentaje de inhibición fúngica. Como resultado, las biopelículas en emulsión 9 y 5 controlaron FIR y FIA, respectivamente. La única diferencia entre ambas biopelículas fue la concentración de bacterias y glicerol. Las biopelículas preformadas 3 y 1 también mostraron control de FIR y FIA, respectivamente, la variación principal fue la concentración de cera de candelilla. La formulación de la biopelícula preformada 1, que contenía una alta concentración de bacterias y una menor cantidad de otros ingredientes, demostró el control más efectivo. Estas biopelículas pudieran ser una estrategia de control del *Fusarium* spp. en frutos o raíces de algunos cultivos.

Palabras clave: Películas, control, *Fusarium* spp. *B. subtilis*.

ABSTRACT

In edible film formulations, antimicrobials, also known as biofilms, have been incorporated to complement their functionality. It has been observed that the addition of *B. subtilis* in these

formulations extends the shelf life of fruits and controls fungi such as *Fusarium oxysporum*. However, little research has been done on the effects of this incorporation so far. 16 biofilms containing guar gum, candelilla wax, glycerol and *B. subtilis* were evaluated in the control of *Fusarium* spp strains. These biofilms were designed with a 2⁴ factorial design, with two concentrations for each of the ingredients. Prior to incorporating the *B. subtilis* suspension, the biofilms were adequately prepared and sterilized. The biofilms were confronted in emulsion and in preformed form with two *Fusarium* strains (FIR and FIA) in PDA medium, with a dual culture and incubation at 37 °C for 4 days. The percentage of fungal inhibition is calculated. As a result, emulsion biofilms 9 and 5 control FIR and FIA, respectively. The only difference between both biofilms was the concentration of bacteria and glycerol. Preformed biofilms 3 and 1 also showed FIR and FIA control, respectively, with the main variation being the candelilla wax concentration. The preformed biofilm formulation 1, which contained a high concentration of bacteria and a lower amount of other ingredients, demonstrated the most effective control. These biofilms could be a control strategy for *Fusarium* spp. in fruits or roots of some crops.

Keywords: edible films, control, *Fusarium* sp. *B. subtilis*.

INTRODUCCIÓN

En algunas formulaciones de películas comestibles, se han incorporado ingredientes como antioxidantes, prebióticos y agentes antimicrobianos con el propósito de mejorar su valor probiótico (Aitboulahsen *et al.*, 2018; Bersaneti *et al.*, 2019). Además, en los últimos años, se ha observado un interés creciente en la inclusión de microorganismos para controlar el crecimiento de moho, levaduras y hongos patógenos en frutos (Kharchoufi *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2019). Donde las algunas películas que contienen microorganismos han mostrado no alterar las propiedades fisicoquímicas de los frutos (Khodaei y Hamidi, 2019). Sin embargo, también se ha observado que factores como los ingredientes presentes en las formulaciones y las condiciones de almacenamiento pueden ejercer influencia sobre la viabilidad de los microorganismos incorporados (Soukoulis *et al.*, 2017; Zong *et al.*, 2021). Por lo tanto, resulta fundamental verificar la viabilidad y funcionalidad de las películas antes de su empleo. Un ejemplo de la efectividad de la incorporación de microorganismos en películas comestibles es el uso de *Lactobacillus plantarum* en la formulación de una película a base de almidón de papa, la cual, al ser utilizada para recubrir uvas, logró controlar el crecimiento de *B. cinerea* después de 7 días a 20°C. Como resultado, se redujo la incidencia y la severidad del ataque del hongo en un 100%. (Plotton *et al.*, 2019). La cepa de *Lactobacillus paracasei* TEP6 incorporada en la formulación de quitosano-gel de *Aloe vera* (100%) y glicerol (10 g L⁻¹) inhibió a *Colletotrichum gloeosporioides* un 59% en pruebas *in vitro* (Barragán *et al.*, 2020). Sin embargo, la investigación sobre la incorporación de microorganismos en películas para el control de fitopatógenos ha sido limitada en su mayoría al género de *Lactobacillus*, debido a su considerada

inocuidad para el consumidor. Hasta hace unos pocos años, se había explorado escasamente la incorporación de derivados de otros géneros con propiedades antifúngicas, tal como el uso de una bacteriocina purificada (0.5%) obtenida de la cepa *Bacillus methyilotrophicus* BM47 en una formulación de carboximetilcelulosa, donde la película logró extender la vida útil de las fresas en almacenamiento a 4°C y 75% de HR durante 16 días. Y a partir del octavo día, se redujo significativamente el porcentaje de descomposición y no se observó crecimiento de hongos en las fresas tratadas en comparación con las fresas control (Tumbariski et al., 2019). También, la adición de ciclolipopéptidos de *B. subtilis* al 3% a una película de alginato de sodio que se aplicó a arándanos, redujo el recuento de hongos (2.5×10^3 UFC/g) al final del almacenamiento y mantuvo la frescura de los frutos (Xu et al., 2020). Aun cuando se han utilizado en las formulaciones de películas productos derivados de bacterias del género *Bacillus*, poco se conoce sobre la incorporación de la bacteria de *B. subtilis* en dichas formulaciones. *B. subtilis* se ha utilizado ampliamente como agente de control biológico contra hongos fitopatógenos y es generalmente reconocida como segura por Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, 2021). En algunos estudios se ha demostrado que *B. subtilis* puede controlar una amplia variedad de hongos fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, entre otros (Cucu et al., 2020, Takwa et al., 2021, Bouchard et al., 2022). Esta bacteria produce una amplia variedad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, como péptidos, enzimas y ácidos orgánicos, que pueden inhibir el crecimiento de hongos. La actividad antifúngica de *B. subtilis* se debe a la producción de enzimas como *B-1,3-glucanasa*, antibióticos como surfactinas, polimixinas, kurstakins, fengicinas y sideróforos, entre otros metabolitos secundarios (Menon et al., 2017, Cucu et al., 2020 Azeem et al., 2022). Estos compuestos pueden degradar las paredes celulares de los hongos y suprimir su crecimiento y reproducción. Por lo anterior en este trabajo, se evaluó la eficacia de 16 películas comestibles elaboradas con goma guar, cera de candelilla y glicerol, con la adición de la bacteria *B. subtilis* para el control de dos cepas de *Fusarium* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y materias primas

Se utilizó la cepa de *B. subtilis* GOS 01 B-67748 con registro Northern Regional Research Lab (NRRL) de Peoria, Illinois en Estados Unidos, seleccionada por su capacidad de inhibir a *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria brassicae*, *Phytophthora* sp. *Rhizoctonia solani* *in vitro* e *in vivo* en frutos.

Se utilizaron dos cepas de *Fusarium* sp. identificadas como FIR y FIA (figura 1) aisladas de raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*) de un invernadero comercial de Jiquilpan Michoacán, México.

Los hongos y bacteria forman parte de la colección de microorganismos del laboratorio de fitopatología del Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Michoacán México.

Para la película se utilizó, goma guar (Sigma Aldrich, USA) glicerol ($\geq 99\%$ de pureza; Sigma Aldrich, USA) y cera de candelilla refinada grado alimenticio.

Diseño de las formulaciones de las películas

Se elaboraron formulaciones de biopelículas utilizando goma guar, cera de candelilla, glicerol y una suspensión de *B. subtilis*. El diseño experimental se basó en un diseño factorial 2^4 utilizando la plataforma Design-Expert® (versión 12, Stat-Ease). Los factores considerados en este diseño fueron los ingredientes, mientras que los niveles consistieron en dos concentraciones: alta y baja, para cada uno de los ingredientes. Las concentraciones se seleccionaron de manera que permitieran la formación adecuada de la emulsión (cuadro 1).

Cuadro 1. Formulaciones de las biopelículas diseñadas

Películas	Goma guar %	Cera de candelilla %	Glicerol %	<i>B. subtilis</i> 20%
1	0.3	0.30	0.30	1×10^{12} UFC/mL
2	0.6	0.15	0.15	1×10^6 UFC/mL
3	0.3	0.15	0.30	1×10^{12} UFC/mL
4	0.6	0.30	0.15	1×10^6 UFC/mL
5	0.6	0.15	0.30	1×10^6 UFC/mL
6	0.3	0.30	0.15	1×10^{12} UFC/mL
7	0.3	0.15	0.15	1×10^{12} UFC/mL
8	0.6	0.30	0.30	1×10^6 UFC/mL
9	0.6	0.15	0.15	1×10^{12} UFC/mL
10	0.3	0.30	0.30	1×10^6 UFC/mL
11	0.6	0.30	0.15	1×10^{12} UFC/mL
12	0.3	0.15	0.30	1×10^6 UFC/mL
13	0.6	0.15	0.30	1×10^{12} UFC/mL
14	0.3	0.30	0.15	1×10^6 UFC/mL
15	0.6	0.30	0.30	1×10^{12} UFC/mL
16	0.3	0.15	0.15	1×10^6 UFC/mL

Preparación de suspensión de *B. subtilis*

La suspensión de *B. subtilis* se elaboraron con la colecta de bacteria (con asa bacteriológica enroscada) de la siembra previa en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (marca MCD Lab. México) contenido en cajas Petri (90 x 15 mm) e incubadas 37 °C por 24 h. En 100 mL de agua destilada estéril contenido un matraz Erlenmeyer de 500 mL se agregó la bacteria y se ajustaron las concentraciones mediante el método del número más probable y se correlacionó con la densidad óptica a 520 nm, después de realizar una curva de crecimiento. Se ajustó a 1×10^6 y 1×10^{12} UFC/mL

con la densidad óptica a 0.5 y 1.0 nm con un espectrofotómetro UV visible (marca Perkin Elmer, modelo Lambda 2, no. serie 5109).

Preparación de las biopelículas

Las biopelículas se prepararon de acuerdo con lo indicado por Oregel et al., (2016) con algunas modificaciones. Se fundió la cera de candelilla en agua destilada a 80 °C contenida en un vaso de licuadora de 1000 mL, después se añadió la goma guar y el glicerol, se homogenizaron a alta velocidad en la licuadora por 5 min para formar la emulsión. Las emulsiones se esterilizaron a 121 °C por 15 min y cuando se enfrió (≈ 35 °C), dentro de la campana de flujo laminar (marca Airegard, modelo nu. 201-430, serie no. 171479120315, USA), se vertió la suspensión de *B. subtilis* a la emulsión y homogenizo manualmente por 3 min.

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de las biopelículas para el control de *Fusarium* spp.

Confrontación de *Fusarium* spp. con las biopelículas en emulsion

Se confrontaron las 16 películas con las cepas de *Fusarium* sp. Se colocó en el centro de medio PDA contenido en placas Petri un trozo de 0.5 cm Ø de crecimiento de hongo (con 5 días en PDA a 25 °C) y alrededor se hicieron 4 pocillos de 0.5 cm Ø donde se agregó 0.6 mL de emulsión de las biopelículas, los pocillos se dejaron a una distancia de 1 cm de la pared de la placa (figura 2). Las placas se distribuyeron al azar e incubaron a 37 °C. Como control se colocaron placas con el hongo y se tomaron en cuenta 3 placas por tratamiento.



Figura 2. Confrontación de emulsión de biopelícula 9 contra *Fusarium* sp

Confrontación de *Fusarium* spp. con las biopelículas preformadas

Se preformaron biopelículas con 20 mL de emulsión y se vertieron en placa Petri estéril seguido del secado a 37 °C por 5 días en un horno (marca INCUCCELL, modelo ICV 55 ECO, serie no. H210560, Alemania) sin quitar la tapa de la caja. Después de preformarse las películas, se cortaron trozos de

1 cm² con bisturí bajo condiciones estériles. Para la confrontación biopelículas preformadas con las dos cepas de hongos, se ubicó en el centro del medio PDA un trozo de hongo con micelio (0.5 cm de Ø) y se colocaron 4 trozos de películas alrededor con una distancia de 1 cm de la pared de la placa (figura 3). Se consideraron 3 placas por tratamiento.

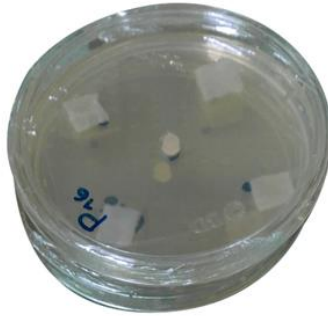


Figura 3. Confrontación de biopelícula 16 preformada contra *Fusarium* sp

Se midió el crecimiento del micelio a los 5 días después de la siembra de los microorganismos. Se consideraron 3 medidas del hongo que crecía hacia las películas (al centro, izquierda y derecha) desde el centro del trozo de hongo inoculado. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial utilizando la fórmula propuesta por Badía *et al.*, (2011) con ligeras modificaciones.

$$\% \text{ Inhibición} = (C.C. - C.P. / C. C.) * 100$$

Dónde:

C.C: Crecimiento del hongo control (cm).

C.P: Crecimiento del hongo en presencia de los antagonistas (cm).

Los tratamientos fueron de las 16 biopelículas antes mencionadas en emulsión y preformadas y se identificaron en emulsión como: PE1, PE2, PE3, PE4, PE5, PE6, PE7, PE8, PE9, PE10, PE11, PE12, PE13, PE14, PE15, PE16 y las preformadas como: PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, PP6, PP7, PP8, PP9, PP10, PP11, PP12, PP13, PP14, PP15, PP16.

Análisis estadísticos

Se estableció un diseño experimental completamente al azar para cada experimento y los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$) mediante el software RStudio versión 4.1.1 para Windows 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de las biopelículas para el control de *Fusarium* spp.

Confrontación de *Fusarium* sp. (FIR) con las biopelículas en emulsión

La biopelícula en emulsión 9 (PE9), que presentaba una alta concentración de goma guar y bacteria, junto con una baja concentración de cera de candelilla y glicerol, demostró significativamente mayor grado de control de la cepa FIR, alcanzando una tasa de inhibición del 67.5%, en comparación con las otras biopelículas (figura 4). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zhu *et al.*, (2020) quienes utilizaron a *B. subtilis* IBFCBF-4 para el control *in vitro*, en medio PDA mediante confrontación dual, de varias especies de *F. oxysporum*. La bacteria inhibió el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *lini* y *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* con tasas del 66.95 %, 66.8 % y 67.8 %, respectivamente. *B. subtilis* IBFCBF-4 causó hinchazón anormal, estrechamiento y aumento de la ramificación de las hifas de *F. oxysporum* f. sp. *niveum* y presentó genes de antibióticos implicados en la biosíntesis de iturina A, bacilomicina, fengicina, surfactina, bacilisina, tasA y mersacidina. Es importante destacar que los ingredientes empleados en la producción de las películas no parecen reducir la capacidad inhibidora de *B. subtilis* GOS 01 B-67748 contra *Fusarium* sp. FIR. Por lo tanto, la eficacia de esta bacteria como agente de control se mantiene intacta.

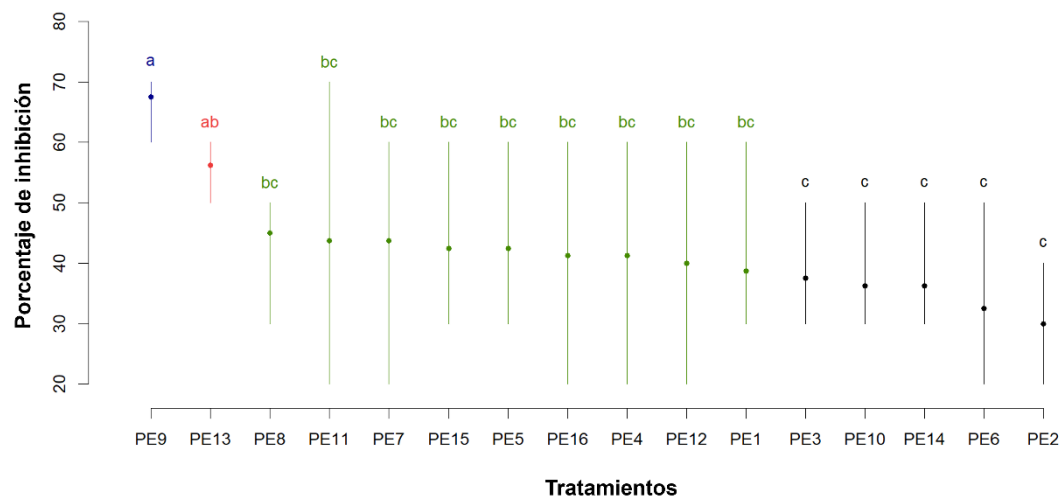


Figura 4. Porcentaje de inhibición de *Fusarium* sp. FIR con las biopelículas en emulsión



Figura 5. Confrontación de las biopelículas en emulsión con *Fusarium* sp. FIR

La biopelícula preformada 3 (PP3) que presentaba una alta concentración de glicerol y bacteria, junto con una baja concentración de goma guar y cera de candelilla, demostró significativamente mayor grado de control de la cepa FIR (58 % de inhibición) en comparación con las demás biopelículas (figura 6). Jiménez *et al.*, (2023), probaron tres cepas de *B. subtilis* (B15, BITV y BIBT) *in vitro* mediante confrontación dual en medio Agar Nutritivo Caldo de Papa para el control de *F. oxysporum*. La cepa BITV fue la que dio mayor inhibición del crecimiento micelial de (56.24 %), seguida de la cepa BIBT (49.62 %) y B15 con la menor inhibición (39.35 %). Como se puede apreciar, el porcentaje de inhibición de *Fusarium* sp. FIR con la biopelícula PP3 coincide con los porcentajes de inhibición obtenidos contra *F. oxysporum* utilizando la cepa de *B. subtilis* BITV.

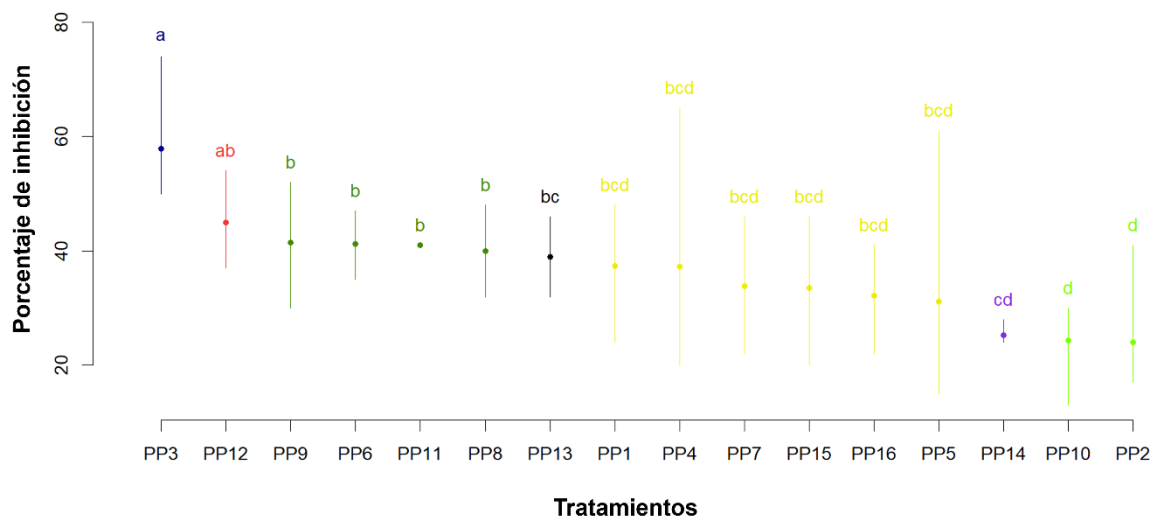


Figura 6. Porcentaje de inhibición de *Fusarium* sp. FIR con las biopelículas preformadas



Figura 7. Confrontación de las biopelículas preformadas con *Fusarium* sp. FIR

Confrontación de *Fusarium* sp. (FIA) con las biopelículas en emulsión

La biopelícula en emulsión 5 (PP5) que presentaba una alta concentración de goma guar y glicerol, junto con una baja concentración de cera de candelilla y bacteria, demostró un significativamente mayor grado de control de la cepa FIA (58% de inhibición) en comparación con las demás biopelículas (figura 8). Florencio et al. (2022) probaron la cepa de *B. subtilis* BASU, *in vitro* en medio PDA y cultivo dual para el control de 3 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 (MIC17188, MIC17191 y MIC17192). El porcentaje mayor de inhibición micelial que presentó *B. subtilis* BASU contra los hongos fue de 55.1%. Esto guarda similitud con los resultados obtenidos utilizando la biopelícula PP5 frente a FIA. Sin embargo, en otros trabajos se ha visto altos porcentajes de inhibición de algunas especies de *Fusarium* como lo obtenido por Khedher et al. (2020), quienes utilizaron la cepa de *B. subtilis* V26 para el control *in vitro* de *F. sambucinum*, *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. graminearum*, en medio PDA y cultivo dual. La bacteria presentó mayor inhibición contra *F. sambucinum* (85.3%), seguido de *F. graminearum* (73.6%), *F. solani* (72.8%) y la menor inhibición contra *F. oxysporum* (54.7%). La bacteria fue capaz de producir sideróforo y enzimas como proteasa, glucanasa, pectinasa, que tienen la capacidad de degradar proteínas, glucanos y pectinas, respectivamente, presentes en la pared celular del hongo *F. oxysporum*. Como se puede observar, el porcentaje de inhibición (54.7%) obtenido para *F. oxysporum* fue inferior al obtenido con la biopelícula PP3 contra FIA (58%).

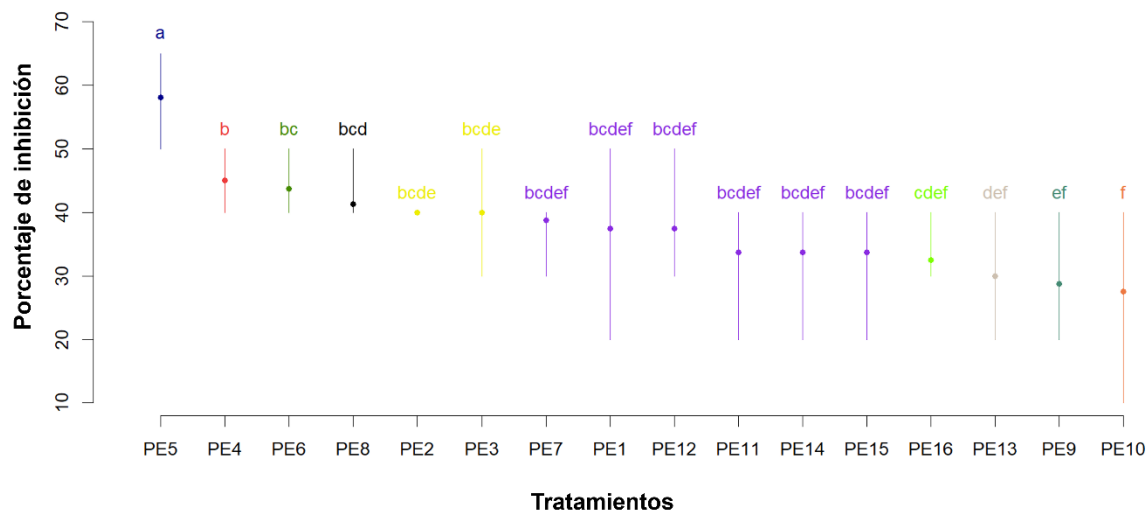


Figura 8. Porcentaje de inhibición de *Fusarium* sp. FIA con las biopelículas en emulsión



Figura 9. Confrontación de las biopelículas en emulsión con *Fusarium* sp. FIA

La biopelícula preformada 1 (PP1) que presentaba una alta concentración de bacteria, junto con una baja concentración de cera de goma guar, candelilla y glicerol, demostró un significativamente mayor grado de control de la cepa FIA (92 % de inhibición) en comparación con las demás biopelículas (figura 10). La biopelícula PP1 demostró la mayor capacidad de inhibición en comparación con los resultados previamente obtenidos en enfrentamientos con cepas de *Fusarium*, así como en comparación con los hallazgos de investigaciones, como la realizada por Haddoudi *et al.* (2021) quienes utilizaron las cepas del de *B. subtilis* VFS3 y VFS25 considerara con alto nivel de inhibición (IH > 85%) contra *F. oxysporum* KLR14, *in vitro* con medio PDA y cultivo dual. Las bacterias presentaron genes *yxvQ* (glucosilasa), *dfnM* (difcidina M sintetasa), *mycA* (micosubtilina A) y la producción de pectinasa. Las cepas *B. subtilis* CBMT51 y CBRF8 exhibieron un alto grado de inhibición, con porcentajes del 71.70% y 69.92%, respectivamente, frente a *F. equiseti* y *F. solani*. (Mejía *et al.*, 2016). En otra investigación, se evaluó la cepa *B. subtilis* str. SV41, en medio PDA y en

un cultivo dual, donde logró inhibir un 75.3% al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. La bacteria presentó genes de quitinasa e indujo genes de resistencia (PR-3 ácido, CHI3) en planta de tomate al ser tratadas con la bacteria (Ben et al., 2017). Es esencial destacar que los resultados derivados de las pruebas de confrontación de biopelículas *in vitro* con cepas de *Fusarium* spp. establecen una base sólida para avanzar en la evaluación de la eficacia antifúngica de las biopelículas más prometedoras en términos de control. Por lo anterior, se optó por realizar confrontaciones en medio de emulsión, para explorar su posible aplicación en raíces, así como en medio sólido, con el objetivo de evaluar su efectividad en la lucha contra la problemática de *Fusarium* en frutos. Además, cabe mencionar que se realizará la identificación de las cepas de *Fusarium* mediante técnicas moleculares.

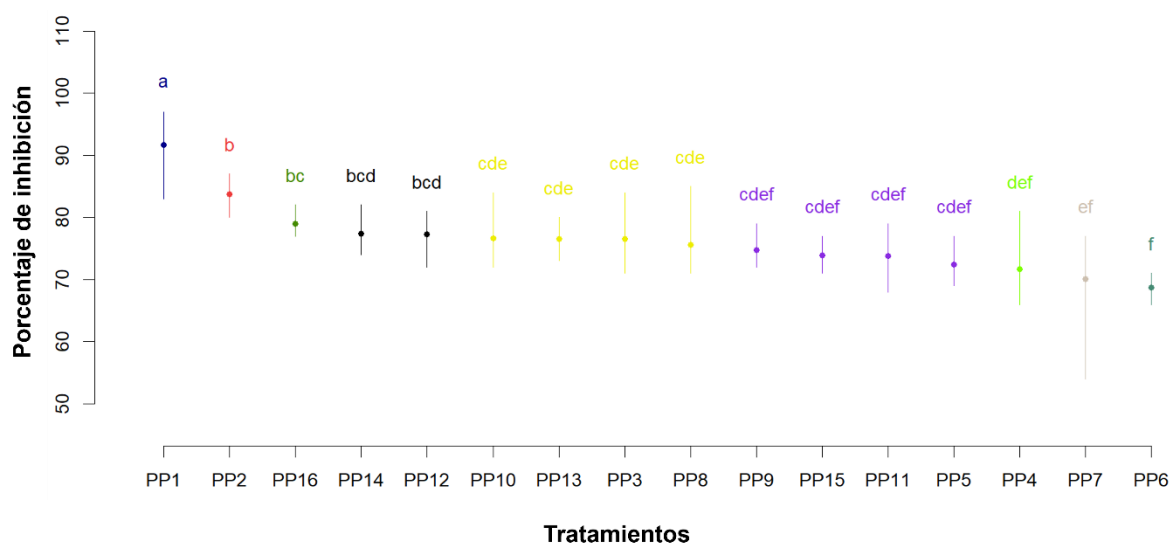


Figura 10. Porcentaje de inhibición de las biopelículas preformadas con *Fusarium* sp. FIA



Figura 11. Confrontación de las biopelículas preformadas con *Fusarium* sp. FIA

CONCLUSIONES

Las biopelículas en emulsión 9 y 5 demostraron su capacidad para controlar las cepas de *Fusarium* FIR y FIA, respectivamente. La única diferencia notoria entre ambas biopelículas fue la concentración de bacterias utilizadas (1×10^{12} y 1×10^6 UFC/mL, respectivamente) y la cantidad de glicerol (0.15 y 0.3%, respectivamente).

Las biopelículas preformadas 3 y 1 exhibieron control de las cepas *Fusarium* FIR y FIA, respectivamente. La única variación entre estas formulaciones fue la concentración de cera de candelilla empleada (0.15% y 0.3%, respectivamente). Sin embargo, la formulación de la biopelícula preformada 1, que presentaba una alta concentración de bacterias y una menor concentración de los otros componentes, logró el control más efectivo.

Estos resultados sugieren que los ingredientes presentes en las formulaciones anteriores no obstaculizan la capacidad antifúngica de las bacterias, lo que plantea la posibilidad de utilizarlas en la protección de frutos o su aplicación en las raíces que puedan estar en riesgo de ser atacadas por cepas de *Fusarium*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

Aitboulahsen, M., Zantar, S., Laglaoui, A., Chairi, H., Arakrak, A., Bakkali, M., Hassani Z. M. (2018) Gelatin-Based Edible Coating Combined with Mentha pulegium Essential Oil as Bioactive Packaging for Strawberries. *J Food Quality*, 2018, 1-7. <https://doi:10.1155/2018/8408915>.

Azeem M., Barba-Aliaga M., Borg-Karlson A. K., Terenius O., Broberg A., Kuttuva R. G. (2019). Heterobasidion-growth inhibiting *Bacillus subtilis* A18 exhibits médium and age dependent production of lipopeptides. *Microbiological Research*, 223–225, 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.006>.

Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J., & Pérez, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L). *Revista Brasileña de Agroecología*, 90-99.

Barragán-Menéndez, C., Gálvez-López, D., Rosas-Quijano, R., Salvador-Figueroa, M., Ovando-Medina, I., Vázquez-Ovando, A. (2020). Films of Chitosan and Aloe vera for Maintaining the Viability

and Antifungal Activity of *Lactobacillus paracasei* TEP6. *Coatings*, 10 (3), 259. <https://doi.org/10.3390/coatings10030259>.

Bersaneti T. G., Garcia S., Mali S., Pedrine C. C.M. A. (2019). Evaluation of the prebiotic activities of edible starch films with the addition of nystose from *Bacillus subtilis* natto. *LWT*. 116. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108502>.

Ben A. R. A., Stedel C., Garagounis C., Nefzi A., Jabnoun-Khiareddine H., Papadopoulou K. K., Daami-Remadi M. (2017). Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of Fusarium wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. *Crop Protection*. 99. 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.008>.

Bouchard-Rochette, M., Cossus Y. M. L., An N. T. T., Antoun H., Droit A., Russell J. Tweddell. (2022). *Bacillus pumilus* PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185: Production of lipopeptides, antifungal activity, and biocontrol ability against *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 170, 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104925>.

Cucu M. A., Massimo P. G. G., Gullino L. M., Garibaldia A. (2020). An assessment of the modulation of the population dynamics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the tomato rhizosphere by means of the application of *Bacillus subtilis* QST 713, *Trichoderma* sp. TW2 and two composts. *Biological Control*, 142, 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104158>.

Florencio-Anastasio, J.G., Alarcón A., García-Ávila, C.J., Ferrera-Cerrato, R., Quezada-Salinas A., AlmarazSuárez, J.J., Espinosa-Mendoza, M., Bocanegra-Flores, D.A. and Hernández-Ramos, L. 2023. In vitro inhibition of bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2. Mexican *Journal of Phytopathology*, 41(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2207-2>.

Haddoudi I., Cabrefiga J., Mora I., Mhadhbi H., Montesinos E., Mrabet M. (2021). Biological control of Fusarium wilt caused by *Fusarium equiseti* in *Vicia faba* with broad spectrum antifungal plant-associated *Bacillus* spp. *Biological Control*.160. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104671>.

Jiménez-Pérez, O., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo, F. D., Espinoza-Ahumada, C. A., Castro del Angel E., Sanchez-Yañez, J. M. (2023). Antagonistic activity of *Pseudomonas donghuensis* and *Bacillus subtilis* for the management of "Damping off" phytopathogens of the chile crop. *Revista Bio Ciencias*, 10 e1382. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1382>.

Kharchoufi, S., Parafati, L.; Licciardello, F., Muratore, G., Hamdi, M., Cirvilleri, G., Restuccia, C. 2018. Edible coatings incorporating pomegranate peel extract and biocontrol yeast to reduce *Penicillium digitatum* postharvest decay of oranges. *Food Microbiol* 74, 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.011>.

Khedher, S. B., Mejdoub-Trabelsi, B., & Tounsi, S. (2020). Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of Fusarium wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control*, 152, 104444. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104444>.

Khodaei D., Hamidi-Esfahani Z. (2019). Influence of bioactive edible coatings loaded with *Lactobacillus plantarum* on physicochemical properties of fresh strawberries. *Postharvest Biology and Technology*. 156. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110944>.

Marín A., Plotto A.; Atarés L., Chiralt A. (2019). Lactic Acid Bacteria Incorporated into Edible Coatings to Control Fungal Growth and Maintain Postharvest Quality of Grapes. *HortScience*, 54, 337-343. <https://doi.org/10.21273/hortsci13661-18>.

Mejía-Bautista, M. Á., Reyes-Ramírez, A., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J. M., Borges-Gómez, L. C., and Pacheco-Aguilar, J. R. (2016). *Bacillus* spp. in the Control of Wilt Caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(3), 208-222. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603>.

Menon V. S., Agarwal H, Gopalakrishnan D. (2017). Caracterización y optimización de bacterias aisladas de muestras de suelo para la producción de sideróforos. *Resource-Effic. Technologies*. 3. 434-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reffit.2017.04.004>.

Oliveira J., Parisi M.C.M., Baggio J.S., Silva P.P.M., (2019). Paviani B., Spoto M.H.F., Gloria E.M. Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose. *Int J Food Microbiol*, 292, 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.014>.

Oregel-Zamudio, E. Aguilar C. N., Oyoque-Salcedo, G, Angoa-Pérez M. V., Mena-Violante, H. G. (2016). Caracterización fisicoquímica de películas comestibles a base de cera de candelilla. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*.17(1). 1-7.

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Soukoulis Ch., Behboudi-Jobbehdar S., Macnaughtan W., Parmenter Ch., Fisk I. D. 2017. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. Food Hydrocolloids. 70. 345-355. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.014>.

Takwa M., Chaouachi M., Sharma A., J allouli S., Mhamdi R., Kaushik N., Djébalí N. (2021). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* using volatile organic compounds of solanaceae seed-borne endophytic bacteria. *Postharvest Biology and Technology*.181. 1-14.

Tumbariski Y., Nikolova R., Petkova N., Ivanov I., Lante A. (2019). Biopreservation of Fresh Strawberries by Carboxymethyl Cellulose Edible Coatings Enriched with a Bacteriocin from *Bacillus methylotrophicus* BM47. *Food Technol Biotechnol*, 57, 230-237. <https://doi:10.17113/ftb.57.02.19.6128>.

Xu L., Zhang B., Qin Y., Li F., Yang S., Lu P., Wang L., Fan J. (2020). Preparation and characterization of antifungal coating films composed of sodium alginate and cyclolipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. *Int J Biol Macromol*, 43, 602-609. <https://doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.051>.

Zhu J., Tan T., Shen A. et al. Potencial de biocontrol de *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 contra el marchitamiento por *Fusarium* de la sandía. *J Plant Pathol* 102, 433–441. 2020. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00457-6>.

Zong X., Zhang X., Bi K., Zhou Y., Zhang M., Qi J., Xu X., Mei L., Xiong G., Fu M. 2021. Novel emulsion film based on gelatin/polydextrose/camellia oil incorporated with *Lactobacillus pentosus*: Physical, structural, and antibacterial properties, Food Hydrocolloids. 121.107063. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107063>.