

Treball final de grau

Estudi: Grau en Innovació i Seguretat Alimentària

Títol: Activitat antimicrobiana de soques de *Pseudomonas fluorescens* enfront a bacteris i fongs fitopatògens.

Document: Memòria del treball Final de Grau

Alumne: Dídac Magaña Gómez

Tutor: Anna Bonaterra i Jesús Francés

Departament: EQATA

Àrea: Producció Vegetal

Convocatòria (mes/any) Juny 2021

ÍNDIX

RESUM	1
AGRAÏMENTS	6
1. INTRODUCCIÓ	7
1.1. El creixement de la població i la demanda d'aliments	7
1.2. Malalties causades per bacteris fitopatògens d'interès agrícola	7
1.2.1. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	7
1.2.2. <i>Erwinia amylovora</i>	8
1.2.3. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	8
1.2.4. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	8
1.3. Malalties causades per fongs fitopatògens d'interès agrícola	9
1.3.1. <i>Penicillium expansum</i>	9
1.3.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	9
1.3.3. <i>Fusarium avenaceum</i>	10
1.3.4. <i>Botrytis cinerea</i>	10
1.4. Problemàtica dels plaguicides d'origen químic i gestió integrada de malalties de cultiu .	10
1.5. Bioplaguicides i la seva rellevància a la unió Europea	11
1.6. Registre de bioplaguicides a la Unió Europea	12
1.7. El complex <i>Pseudomonas fluorescens</i> com bioplaguicides	14
1.7.1. Diversitat de metabòlits secundaris produïts per <i>Pseudomonas</i> amb activitat antimicrobiana	15
1.8. Bacteriocines i ciclolipopèptids produïts per <i>Pseudomonas fluorescens</i>	16
1.9. Influència dels medis de cultiu i el desenvolupament del bioplaguicida	18
2. ANTECEDENTS	20
3. OBJECTIUS	21
4. MATERIAL I MÈTODES	22
4.1. Medis de cultiu, tampons i reactius	22
4.2. Soques de <i>Pseudomonas</i> spp. utilitzades	24
4.3. Preparació dels bacteris indicadors patògens	25
4.4. Obtenció del fongs indicadors patògens	26
4.5. Avaluació de l'activitat antibacteriana	26
4.5.1. Obtenció del sobrenedant sense cèl·lules a partir de cultius.	26
4.5.2. Determinació de l'activitat antimicrobiana	28
4.6. Optimització de les condicions d'assaig	30
4.6.1. Efecte del medi de cultiu en la producció de metabòlits	30
4.6.2. Efecte de la neutralització dels SSC en l'activitat antimicrobiana	31

4.7.	Activitat antibacteriana dels SSC obtinguts de les soques de <i>Pseudomonas spp.</i> enfront Ea, Psa, Pst i Xav	32
4.8.	Activitat antifúngica de les soques de <i>Pseudomonas spp.</i> seleccionades.....	33
4.8.1.	Activitat antifúngica <i>in vitro</i> de soques de <i>Pseudomonas spp.</i> en cultius duals.....	33
4.8.2.	Activitat antifúngica <i>in vitro</i> dels SSC obtinguts de cultius de soques de <i>Pseudomonas spp.</i> pel mètode de la inhibició del creixement del fong	34
5.	RESULTATS	35
5.1.	Efecte del medi de cultiu en la producció de metabòlits antimicrobians	35
5.2.	Efecte de la neutralització dels SSC en l'activitat antimicrobiana	40
5.3.	Activitat antibacteriana dels SSC obtinguts de les soques de <i>Pseudomonas spp.</i> enfront Ea, Psa, Pst i Xav	41
5.4.	Activitat antifúngica invitro de les soques de <i>Pseudomonas spp</i> en cultius duals	54
5.4.	Activitat antifúngica dels SSC obtinguts de soques de <i>Pseudomonas</i> pel mètode d'inhibició de creixement	56
6.	DISCUSSIÓ	58
7.	APLICABILITAT	62
8.	CONCLUSIONS	63
9.	BIBLIOGRAFIA.....	64

RESUM

La població experimenta un creixement continu, i existeix la necessitat d'incrementar la producció de cultius agrícoles per garantir la seguretat alimentària i al mateix temps cal desenvolupar nous sistemes de maneig de malalties i plagues més sostenibles pel medi ambient. Els múltiples efectes adversos dels plaguicides químics han conduït a la recerca de noves eines alternatives com són els bioplaguicides.

Després de dècades d'aplicació intensiva de plaguicides d'origen sintètic, s'ha fet evident que no és la solució per una agricultura sostenible, sumat al conjunt d'efectes adversos al medi ambient i a l'exigència dels consumidor per obtenir productes sense residus. Tots aquests factors han conduït a la recerca d'eines que permetin la substitució dels agents químics.

Els bioplaguicides són plaguicides d'origen natural que inclouen microorganismes beneficiosos (agents de biocontrol) o els compostos derivats del seu metabolisme, així com productes naturals com extractes de plantes que permeten minimitzar o inhibir el desenvolupament de les malalties (Ondarza-Beneitez, 2017).

Els bacteris del complex *Pseudomonas fluorescens* són coneguts per les seves propietats de protecció vegetal contra els fongs i bacteris fitopatògens i alhora mostren una potent activitat antimicrobiana. El gènere *Pseudomonas* té diverses espècies d'interès biotecnològic entre les que s'engloben les del complex *Pseudomonas spp.* que conté 8 filogrupos (Garrido-Sanz et al., 2016; Gomila et al., 2015): *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. chlororaphis* i *P. protegens*. Particularment, la majoria d'aquestes produeixen una sèrie de compostos antimicrobians com el 2,4-diacetilfloroglucinol, resorcinol, fenazines i altres antibiòtics com la pirrolnitrina i pioluteorina (Raaijmakers i Weller, 2001). Altres espècies de *Pseudomonas* d'interès són *Pseudomonas frederikbergensis*, *Pseudomonas helmanticensis*, que també presenten gens de producció de compostos antimicrobians. Tots ells són candidats per ser utilitzats com a bioplaguicides perquè produeixen una gran quantitat de metabòlits secundaris amb activitat antifúngica, antimicrobiana i insecticida.

L'objectiu d'aquest treball va consistir en optimitzar la metodologia per determinar l'activitat antimicrobiana *in vitro* de les soques de *Pseudomonas fluorescens* enfront a fongs i bacteris fitopatògens, i a la vegada determinar-ne la seva activitat antimicrobiana i l'espectre d'acció.

La composició del medi va ser un factor que va afectar significativament en l'activitat antimicrobiana dels sobrenedants sense cèl.lules (SCC) de *Pseudomonas*. Les condicions

òptimes per l'obtenció de majors percentatges d'inhibició del creixement eren amb medis GA i LB. A la vegada els canvis de pH produïts en els cultius de *Pseudomonas* en GA i LB per l'obtenció de sobrenedants no afectaven en general a la seva activitat enfront a Xav i Psa. Però si hi havien diferències significatives en els percentatges d'inhibició dels SSC enfront a bacteris fitopatògens ja que existien moltes més SSC actius obtinguts de les soques antagonistes en medi LB que en el GA.

Paraules clau

Complex *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia amylovora* (Ea), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav), *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Fusarium avenaceum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* i *Penicillium expansum*, bioplaguicida.

Abreviatures

BCPD: Bacteris promotors del creixement de plantes

Bc: *Botrytis cinerea*

CLPs: Ciclolipopèptids

DAGP: 2,4-Diacetilfloroglucinol

DO: Densitat òptica

Ea: *Erwinia amylovora*

Fa: *Fusarium avenaceum*

Fo: *Fusarium oxysporum*

GA: medi glucosa asparagina

RSI: Resistència sistèmica induïda

KB: medi King de B

LB: Medi Luria Bertani

LIPAs: Lectin-like bacteriocins

MM: medi Mínim de Sals

mL: mil·lilitre

NRPSs: Sintetases no ribosomals

Pe: *Penicillium expansum*

PDB: medi brou patata dextrosa

PDA: medi agar patata dextrosa

Psa: *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*

Pst: *Pseudomonas syringae pv. tomato*

SSC: Sobrenedant sense cèl·lules

ROS: Reactive oxygen species

UFC: Unitats formadores de colònies.

Xav: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*

AGRAÏMENTS

Per començar m'agradaria expressar el meu agraïment al Dr. Jesús Francès i la Dra. Anna Bonaterra, tutors del treball, i així com també a la Dra. Esther Badosa per el seu constant suport, ànims, orientació, dedicació i sobretot paciència durant el desenvolupament del present projecte, tant experimental com escrit. També agrair el repte que ha suposat realitzar el meu treball final de grau en el departament EQATA , en el grup de recerca Patologia Vegetal (CIDSAV) de la UdG que m'ha permès endinsar-me en un camp que fins a dia d'avui era desconegut i he pogut enriquir-me de nous coneixements.

A l'Eric Manzano un especial agraïment pel suport moral durant tots els matins al laboratori des d'inicis del curs, la positivitat, el treball en equip, l'ajuda i el recolzament transmès durant tot el temps compartit .

Donar les gràcies a totes les persones que em van ajudar durant la realització d'aquest treball, i també aquelles que em van ajudar durant tota la vida universitària.

Finalment, als meus amics, família i parella que són els qui creuen més en mi. Gràcies per estar allà, donant-me suport dia darrera dia per superar-me a mi mateix, fer-me creure en mi i assolir els meus objectius.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. El creixement de la població i la demanda d'aliments

La població mundial està experimentant un creixement exponencial en els darrers anys (Gatehouse et al., 2011) situant-se a la xifra de 7.875 milions l'any 2021 i s'espera que s'augmenti fins als 9.700 milions l'any 2050, i quasi fins els 11.000 milions a finals de segle (United Nations, 2017).

Per fer front aquesta explosió demogràfica, s'haurà d'incrementar notablement la producció agrícola i assegurar la seguretat alimentària a escala global, impulsant el desenvolupament de pràctiques agrícoles sostenibles i que incloguin alternatives als productes de síntesis química pel control de malalties i plagues, que disminueixen considerablement la productivitat dels cultius.

Amb el món en expansió i creixement continu, un dels reptes més importants de l'agricultura ha sigut augmentar la seva productivitat.

S'estima que el 26 i 29% són les pèrdues que es produeixen en la productivitat del cultiu de soja, blat i cotó. Així mateix les afectacions en el blat de moro, l'arròs i les patates són del 31, 37 i 40%, respectivament. Aquestes pèrdues agronòmiques i econòmiques són provocades per les males herbes (34%), les plagues animals (18%) i pels fitopatògens (16%) (Oerke, 2006).

1.2. Malalties causades per bacteris fitopatògens d'interès agrícola

1.2.1. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*

Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria* és un bacil gram negatiu, aeròbic obligat i sapròfit facultatiu capaç de produir un exopolisàcarid, conegut com la goma xantana. Aquesta goma afavoreix la formació de biopel·lícules que exerceixen una acció protectora per les comunitats enfront a canvis de temperatura, pH, radiació ultraviolada etc (Papagianni et al., 2001).

Aquest bacteri causa la taca bacteriana del tomàquet i pebrot com a conseqüència de la infecció de la planta a través dels estomes foliars o bé les ferides superficials. Un cop establert dins la planta obstrueix els teixits vasculars impeding el transport de nutrients i com a conseqüència provocant la necrosis de les fulles i el pansiment dels teixits (Hayward, 1993).

En condicions humides, les fulles, les tiges i els fruits desenvolupen lesions inicials en forma de taques marrones de petites dimensions i amb un centre necròtic. Aquestes taques normalment no augmenten més de 3mm de diàmetre (Jones i Pernezny, 2003). Les fulles

pateixen un viratge de color groc i poden caure prematurament causant pèrdues en el cultiu (Ritchie, 2000).

1.2.2. *Erwinia amylovora*

Erwinia amylovora és un bacil gram negatiu que pertany a la família de les enterobacteriàcies. És l'agent causal del foc bacterià que afecta una àmplia gamma d'hostes de la família de les Rosàcies i és la major amenaça a nivell mundial en la producció de poma i pera (Bonn et al., 2000; Laala et al., 2012). El foc bacterià és una malaltia distribuïda en 46 països de tots els continents.

Aquesta malaltia es transmet a partir de plantes infectades amb símptomes o amb infeccions latents. Els bacteris hivernen en els xancre, multiplicant-se durant la primavera i posteriorment són dispersats per les eines de treball, pluja, vent, insectes i ocells (Johnson et al., 1993).

1.2.3. *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*

Pseudomonas syringae pv. actinidiae (Psa) és un bacteri que causa la malaltia del xancre bacterià. Els seus símptomes són similars als produïts per altres espècies de *Pseudomonas* com *P. syringae pv. syringae*. És un epífit que es troba en la part aèria de la planta durant totes les èpoques de l'any, en branques i òrgans vegetatius, i pot sobreviure en el material infectat (Ferrante i Scortichini, 2009).

Quan la temperatura i humitat són òptimes, Psa es multiplica i penetra a la planta per ferides o obertures naturals produint la infecció. La seva penetració es pot produir pels estomes de les fulles, lenticel·les de les branques, ferides naturals provocades per la caiguda de les fulles o la brotació, ferides de poda o les produïdes per accidents climàtics. Els símptomes en flors i fulles són similars a altres bacteriosis, com la coloració marronosa i seca, i taques necròtiques angulars a les fulles, amb o sense halo groc (Vanneste et al., 2011).

1.2.4. *Pseudomonas syringae pv. tomato*

Pseudomonas syringae pv. tomato (Pst) és un patògen amb gran impacte en els cultius i causant de la taca bacteriana en el tomàquet i el pebrot. Aquesta malaltia s'afavoreix per les baixes temperatures i condicions d'humitat molt altes (Pernezny i Zhang, 2008). Genera lesions de coloracions fosques, típicament marronoses i negres per tota la fulla, també afecta la tija,

peduncle, pedicels i sèpals. A nivell de fruit es caracteritza per la formació de taques fosques d'1mm de diàmetre i amb volum sobre la superfície (Peernezny i Zhang, 2008; Kado, 2010).

És un patogen foliar que mostra dos estadis d'infecció, el primer correspon a una fase epífita i la segona a una fase endòfita en el apoplast (Meloto et al., 2008). La transmissió es produeix a través de la llavor i es difon gràcies a l'aigua de pluja, les eines de treball o els transplants.

1.3. Malalties causades per fongs fitopatògens d'interès agrícola

1.3.1. Penicillium expansum

Penicillium expansum (Pe) és un fong que produeix la floridura blava una de les malalties més comunes en post collita de diversos fruits com pomes, peres, maduixes, tomàquets, blat de moro, cítrics i fins i tot l'arròs. Aquest microorganisme genera una neurotoxina, la patulina, que ha estat classificada com a perillosa pel consum humà (Morales et al., 2007).

La infecció de Pe en les fruites es produeix a través dels conidis que penetren a través de les lenticel·les o ferides que es generen durant la collita, envasat i processament (Torres et al., 2006). Aquests conidis poden sobreviure a temperatures baixes i trobar-se en el sòl, materials amb descomposició o com epífits en les plantes. Quan els conidis es dipositen a la ferida poden germinar formant tubs germinatius i hifes que causen les podridures dels fruits (Santos et al., 2006).

1.3.2. Fusarium oxysporum

El gènere *Fusarium* és una de les espècies més complexes que inclouen tant patògens vegetals, animals i humans a una àmplia gamma de no patògens (Gordon, 2017). Els membres de l'espècie generalment es transmeten pel sòl a una àmplia gamma de cultius hortícoles i són els responsables de malalties vasculars destructives i podriments (Bodah, 2017).

La malaltia vascular del tomàquet és causada per *Fusarium oxysporum* (Fo) (Borisade et al., 2017). El fong fitopatogen entra per l'epidermis de l'arrel, i més tard es propaga a través del teixit vascular infectant en els vasos del xilema provocant l'obstrucció de la circulació de l'aigua, sals minerals i nutrients, cap a altres parts de la planta (Singh et al., 2017) fet que genera el pansiment de la planta i el canvi de color groc de les fulles.

1.3.3. *Fusarium avenaceum*

Fusarium avenaceum (Fa) és un patogen vegetal amb una àmplia gamma d'hostes i responsable de malalties a més de 80 gèneres de plantes (Nyandoro, 2017). És ben conegut per causar la podridura a les arrels de cereals i plagues d'espècies vegetals conegudes com a *Pinus* i *Eustoma*. Així com el podriment durant l'emmagatzematge post collita de nombrosos cultius com patates (Satyaprasad i Bateman, 1997), bròquil (Mercier, 1991) i poma (Sorensen et al., 2009).

1.3.4. *Botrytis cinerea*

Botrytis spp. és un patogen molt diversificat que genera grans pèrdues de fruites, vegetals i plantes ornamentals, ja que és capaç d'infectar fulles, tiges, flors i fruits, essent un dels patògens més importants en els cultius hortícoles en molts països (Elad i Shtienberg, 1995).

B. cinerea (Bc) és l'agent causal de la "podridura grisa", que infecta a més de 200 espècies vegetals, generant pèrdues econòmiques greus abans i després de la recol·lecció (Benito et al., 2000). El fong pot infectar les plantes en qualsevol estat de desenvolupament i part de la planta. La infecció s'origina quan els conidis entren a la planta a partir de ferides o obertures naturals i germinen, d'on es desenvolupen les hifes i penetren als teixits sans (Latorre, 2002).

1.4. Problemàtica dels plaguicides d'origen químic i gestió integrada de malalties de cultiu

Una de les estratègies més utilitzades per la gestió de malalties ha sigut la utilització de plaguicides d'origen químic. En les últimes dècades, la utilització d'aquests compostos ha contribuït a millorar molt significativament la productivitat dels conreus. No obstant, la seva aplicació té també interminables efectes nocius cap al medi ambient i la salut pública (Heckel, 2012).

Els plaguicides són considerats com un dels factors involucrats en l'augment de contaminació ambiental (Compant et al., 2005). Tot i ser efectius en el control de malalties, el seu ús extensiu i prolongat en el temps ha provocat perjudicis a la salut humana, ja que els seus components actius poden ser metabolitzats, excretats o bé ser emmagatzemats i bioacumulats en el greix corporal provocant una toxicitat acumulativa i crònica (Alewu i Nosiri, 2011) que deriva en

malalties dermatològiques, gastrointestinals, cancerígenes, neurològiques, respiratòries, endocrines i reproductives (Mostafalou i Abdollahi, 2013).

Els residus de plaguicides es poden trobar en una gran varietat d'aliments com fruites, verdures, hortalisses, pinsos per animals i fins i tot en begudes com aigua, vi, suc de fruites o refrescs (Chourasiya et al., 2015). En la majoria dels casos, les concentracions no superen els nivells de seguretat determinats per la legislació vigent (Lorenzin M., 2007). No obstant això, els límits segurs per la salut podrien en alguns casos haver estat subestimats, com podria ser el cas de l'exposició coincident a dos o més substàncies químiques que podrien generar efectes negatius sinèrgics (Kortenkamp, 2007).

Aquests efectes negatius dels plaguicides químics han provocat una modificació en el marc legislatiu de la Unió Europea (UE). La comercialització i utilització de productes fitosanitaris està actualment regulada a la UE a través del Reglament (CE) N°1107/2009 i la directiva 2009/129/CE que té com objectiu la reducció del risc de l'ús de productes fitosanitaris mitjançant la gestió integrada de malalties. Aquest marc legislatiu estableix que els medis de lluita fitosanitària han de ser en la mesura del possible, biològics i físics, en aquest sentit s'han cercat durant anys alternatives sostenibles per controlar les malalties dels conreus.

En definitiva, la gestió integrada de malalties es basa en el desenvolupament d'una estratègia dirigida a l'ús racional de productes fitosanitaris, a partir de la posta en marxa conjunta d'una sèrie de mesures orientades a incrementar la protecció dels cultius

1.5. Bioplaguicides i la seva rellevància a la unió Europea

Els bioplaguicides són plaguicides d'origen natural que inclouen microorganismes beneficiosos (agents de biocontrol) o els compostos derivats del seu metabolisme, així com productes naturals com extractes de plantes que permeten minimitzar o inhibir el desenvolupament de les malalties (Ondarza-Beneitez, 2017). L'interès pels bioplaguicides en les últimes dècades ha estat influenciat per les tendències de l'agricultura cap a una major sostenibilitat i la preocupació pública de l'ús massiu de plaguicides de síntesi química (Van den Bosch i Stern, 1962). Aquests productes es consideren una alternativa enfront dels productes de síntesi que provoquen la contaminació dels sòls agrícoles i dels productes agropecuaris a escala mundial.

Els bioplaguicides consistents en compostos actius obtinguts a partir de microorganismes tenen un elevat potencial en el futur per la seva eficàcia i baixa toxicitat. Aquest compostos es poden

obtenir d'una manera molt eficient a partir de processos de fermentació que es poden optimitzar per tal d'obtenir els compostos desitjats a partir de substrats de baix cost. Els productes avermectina i spinosad, produïts per *Streptomyces avermitilis* i *Saccharopolyspora spinosa*, respectivament són els dos bioplaguicides més exitosos produïts a partir de fermentació sòlida i comercialitzats com insecticides pel sector agrícola (Omarini et al., 2020).

1.6. Registre de bioplaguicides a la Unió Europea

Des del 2011 a la UE, els bioplaguicides estan categoritzats com a productes fitosanitaris, per ús agrícola i/o hortícola, amb l'objectiu que es puguin incloure en els programes de maneig integrat de malalties. Per tant, aquests productes es regeixen pel marc regulador N° 1107/2009 que té com objectiu garantir la salut humana, animal i mediambiental. A més, aquesta normativa exigeix a la indústria demostrar que les substàncies actives no tenen efectes perjudicials per a la salut humana o animal (Czaja et al., 2015). A dia d'avui a la Unió Europea hi ha al voltant de 46 bioplaguicides registrats pel control de malalties i plagues que es mostren a la taula 1.1.

Taula 1.1. Bioplaguicides microbians aprovats a la Unió Europea pel control de malalties a les plantes a la Unió Europea.

Substància activa	Categorització
Fongs	
<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ10	Fungicida
<i>Beauveria bassiana</i> 203	Insecticida
<i>Beauveria bassiana</i> IMI 389521	Insecticida
<i>Beauveria bassiana</i> PPRI 5339	Insecticida
<i>Beauveria bassiana</i> 147	Insecticida
<i>Beauveria bassiana</i> NPP111B005	Insecticida
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 74040 GHA	Insecticida
<i>Clonostachys rosea</i> J1446	Fungicida
<i>Coniothyrium mintans</i> CON/M/91-08 (DSM 9660)	Fungicida
<i>Isaria fumosorosea</i> Apopka 97	Insecticida
<i>Lecanicillium muscarium</i> Ve6	Insecticida
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>Anisopliae</i> BIPESCO 5/ F52	Insecticida
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> Fe9901	Insecticida
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	Fungicida
<i>Trichoderma asperellum</i> (formalment <i>T. harzianum</i>) ICC012, T25 i TV1	Fungicida
<i>Trichoderma asperellum</i> T34	Fungicida
<i>Trichoderma atroviride</i> (formalment <i>T. harzianum</i>) IMI 206040 i T11	Fungicida
<i>Trichoderma atroviride</i> AGR2	Fungicida

<i>Trichoderma atroviride</i> I-1237	Fungicida
<i>Trichoderma atroviride</i> SC1	Fungicida
<i>Trichoderma gamsii</i>	Fungicida
<i>Trichoderma harzianum</i> T-22 i ITEM 908	Fungicida
<i>Verticillium albo-atrum</i> WCS850	Fungicida
<i>Fusarium</i> sp. L13	Fungicida
Bacteris	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST 713	Bactericida/fungicida
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AH2	Fungicida
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT-45	Fungicida
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBI 600	Fungicida
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB24	Fungicida
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> D747	Fungicida
<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	Fungicida
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST 713	Bactericida/ fungicida
<i>Bacillus subtilis</i> IAB/BS03	Fungicida
<i>Bacillus sphaericus</i>	Insecticida
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Aizawai</i> ABTS-1857 i GC-91	Insecticida
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Israeliensis</i> AM65-52	Insecticida
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> ABTS 351, PB 54, SA 11, SA12 i EG	Insecticida
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Tenebrionis</i> NB 176 (TM 14 1)	Insecticida
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	Fungicida
<i>Pseudomonas</i> sp. DSMZ 13134	Fungicida
<i>Streptomyces</i> K61 (formalment <i>S. griseoviridis</i>)	Fungicida
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC 108	Fungicida/ Bactericida
Llevats	
<i>Aureobasidium pullulans</i> DSM 14940 I DSM 14941	Fungicida/ bacteriocida
<i>Candida oleophila</i> O	Fungicida
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Fungicida
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LASO2	Fungicida

1.7. El complex *Pseudomonas fluorescens* com bioplaguicides

El complex *Pseudomonas fluorescens* és un grup de bacteris gram negatius no esporulats, altament versàtils i que poden utilitzar un gran espectre de components orgànics com a font de carboni i d'energia, conferint-los una elevada capacitat d'adaptació a múltiples ambients (Silby et al., 2011). Són microorganismes psicròtrofs ja que poden créixer a temperatures des de 4°C fins als 43°C. A més, mostren una alta diversitat genètica i metabòlica (Jun et al., 2016). Els seus efectes beneficiosos inclouen l'antagonisme contra patògens, la inducció de defenses de la planta hoste, a més de la producció de sideròfors i antibiòtics (Beneduzi et al., 2012). Al llarg dels anys la taxonomia del gènere *Pseudomonas* ha patit grans canvis, produint-se un increment en el nombre d'espècies reconegudes arribant a les 396 espècies i 21 subespècies (<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>). En el cas del complex *P. fluorescens* actualment la classificació inclou 8 filogrupos: *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. chlororaphis* i *P. protegens* (Garrido-Sanz et al., 2017).

Els membres del complex *P. fluorescens* han estat aïllats de diferents nínxols ecològics com vessaments de petroli a alta mar (Viggor et al., 2013), tota mena de sòls (Weller et al., 2002), superfícies aèries i arrels de les plantes (Loper et al., 2012), intestins dels insectes (Vodovar et al., 2005). A més, alguns d'ells poden viure com a sapròfits, mentre que d'altres són patògens vegetals o oportunistes per l'espècie humana.

Alguns bacteris d'aquest grup tenen un gran interès biotecnològic en agricultura com a bioplaguicides i/o biofertilitzants perquè ofereixen una alternativa ecològica per controlar malalties causades pels patògens, millorar el rendiment dels cultius, promoure el creixement de les plantes, ajudar als tractaments de bioremediació de sòls (Vacheron et al., 2019).

Avui en dia i amb els avanços recents en les tècniques de microbiologia i biologia molecular s'ha contribuït significativament a esbrinar els mecanismes d'acció pels quals els bacteris antagonics generen metabòlits secundaris amb efecte inhibitori (Akkermans et al., 1995; Kraus i Loper, 1995). Entre els mecanismes de biocontrol es troben la competència per un nínxol ecològic, competència pel substrat, la síntesi de sideròfors, l'antibiosi, i la producció d'enzims (Bais et al., 2004), així com la inducció de resistència sistèmica a la planta (Matiru i Dakora, 2004).

1.7.1. Diversitat de metabòlits secundaris produïts per *Pseudomonas* amb activitat antimicrobiana

Pseudomonas fluorescens tenen la capacitat de produir diversitat de compostos amb activitat antimicrobiana (Weller, 2007) com la pioluteorina, pirrolnitrina, fenazina-1-àcid carboxílic i 2,4 diacetil-floroglucinol (Thomashow et al., 1997) (Figura 1.1).

- **Fenazines.** Són compostos heterocíclics nitrogenats pigmentats amb gran espectre d'activitat antimicrobiana enfront bacteris, fongs i paràsits. El seu mecanisme d'acció es basa amb la capacitat redox, ja que actuen com acceptors d'electrons procedents d'agents reductors que transmeten generant espècies reactives de l'oxigen (ROS) tòxiques pel patogen (Mavrodi et al., 2013). Les fenazines descrites en *Pseudomonas spp.* són capaces d'inhibir fongs com *Fusarium oxysporum* (Kupferschmied et al., 2013), *Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Gibberella avenacea*, *Alternaria spp* i *Drechlera graminea* (Mavrodi et al., 2006).
- **Diacetilfloroglucinol.** El 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) és un antibiòtic fenòlic que ha mostrat activitat antiviral, antibacteriana i antifúngica. La seva activitat antimicrobiana és deguda a la inhibició de l'aldosa reductasa, un enzim implicat en el metabolisme de la glucosa i la fructosa. El seu espectre inhibitori és ampli i inclou a bacteris, fongs, oomicets i nematodes. S'ha confirmat la producció de DAPG com a principal mecanisme d'acció de *Pseudomonas* en el control d'algunes malalties com el take-all del blat (Raaijmakers i Weller, 1998).
- **Pirrolnitrina.** La pirrolnitrina és un compost produït per una ampla gamma de *Pseudomonas spp.* que té activitat contra bacteris i fongs. És un fenilpirrol clorat que es sintetitza a partir del L-triptòfan i que causa la inhibició de la cadena respiratòria en fongs. Degut a la seva activitat antifúngica s'ha utilitzat tant en medicina com en agricultura com a mètode de control de malalties (Gross i Loper, 2009). Entre les soques productores cal destacar *P. fluorescens* CHA0 i *P. fluorescens* BL915 (Badosa, 2001).

- **Pioluteorina.** És un compost produït per algunes soques de *Pseudomonas* amb un anell de resorcinol unit a un dicloropirrol amb activitat herbicida, bactericida i fungicida (Hoch et al., 2008).

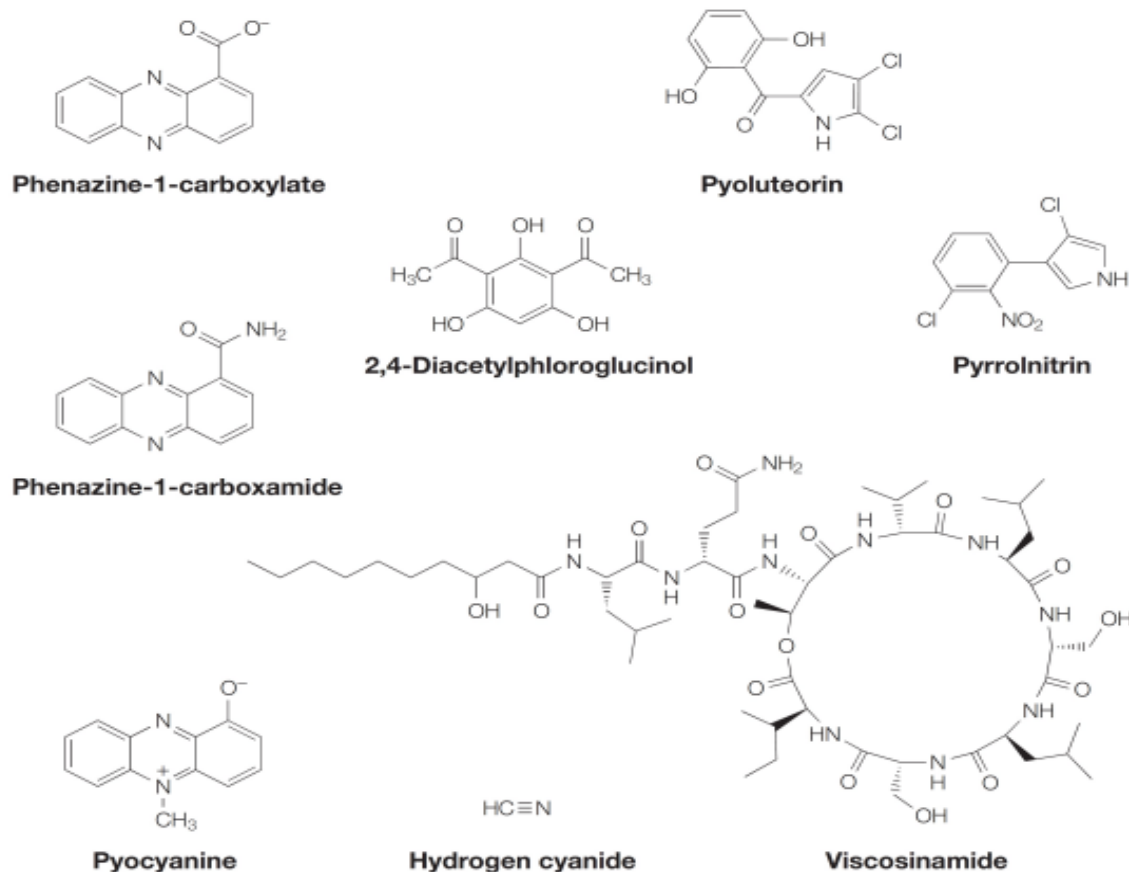


Figura 1.1. Compostos produïts per *Pseudomonas* amb activitat antimicrobiana rellevants pel biocontrol proposats per Haas i Défago, 2005.

1.8. Bacteriocines i ciclolipopèptids produïts per *Pseudomonas fluorescens*

Les bacteriocines són proteïnes o pèptids de síntesi ribosomal que pertanyen a la classe més abundant i diversa dels compostos antimicrobians. En general aquests compostos tenen activitat antimicrobiana contra patògens estretament relacionats amb la soca productora (Oliveira et al., 2018). No obstant això existeixen algunes bacteriocines amb ampli espectre que poden inhibir altres procariotes, fongs o paràsits (De la Fuente et al., 2015).

Fins a dia d'avui s'han identificat quatre tipus principals de bacteriocines produïdes pel gènere *Pseudomonas* i altres gèneres microbians entre les quals destaquen les piocines, les bacteriocines modulares, les microcines tipus B i les lectines-bacteriocines.

Les piocines són bacteriocines produïdes generalment pel patogen oportunista *Pseudomonas aeruginosa* i en funció de la seva estructura es poden classificar com a tipus R, F i S. Les tipus R són resistents a la nucleasa-proteasa i la seva morfologia s'assimila a cues no flexibles i contràctils dels bacteriòfags (Scholl, 2017). Les piocines provoquen la formació de porus en les membranes citoplasmàtiques de les cèl·lules diana causant la seva despolarització.

Per altra part, les piocines de tipus F són resistents a la proteasa d'alt pes molecular i la seva forma és similar a la de tipus F, però la seva estructura és flexible i no contràctil. Mentre que les de tipus S són similars a colicina, sensibles a la proteasa i la seva estructura consta de dos components, el que provoca la lisi cel·lular (DNAasa, RNAasa o per activitats de formació de porus). Mentre que el component més petit mostra homologia amb la colicina E2 i es considera com una proteïna d'immunitat. Les piocines tipus S causen la lisi cel·lular per descomposició del DNA i la formació de porus a la membrana (Parret i De Mot, 2002).

Altres exemples de bacteriocines produïdes pel gènere són les microcines. Aquestes molècules peptídiques són hidròfobes, de baix pes molecular sintetitzades ribosomalment. La seva producció es realitza a través d'un pèptid precursor, incloent-hi un pèptid amb un grup N-terminal i pèptids bàsics que poden o no sotmetre's a modificacions post-traduccionals (Meteliev et al., 2013). Aquests compostos es caracteritzen per mostrar tolerància a temperatures elevades, als canvis de pH i a les proteases, i els seus mecanismes d'acció inclouen la formació de porus a la membrana, activitat DNAasa, RNAasa i inhibició de la síntesi de proteïnes (Yang et al., 2014).

Un altre tipus de bacteriocines produïdes per *Pseudomonas* són les *Lectin-like* bacteriocines (LIPAs) o tipus-L que estan formades per dues zones d'unió de carbohidrats de B-lectina i una extensió curta amb un carboxil-terminal. Aquest grup carboxil té la funció d'unir els residus de D-ramnosa presents en la capa de lipopolisacàrids, mentre que el grup aminoterminal interacciona amb la proteïna de membrana externa, el que determina la seva gran selectivitat i especificitat (Parret et al., 2003).

Els bacteris del complex *P. fluorescens* poden produir també ciclolipopèptids (CLPs). Aquests compostos són molècules amfifíliques que contenen un oligopèptid cíclic amb un anell de lactona unit a una cadena d'àcid gras pel extrem N-terminal de l'aminoàcid (Raaijmakers et al., 2006). Les dues parts són variables i confereixen diferents propietats biològiques que inclouen activitat antimicrobiana i activitat antibiofilm entre d'altres. Els CLPs són sintetitzats per sintetases no ribosomals (NRPSs) i presenten un ampli espectre d'acció contra

microorganismes patògens, entre els que s'inclouen virus, micoplasmes i bacteris. Aquesta activitat ha sigut explotada en el control biològic de patògens de plantes com *Pythium myriotylum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora capsici* i *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Cochliobolus miyabeanus*, i *Magnaporthe oryzae* (Omoboeye et al., 2019).

Els CLPs produïts per *P. fluorescens* poden estar implicats en la reducció de les malalties causades per patògens mitjançant l'antagonisme directe o indirectament a través de la resistència sistèmica induïda (RSI). La RSI pot ser elicitada per compostos secretats per microorganismes que són reconeguts pels receptors de la membrana cel·lular de la planta que provoquen l'activació de la immunitat innata (Boutrot i Zipfel, 2017). Diversos compostos secretats per bacteris beneficiosos poden desenvolupar RSI (De Vleeschauwer i Höfte, 2009; Mariutto i Ongena, 2015) incloent alguns tipus de CLPs sintetitzats per *Pseudomonas* spp. com massetolide A, morfamida i sessilin (Tran et al., 2007; Ma et al., 2016). Altres estudis han caracteritzat altres compostos com la entolisina, lokisina, putisolvina, xanfolisina, WLIP, cocoyamide A (Oni et al., 2019).

1.9. Influència dels medis de cultiu i el desenvolupament del bioplaguicida

Durant el desenvolupament de bioplaguicides es realitza l'optimització dels medis de cultiu i del sistema de fermentació, on s'engloben estudis de preformulació, vida útil i control de la qualitat del nou producte (microbiològic, fisicoquímic, biològic). Altres aspectes importants són l'estandardització de bioassajos per l'avaluació de l'eficàcia en condicions controlades, la compatibilitat del bioplaguicida amb agroquímics i el seu efecte sobre els organismes implicats rutinàriament en el maneig integrat del cultiu (parasitoides, depredadors i pol·linitzadors).

El disseny d'un medi de cultiu per l'obtenció del principi actiu es una tasca complexa, ja que aquesta funció està relacionada amb el tipus de microorganisme i per tant es requereix un major coneixement sobre el seu metabolisme i la fisiologia. Tot això inclou, informació experimental com els perfils d'assimilació de fonts de carboni i nitrogen, els rangs de creixement en funció del pH, la temperatura, l'activitat d'aigua, la intensitat lumínica i els requeriments d'oxigen i agitació entre altres. A causa de les múltiples interaccions entre el medi de cultiu i el microorganisme, és normal que el medi sigui específic pel microorganisme i no es puguin garantir resultats similars fins i tot amb altres soques de la mateixa espècie (Singh et al., 2016).

En termes generals, el disseny d'un medi de cultiu involucra l'avaluació d'un número significatiu de variables, que inclouen la font de carboni, la font de nitrogen, els macroelements i els microelements, així com aminoàcids i vitamines. A més durant l'escalat s'han d'avaluar les variables fisicoquímiques del procés fermentatiu, com la temperatura, el pH, la velocitat d'agitació, demanda d'oxigen etc.

La producció de metabòlits secundaris amb activitat antimicrobiana obtinguts de *Pseudomonas spp.* depèn en gran part de la formulació del medi de cultiu, així com de les condicions d'incubació de les soques estudiades. Alguns estudis han demostrat que les fonts de carboni presents en el medi tenen una influència diferencial en la producció d'antibiòtics en les soques de *P. fluorescens*. Concretament la producció de pioluteorina i de 2,4-diacetil-floroglucionol és estimulada per la presència de glicerol i glucosa en el medi de cultiu (Duffy i Défago, 1999). El pH del medi també influeix en la producció d'antibiòtics perquè depenent de l'alcalinitat o la presència d'elements com els fosfats es pot reduir dràsticament la producció d'aquests compostos (Pusey et al., 2008). També s'ha observat que la producció de fenazines depèn de la temperatura i el pH del cultiu, així com de la font de carboni, segons estudis de Slininger i SheaWilbur (1995) realitzats amb la soca Pf 2-79 (Slininger i SheaWilbur, 1995).

2. ANTECEDENTS

La línia de recerca del grup de Patologia Vegetal-CIDSAV on s'ha realitzat aquest treball té com objectiu desenvolupar i aplicar noves tecnologies sostenibles pel maneig de plagues bacterianes i fúngiques de les plantes. Més concretament, una d'aquestes tecnologies està basada en el desenvolupament i aplicació de nous bioplaguicides de baixa toxicitat basats en microorganismes i pèptids funcionals. Aquests presenten avantatges interessants com l'elevada activitat antimicrobiana, baixa toxicitat i elevada biodegradabilitat.

El grup de Patologia Vegetal-CIDSAV disposa d'una col·lecció de més de 250 aïllats de *P. fluorescens* obtinguts de diferents mostres vegetals de diversos orígens. En estudis previs aquests aïllats es van caracteritzar pel que fa l'activitat antimicrobiana in vitro enfront bacteris i fongs fitopatògens, l'eficàcia del biocontrol de malalties i la presència de gens relacionats amb la síntesi de compostos antimicrobians com les fenazines, DAGP, pirrolnitrina, pioluteorina i també més recentment CLPs. Concretament, es van obtenir un conjunt de soques de *Pseudomonas spp.* que presentaven característiques d'interès com activitat antimicrobiana o de biocontrol, o presència de gens de producció de compostos d'interès i es varen escollir com a candidates per a futurs estudis.

3. OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest treball és seleccionar bacteris del complex *P. fluorescens* amb capacitat de produir substàncies antimicrobianes actives enfront diferents patògens de plantes causants de malalties d'importància econòmica. Aquests bacteris podrien ser bons candidats a ser desenvolupats com a bioplaguicides. Per això, els objectius concrets d'aquest treball són:

- Optimitzar la metodologia per determinar l'activitat antimicrobiana *in vitro* de les soques de *P. fluorescens* enfront bacteris i fongs fitopatògens.
- Determinar l'activitat antimicrobiana i l'espectre d'acció enfront bacteris i fongs fitopatògens d'una selecció de soques de *Pseudomonas spp.*

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1. Medis de cultiu, tampons i reactius

Medi Glucosa Asparagina GA

PART A: Pesar els següents components, dissoldre en 900 mL d'aigua, homogeneïtzar i esterilitzar a l'autoclau a 121°C durant 20 minuts a 1 atm.

- K ₂ HPO ₄	11,5g
- KH ₂ PO ₄	4,5g
- MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,12g
- Aigua destil·lada	900ml

PART B: Pesar els següents components, dissoldre en 100 mL i esterilitzar per filtració amb filtres de 0,2 µm de diàmetre de porus.

- Glucosa	20 g
- L-Asparagina	0,3 g
- Àcid nicotínic	0,05 g
- Aigua destil·lada	100 ml

Quan la part del medi esterilitzada a l'autoclau s'hagi refredat barrejar les dues parts.

Medi Luria Bertani LB líquid

- Extracte de llevat	5 g
- Triptona	10 g
- NaCl	10 g
-Aigua destil·lada	1000 ml

Homogeneïtzar i esterilitzar la mescla a 121°C durant 20 minuts a l'autoclau.

Medi Luria Bertani LB sòlid

- Extracte de llevat	5 g
- Triptona	10 g
- NaCl	10 g
-Aigua destil·lada	1000 ml
- Agar	10 g

PDB

- Extracte de patata	24 g
- Peptona	3 g
- Extracte de llevat	2 g
- Aigua destil·lada	100 ml

Medi Agar Patata Dextrosa PDA

-Agar de patata i dextrosa	29 g
----------------------------	------

Aigua /Tampó fosfat

- Na_2HPO_4	7,10 g
- KH_2PO_4	2,72 g
- Aigua destil·lada	100 ml

Medi B de King KB

- Proteosa peptona	15 g
- K_2HPO_4	1,5 g
- $Mg_2SO_4 \times 7 H_2O$	1,5 g
- Glicerol	10 g
- Agar	15 g
- Aigua destil·lada	100 ml

Medi Mínim de Sals MM

-NaCl	0,5 g
- NH_4Cl	1,0 g
-Glucosa	5,0 g
- $Mg_2SO_4 \times 7 H_2O$	0,2 g
- KH_2PO_4	3,0 g
- Na_2HPO_4	2,4g
-Aigua destil·lada	100 ml

4.2. Soques de *Pseudomonas* spp. utilitzades

Per la realització del Treball Final de Grau es van utilitzar 35 soques, d'una col·lecció procedent del grup de Patologia Vegetal-Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal (CIDSAV), del complex *Pseudomonas fluorescens* (Taula 4.1).

Taula 4.1. Soques del complex *P. fluorescens* emprades en aquest projecte (PV-CIDSAV EPS soques de referència).

Soca	Espècie	Procedència		Activitat antimicrobiana		Presència de gens relacionats amb la síntesi de compostos antimicrobians				
		Planta	Òrgan	Bacteris	Fongs	DAPG	PCA	Prn	HCN	PLT
BL915*	<i>P. chlororaphis</i>	cotó	arrel	+	+	-	-	+	+	-
CHAO*	<i>P. protegens</i>	tabac	arrel	+	+	+	-	+	+	+
EPS209	<i>Pseudomonas sp</i>	lleguminosa	arrel	++	++	-	-	-	+	-
EPS240	<i>Pseudomonas sp</i>	blat	arrel	++	+	-	-	-	-	-
EPS260	<i>Pseudomonas sp</i>	pomera	arrel	++	+	-	-	-	+	-
EPS262	<i>Pseudomonas sp</i>	pomera	arrel	++	+	-	-	-	+	-
EPS263	<i>Pseudomonas sp</i>	faig	arrel	+	++	-	+	+	-	-
EPS274	<i>Pseudomonas sp</i>	luzula	arrel	++	-	-	-	-	-	-
EPS288	<i>Pseudomonas sp</i>	panís	arrel	++	++	-	-	-	+	-
EPS290	<i>Pseudomonas sp</i>	panís	arrel	+	-	-	-	-	+	-
EPS301	<i>P. fluorescens</i>	gramínia	arrel	++	++	-	-	-	-	-
EPS317	<i>Pseudomonas sp</i>	tabac	arrel	+	++	+	-	-	-	-
EPS327	<i>Pseudomonas sp</i>	enciam	arrel	++	-	-	-	-	-	-
EPS356	<i>P. fluorescens</i>	perera	borró	+	++	-	-	-	-	-
EPS383	<i>Pseudomonas sp</i>	Veronica	flor	++	++	-	-	-	-	-
EPS384	<i>P. fluorescens</i>	gramínia	fulla	++	++	-	-	-	-	-
EPS531	<i>P. fluorescens</i>	presseguer	flor	+	+	-	-	-	-	-
EPS539	<i>P. fluorescens</i>	perera	borró	+	++	-	-	-	-	-
EPS550	<i>P. fluorescens</i>	cirerer	borró	+	++	-	-	-	-	-
EPS584	<i>P. fluorescens</i>	perera	flor	-	-	-	-	-	-	-
EPS817	<i>Pseudomonas sp</i>	cirerer	arrel	+	+	+	-	-	+	-
EPS894	<i>P. fluorescens</i>	pomera	fulla	+	-	-	+	-	-	-
EPS895	<i>P. fluorescens</i>	pomera	fulla	+	-	-	+	-	-	+
MSN12	<i>P. koreensis</i>	nd	nd	-	+	-	-	-	+	-
pkMSN26	<i>P. koreensis</i>	nd	nd	+	+	-	-	-	+	-
Ps2-79*	<i>P. fluorescens</i>	blat	arrel	+	+	-	+	-	-	-
pspALZM3	<i>Pseudomonas sp</i>	nd	nd	++	++	-	-	-	-	-
pspMSN5	<i>P. frederiksbergensis</i>	nd	nd	-	+	-	-	-	+	+
PspVIA1	<i>P. helmanticensis</i>	nd	nd	+	+	-	-	-	-	-
psSARTAS5	<i>Pseudomonas sp</i>	nd	nd	-	+	-	-	-	+	-
Q4-87*	<i>P. corrugata</i>	blat	arrel	+	+	+	-	-	+	-
SBW25*	<i>P. fluorescens</i>	remolatxa	fulla	+	-	-	-	-	-	-

Nd: No determinat.

* Soques de referència

Les soques seleccionades es mantenen crioconservades a -80°C (Ultra congelador MDF-U51865S, Sanyo, Tokio, Japó) en medi LB amb glicerol al 20%. Per la realització d'aquest estudi es van sembrar amb estria en medi LB sòlid sota campana de flux laminar per assegurar-ne l'esterilitat, a continuació es van incubar a 23°C durant 24 hores. Posteriorment es va dur a terme un segon repicat per assegurar l'obtenció de cultius frescos pels assajos posteriors.

4.3. Preparació dels bacteris indicadors patògens

Es van utilitzar les següents soques de bacteris fitopatògens: *Erwinia amylovora* (Ea) PMV6076, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) 206, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) 3700.1, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000.

Les soques indicadores es van descongelar i es van sembrar en estria en plaques d'agar LB sòlid. Cadascuna d'elles es va incubar 24 hores a 23°C, excepte Xav que es va incubar 48 hores perquè li costa més créixer.

La preparació de les suspensions dels bacteris indicadors es va realitzar utilitzant cultius en medi LB sòlid de 24 h per Ea, Psa, Pst i de 48 h per Xav. Es va agafar una colònia de cultiu amb l'ajuda d'una nansa de Kollé, es va resuspendre en 5 mL de tampó fosfat i es va homogeneïtzar. La concentració de la suspensió es va determinar mitjançant la lectura de l'absorbància a 600nm amb un espectrofotòmetre (Shimadzu UV-150A, Shimadzu Europa GMBH, Japó). Les concentracions de les suspensions de les diferents soques es van ajustar a 10⁸ ufc/mL segons les equivalències entre ufc/mL i DO_{600nm} (Taula 4.2).

Taula 4.2. Densitats òptiques (DO) de lectures de l'absorbància a l'espectrofotòmetre (600nm), de les soques bacterianes utilitzades com a indicadors, corresponents a 10⁸ ufc/mL.

Microorganismes indicadors	DO _{600nm}
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>vesicatoria</i> 206	0.25
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> 3700.1	0.20
<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> DC3000	0.20
<i>Erwinia amylovora</i> PMV6076	0.15

Un cop van estar preparades les suspensions dels bacteris, es va procedir a realitzar un banc de dilucions i recompte en placa per verificar la seva concentració. Es van realitzar dilucions decimals successives de la suspensió, i es van sembrar 20 µL de les dilucions adequades en placa d'agar LB que es van incubar 48 hores a 23°C. Un cop passat el període d'incubació es va procedir al recompte de les colònies crescudes.

4.4. Obtenció del fongs indicadors patògens

Es van utilitzar quatre fongs fitopatògens: *Fusarium avenaceum* (PV-CIDSAV) (Fa), *Botrytis cinerea* ATCC33759B (Bc), *Fusarium oxysporum* (ATCC 201829) (Fo) i *Penicillium expansum* EPS26 (PV-CIDSAV) (Pe). Aquests es mantenen en cultius en agar patata dextrosa (PDA) en tubs inclinats i emmagatzemats a 4°C. Per cultivar els fongs, es va dipositar un cub de cultiu del fong conservat en el vial, d'aproximadament 1 cm², en una placa d'agar PDA i es van incubar durant 7 dies a 23°C. A partir d'aquests cultius es van realitzar repicats periòdics en medi PDA cada 7 dies.

Per a la preparació de les suspensions de conidis dels fongs es van utilitzar cultius en medi PDA de 7 dies. Es van abocar 5 mL d'aigua destil·lada estèril amb una gota de Tween 20 com a surfactant a l'interior de les plaques de cultiu del fong i amb l'ajut d'una nansa de Digrafsky, es van resuspendre els conidis i es van recollir en un pot estèril. La suspensió es va filtrar a través d'un filtre miracloth que permetia separar les restes de miceli i obtenir solament els conidis. La concentració de conidis es va determinar mitjançant el microscopi amb l'ajut d'una càmera Thoma i es van realitzar dilucions de la suspensió fins ajustar-la a 10⁴ conidis/mL.

4.5. Avaluació de l'activitat antibacteriana

4.5.1. Obtenció del sobrenedant sense cèl·lules a partir de cultius.

Per obtenir sobrenadants sense cèl·lules (SSC) a partir de cultius frescos de *Pseudomonas spp.* es va procedir a la realització dels precultius. A partir d'un cultiu de 48 h de *Pseudomonas spp.* en medi LB, es va agafar una colònia amb una nansa de Kolle i es va resuspendre en 4,5 mL de medi de cultiu a l'interior d'un tub d'assaig. Els tubs es van incubar durant 24 h a 25 °C en agitació a 125 rpm (Agitador, IKA K5501 Digital, IKA LABORTECHNIK, Staufen, Alemanya).

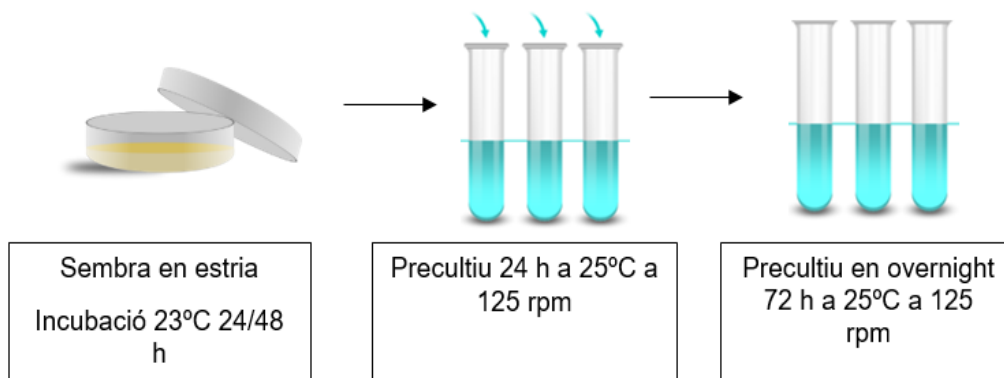


Figura 4.1. Preparació dels precultius i cultius dels bacteris assajats.

Passades les 24 h i amb les soques crescudes es van realitzar els cultius per obtenir el SSC, introduint 0,5 mL del precultiu en 4,5mL de medi fresc. Aquests cultius es van incubar a 25°C, amb agitació constant a 125 rpm durant les 72 h com s'il·lustra a la Figura 4.1. Un cop passat el període d'incubació es van transferir 2 mL dels cultius a microtubs eppendorf i es van centrifugar a 10.000 rpm durant 15 min a 5°C i així obtenir la separació de dues fases el sobrenedant i el pellet. Posteriorment, el sobrenedant es va filtrar amb un filtre de 0,2 µm de diàmetre de porus per obtenir el sobrenedant sense cèl·lules amb els compostos actius com es mostra a la Figura 4.2.

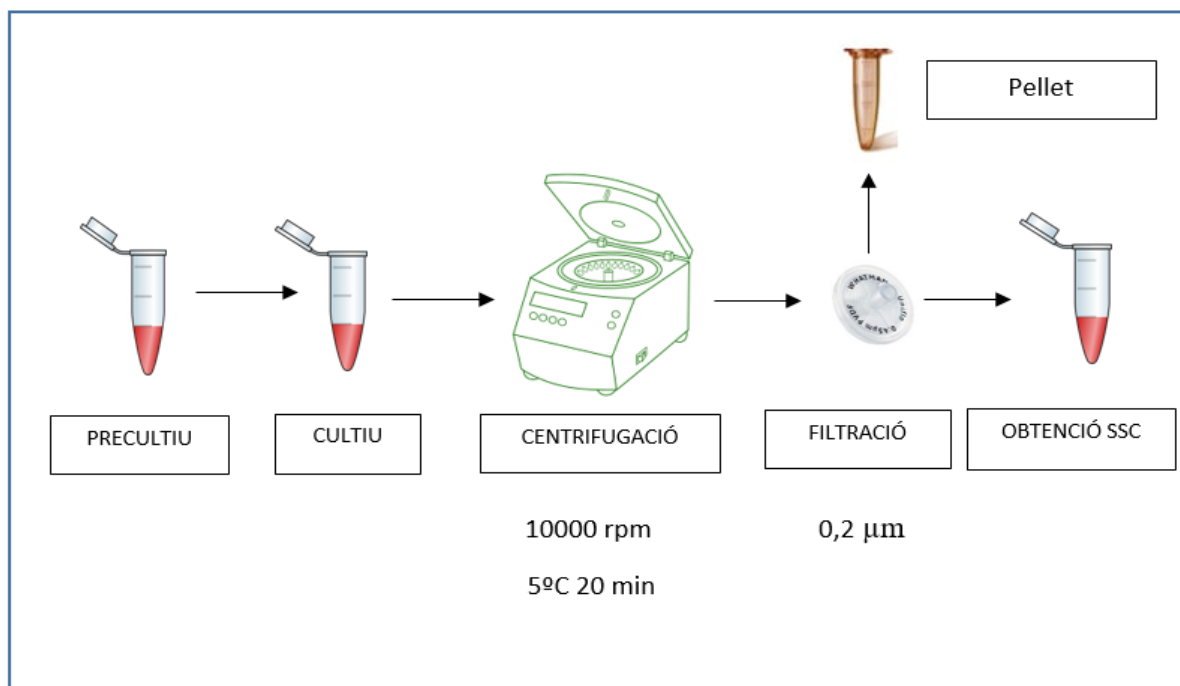


Figura 4.2. Obtenció dels sobrenadants sense cèl·lules (SSC) dels cultius.

4.5.2. Determinació de l'activitat antimicrobiana

L'activitat antimicrobiana dels SSC obtinguts a partir dels cultius de *Pseudomonas spp.* enfront 4 bacteris indicadors Ea, Psa, Pst i Xav es va determinar utilitzant el lector de plaques Bioscreen (Bioscreen C, Labsystem, Helsinki, Finland). Aquest equip és un espectrofotòmetre programable que permet quantificar el creixement microbiològic dels diferents bacteris patògens indicadors a temps real mitjançant la mesura de la densitat òptica. En els diferents assajos es van utilitzar els SSC de les soques de *Pseudomonas spp.* que es van posar en contacte amb les cèl·lules dels bacteris fitopatògens (Ea, Xav, Psa, Pst) amb l'objectiu de determinar la inhibició del seu creixement pels metabòlits presents als sobrenadants.

El mètode de la turbidimetria és un mètode indirecte que s'utilitza per quantificar el creixement bacterià mitjançant la quantificació de la densitat òptica (DO) o absorbència que generen els cultius inoculats. Aquesta tècnica es basa amb el fet que les cèl·lules bacterianes són capaces d'absorbir i dispersar un feix de llum incident dependent de la seva concentració, mida i forma. Aquesta proporcionalitat és la base de l'ús de la turbidimetria com un mètode ràpid, no destructiu i relativament econòmic per monitoritzar el creixement, o la inhibició de cultius microbians. L'equip Bioscreen C utilitzat en aquest treball permet a més processar 200 mostres simultàniament.

L'activitat inhibidòria dels SSC enfront els patògens indicador es va determinar mitjançant una prova d'inhibició de creixement posant en contacte el SSC, el patogen i en alguns experiments es va incloure també un suplement del medi de cultiu per si s'havien esgotat els nutrients. Per a realitzar els experiments, es van introduir 160 µL dels SSC en un pou d'una placa multipouet i es van barrejar amb 20 µL de la suspensió del patogen indicador i 20 µL del suplement de medi adequat. Es van incloure dos tipus de controls positius que consistien en: i) 160 µL de medi de cultiu, 20 µL de la suspensió del patogen, 20 µL d'aigua destil·lada, ii) 160 µL del medi de cultiu, 20 µL suspensió del patogen i 20 µL del suplement de medi adequat. A més es van incloure tres tipus de controls negatius: i) 160 µL SSC, ii) 160 µL del medi de cultiu i 20 µL d'aigua destil·lada, o iii) 160 µL medi de cultiu i 20 µL del suplement adequat.

El creixement del bacteri indicador es va determinar mitjançant la mesura de la densitat òptica (DO) a 600 nm amb el lector de plaques de Bioscreen. Les microplaques es van incubar 25 °C amb 20 s d'agitació abans de cada mesura. La DO es van mesurar cada hora durant un total de 72 hores (Figura 4.3).

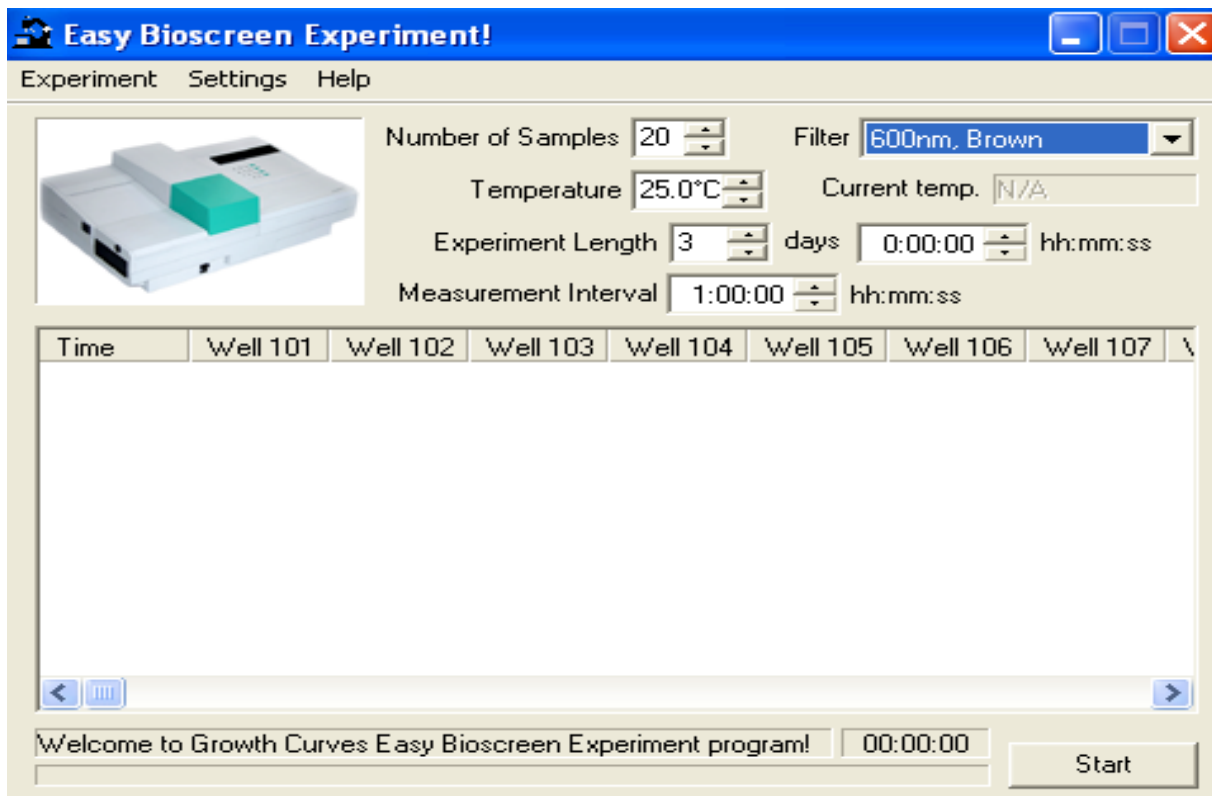


Figura 4.3. Programació de variables amb el Software Bioscreen C.

Un cop passades les 72 hores d'incubació i obtingudes les lectures d'absorbància a 600 nm es va procedir a descarregar l'arxiu en format Excel i a tractar les dades per poder obtenir el resultat del percentatge d'inhibició de creixement de cadascun dels experiments. En primer lloc es va treure el soroll de fons i es va determinar el creixement bacterià DO en relació al temps d'incubació mitjançant la determinació de l'àrea sota la corba de cadascuna de les mostres (cada pou de la microplaca), que correspon a l'integral de les DO obtingudes al llarg del període d'incubació (72 h). Per fer-ho es va realitzar el sumatori de les àrees parcials aplicant la següent fórmula:

$$AUC = \sum_{i=2}^n \frac{1}{2} (DO_{i-1} + DO_i) * (t_i - t_{i-1})$$

On:

DO_i: correspon a la densitat òptica a 600 nm obtinguda en cadascun dels temps.

t_i: correspon als temps en que s'ha realitzat les lectures d'absorbància

A continuació, es va calcular el percentatge d'inhibició del creixement que es defineix com:

$$\% \text{ Inhibició} = \left(\frac{AUC_{C+} - AUC_{SSC}}{AUC_{C+}} \right) * 100$$

On:

AUC_{C+} : és l'àrea sota la corba del bacteri indicador (control sense tractar).

AUC_{SSC} : és l'àrea sota la corba obtinguda per un determinat SSC.

4.6. Optimització de les condicions d'assaig

4.6.1. Efecte del medi de cultiu en la producció de metabòlits

L'objectiu d'aquesta prova va ser determinar l'efecte del medi de cultiu utilitzat per l'obtenció de SSC en l'activitat antimicrobiana enfront a Xav i Psa. Es va realitzar l'experiment obtenint SSC a partir de les soques EPS240, EPS384, EPS584 en els medis MM, GA, KB, LB i PDB modificat tal com s'ha explicat en l'apartat 4.5.1.

L'activitat antimicrobiana dels SSC enfront Xav i Psa es va avaluar mitjançant una prova d'inhibició de creixement (apartat 4.5.2). Es van introduir 180 µL dels SSC (de les 3 soques assajades i dels 5 medis) en un pou d'una placa multipouet de Bioscreen i es van barrejar amb 20 µL d'una suspensió del patogen indicador. A més, es va realitzar un control positiu introduint 180 µL de MM, GA, PDB, LB o KB i 20 µL de la suspensió del patogen indicador, i finalment un control negatiu introduint 180 µL de SSC i 20 µL d'aigua destil·lada (Taula 4.2).

El percentatge d'inhibició del SSC es va determinar tal com s'explica en l'apartat anterior. El disseny experimental va consistir en 3 rèpliques per cada soca i medi i l'experiment es va realitzar dues vegades. Els resultats del percentatge d'inhibició dels SSC en diferents medis enfront del creixement dels patògens indicadors van ser tractats mitjançant l'anàlisi de la variància ANOVA i el test de Tukey ($P < 0,05$).

Taula 4.3 Tractaments (barreges introduïdes en els pous de la placa de Bioscreen C) en l'assaig de l'efecte del medi de cultiu en la producció de metabòlits.

<i>Tractament</i>	<i>Rèpliques</i>	<i>SSC o medi (μL)</i>	<i>Suspensió de patogen (μL)</i>	<i>de Aigua destil·lada (μL)</i>
SSC amb patogen	3	180 SSC (cultiu de les soques en GA, MM, KB, PDB, LB)	20	0
Medi amb patogen sense tractar	3	180 (medi GA, MM, GA,KB, PDB, LB,KB)	20	0
SSC sense patogen	3	180 SSC	0	20
Medi sense patogen	3	180 medi	0	20

4.6.2. Efecte de la neutralització dels SSC en l'activitat antimicrobiana

L'objectiu d'aquesta prova va ser determinar si les variacions de pH en els SSC durant la seva obtenció afectaven l'activitat antimicrobiana. Es van obtenir SSC de dos soques l'EPS384 i EPS584 en dos medis GA i LB tal i com s'explica en l'apartat 4.5.1.

Una vegada obtinguts els SSC es van subdividir en dos mostres, neutralitzades i no neutralitzades. La mostra neutralitzada es va ajustar a pH de 7 utilitzant NaOH (1M) o bé HCl (1M) en funció del medi i mesurant el pH amb el pH-metre GLP21.

L'activitat antimicrobiana dels SSC enfront Xav i Psa es va avaluar mitjançant una prova d'inhibició del creixement tal com s'explica en l'apartat 4.5.2. Es van introduir 180 μL del SSC en un pou d'una placa multipouet de Bioscreen i es van barrejar amb 20 μL d'una suspensió del patogen indicador. En el cas dels SSC obtinguts en medi GA es va realitzar una variació barrejant 160 μL de SSC, 20 μL de la suspensió de patogen i 20 μL de suplement de GA 6X. A més es va realitzar un control positiu introduint 180 μL de GA o LB i 20 μL de la suspensió del patogen indicador i també 160 μL de GA, 20 μL suspensió del patogen i 20 μL del suplement de medi GA6X. Finalment es van realitzar dos controls negatius introduint 180 μL de SSC i 20 μL d'aigua destil·lada i un amb 180 μL de GA i 20 μL del suplement GA6X (Taula 4.4). El percentatge d'inhibició dels SSC es va determinar tal i com s'explica en l'apartat anterior. El disseny experimental va consistir en 3 rèpliques per cada soca i medi. Els resultats del percentatge d'inhibició dels SSC enfront del creixement dels patògens indicadors van ser tractats mitjançant l'anàlisi de la variància ANOVA i el test de Tukey ($P < 0,05$).

Taula 4.4. Tractaments (barreges introduïdes en els pous de la placa de Bioscreen C) en l'assaig de l'efecte de la neutralització dels SSC en l'activitat antimicrobiana.

<i>Tractament</i>	<i>Rèpliques</i>	<i>SSC o medi (μL)</i>	<i>Suspensió patogen (μL)</i>	<i>Aigua o suplement (μL)</i>
SSC LB amb patogen	3	180 (SSC LB)	20	0
SSC GA amb patogen	3	160 (SSC GA)	20	20 de suplement GA 6X
Medi amb patogen	3	180 (LB o GA)	20	0
SSC LB sense patogen	3	180 (SSC LB)	0	20
SSC GA sense patogen	3	160 (SSC GA)	0	20 suplement GA 6X i 20 aigua
Medi sense patogen	3	180 (LB o GA)	0	20

4.7. Activitat antibacteriana dels SSC obtinguts de les soques de *Pseudomonas spp.* enfront Ea, Psa, Pst i Xav

Els SSC de les 35 soques de *Pseudomonas spp.* seleccionades en aquest treball es van obtenir a partir de cultius realitzats en medi LB i GA com indica l'apartat 4.5.1.

L'activitat antimicrobiana dels SSC enfront Ea, Psa, Pst i Xav es va avaluar mitjançant una prova de contacte. Es van introduir 180 μL del SSC en un pou d'una placa mutipouet (Figura 4.4) de Bioscreen i es van barrejar 20 μL d'una suspensió de patogen indicador. En el cas dels SSC obtinguts en medi GA es va realitzar una variació barrejant 160 μL de SSC, 20 μL de la suspensió de patogen i 20 μL de suplement de GA 6X. A part, es va realitzar dos controls positius introduint 180 μL de GA o LB i 20 μL de la suspensió del patogen indicador i també 160 μL de GA, 20 μL suspensió del patogen i 20 μL del suplement de medi GA6X. Finalment es van realitzar dos controls negatius introduint 180 μL de SSC i 20 μL d'aigua destil·lada i un amb 180 μL de GA i 20 μL del suplement GA6X (Taula 4.6). El percentatge d'inhibició dels SSC es va determinar tal i com indica l'apartat 4.5.2. El disseny experimental va consistir en 3 replicues per soca i medi i l'experiment es va realitzar dues vegades. Els resultats del percentatge d'inhibició dels SSC enfront del creixement dels patògens indicadors van ser tractats mitjançant l'anàlisi de la variància ANOVA i el test de Tukey ($P < 0,05$). També es va realitzar una classificació de les soques en funció de la seva activitat antimicrobiana global per tots els bacteris indicadors. Per obtenir aquesta classificació es va utilitzar una escala numèrica, per cadascun dels indicadors, assignant les següents puntuacions: i) 0, quan el percentatge d'inhibició és de 0; ii) 1, entre 0 i 25% d'inhibició; iii) 2, entre 25 i 50% d'inhibició; iv) 3, entre 50 i 90% d'inhibició, v) 4, >90% d'inhibició. A continuació es va realitzar el sumatori dels valors obtinguts de cadascuna de les soques.

Taula 4.5. Tractaments (barreges de la placa Bioscreen C) en l'assaig d'activitat antibacteriana dels SSC enfront Ea, Psa, Pst, Xav (screening).

<i>Tractament</i>	<i>Rèpliques</i>	<i>SSC o medi μL</i>	<i>Suspensió de patogen μL</i>	<i>Aigua o suplement</i>
SSC LB amb patogen	3	180 SSC (cultiu en LB)	20	0
SSC GA amb patogen		160 SSC (cultiu en GA)		20 suplement GA 6X
Medi amb patogen	3	180 GA o LB	20	0
Medi sense patogen		180 LB	0	20 aigua
Medi sense patogen	3	160 GA	0	20 suplement GA 6X + 20 aigua

4.8. Activitat antifúngica de les soques de *Pseudomonas spp.* seleccionades

Aquest assaig es va realitzar per mesurar l'activitat antifúngica de les 32 soques assajades amb anterioritat enfront els quatre fongs fitopatògens. Per fer-ho es va utilitzar el mètode de cultiu dual en placa i el mètode d'inhibició del creixement en líquid.

4.8.1. Activitat antifúngica *in vitro* de soques de *Pseudomonas spp.* en cultius duals

Pels assajos d'antagonisme en cultius duals es van utilitzar cultius de les 32 soques de *Pseudomonas spp.* sembrades en sembra homogènia en superfície en plaques d'LB i incubades durant 24 hores. A partir d'aquests cultius, amb l'ajut d'un trepant es van obtenir discs 5 mm de diàmetre. Per sembrar els fongs es van preparar suspensions de conidis ajustades a $10^4 - 10^5$ conidis/mL tal i com s'explica a l'apartat 4.4. La sembra es va realitzar en sobrecapa en plaques de petri de medi PDA. La sobrecapa es va preparar barrejant 5 mL d'agar tou PDA (10 g d'agar/L) (mantinguts a 45°C per evitar la solidificació) i 0,1 mL de la suspensió de conidis del fong. Aquesta barreja es va homogeneïtzar i es va distribuir sobre una placa d'agar del mateix medi. Un cop solidificada la sobrecapa es van dipositar els discos procedents dels cultius de *Pseudomonas spp.* de manera que el bacteri tingués contacte amb les cèl·lules del fong. Cada soca es va sembrar per triplicat. Aquestes plaques es van incubar a 25 °C durant 7 dies. Passat el període d'incubació es va determinar si s'havien format halos d'inhibició i en aquest cas es va mesurar el seu diàmetre. Seguidament es van assignar valors no numèrics en les soques en funció de la seva activitat antimicrobiana per contacte per cada fong estudiat segons el següent criteri: i) ---, quan no es forma halo d'inhibició en cap dels tres triplicats; ii) --+ quan només hi ha un halo d'inhibició en un dels tres replicats, iii) -++ quan hi ha 2 halos d'inhibició i iii) +++ quan hi ha 3 halos d'inhibició (en tots replicats ha donat halo d'inhibició).

4.8.2. Activitat antifúngica *in vitro* dels SSC obtinguts de cultius de soques de *Pseudomonas spp.* pel mètode de la inhibició del creixement del fong

L'objectiu d'aquesta prova va ser determinar l'efecte dels SSC de les 32 soques seleccionades enfront a quatre fongs indicadors. L'activitat antifúngica dels SSC es va avaluar mitjançant una prova d'inhibició del creixement del fong utilitzant el sistema Bioscreen amb plaques multipouet. Es va introduir 160 µL de SSC en un pou d'una placa de Bioscreen i es va barrejar amb 20 µL de medi PDB 6X i 20 µL de conidis. Es va realitzar un control positiu amb 160 µL del medi, 20 µL d'aigua destil·lada i 20 µL de conidis, i finalment un control negatiu introduint 160 µL del medi i 40 µL d'aigua (Taula 4.7). Es van realitzar dos experiment. Els resultats van ser tractats calculant la mitjana dels percentatges d'inhibició del creixement dels fongs. Seguidament, es van assignar valors no numèrics a les soques, en funció de la seva activitat antimicrobiana per cada fong indicador estudiat, segons el següent criteri: i) -, igual a 0% d'inhibició; ii) +, més gran que 0% i inferior a 30%; iii) ++, superior a 30% i inferior a 60%; i per finalitzar iv) +++, superior a 60% d'inhibició.

Taula 4.7. Tractaments (barreges introduïdes en els pous de les plaques de Bioscreen C) per l'avaluació d'activitat antifúngica.

<i>Tractament</i>	<i>Rèpliques</i>	<i>SSC o medi µL</i>	<i>Suspensió de patogen µL</i>	<i>Aigua o suplement µL</i>
SSC amb patogen	3	160 SSC	20	20 suplement PDB6X
Medi amb patogen	3	160 medi	20	20 aigua
SSC sense patogen	3	160 SSC	0	40 aigua
Medi sense patogen	3	160 medi	0	40 aigua

5. RESULTATS

5.1. Efecte del medi de cultiu en la producció de metabòlits antimicrobians

Es van utilitzar cinc medis de cultiu amb diferents formulacions i fonts de carboni per obtenir els SSC de les soques EPS284, EPS384 i EPS584 i es va determinar la seva activitat antimicrobiana enfront dos bacteris fitopatògens Xav i Psa. Es va determinar que hi havia un efecte significatiu de la soca ($Pr>F$; 0,0051) i del medi de cultiu ($Pr>F$; 0,0001) en l'activitat antimicrobiana. A les Figures 5.1, 5.2, 5.3 es mostren les mitjanes del percentatge d'inhibició ($n=3$) amb el seu interval de confiança. Les mitjanes dels percentatges d'inhibició amb la mateixa lletra no presenten diferències significatives, segons el test de Tukey ($P<0,05$).

En la Figura 5.1 es mostra l'efecte del medi de cultiu utilitzat per l'obtenció de SSC en l'activitat antimicrobiana de la soca EPS240 enfront de Xav. Els SSC obtinguts en el medi MM presentaven un percentatge d'inhibició significativament superior que en GA i els medis complexos PDB, KB, LB.

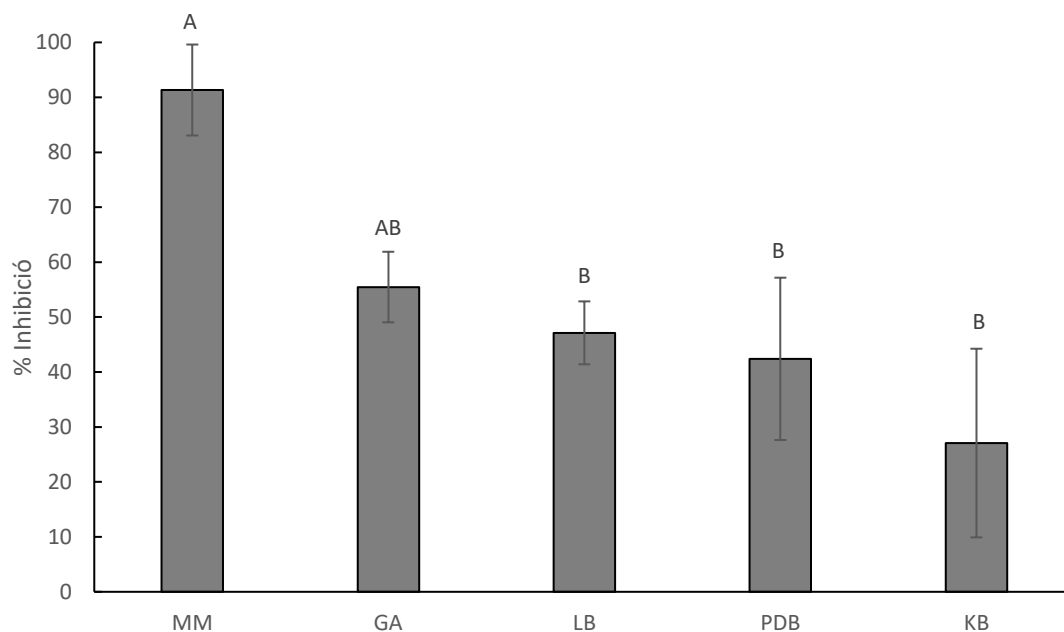


Figura 5.1. Efecte del medi de cultiu utilitzat per l'obtenció dels SSC de la soca EPS240 en la inhibició del creixement de Xav. Lletres idèntiques signifiquen que no existeixen diferències significatives entre medis segons Tukey ($P<0,05$).

A la Figura 5.2 s'observa que existeixen diferències significatives en el percentatge d'inhibició dels SSC de la soca EPS384 enfront Xav. El MM amb el 94,59% ha sigut el medi que ha presentat significativament una major inhibició que la resta de medis. El medi KB, per contra, ha sigut el que ha presentat una menor inhibició (< 25%). Els tractaments GA, LB i PDB (58,07, 63,35 i 58,69% respectivament) han presentat unes inhibicions significativament menors que el medi MM i majors que la inhibició obtinguda amb el medi KB.

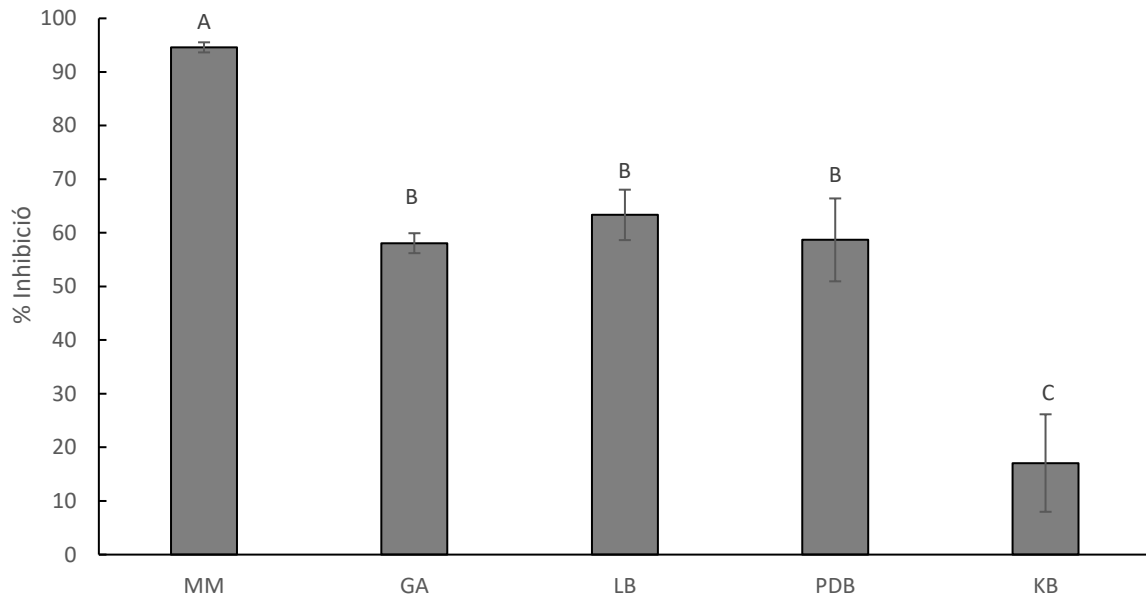


Figura 5.2. Efecte del medi de cultiu utilitzat per l'obtenció dels SSC de la soca EPS384 en la inhibició del creixement de Xav. Lletres idèntiques signifiquen que no existeixen diferències significatives entre medis segons Tukey ($P < 0,05$).

En la Figura 5.3 s'observa que existeixen diferències significatives en el percentatge d'inhibició dels SSC de la soca EPS584 enfront Xav. Amb el medi PDB s'ha obtingut una significativament menor inhibició que en el medi GA. Entre els medis GA, MM, LB, i KB no s'han trobat diferències significatives en quant al percentatge d'inhibició.

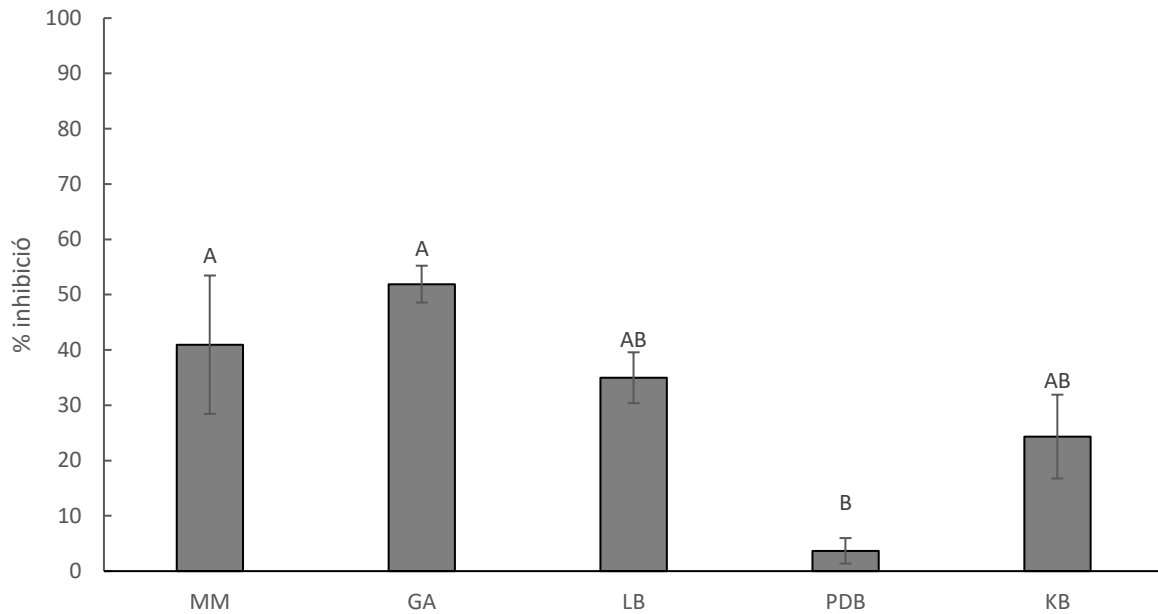


Figura 5.3. Efecte del medi de cultiu utilitzat per l'obtenció dels SSC de la soca EPS584 en la inhibició del creixement de Xav. Lletres idèntiques signifiquen que no existeixen diferències significatives entre medis segons Tukey ($P < 0,05$).

Seguidament es va avaluar l'activitat antimicrobiana dels SSC de les mateixes soques enfront a Psa i es va estudiar l'efecte del medi de cultiu utilitzat en l'activitat antimicrobiana.

A la Figura 5.4 s'observa el percentatge d'inhibició dels SSC de la soca EPS240 enfront Psa. El medi KB ha sigut el que ha presentat un menor percentatge d'inhibició i a la vegada ha donat una diferència significativa enfront al medi MM. Entre els tractaments MM, GA, LB, PDB no s'han trobat diferències significatives. Ni tampoc entre els tractaments GA, LB, PDB i KB.

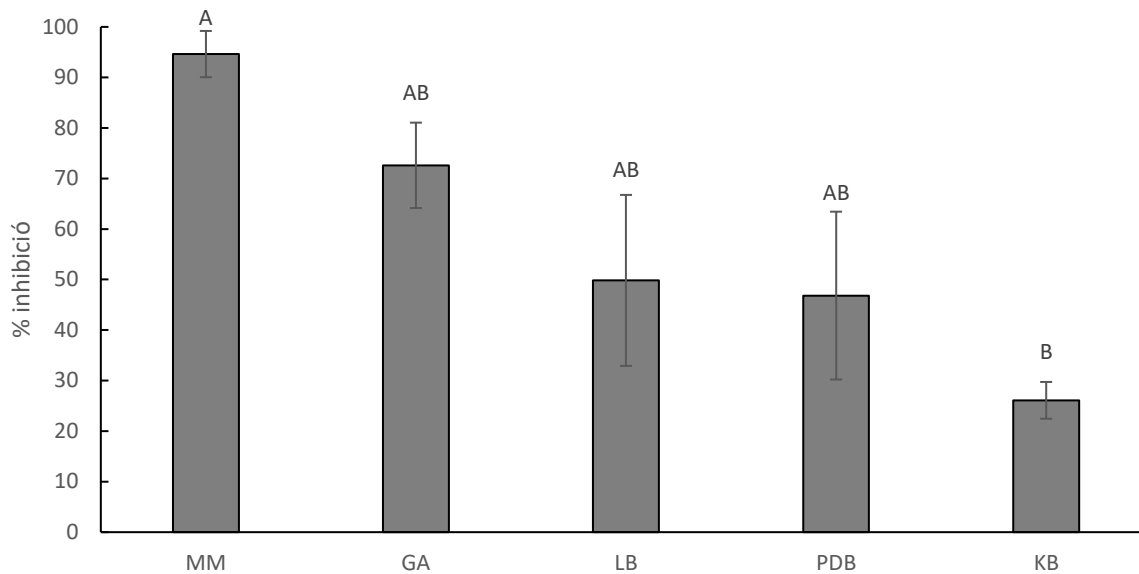


Figura 5.4. Efecte del medi de cultiu utilitzat per l'obtenció dels SSC de la soca EPS240 en la inhibició del creixement de Psa. Lletres idèntiques signifiquen que no existeixen diferències significatives entre medis segons Tukey ($P < 0,05$).

A continuació la Figura 5.5 es mostra la inhibició dels SSC de la soca EPS384 enfront Psa. S'han trobat diferències significatives entre els medis estudiats. El MM i GA (95% i 99%) han sigut els medis en els que s'han obtingut un percentatge d'inhibició significativament major que la resta de medis estudiats. El KB ha sigut el medi en el qual s'ha obtingut el menor percentatge d'inhibició (<30%). Amb els medis LB i PDB s'han obtingut uns percentatges d'inhibició significativament menors que els obtinguts en MM i GA i significativament majors que l'obtingut en KB. No s'han trobat diferències significatives entre el medi MM i GA, ni entre LB i PDB.

A la Figura 5.6 es mostra la inhibició dels SSC de la soca EPS584 enfront Psa. S'han trobat diferències significatives entre els medis estudiats. El MM i GA han sigut els medis en els que s'han obtingut un percentatge d'inhibició significativament major que la resta de medis estudiats. Amb el medi LB s'ha obtingut un percentatge d'inhibició significativament menor que l'obtingut en MM i GA i significativament majors que l'obtingut en PDB i KB. No s'han trobat diferències significatives entre les mitjanes dels medis MM i GA, ni entre KB i PDB.

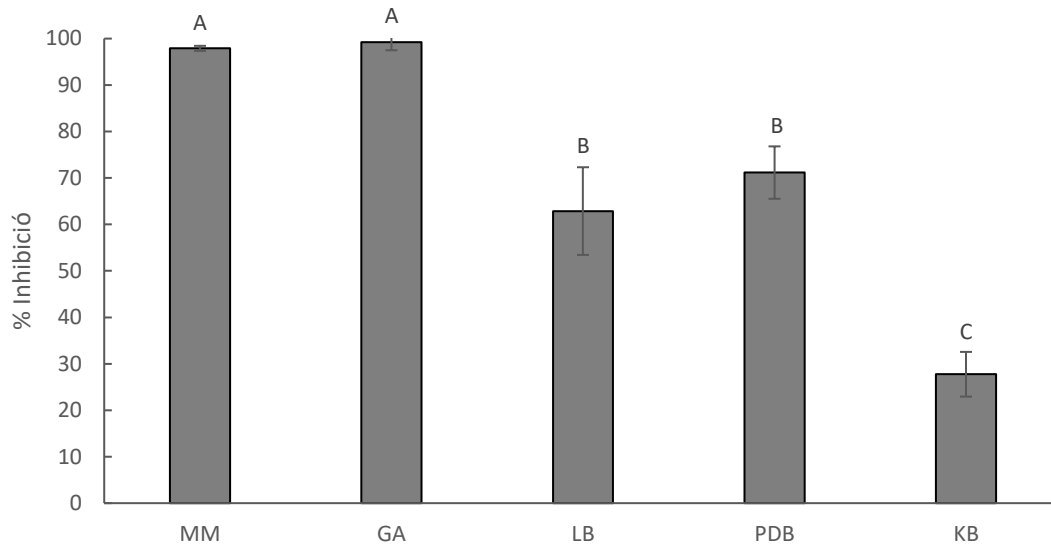


Figura 5.5. Efecte del medi de cultiu utilitzat per l'obtenció dels SSC de la soca EPS384 en la inhibició del creixement de Psa. Lletres idèntiques signifiquen que no existeixen diferències significatives entre medis segons Tukey ($P < 0,05$).

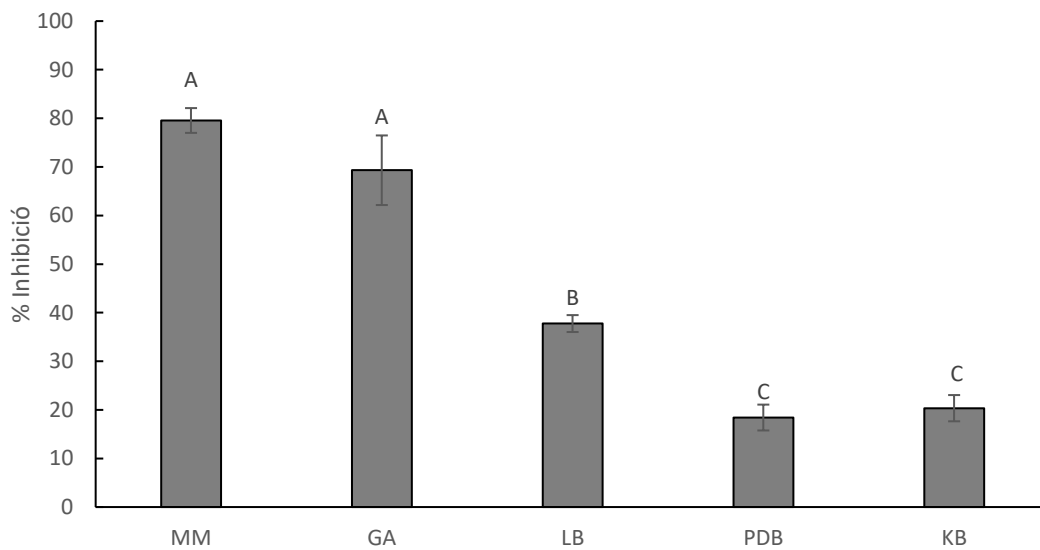


Figura 5.6. Efecte del medi de cultiu utilitzat per l'obtenció dels SSC de la soca EPS584 en la inhibició del creixement de Psa. Lletres idèntiques signifiquen que no existeixen diferències significatives entre medis segons Tukey ($P < 0,05$).

5.2. Efecte de la neutralització dels SSC en l'activitat antimicrobiana

Un cop es van optimitzar i seleccionar els millors medis de cultiu per la inhibició de fitopatògens, es va analitzar i quantificar l'efecte de la inhibició de les soques EPS384 i EPS584 crescudes en medi LB enfront Xav i Psa. El SSC crescut en medi LB es va mantenir a pH bàsic de 8 i l'altre tub es va neutralitzar amb NaOH (1M) a pH 7 (neutre). Per altre part es va mesurar i quantificar l'efecte de la inhibició de les soques EPS384 i EPS584 crescudes en medi GA enfront Xav i Psa. També el SSC en GA es va mantenir a pH de 8 i es va acidificar fins a un pH de 7 (neutre). Els resultats del percentatge d'inhibició del creixement dels patògens indicadors van ser tractats mitjançant l'anàlisi de la variància ANOVA i es va determinar que dins de la mateixa prova existien diferències entre les soques ($P > F; 0,001$).

En la figura 5.7 i 5.8 s'observa que tant per la soca EPS384 i EPS584, enfront de Psa es determina que no existeixen diferències significatives entre medi neutralitzat en LB i en GA, com tampoc entre medis de cultius emprats. Si que s'han trobat diferències significatives entre medis (GA i LB), tant si s'havia neutralitzat com sino en les dues soques estudiades (EPS384 i EPS584).

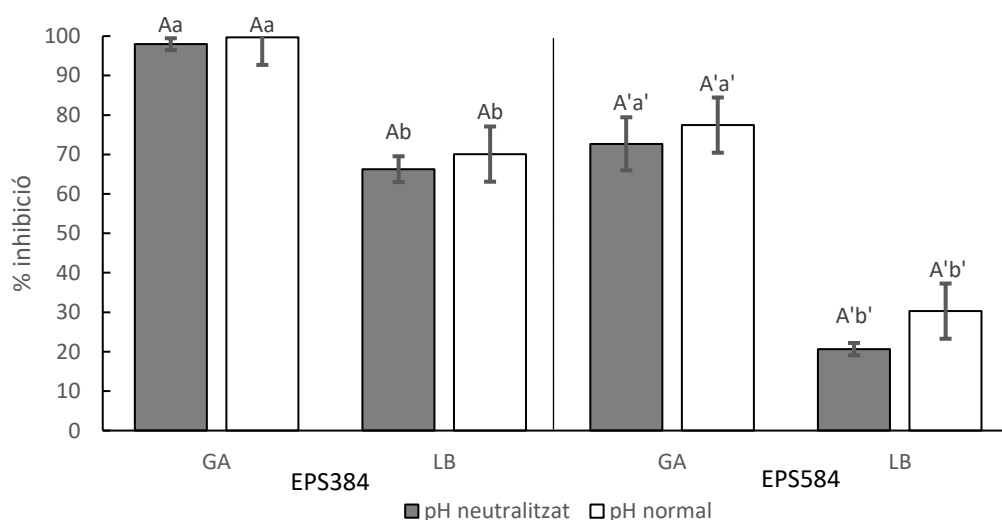


Figura. 5.7 i 5.8 Efecte de la neutralització dels SSC obtinguts de cultius de les soques EPS384 i EPS584 en LB i GA en la inhibició del creixement de **Xav** (%). Les mitjanes del percentatge d'inhibició amb lletres majúscules idèntiques indiquen que no existeixen diferències significatives entre medi neutralitzat i no neutralitzat i les lletres minúscules entre medis de cultiu segons el test de Tukey ($P < 0,05$).

En la Figura 5.9 i 5.10 (marge esquerra) s'observa com el percentatge d'inhibició, enfront Xav, dels SSC de la soca EPS384, no hi ha diferències significatives segons el test de Tukey, entre medis neutralitzats (pH 7) i normals (pH 8), en els dos medis estudiats (GA, LB). Existeix

només diferències significatives entre soques i medis, diferint en el percentatge d'inhibició. Per un altre costat (marge dret), els resultats d'inhibició en la soca EPS584 mostren que no hi ha diferències significatives entre neutralitzat i no neutralitzat quan s'utilitza el medi GA, mentre que si existeixen diferències significatives en medi LB. Si que s'han trobat diferències significatives entre medis (GA i LB), tant si s'havia neutralitzat com sino en les dues soques estudiades (EPS384 i EPS584).

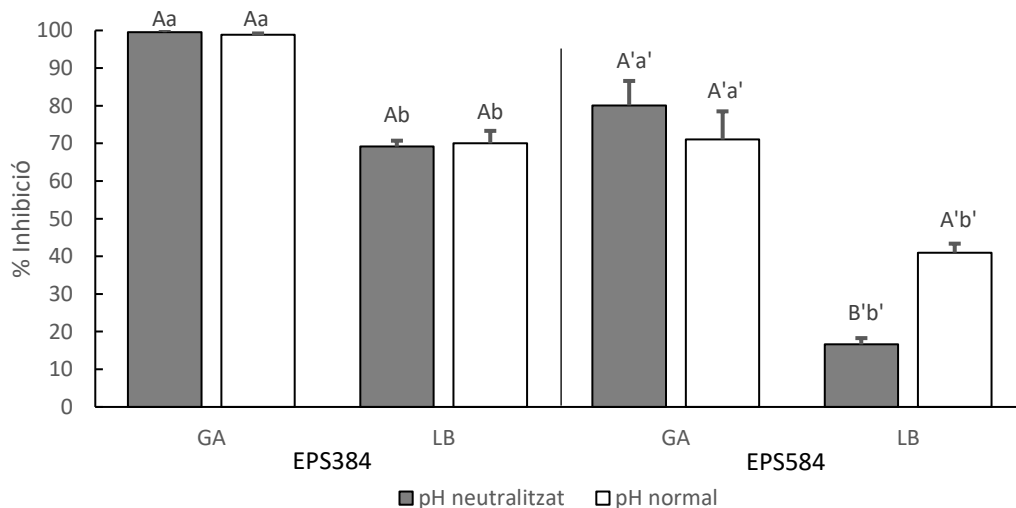


Figura 5.9. i 5.10 Efecte de la neutralització dels SSC obtinguts de cultius de les soques EPS384 i EPS584 en LB i GA en la inhibició del creixement de **Psa** (%). Les mitjanes del percentatge d'inhibició amb lletres majúscules idèntiques indiquen que no existeixen diferències significatives entre medi neutralitzat i no neutralitzat i les lletres minúscules entre medis de cultiu segons el test de Tukey ($P < 0,05$).

5.3. Activitat antibacteriana dels SSC obtinguts de les soques de *Pseudomonas spp.* enfront Ea, Psa, Pst i Xav

Es va avaluar l'activitat antibacteriana, enfront a 4 bacteris indicadors Ea, Psa, Pst i Xav, dels SSC obtinguts del cultiu de 35 soques en medi GA. De cadascuna d'aquestes soques es van realitzar 3 replics i dos experiments. A partir de les dades obtingudes es va realitzar l'anàlisi de la variància ANOVA. Es va observar que hi havia efecte significatiu de la soca en la inhibició del creixement de tots els patògens indicadors ($P > F$; 0,001). Posteriorment es va aplicar el test de Tukey que va permetre determinar si hi havia diferències significatives entre les mitjanes.

En la Figura 5.11 i 5.12 es mostren els resultats de la inhibició dels SSC en medi GA enfront Ea en el experiment 1 i 2 respectivament. Es pot observar que hi ha diferències significatives entre les soques assajades i el 25,7% de les soques es situen entre el 75-100% d'inhibició

destacant la soca EPS383, EPS531, EPS895, EPS384, EPS327, EPS550, EPS288, EPS817, EPS584 i EPS817 que es situen sobre del rang del 90% d'inhibició mentre que el 20% entre el 50-75%, el 28,6% entre el 25-50% i el 25,7% entre el 0 i 25%.

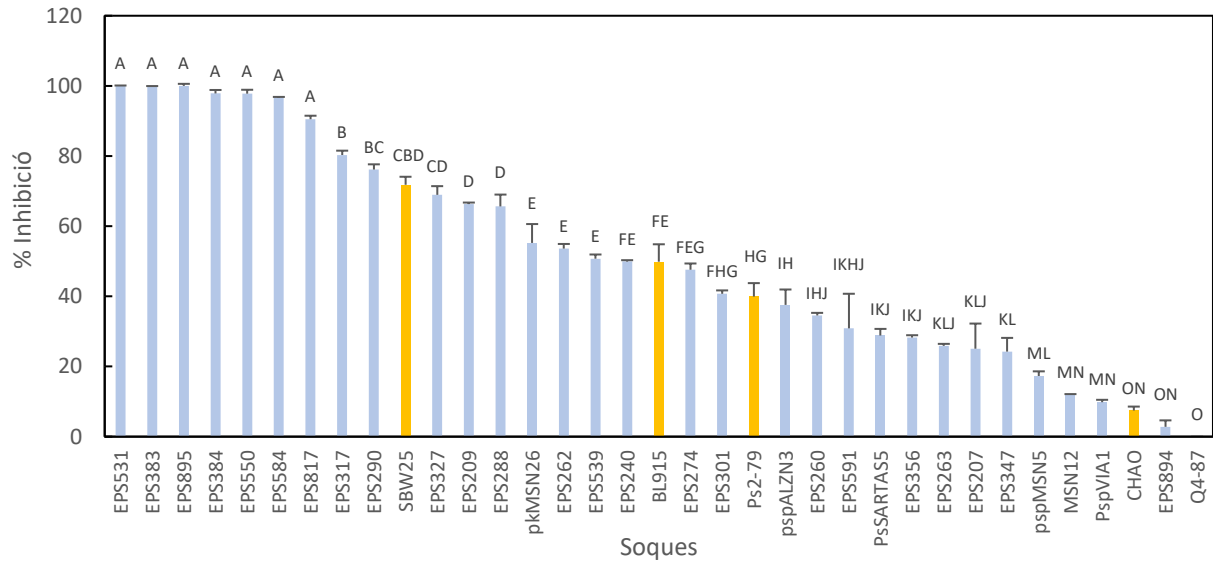


Figura 5.11. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Ea**, en medi **GA** (Experiment 1).

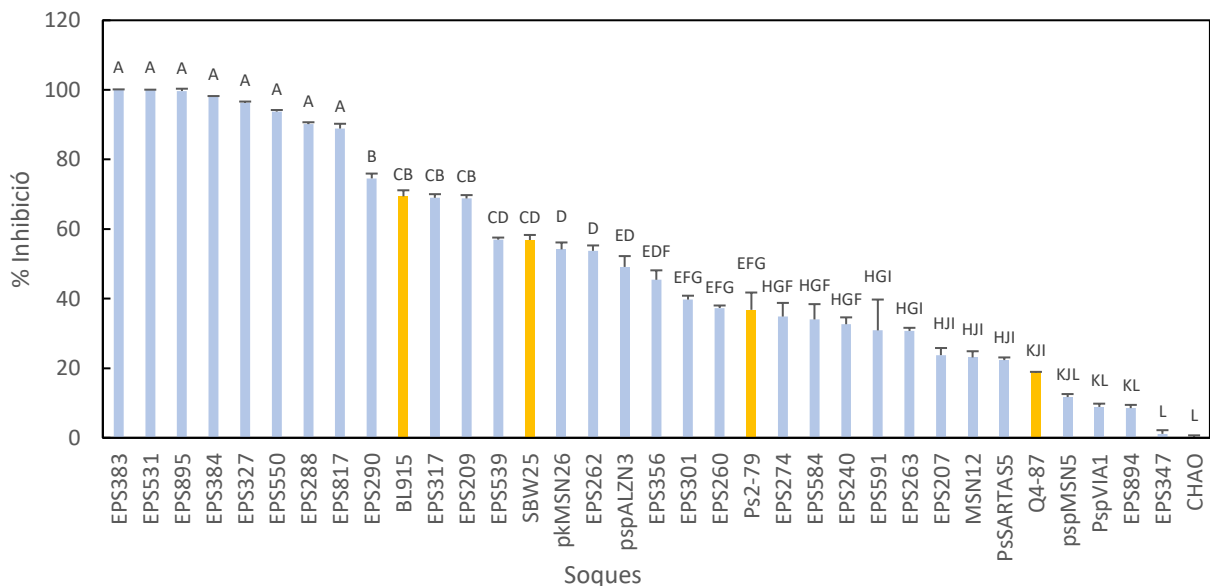


Figura 5.12. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Ea**, en medi **GA** (Experiment 2).

A la Figura 5.13 i 5.14 es pot observar la influència del medi GA i del patogen en l'activitat antimicrobiana desenvolupat per els SSC de les soques seleccionades en els dos experiments. Gran part dels bacteris (57,14%) es situen en rangs d'inhibició de 0-25%, mentre que poques soques (11,43%) arriben a rangs entre el 75-100%. Cal mencionar les soques productores de metabòlits amb gran activitat antagonica enfront a Xav com són la EPS531 (100%), EPS383 (100%) i EPS550 (98%) i EPS327 (97%).

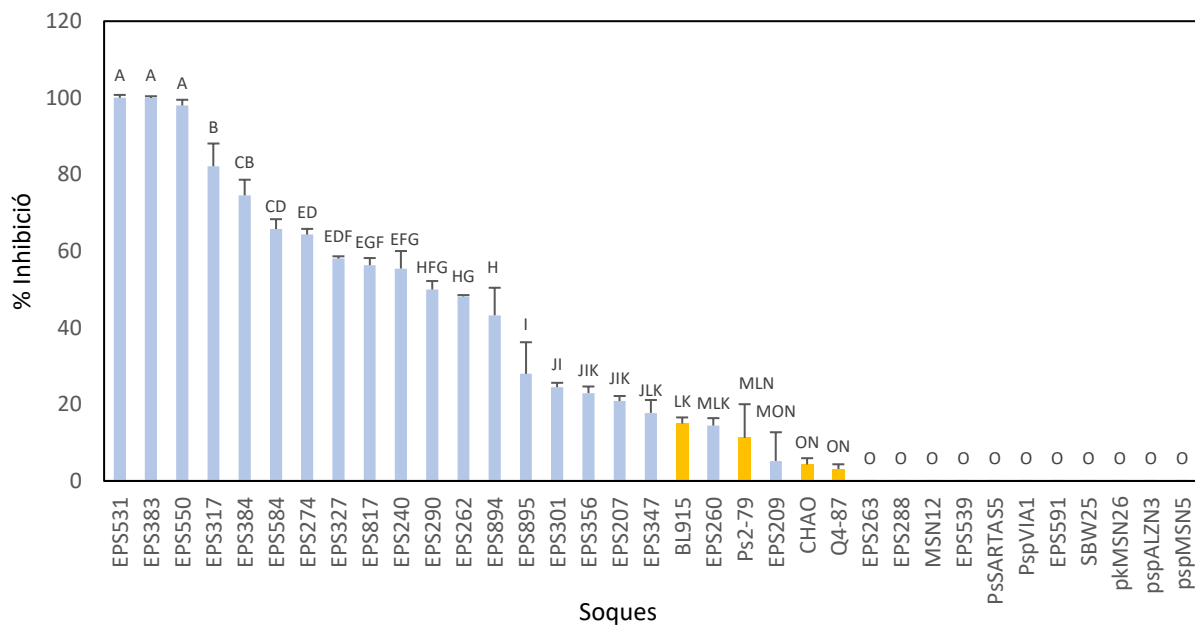


Figura 5.13. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront Xav, en medi GA (Experiment 1).

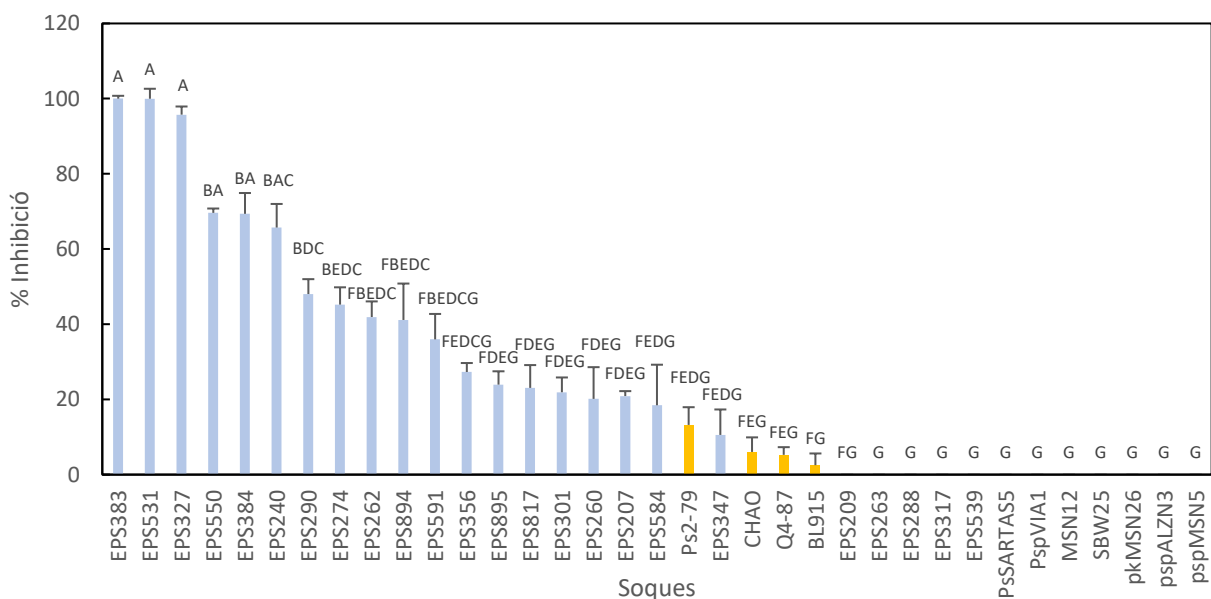


Figura 5.14. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront Xav, en medi GA (Experiment 2).

A la Figura 5.15 corresponent a l'experiment 1 es mostra l'activitat antimicrobiana dels SSC de les soques enfront a Psa, hi ha un total de 11 soques que es situen entre el 75-100% d'inhibició. Entre elles 8 soques superen el 90% EPS383, EPS209, EPS817, EPS531, EPS584, EPS384, EPS327, EPS550. Mentre que en l'experiment 2 (Figura 5.16) s'observen resultats similars als anteriors observant-se un total de 8 soques per sobre del 90% d'inhibició aquestes són la EPS531, EPS240, EPS383, EPS384, EPS817, EPS209, EPS584 i EPS550.

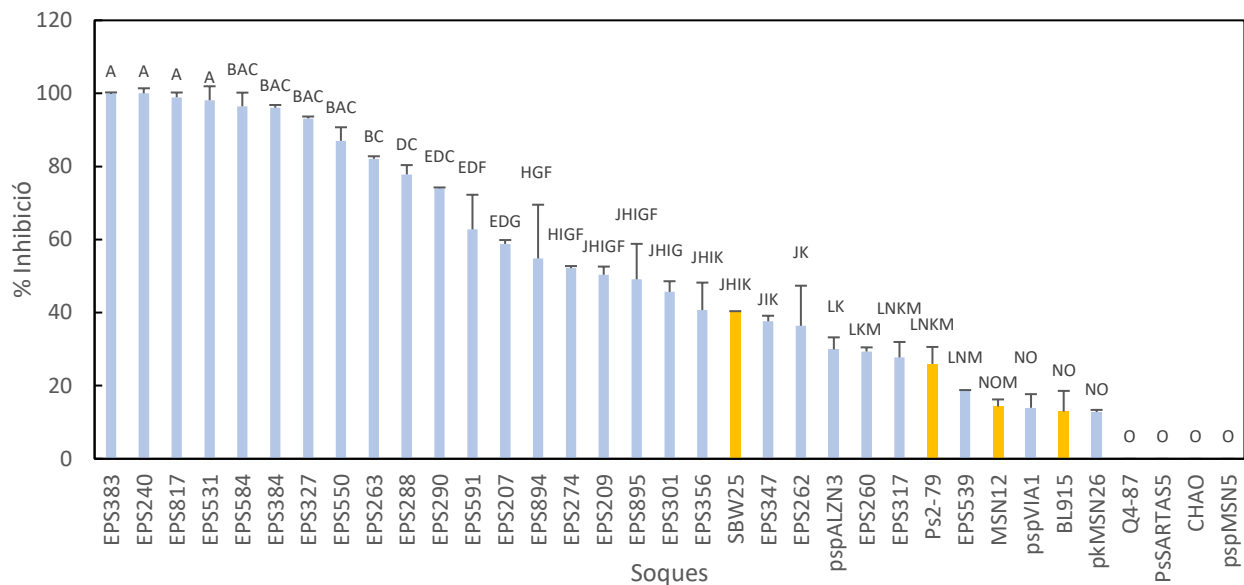


Figura 5.15. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Psa**, en medi **GA** (Experiment 1).

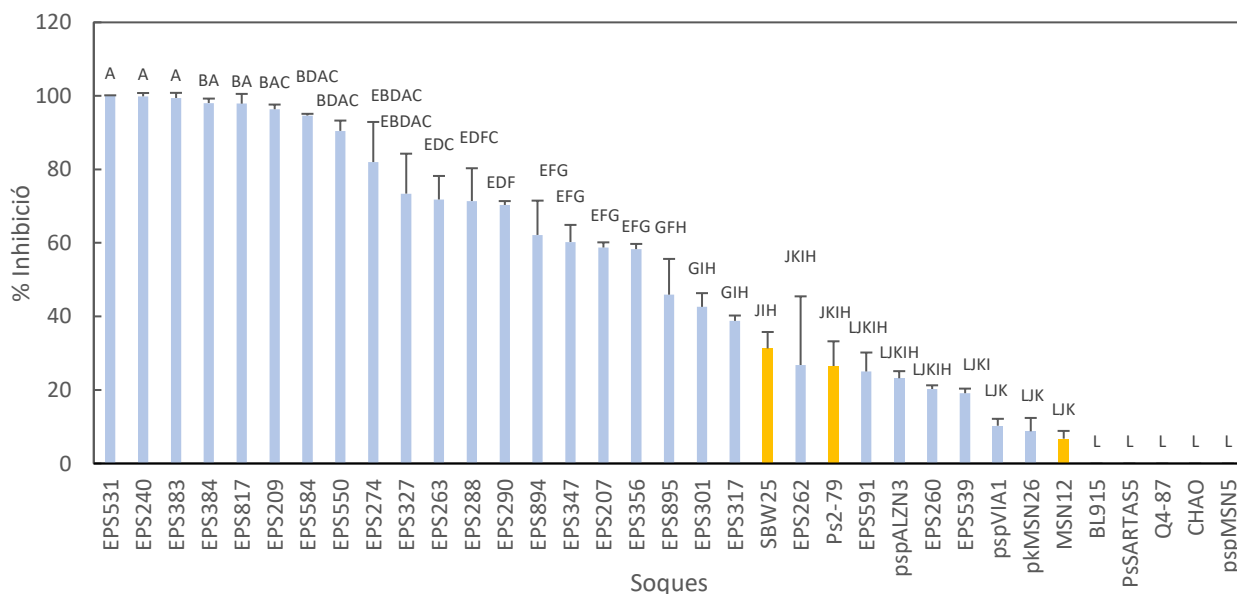


Figura 5.16. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Psa**, en medi **GA** (Experiment 2).

Per continuar, a la Figura 5.17 i 5.18 es mostra el percentatge d'inhibició dels SSC de les soques enfront l'indicador Pst. La Figura 5.17 corresponent a l'experiment mostra com hi ha un total de 10 soques amb percentatges d'inhibició superiors al 90% per a Pst. Aquestes soques són la EPS895, EPS817, EPS531, EPS240, EPS383, EPS384, EPS584, EPS550, SBW25 i EPS894. Respecte l'experiment dos es van observar resultats molt similars als obtinguts en l'experiment 1, les 10 soques anteriors es situaven per sobre el llindar del 90 % d'inhibició, exceptuant EPS550.

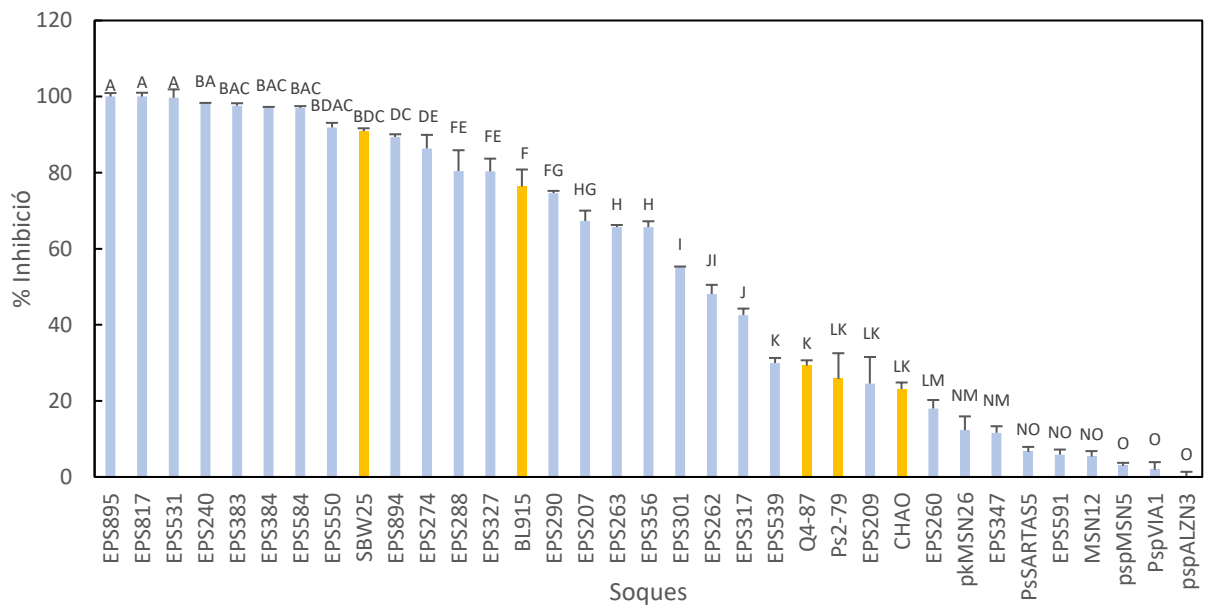


Figura 5.17. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Pst**, en medi **GA (Experiment 1)**.

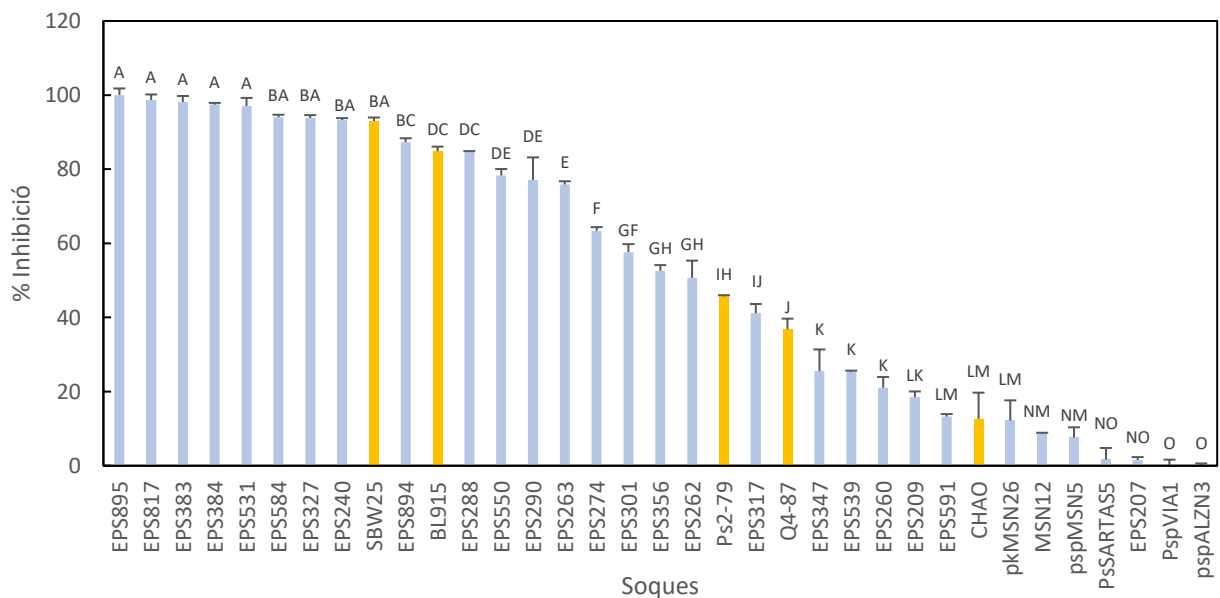


Figura 5.18. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Pst**, en medi **GA (Experiment 2)**.

Per finalitzar, s'ha realitzat una classificació de les soques en funció de la seva activitat antimicrobiana **global** per tots els bacteris indicadors. Per obtenir aquesta classificació es va utilitzar una escala numèrica, per cadascun dels indicadors, assignant les següents puntuacions: i) 0, quan el percentatge d'inhibició és de 0; ii) 1, entre 0 i 25% d'inhibició; iii) 2, entre 25 i 50% d'inhibició; iv) 3, entre 50 i 90% d'inhibició, v) 4, >90% d'inhibició. A continuació es va realitzar el sumatori dels valors obtinguts de cadascuna de les soques.

En la taula 5.1 es mostra la classificació de les soques segons la seva **activitat global** en medi GA. La soca EPS240 mostra activitat d'inhibició enfront les 4 soques indicadores, amb més del 50% d'inhibició per cada indicador estudiat (52,24% per Ea, 60,27% per Xav, 99,94% per Psa i 95,70% per Pst) essent una de les millors candidates a ser utilitzada i desenvolupada com a futur bioplaguicida. A més, n'hi ha un total de 13 que obtenen puntuacions superiors a 10 (que presenten un percentatge d'inhibició alt en 3 dels 4 indicadors) indicant que també poden ser bons candidats a ser utilitzats i desenvolupats com a futurs bioplaguicides. Com és el cas de les soques EPS550, EPS327, EPS550, EPS531, EPS383, EPS274 i EPS384 que mostren una gran activitat enfront Xav, Psa i Pst superior al 50%, però no contra a Ea.

Les soques EPS894 i EPS817 mostren percentatges elevats d'inhibició enfront a Ea, Pst i Psa, però no són efectives enfront a Xav. Les soques EPS895 i SBW25 són supressores de Ea i Pst però per contra no ho són per a Psa i Xav. Per últim la soca EPS290 i EPS584 són efectives enfront a Pst i Psa, però no en la resta d'indicadors. Hi ha bacteris que mostren inhibició molt específica enfront a un sol indicador com és el cas de les soques pkMSN26, pspMSN5, MSN12, PspSARTAS5, PspVIA1, pspALZN3 i la soca de referència SBW25, ja que mostren percentatges molt elevats d'inhibició exclusivament davant Ea.

Taula 5.1. Classificació dels SSC en funció de l'activitat global de les 35 soques en medi GA.

Soca	Patogen				Puntuació				Total
	Ea	Xav	Psa	Pst	Ea	Xav	Psa	Pst	
EPS240	52,24	60,57	99,94	95,70	3	3	4	4	14
EPS817	67,54	39,68	98,41	99,35	3	2	4	4	13
EPS384	39,02	71,95	97,07	97,26	2	3	4	4	13
EPS383	23,29	100,00	99,67	97,87	1	4	4	4	13
EPS531	17,99	99,99	99,06	98,38	1	4	4	4	13
EPS894	84,59	42,18	58,50	88,33	3	2	3	4	12
EPS584	38,35	42,09	95,55	95,52	2	2	4	4	12
EPS895	75,35	25,94	47,51	100,00	3	2	2	4	11
EPS274	31,76	54,76	67,09	74,87	2	3	3	3	11
EPS290	29,85	49,00	72,19	75,86	2	2	3	4	11
SBW25	97,94	0,00	35,73	91,96	4	0	2	4	10
EPS327	24,82	76,89	83,28	87,07	1	3	3	3	10
EPS550	9,35	83,81	88,74	85,09	1	3	3	3	10
Ps2-79	70,60	12,23	26,24	35,75	3	1	2	2	8
BL915	61,29	8,74	6,47	80,62	3	1	1	3	8
EPS209	53,89	2,61	73,37	21,53	3	1	3	1	8
EPS263	49,52	0,00	76,96	70,80	2	0	3	3	8
EPS288	47,65	0,00	74,60	82,61	2	0	3	3	8
EPS317	43,66	41,07	33,26	41,86	2	2	2	2	8
EPS262	34,29	45,04	31,59	49,39	2	2	2	2	8
EPS301	29,49	23,20	44,14	56,38	2	1	2	3	8
EPS356	24,08	25,11	49,51	59,14	1	2	2	3	8
EPS207	1,97	20,87	58,78	34,42	1	1	3	2	7
pkMSN26	100,00	0,00	10,77	12,27	4	0	1	1	6
MSN12	99,84	0,00	10,53	7,08	4	0	1	1	6
PspVIA1	95,21	0,00	12,11	0,95	4	0	1	1	6
pspALZN3	90,32	0,00	26,57	0,00	4	0	2	0	6
Q4-87	68,96	4,18	0,00	33,07	3	1	0	2	6
CHAO	56,04	5,16	0,00	17,88	3	1	1	1	6
pspMSN5	99,94	0,00	0,00	5,27	4	0	0	1	5
PsSARTAS5	97,03	0,00	0,00	4,14	4	0	0	1	5
EPS260	36,21	17,30	24,80	19,53	2	1	1	1	5
EPS539	11,83	0,00	18,86	27,69	1	1	1	2	5
EPS347	7,99	14,16	48,94	18,56	1	1	2	1	5
EPS591	0,00	17,99	43,91	10,63	1	1	2	1	5

Valors de classificació: i) 0, quan el percentatge d'inhibició és de 0; ii) 1, entre 0 i 25% d'inhibició; iii) 2, entre 25 i 50% d'inhibició; iv) 3, entre 50 i 90% d'inhibició, v) 4, >90% d'inhibició.

Un cop provat l'efecte del medi GA es va avaluar l'activitat antibacteriana, enfront a 4 bacteris indicadors Ea, Psa, Pst i Xav, dels SSC obtinguts del cultiu de 35 soques en medi LB. De cadascuna d'aquestes soques es van realitzar 3 repliques i dos experiments. Es va aplicar el test de Tukey que va permetre determinar si hi havia diferències significatives entre les mitjanes. Com es pot comprovar a la Figura 5.19, 31 de les 35 soques mostren una inhibició superior al 90% enfront a Ea. La Figura 5.20 que representa l'experiment 2 mostra els mateixos resultats.

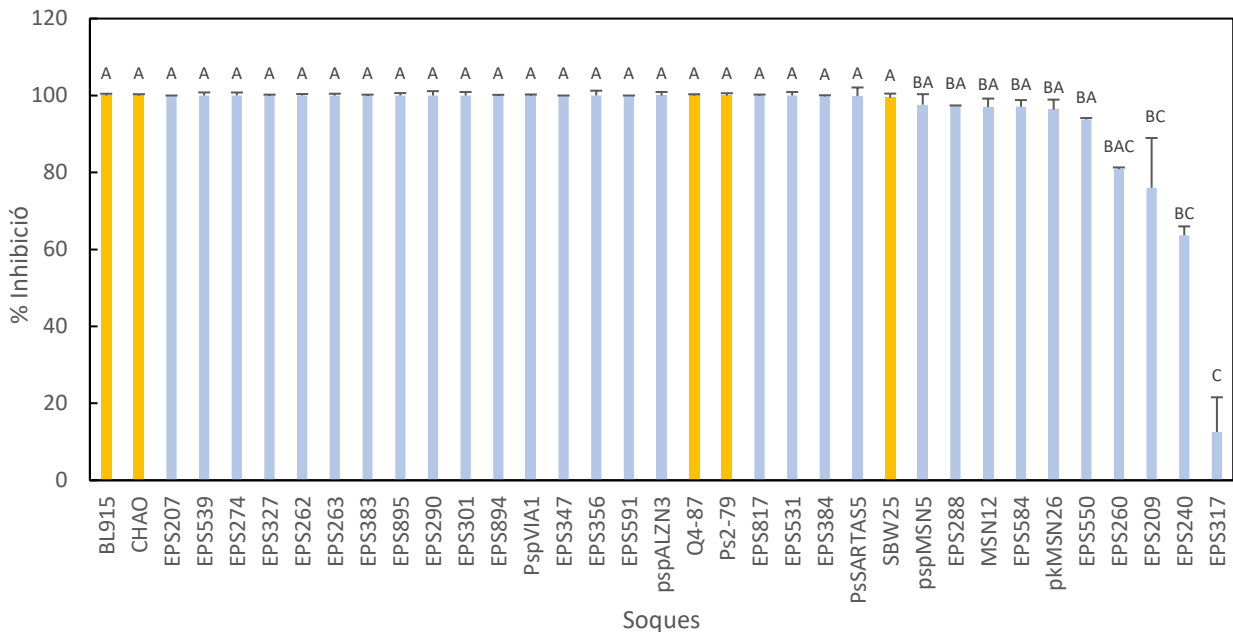


Figura 5.19. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Ea**, en medi LB (Experiment 1).

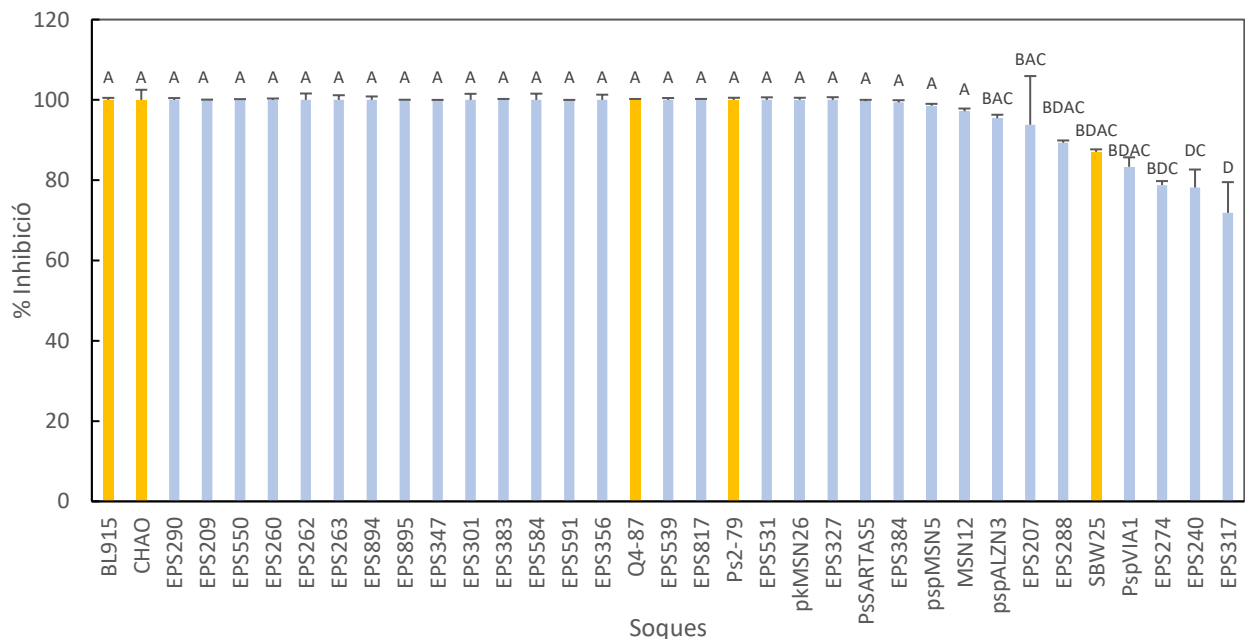


Figura 5.20. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Ea**, en medi LB (Experiment 2).

La figura 5.21 i la figura 5.22 on es mostren els resultats de l'activitat antimicrobiana enfront al patogen Xav en els dos experiments i com es pot corroborar els SSC de les 32 soques han mostrat més del 75% d'activitat antimicrobiana representant. En canvi el 8,75% es situen en rangs d'entre el 50-75%. Cal emfatitzar que els SSC de les soques EPS895, EPS894, Ps2-79, Q4-87, EPS817, BL915, CHAO, EPS274, EPS290, EPS301, EPS327, EPS356 han manifestat el 100 % d'inhibició.

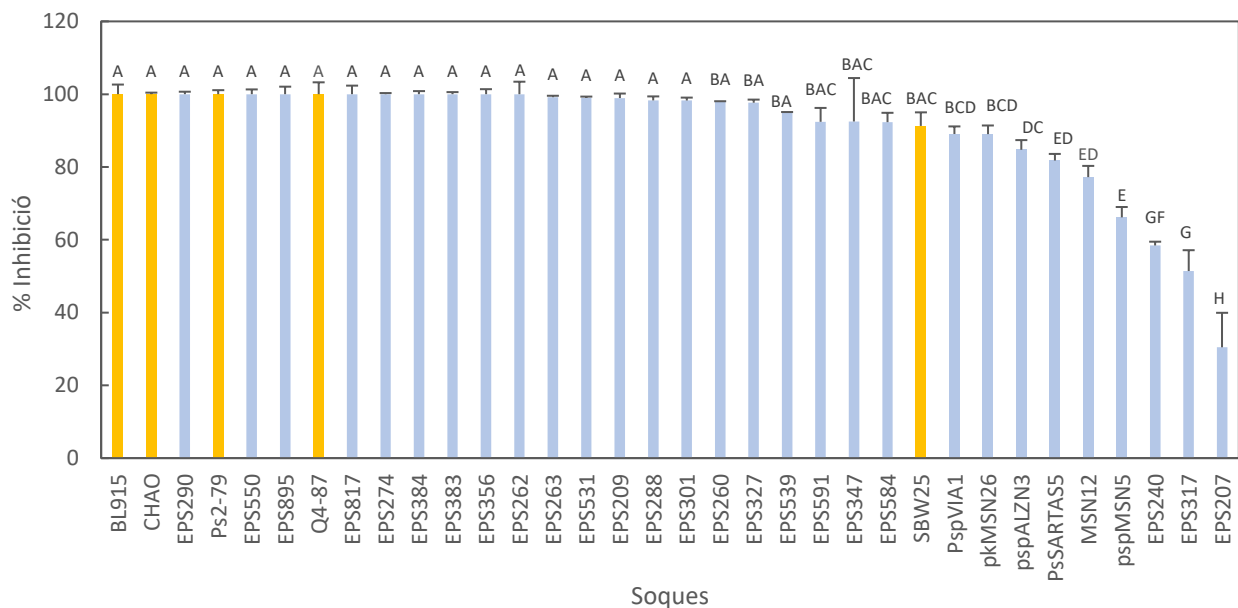


Figura 5.21. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront Xav, en medi LB (Experiment 1).

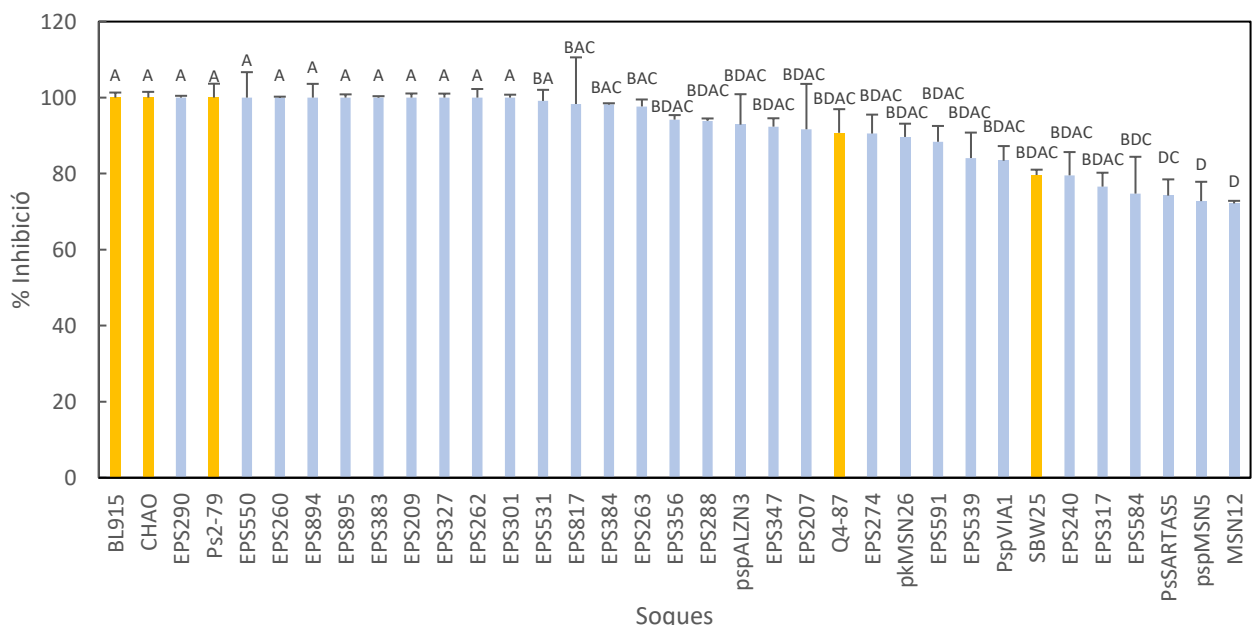


Figura 5.22. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront Xav, en medi LB (Experiment 2).

Tot seguit la figura 5.23 i 5.24 es mostra el resultat de la prova d'antagonisme en LB de les soques de *Pseudomonas spp.* enfront de **Psa**. Pràcticament, 34 de les soques (97,142%) es troben en el rang d'inhibició del 75-100%. Mentre que només 1 de les soques, concretament la soca EPS317 es troba dins del rang 50-75% amb una inhibició del 56,92%, 5 soques Ps2-79, Q4-87, EPS817, BL915, CHAO mostren un 100% d'inhibició en els dos experiments.



Figura 5.23. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Psa**, en medi **LB (Experiment 1)**.

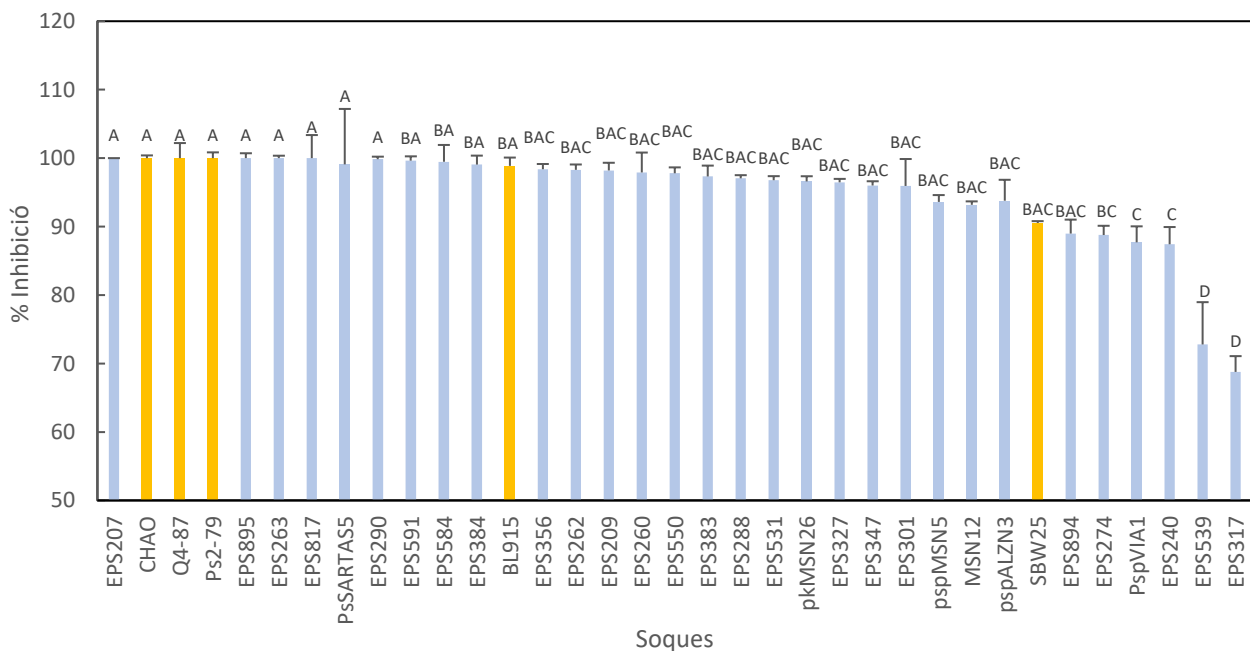


Figura 5.24. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Psa**, en medi **LB (Experiment 2)**.

En últim terme es va avaluar l'activitat antimicrobiana d'aquests bacteris enfront a Pst i es va concloure que un total de 31 soques en l'experiment 1 (Figura 5.25) i a l'experiment 2 (Figura 5.26) presentaven valors d'inhibició entre el 75-100% i entre elles les soques la Q4-87, EPS817, BL915, EPS 384, EPS584 presentaven el 100% d'inhibició en els dos experiments

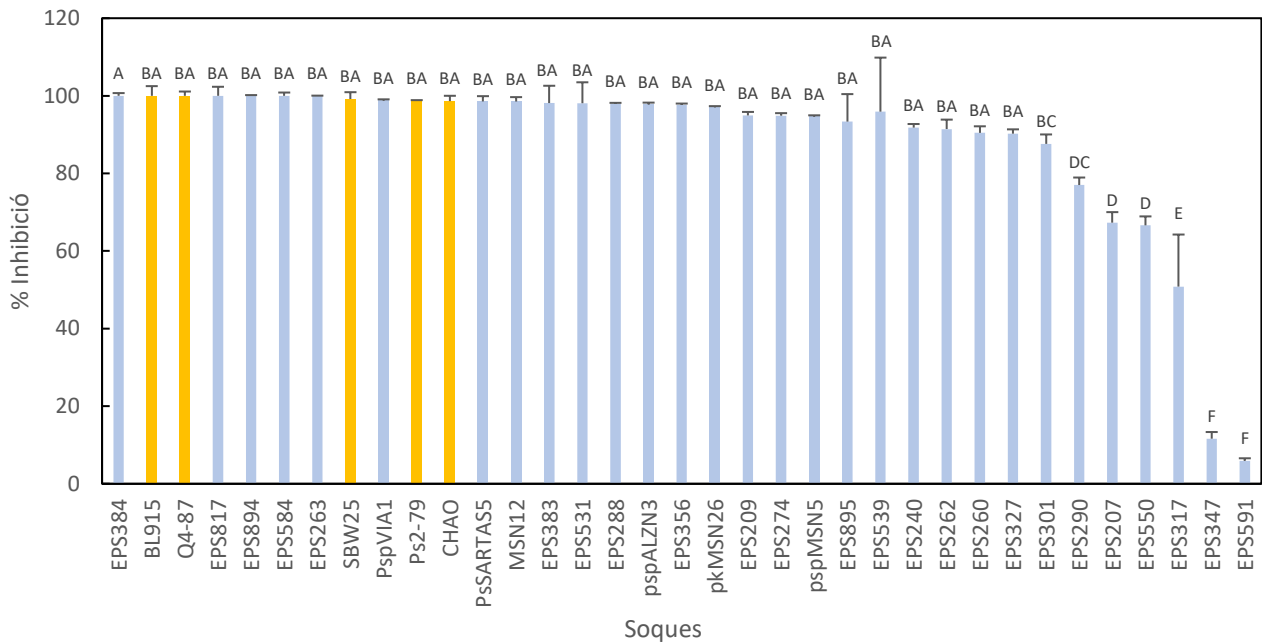


Figura 5.25. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Pst**, en medi LB (Experiment 1).

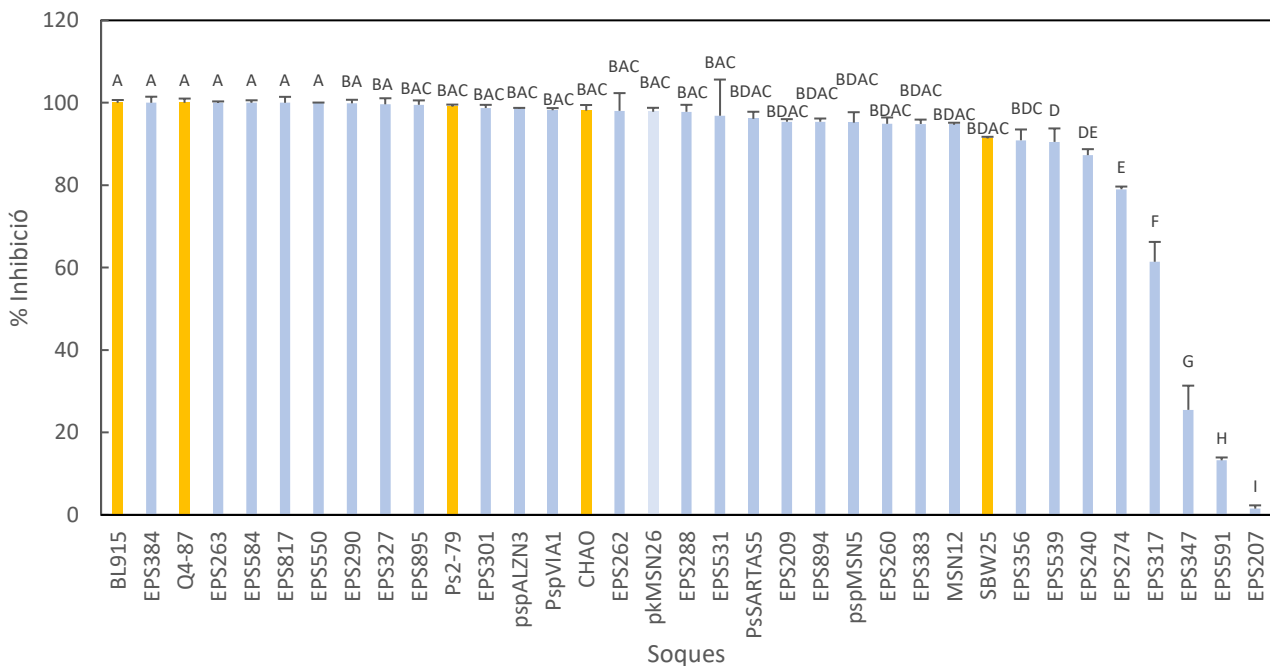


Figura 5.26. Percentatge d'inhibició de creixement dels SSC de les 35 soques enfront **Pst**, en medi LB (Experiment 2).

Per finalitzar s'ha realitzat un classificació de les soques en funció de la seva activitat antimicrobiana global per tots els bacteris indicadors. Per obtenir aquesta classificació es va utilitzar una escala numèrica, per cadascun dels indicadors, assignant les següents puntuacions: i) 0, quan el percentatge d'inhibició és de 0; ii) 1, entre 0 i 25% d'inhibició; iii) 2, entre 25 i 50% d'inhibició; iv) 3, entre 50 i 90% d'inhibició, v) 4, >90% d'inhibició. A continuació es va realitzar el sumatori dels valors obtinguts de cadascuna de les soques. Quant a l'espectre d'antagonisme, en les soques estudiades en el nostre treball i com s'observa a la taula 5.2, s'ha obtingut que el 100% de les soques (35 soques) són productores de substàncies inhibidores amb més del 50% d'inhibició enfront **Ea** i **Psa**. En el cas de la inhibició enfront **Pst** i **Xav**, 33 i 32 de les 35 soques presenten un percentatge d'inhibició superior o igual al 50%.

L'activitat dels SSC enfront a Ea va mostrar que existien un total de 16 soques amb una inhibició del 100% aquestes són la EPS894, EPS895, Ps2-79, Q4-87, EPS817, BL915, CHAO, EPS290, EPS301, EPS317, EPS356, EPS383, EPS539, EPS263, EPS531 i EPS262. Mentre que n'hi ha un total de 11 enfront a Xav que arriben al llindar del 100% d'inhibició la EPS894, EPS895, Ps2-79, Q4-87, EPS817, BL915, CHAO, EPS290, EPS301, EPS317, EPS356. En l'activitat dels SSC enfront a Psa destaquen 5 soques amb el 100% d'inhibició la Ps2-79, Q4-87, EPS817, BL915, CHAO i per a Pst les soques Q4-87, EPS817, BL915.

Taula 5.2. Classificació dels SSC en funció de l'activitat global de les 35 soques en medi LB.

Soca	Patogen				Puntuació				Total
	Ea	Xav	Psa	Pst	Ea	Xav	Psa	Pst	
EPS894	100,00	100,00	94,49	97,70	4	4	4	4	16
EPS895	100,00	100,00	98,74	96,43	4	4	4	4	16
Ps2-79	100,00	100,00	100,00	98,87	4	4	4	4	16
Q4-87	100,00	100,00	100,00	100,00	4	4	4	4	16
EPS817	100,00	100,00	100,00	100,00	4	4	4	4	16
BL915	100,00	100,00	100,00	100,00	4	4	4	4	16
CHAO	100,00	100,00	100,00	98,36	4	4	4	4	16
EPS290	100,00	100,00	89,97	88,43	4	4	4	4	16
EPS301	100,00	100,00	93,63	93,16	4	4	4	4	16
EPS327	100,00	100,00	92,14	94,94	4	4	4	4	16
EPS356	100,00	100,00	99,01	94,29	4	4	4	4	16
EPS383	100,00	99,56	98,02	96,50	4	4	4	4	16
EPS539	100,00	97,47	82,64	93,22	4	4	4	4	16
EPS263	100,00	96,53	99,83	100,00	4	4	4	4	16
EPS531	100,00	91,55	97,26	99,05	4	4	4	4	16
EPS262	100,00	89,39	96,41	94,74	4	4	4	4	16
PsSARTAS5	99,77	77,99	95,87	97,33	4	4	4	4	16
EPS384	99,57	87,37	96,43	100,00	4	4	4	4	16
EPS584	98,54	96,15	99,73	100,00	4	4	4	4	16
pkMSN26	98,17	86,63	95,80	97,42	4	4	4	4	16
pspALZN3	97,73	88,81	96,89	98,12	4	4	4	4	16
EPS550	96,88	96,18	84,75	83,30	4	4	4	4	16
EPS288	93,35	87,44	95,48	97,88	4	4	4	4	16
SBW25	93,24	85,46	94,86	95,36	4	4	4	4	16
PspVIA1	91,66	86,23	93,85	98,48	4	4	4	4	16
EPS260	90,46	90,46	94,25	92,67	4	4	4	4	16
EPS274	89,39	100,00	94,21	86,94	4	4	4	4	16
EPS209	88,02	89,24	98,83	94,65	4	4	4	4	16
EPS240	70,91	78,05	89,60	89,55	4	4	4	4	16
pspMSN5	98,07	69,46	93,16	94,91	4	3	4	4	15
MSN12	97,10	74,69	95,40	96,60	4	3	4	4	15
EPS317	42,21	75,46	56,92	56,12	4	4	4	3	15
EPS347	100,00	92,09	97,98	18,56	4	4	4	2	14
EPS207	100,00	59,42	99,89	34,41	4	3	4	2	13
EPS591	100,00	92,41	99,82	13,24	4	3	4	1	12

Valors de classificació: i) 0, quan el percentatge d'inhibició és de 0; ii) 1, entre 0 i 25% d'inhibició; iii) 2, entre 25 i 50% d'inhibició; iv) 3, entre 50 i 90% d'inhibició, v) 4, >90% d'inhibició.

5.4. Activitat antifúngica invitro de les soques de *Pseudomonas spp* en cultius duals

Els resultats dels assajos d'antagonisme in vitro de les 32 soques de *Pseudomonas spp.* envers els fongs indicadors *P. expansum*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *F. avenaceum* es mostren a la taula 5.3.

Taula 5.3. Activitat antimicrobiana dels SSC de les soques de *P. fluorescens* envers els fongs indicadors *P. expansum*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *F. avenaceum*.

<i>Soca</i>	<i>P. expansum</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. avenaceum</i>
BL915	+++	+++	+++	---
CHAO	+++	+++	---	---
EPS209	---	---	---	---
EPS240	---	+++	---	---
EPS260	---	+++	---	---
EPS262	---	++-	---	---
EPS263	+++	+++	+++	+++
EPS274	---	+-	---	---
EPS288	---	+++	---	---
EPS290	---	+++	---	---
EPS301	---	---	---	---
EPS317	---	---	---	---
EPS327	---	---	---	---
EPS356	---	+++	---	---
EPS383	---	+-	---	---
EPS384	---	+++	---	---
EPS531	---	+++	---	---
EPS539	---	--+	---	---
EPS550	+++	---	+++	+++
EPS584	---	+-	---	---
EPS817	---	+++	+++	+++
EPS894	+++	+++	+++	+++
EPS895	+++	+++	---	---
MSN12	---	---	---	nv
PkMSN26	---	---	---	nv
Ps2-79	+++	+++	+++	+++
PspALZN3	+++	+++	+++	---
PspVIA1	---	+++	---	+++
PsSARTAS5	---	---	---	---
Q4-87	---	+++	---	+++
SBW25	---	+++	---	nv
SpsMSN5	---	---	---	nv

Valors de classificació: i) ---, quan no es forma halo d'inhibició en cap dels tres triplicats; ii) --+, quan només hi ha un halo d'inhibició en un dels tres replicats, iii) -+-, quan hi ha 2 halos d'inhibició i iii) +++ , quan hi ha 3 halos d'inhibició (en tots replicats ha donat halo d'inhibició); nv, no valor.

Els resultats van ser tractats calculant l'halo d'inhibició format, seguidament es van assignar valors no numèrics en les soques en funció de la seva activitat antimicrobiana per contacte per cada fong estudiat segons el següent criteri: i) ---, quan no es forma halo d'inhibició en cap dels tres triplicats; ii) --+, quan només hi ha un halo d'inhibició en un dels tres replicats, iii) -++, quan hi ha 2 halos d'inhibició i iii) +++, quan hi ha 3 halos d'inhibició (en tots replicats ha donat halo d'inhibició). A la taula 5.3 es mostra que les soques Ps2-79, EPS263 i EPS894 van inhibir a tots quatre indicadors, mentre que les soques PspALZN3, EPS817, EPS550, B1915 van mostrar capacitat antifúngica vers 3 indicadors. Les soques EPS895, CHAO i PspVIA1 ho han sigut enfront a dos dels 2 patògens.

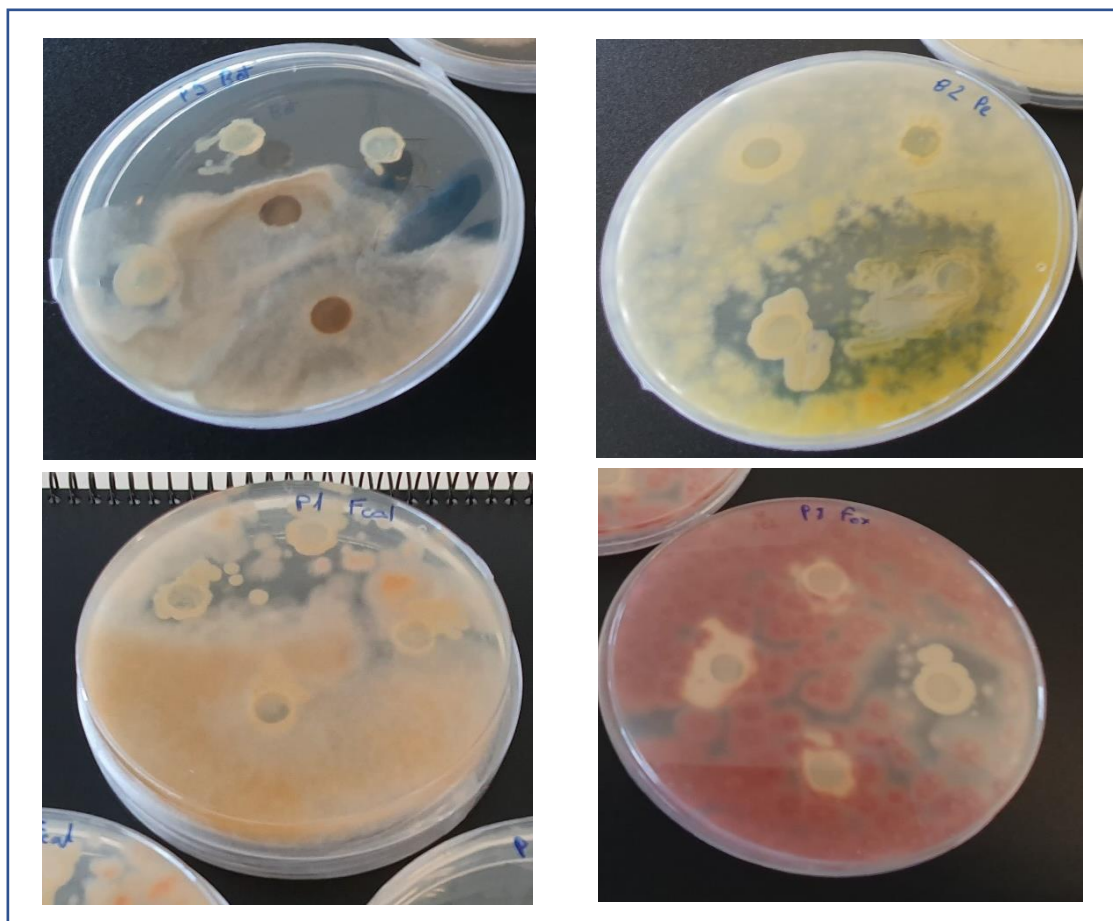


Figura 5.27. Halos d'inhibició desenvolupats per les soques enfront a Bot, Pe, Fa i Fo.

5.4. Activitat antifúngica dels SSC obtinguts de soques de *Pseudomonas* pel mètode d'inhibició de creixement

Per la determinació de la capacitat antifúngica dels SSC de les soques es van emprar diversos fongs fitopatògens indicadors *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum*. Els resultats van ser tractats calculant la mitjana dels percentatges d'inhibició del creixement dels fongs. Seguidament, es van assignar valors no numèrics en les soques en funció de la seva activitat antimicrobiana per cada fong indicador estudiat segons el següent criteri: i) -, igual a 0% d'inhibició; ii) +, més gran que 0% i inferior a 30%; iii) ++, superior a 30% i inferior a 60%; i per finalitzar iv) +++, superior a 60% d'inhibició.

Com es pot observar a la taula 5.4 hi ha un total de 6 soques, la pspALZN3, EPS550, EPS539, EPS531, EPS209 i CHAO que han provocat una inhibició superior al 60% enfront a 3 fongs indicadors. Mentre que un total de 10 soques la PspVIA1, PsSARTAS5, SBW25, EPS894, EPS895, EPS384, EPS288, EPS263, EPS240, BL915 han sigut efectives contra mínim dos indicadors. No obstant, la majoria de soques, en total 29 mostren una activitat superior al 60% enfront a Bo, 6 soques enfront a Fo que són la CHAO, EPS209, EPS531, EPS539, EPS550 i PspALZN3. Per últim hi ha hagut un total de 23 soques amb més del 60% d'activitat enfront Pe.

Taula 5.4. Activitat antimicrobiana dels SSC obtinguts de les soques de *P. fluorescens* envers els fongs indicadors, *B. cinerea*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *P. expansum*.

Soca	Intensitat d'inhibició			
	Bc	Fa	Fo	Pe
BL915	+++	-	++	+++
CHAO	+++	+	+++	+++
EPS209	+++	-	+++	+++
EPS240	+++	-	++	+++
EPS260	++	+	+	+++
EPS262	+++	-	+	++
EPS263	+++	-	++	+++
EPS274	+++	-	+	++
EPS288	+++	-	+	+++
EPS290	+++	-	+	++
EPS301	++	-	+	+++
EPS317	++	+	+	++
EPS327	+++	+	+	+
EPS356	+++	-	+	++
EPS383	+++	-	++	++
EPS384	+++	-	+	+++
EPS531	+++	-	+++	+++
EPS539	+++	+	+++	+++
EPS550	+++	++	+++	+++
EPS584	+++	-	+	++
EPS817	+++	+	+	++
EPS894	+++	+	++	+++
EPS895	+++	+	++	+++
MSN12	+++	-	++	+++
pkMSN26	++	-	+	+++
Ps2-79	++	+	++	+++
pspALZN3	+++	+	+++	+++
pspMSN5	++	-	+	+++
PspVIA1	+++	+	+	+++
PsSARTAS5	+++	-	+	+++
Q4-87	++	-	+	+++
SBW25	+++	-	++	+++

Intensitat d'inhibició: -, igual a 0% d'inhibició; ii) +, més gran que 0% i inferior a 30%; iii) ++, superior a 30% i inferior a 60%; i per finalitzar iv) +++, superior a 60% d'inhibició.

6. DISCUSSIÓ

Les malalties produïdes per bacteris i fongs fitopatògens suposen un greu problema pels cultius i afecten directament a la seva producció, ja que provoquen pèrdues econòmiques elevades a nivell mundial. Es coneixen diversos productes fitosanitaris que poden prevenir i combatre aquestes malalties, però aquests compostos presenten certs desavantatges, com la alta toxicitat. A nivell legislatiu les noves directives europees com la 128/2009 i el Reglament 1107/2009 restringeixen l'ús d'aquests productes. En conseqüència, a dia d'avui el nombre de fitosanitaris autoritzats està molt reduït. És per aquest motiu que hi ha un gran interès en desenvolupar nous productes com els bioplaguicides que puguin combatre de manera eficaç les malalties sense presentar toxicitat.

Aquest projecte té com a principal objectiu seleccionar soques de *Pseudomonas spp.* que produeixin SSC amb activitat antimicrobiana. L'objectiu final es basaria en desenvolupar bioplaguicides consistents en metabòlits de fermentació obtinguts de cultius bacterians. El gènere *Pseudomonas* té diverses espècies d'interès biotecnològic entre les que s'engloben les del complex *Pseudomonas spp.* que conté 8 filogrupos (Garrido-Sanz et al., 2016; Gomila et al., 2015): *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. chlororaphis* i *P. protegens*. Particularment, la majoria d'aquestes produeixen una sèrie de compostos antimicrobians com el 2,4-diacetilfloroglucinol, resorcinol, fenazines i altres antibiòtics com la pirrolnitrina i pioluteorina (Raaijmakers i Weller, 2001). Altres espècies de *Pseudomonas* d'interès són *Pseudomonas frederikbergensis*, *Pseudomonas helmanticensis*, que també presenten gens de producció de compostos antimicrobians. L'estudi va permetre establir les condicions òptimes de producció de SSC actius en volums petits, mitjançant els cultius en 5 mL en tubs d'assaig. A causa de que la síntesis de compostos antimicrobians depèn en gran mesura de les condicions de cultiu, en el present treball es van establir les condicions òptimes per a l'obtenció de SSC amb activitat inhibidora enfront a 4 bacteris fitopatògens Ea, Xav, Psa, Pts i 4 fongs Bc, Fo, Fa i Pe.

El disseny i elecció d'un medi de cultiu per l'obtenció del principi actiu d'un bioplaguicida es una tasca complexa ja que depèn de molts factors i requereix el major coneixement possible entorn el metabolisme i la fisiologia d'un microorganisme, això inclou informació experimental, com els perfils d'assimilació de fonts de carboni i nitrogen, els rangs de creixement o inhibició en funció del pH, la temperatura, el requeriments d'oxigen, l'agitació etc (Singh et al., 2016).

En altres estudis s'ha observat que el pH del medi influeix en la producció d'antibiòtics (Pusey et al., 2008). Depenent de l'alcalinitat del medi o de la presència de compostos com els fosfats es pot reduir dràsticament la producció de metabòlits secundaris. En el present treball es va observar que el canvi de pH produït en el cultiu de les soques de *Pseudomonas* no afectava a l'activitat antimicrobiana dels SCC. Aquesta observació podria indicar que les petites variacions de pH que es produeixen durant el cultiu tant en medi GA com LB no són suficients per inactivar els metabòlits presents en els SCC.

En aquest estudi s'ha observat un efecte del medi de cultiu utilitzat per obtenir els SCC en l'activitat antimicrobiana. Els sobrenadants obtinguts en els cultius en medi GA i LB presentaven una activitat inhibidòria elevada enfront a Xav i Psa. En la majoria dels casos la inhibició més elevada es produeix en medis MM i GA amb glucosa i suplementats amb sals minerals. Els valors d'inhibició del creixement dels patògens indicadors dels SCC de les soques EPS240, EPS384 i EPS584 eren molt elevats enfront els patògens assajats. En canvi, en medis més rics com l'LB amb fonts de nitrogen com la triptona, sals minerals i extracte de llevats l'activitat dels SCC de les soques EPS240, EPS384 i EPS584 eren més baixos. Per tant, un dels factors que més influència en l'activitat antimicrobiana in vitro és el medi de cultiu emprat i el patògen indicador (Wei et al., 1991). La combinació de fonts de carboni com la glucosa i fonts de nitrogen com la triptona, amb l'addició de vitamines com l'àcid nicotínic i d'aminoàcids com l'asparagina, haurien d'escollir-se com a ingredients de medis per el cultiu de soques productores de metabòlits secundaris, ja que segons (Alemany et al., 2002) un dels factors condicionants que afecta al creixement del microorganisme de biocontrol i a la producció de substàncies antimicrobianes és la formulació del medi. En les proves d'antagonisme in vitro, el mecanisme que es posa de manifest és la producció de substàncies antibiòtiques i la seva síntesi ha mostrat en repetides vegades ser depenent del medi. Per exemple, en el cas de la producció de DAGP té un paper important la glucosa, mentre que en algunes soques s'ha comprovat que actua com un inhibidor o bé com un estimulador en funció de la seva concentració (Nielsen et al., 1998). Badosa (2002) va determinar que l'efecte del tipus de medi de cultiu en la síntesi de metabòlits era significatiu i va optimitzar la utilització de medis GA, KB i el LB per estudiar l'activitat antimicrobiana contra bacteris mentre que va utilitzar GA, PDA i LB en assajos d'activitat contra fongs per afavorir la diversitat de metabòlits. La producció de HCN requereix la presència de ferro, o contràriament per la producció de sideròfors és necessària l'absència de ferro.

Els SCC obtinguts del cultiu de les soques en medi GA, EPS383, EPS531, EPS895, EPS384, EPS327, EPS550 i EPS288 van mostrar un percentatge elevat d'inhibició enfront a Ea. En canvi els SSC obtinguts de les soques EPS531, EPS383, EPS550 i EPS 327 van resultar ser efectius enfront a Xa, mentre que els SSC de 4 soques la EPS383, EPS240, EPS817 i EPS531 van mostrar percentatges elevats d'inhibició del creixement enfront Psa. I els SSC obtinguts de les soques EPS895, EPS817, EPS383, EPS531 i EPS384 van resultar efectius enfront a Pst. D'aquestes soques la EPS817 produeix DAGP i HCN mentre que la EPS288 sintetitza HCN i la EPS895 produeix PCA i PLT. Les soques EPS240, EPS383, EPS531, EPS384, EPS327 i EPS550 no contenen cap dels gens relacionats amb la producció dels metabòlits estudiats. Probablement aquestes soques produeixen algun altre compost com podria ser bacteriocines o bé CLP.

Els SSC obtinguts del cultiu de les soques crescudes en medi LB s'ha pogut comprovar que generen percentatges d'inhibició molt elevats del creixement en la majoria de soques fitopatògenes en els diversos experiments realitzats. Es va determinar que 31 dels SSC obtinguts de les soques mostraven percentatges d'inhibició del creixement enfront Ea entre el 75-100%, 32 soques mostraven percentatges entre el 75-100% enfront a Xav, 34 soques enfront Psa i 31 enfront a Pst. Com es pot comprovar els resultats són molt estables i repetitius el que significa que es molt probable que el medi LB estimuli la capacitat d'inhibició dels SSC obtinguts de les soques.

En aquest estudi també s'han emprat 5 soques productores de quitinasa BL915 i EPS290 que a més produeixen HCN, CHAO que a més produeix una bateria de metabòlits com HCN, DAPG, Prn i PLT, EPS263 que també sintetitza PCA i EPS550 que només produeix quitinases. Aquestes soques van mostrar activitat superior al 60% enfront a Bc, Fo, Pe, però no contra Fa, exceptuant la soca EPS290 que no va mostrar activitat enfront a Fo i Pe. No obstant, també altres soques no productores de quitinases tenien activitat enfront als 3 indicadors mencionats exceptuant a Fa. Altres autors (Badosa, 2001) han observat que hi ha una relació entre la producció de quitinases i l'antagonisme dels fongs.

En aquest treball s'han preseleccionats soques d'interès del complex de *Pseudomonas spp.* productores de substàncies amb capacitat d'inhibició del creixement enfront a diferents bacteris i fongs fitopatògens. Donat que el medi de cultiu afectava significativament a l'activitat del percentatge d'inhibició es va optar per utilitzar els medis GA i LB. Els canvis produïts en el pH dels cultius de *Pseudomonas spp.* en medi GA i LB no afectaven al percentatge d'inhibició.

Amb els assajos d'screening es va poder corroborar que en els medis LB podien contenir components que provocaven l'augment del percentatge d'inhibició enfront les soques indicadores, en canvi els SSC obtinguts en medi GA no van tenir percentatges d'inhibició tant elevats. No obstant això, aquest estudi queda obert realitzar experiments utilitzant medis alternatius i suplementats, com al fraccionament del SSC per determinar quins són els components encarregats de provocar la inhibició dels patògen i la seva concentració efectiva. També s'hauria de fer l'escalat dels cultius en volums majors, utilitzant bioreactors, i la modificació de variables com l'agitació i la temperatura.

7. APLICABILITAT

L'objectiu d'aquest treball ha sigut l'optimitzar una metodologia per determinar l'activitat antimicrobiana in vitro de les soques dels bacteris del complex *Pseudomonas fluorescens* amb capacitat de produir substàncies antimicrobianes actives enfront a diferents bacteris i fongs fitopatògens. Com també determinar l'espectre d'acció enfront bacteris i fongs fitopatògens que podrien ser bons candidats a ser desenvolupats com a bioplaguicides. Aconseguir un bioplaguicida implica el compliment de diverses tècniques que assegurin un producte segur i eficaç. Aquests passos comprenen el aïllament del microorganisme i la seva conservació, la avaluació de la seva capacitat per produir SSC amb capacitat d'inhibició de creixement dels indicadors, les investigacions per conèixer la seva interacció amb l'ambient, fisiologia i taxonomia, la seva producció en massa, la seva formulació, la determinació de dosis i freqüències d'aplicació, la seva avaluació en el camp, els estudis d'impacte ambiental i caracterització molecular.

Un cop obtingut inòculs de SSC efectius, s'hauria de sotmetre a una fase de formulació amb l'objectiu de fer el fraccionament dels SSC per poder estudiar, identificar i verificar quins elements presents o absents en el medi poden potenciar o inhibir la producció d'antibiòtics com els produïts per el complex *Pseudomonas spp.*

Per un altre costat, una vegada analitzat el seu espectre d'activitat in vitro i el fraccionament dels seus component s'hauria de provar l'activitat d'aquests SSC in vivo, és a dir en condicions d'hivernacle i sobre les plantes i corroborar si mantenen el mateix percentatge d'inhibició antimicrobiana. Aquesta fase inclouria la determinació dels seus temps d'acció i les concentracions mínimes de SSC efectives per aconseguir la inhibició del creixement dels patògens. Per altre costat s'hauria d'intentar poder optimitzar la producció amb escalats industrials de bioplaguicides realitzant l'optimització dels medis i el sistema de fermentació, on s'englobaria estudis de preformulació, vida útil i control de la qualitat del nou producte (microbiològic, fisicoquímic, biològic). Altres aspectes importants son l'estandardització de bioassajos per l'avaluació de l'eficàcia en condicions controlades, la compatibilitat del bioplaguicida amb agroquímics i el seu efecte sobre els organismes implicats rutinàriament en el maneig integrat del cultiu.

8. CONCLUSIONS

1. La composició del medi és un factor que afecta significativament en l'activitat antimicrobiana dels sobredant sense cèl·lules de *Pseudomonas*. Les condicions òptimes per l'obtenció de majors percentatges d'inhibició del creixement són amb els cultius GA suplementat i medi LB.
2. El canvis de pH produïts en els cultius de *Pseudomonas* en GA i LB per l'obtenció dels SSC no afecten en general a la seva activitat d'inhibició enfront a Xav i Psa.
3. Els SSC obtinguts en **medi GA** (obtinguts de les 35 soques, de la col·lecció procedent del grup CIDSAV, del complex *Pseudomonas fluorescens*) d'un elevat número de soques (entre 7 i 18 soques del total de 35, en funció del indicador estudiat) presenten una alta **activitat antimicrobiana** que supera el llindar del 50% d'inhibició. I al menys 7 soques que presenten **un elevat espectre d'acció** enfront a 3 dels 4 indicadors estudiats (soques EPS550, EPS327, EPS550, EPS531, EPS383, EPS274 i EPS384 que mostren una gran activitat enfront Xav, Psa i Pst). La soca EPS240 va mostrar activitat d'inhibició enfront les 4 soques indicadores, amb més del 50% d'inhibició per cada indicador estudiat, essent una de les millor candidates a ser utilitzada i desenvolupada com a futur bioplaguicida antibacteriana.
4. En el cas dels SSC obtinguts en **medi LB**, s'obtenen percentatges d'inhibició del creixement molt elevats, en la majoria de soques indicadores (fitopatògenes) i en els diversos experiments realitzats. S'ha determinat que 31 dels SSC obtinguts de les soques mostraven percentatges d'inhibició del creixement enfront Ea entre el 75-100% d'inhibició, 32 soques mostraven percentatges entre el 75-100% d'inhibició enfront a Xav, 34 soques enfront Psa i 31 enfront a Pst.
5. En 25 i 23 de les 32 soques estudiades s'ha observat un elevat percentatge d'inhibició (> 60%) enfront als fongs Bo i Pe, respectivament (mètode d'inhibició de creixement). El número de soques que presenten inhibició enfront Fo és baix i només les soques CHAO, EPS209, EPS531, EPS539, EPS550 i PspALZN3 presenten valors d'inhibició superiors al 60%. Únicament la soca EPS550 ha mostrat inhibició en front a Fa amb un 30-60% d'inhibició, essent una candidata a ser utilitzada i desenvolupada com a futur bioplaguicida antifúngic.

9. BIBLIOGRAFIA

Akkermans, A. D., Van Elsas, J. D., & De Bruijn, F. J. (Eds.). (1995). *Molecular microbial ecology manual* (No. C/576.15 M6). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Alewu, B., & Nosiri, C. (2011). Pesticides and human health. *Pesticides in the Modern World—Effects of Pesticides Exposure. InTech*, 231-50

Badosa, E. (2001). Anàlisi polifàsica de soques de *Pseudomonas fluorescens* potencials agents de biocontrol en malalties de fruiters. Tesi doctoral. Universitat de Girona.

Bais, H. P., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*, 134(1), 307-319. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Luciana M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1044-1051. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>

Benito, E. P., Arranz, M., & Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S43-S46. <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S43S46.pdf>

Bodah, E. T. (2017). Root rot diseases in plants: a review of common causal agents and management strategies. *Agric. Res. Technol*, 5, 555661. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.04.555661>

Bonn, W. G., & van der Zwet, T. (2000). Distribution and economic importance of fire blight. *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, 37, 53.

Borisade, O. A., Uwaidem, Y. I., & Salami, A. E. (2017). Preliminary report on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sensu lato) from some tomato producing agroecological areas in Southwestern Nigeria and susceptibility of F1-resistant tomato hybrid (F1-Lindo) to infection. *Annual Research & Review in Biology*, 1-9. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/34626>

Boutrot, F., & Zipfel, C. (2017). Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual review of phytopathology*, 55, 257-286. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>

Chourasiya, S., Khillare, P. S., & Jyethi, D. S. (2015). Health risk assessment of organochlorine pesticide exposure through dietary intake of vegetables grown in the periurban sites of Delhi, India. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(8), 5793-5806. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3791-x>

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 4951-4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>

Czaja, K., Góralczyk, K., Struciński, P., Hernik, A., Korcz, W., Minorczyk, M., & Ludwicki, J. K. (2015). Biopesticides—towards increased consumer safety in the European Union. *Pest management science*, 71(1), 3-6.. <https://doi.org/10.1002/ps.3829>

De La Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Mansour, S. C., Reckseidler-Zenteno, S. L., Hernández, D., Brackman, G., & Hancock, R. E. (2015). D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chemistry & biology*, 22(2), 196-205. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.01.002>

De Vleeschauwer, D., & Höfte, M. (2009). Rhizobacteria-induced systemic resistance. *Advances in botanical research*, 51, 223-281. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51006-3)

Duffy, B. K., & Défago, G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and environmental microbiology*, 65(6), 2429-2438. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2429-2438.1999>

Elad, Y., & Shtienberg, D. (1995). Botrytis cinerea in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews*, 1(1), 15-29. <https://doi.org/10.1007/BF00140331>

Ferrante, P., & Scortichini, M. (2009). Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *Journal of Phytopathology*, 157(11-12), 768-770. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01550.x>

Garrido-Sanz, D., Arrebola, E., Martínez-Granero, F., García-Méndez, S., Muriel, C., Blanco-Romero, E., & Redondo-Nieto, M. (2017). Classification of isolates from the *Pseudomonas*

fluorescens complex into phylogenomic groups based in group-specific markers. *Frontiers in microbiology*, 8, 413. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00413>

Gatehouse, A. M. R., Ferry, N., Edwards, M. G., & Bell, H. A. (2011). Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1569), 1438-1452. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0330>

Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in microbiology*, 6, 214. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214>

Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome. *Annual review of phytopathology*, 55, 23-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>

Gross, H., & Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural product reports*, 26(11), 1408-1446. <https://doi.org/10.1039/B817075B>

Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews microbiology*, 3(4), 307-319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>

Hayward, A. C. (1993). The hosts of *Xanthomonas*. In *Xanthomonas* (pp. 1-119). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1526-1_1

Heckel, D. G. (2012). Insecticide resistance after silent spring. *Science*, 337(6102), 1612-1614. <https://doi.org/10.1126/science.1226994>

Hoch, H. C., Burr, T. J., De La Fuente, L., Zaini, P. A., Cursino, L., Almeida, R., & Lindow, S. E. (2008). Understanding control of *Xylella fastidiosa* cell aggregation: importance in colonization and biofilm development in grapevine and sharpshooter foregut. In *Pierce's Disease Research Symp. Proc* (pp. 106-109).

Johnson, K. B., Stockwell, V. O., Burgett, D. M., Sugar, D., & Loper, J. E. (1993). Dispersal of *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas fluorescens* by honey bees from hives to apple and pear blossoms. *Phytopathology*, 83(5), 478-484.

Jun, S.R., Wassenaar, T.M., Nookaew, I., Hauser, L., Wanchai, V., Land, M., Timm, C.M., S.Lu, T.Y., Schadt, C.W., Doktycz, M.J., Pelletier, D.A. & Ussery, D.W. (2016). Comparative

genome analysis of *Pseudomonas* genomes including *Populus*-associated isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.02612-15>

Kado, C. I. (2010). *Plant bacteriology* (No. PA 581.2 K33 2010.). St Paul, MN: American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890545034>

Kortenkamp, A. (2007). Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental health perspectives*, 115(Suppl 1), 98-105. <https://doi.org/10.1289/ehp.9357>

Kraus, J., & Loper, J. E. (1995). Characterization of a Genomic Region Required for Production of the Antibiotic Pyoluteorin by the Biological Control Agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and environmental microbiology*, 61(3), 849–854. <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.849-854.1995>

Kupferschmid, P., Maurhofer, M., & Keel, C. (2013). Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Frontiers in plant science*, 4, 287. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00287>

Laala, S., Manceau, C., Valentini, F., Kerkoud, M., & Kheddami, M. (2012). Fireblight survey and first characterization of *Erwinia amylovora* isolates from Algeria. *Journal of Plant Pathology*, 693-696. <http://www.jstor.org/stable/45156299>

Latorre, G. (2002). Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*.

Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis II, E. W., Lim, C. K., Shaffer, B. T., & Paulsen, I. T. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet*, 8(7), e1002784. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002784>

Lorenzin, M. (2007). Pesticide residues in Italian Ready-Meals and dietary intake estimation. *Journal of Environmental Science and Health*, 42(7), 823-833. <https://doi.org/10.1080/03601230701555021>

Ma, Z., Ongena, M., & Höfte, M. (2017). The cyclic lipopeptide orfamide induces systemic resistance in rice to *Cochliobolus miyabeanus* but not to *Magnaporthe oryzae*. *Plant cell reports*, 36(11), 1731-1746. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2187-z>

- Mariutto, M., & Ongena, M. (2015). Molecular patterns of rhizobacteria involved in plant immunity elicitation. *Advances in Botanical Research*, 75, 21-56. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.07.002>
- Matiru, V. N., & Dakora, F. D. (2004). Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-7. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2002>
- Mavrodi, D. V., Blankenfeldt, W., & Thomashow, L. S. (2006). Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 417-445. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710>
- Mavrodi, D. V., Parejko, J. A., Mavrodi, O. V., Kwak, Y. S., Weller, D. M., Blankenfeldt, W., & Thomashow, L. S. (2013). Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology*, 15(3), 675-686. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02846.x>
- Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 101-122. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.121107.104959>
- Mercier, J., Makhoulouf, J., & Martin, R. A. (1991). *Fusarium avenaceum*, a pathogen of stored broccoli. *Canadian Plant Disease Survey*, 71(2), 161-162
- Metelev, M., Serebryakova, M., Ghilarov, D., Zhao, Y., & Severinov, K. (2013). Structure of microcin B-like compounds produced by *Pseudomonas syringae* and species specificity of their antibacterial action. *Journal of bacteriology*, 195(18), 4129-4137. <https://doi.org/10.1128/JB.00665-13>
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology*, 268(2), 157-177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
- Morales, H., Marín, S., Rovira, A., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2007). Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. *Letters in applied microbiology*, 44(1), 30-35. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02035.x>
- Nielsen, T. H., Krapp, A., Röper-Schwarz, U., & Stitt, M. (1998). The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP

glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant, Cell & Environment*, 21(5), 443-454. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00295.x>

Nyandoro, R. (2017). Fusarium Root Rot of Soybean in Southern Alberta: Pathogen Aggressiveness and Disease Management. <https://doi.org/10.7939/R38W38F12>

Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>

Oliveira, A., Sousa, J. C., Silva, A. C., Melo, L. D., & Sillankorva, S. (2018). Chestnut honey and bacteriophage application to control *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms: evaluation in an ex vivo wound model. *Frontiers in microbiology*, 9, 1725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01725>

Omarini, A. B., Achimón, F., Brito, V. D., & Zygodlo, J. A. (2020). Fermentation as an Alternative Process for the Development of Bioinsecticides. *Fermentation*, 6(4), 120. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040120>

Omoboye, O. O., Oni, F. E., Batool, H., Yimer, H. Z., De Mot, R., & Höfte, M. (2019). *Pseudomonas* cyclic lipopeptides suppress the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* by induced resistance and direct antagonism. *Frontiers in plant science*, 10, 901. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00901>

Ondarza-Beneitez, M. A. (2017). Biopesticidas: tipos y aplicaciones en el control de plagas agrícolas. *Agroproductividad*, 10(3), 31-367.

Oni, F. E., Olorunleke, O. F., & Höfte, M. (2019). Phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a are involved in the biological control of *Pythium myriotylum* on cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*). *Biological Control*, 129, 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.005>

Papagianni, M., Psomas, S. K., Batsilas, L., Paras, S. V., Kyriakidis, D. A., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2001). Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*, 37(1), 73-80. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00174-1)

Parret, A. H., & De Mot, R. (2002). Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria. *Trends in microbiology*, 10(3), 107-112. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02307-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02307-7)

- Parret, A. H., Schoofs, G., Proost, P., & De Mot, R. (2003). Plant lectin-like bacteriocin from a rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* isolate. *Journal of bacteriology*, 185(3), 897–908. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.897-908.2003>
- Pernezny, K., Jones, J. B., Roberts, P. D., & Dickstein, E. (2003). An outbreak of a leaf spot disease of cabbage in Southern Florida Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*. *Plant disease*, 87(7), 873-873. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.7.873B>
- Pernezny K & Zhang (2008). Bacterial speck of tomato. Publication PP-10. *Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences*, University of Florida.
- Pusey, P. L., Stockwell, V. O., & Rudell, D. R. (2008). Antibiosis and acidification by *Pantoea agglomerans* strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 98(10), 1136-1143. <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-10-1136>
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., & de Kock, M. J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 699-710. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0699>
- Raaijmakers, J. M., & Weller, D. M. (1998). Natural plant protection by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(2), 144-152. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.2.144>
- Raaijmakers, J. M., & Weller, D. M. (2001). Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2545–2554. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2545-2554.2001>
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 117-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Ritchie, D.F. (2000) Bacterial spot of pepper and tomato. Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-I-2000-1027-01
- Santos, I. M., Abrunhosa, L., Venâncio, A., & Lima, N. (2002). The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link.

Letters in applied microbiology, 35(4), 272-275. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01186.x>

Satyaprasad, K., & Bateman, G. L. (1997). Variation among isolates of *Fusarium avenaceum* from different hosts determined by DNA analyses and vegetative compatibility groupings. *Cereal Research Communications*, 25(3), 543-547. <https://doi.org/10.1007/BF03543773>

Scholl, D. (2017). Phage tail-like bacteriocins. *Annual review of virology*, 4, 453-467. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041632>

Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35(4), 652-680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>

Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. (2016). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2087. doi:10.3389/fmicb.2016.02087

Singh, V. K., Singh, H. B., & Upadhyay, R. S. (2017). Role of fusaric acid in the development of 'Fusarium wilt' symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. *Plant physiology and biochemistry*, 118, 320-332. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.028>

Slininger, P. J., & Shea-Wilbur, M. A. (1995). Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(5), 794-800. <https://doi.org/10.1007/BF02431910>

Sorensen, J. L., Phipps, R. K., Nielsen, K. F., Schroers, H. J., Frank, J., & Thrane, U. (2009). Analysis of *Fusarium avenaceum* metabolites produced during wet apple core rot. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4), 1632-1639. <https://doi.org/10.1021/jf802926u>

Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 425-448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>

Stéphane Compant, Brion Duffy, Jerzy Nowak, Christophe Clément, Essaïd Ait Barka (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles,

mechanisms of action, and future prospects. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>

Thomashow, L. S., Bangera, M. G., Bonsal, R. F., Kim, D. S., Raaijmakers, J. M., & Weller, D. M. (1997). 2,4-diacetylphloroglucinol, a key antibiotic in soilborne pathogen suppression by fluorescent *Pseudomonas* spp. *In Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions* (pp. 469-475)

Torres, R., Teixido, N., Vinas, I., Mari, M., Casalini, L., Giraud, M., & Usall, J. (2006). Efficacy of *Candida sake* CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean regions. *Journal of food protection*, 69(11), 2703-2711. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.11.2703>

Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., & Raaijmakers, J. M. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytologist*, 175(4), 731-742. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02138.x>

United Nations. (2017). World Population Prospects The 2017 Revision Key Findings and Advance Tables ESA/P/WP/248. World Population Prospects The 2017 revision. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Vacheron, J., Péchy-Tarr, M., Brochet, S., Heiman, C. M., Stojiljkovic, M., Maurhofer, M., & Keel, C. (2019). T6SS contributes to gut microbiome invasion and killing of an herbivorous pest insect by plant-beneficial *Pseudomonas protegens*. *The ISME journal*, 13(5), 1318-1329. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0353-8>

Van den Bosch, R., Stern, V.M. (1962). The integration of chemical and biological control of arthropod pests. *Annual review of entomology*. 7, 367-386. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.07.010162.002055>.

Vanneste, J. L., Yu, J., Cornish, D. A., Max, S., & Clark, G. (2011). Presence of *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* the causal agent of bacterial canker of kiwifruit on symptomatic and asymptomatic tissues of kiwifruit. *New Zealand Plant Protection*, 64, 241-245. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2011.64.5948>

Vargas, P., Farias, G. A., Nogales, J., Prada, H., Carvajal, V., Barón, M., & Gallegos, M. T. (2013). Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 flagella and type

III secretion system. *Environmental microbiology reports*, 5(6), 841-850.
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12086>

Viggor, S., Juhanson, J., Joesaar, M., Mitt, J., Truu, J., Vedler, E., & Heinaru, A. (2013). Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiological Research*, 168(7), 415-427. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.006>

Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., & Lemaitre, B. (2005). Drosophila host defense after oral infection by an entomopathogenic Pseudomonas species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32), 11414-11419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502240102>

Wei, G., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to Colletotrichum orbiculare by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81(11), 1508-1512.

Weller, D. M. (2007). Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0250>

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B., & Tomashow, L.S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 309-348. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010>

Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., & Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, 5, 241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>