

Projecte/Treball Fi de Carrera

Estudi: Eng. Tècn. Agrícola Ind.Agràries i Aliment. Pla 99

Títol: Millora fisiològica de l'agent de control biològic *Pantoea* agglomerans EPS 125 mitjançant osmoadaptació

Document: Memòria

Alumne: Albert Garcia i Badosa

Director/Tutor: Esther Badosa / Anna Bonaterra
Departament: Eng. Química, Agrària i Tecn. Agroalimentària
Àrea: Producció vegetal

Convocatòria (mes/any): Febrer 2008

AGRAÏMENTS

Voldria donar les gràcies a tots els que han fet possible la realització d'aquest projecte. En primer lloc voldria agrair especialment a les meves tutores, l'Esther Badosa i l'Anna Bonaterra per donar-me la possibilitat de realitzar el projecte a la secció de Patologia Vegetal de l'Institut de Tecnologia Alimentària de la UdG. També donar-les-hi les més sinceres gràcies per haver tingut tanta paciència i dedicació, ja que sense la seva ajuda no hauria estat possible la realització d'aquest projecte.

També vull agrair la col·laboració d'en Jesús Francés, per proporcionar-me el material vegetal i pel seu interès en el meu projecte.

En segon lloc agrair a tots els companys i companyes de laboratori per ensenyar-me i assessorar-me en el funcionament del laboratori i per aguantar-me.

També vull agrair a en Juanjo el seu companyarisme en tantes i tantes hores junts al laboratori, i a la Paula per donar-me consells i ensenyar-me a fer anar alguns programes informàtics. També agrair als dos per animar-me en dies dolents.

Per últim agrair molt a la meva xicota haver-me donat "canya" perquè em posés a escriure el projecte, i pel seu suport anímic i emocional. També agrair l'ajuda de la meva família per tots aquests llargs anys de carrera que semblen arribar al final.

A tots i totes que heu estat al meu costat, moltes gràcies.

RESUM

Els sectors de la producció de fruita i hortalisses a Espanya representen una de les pedres angulars de la seva agricultura i de l'economia en general. Les pèrdues econòmiques causades en la postcollita poden arribar fins al 25% en països desenvolupats, i fins a un 50%, en països en vies de desenvolupament. Aquestes pèrdues són causades principalment per fongs i d'entre aquests cal destacar la podridura blava causada per *Penicillium expansum*. Tradicionalment s'han controlat aquestes malalties mitjançant l'aplicació de productes químics. Tot i ser molt eficaços, el seu ús s'està limitant per raons toxicològiques i ambientals. Una de les alternatives rau en el biocontrol que consisteix en la utilització de microorganismes antagonistes que redueixen o impedeixen el desenvolupament del patògen. La soca *Pantoea agglomerans* EPS125 és un agent de biocontrol molt efectiu enfront les podridures causades per diferents fongs en postcollita.

L'objectiu concret d'aquest treball ha estat determinar l'eficàcia de la preadaptació de l'agent de biocontrol *Pantoea agglomerans* EPS 125 mitjançant la osmoadaptació per millorar la seva supervivència en la superfície de fruita. L'osmoadaptació és un procés fisiològic d'adaptació a la baixa disponibilitat d'aigua, i que consisteix en l'acumulació intracel·lular de soluts compatibles i osmolits, que aconsegueixen incrementar la tolerància de les cèl·lules enfront diferents condicions d'estrès, dessecament, temperatures elevades, congelació i elevada salinitat.

En la primera part del treball es va realitzar una posta a punt de mètodes de mostreig i de recompte de bacteris en la superfície de pomes, així com la determinació de la influència de les condicions de cultiu (diferents medis i temps d'incubació) de *P. agglomerans* EPS125 en la concentració obtinguda. Es va comprovar que les condicions de cultiu no afecten a la relació entre l'absorbància i el nombre de viables. Així mateix, es va posar de manifest que per a mesurar el nivell poblacional en la superfície de pomes Golden es poden utilitzar indistintament un conjunt de petites superfícies circulars o mostres rectangulars més grans, ja que s'obtenen resultats semblants. Finalment es va obtenir una bona correlació entre el mètode de sembra i recompte automàtic i el mètode de sembra en gota i recompte manual per a la

determinació dels nivells poblacionals de *P. agglomerans* EPS125 en la superfície de les pomes.

En la segona part del treball, es va determinar l'efecte de l'osmoadaptació en la supervivència de *P. agglomerans* EPS125 en ferides i superfície de pomes en diferents condicions d'humitat relativa. No s'han observat diferències en la supervivència de EPS125 ni en ferides ni en la superfície de pomes que posessin de manifest la millora fisiològica de la soca deguda a la preadaptació de l'ACB per osmoadaptació en cap de les condicions assajades. Si però que s'ha observat que els nivells poblacionals determinats en ferides realitzades 24 h abans del mostreig, constitueixen un enriquiment dels nivells poblacionals presents en la superfície. Per tant aquest tipus de mostreig podria ser útil en mostres en els que els nivells poblacionals fossin inferiors al nivell de detecció.

INDEX

1	INTRODUCCIÓ.....	1
1.1	PRODUCCIÓ DE FRUITA DE LLAVOR	2
1.2	PÈRDUES EN POSTCOLLITA	3
1.3	CONTROL DE LES MALALTIES EN POSTCOLLITA	4
1.3.1	Control químic.....	5
1.3.2	Control biològic.....	6
1.4	EL CONTROL BIOLÒGIC EN POSTCOLLITA	7
1.4.1	Avantatges i limitacions del control biològic	8
1.4.2	Característiques desitjables en un agent de control biològic.....	10
1.4.3	La soca <i>Pantoea agglomerans</i> EPS125, agent de control biològic contra <i>Penicillium expansum</i>	11
1.5	MILLORA DE L'EFICÀCIA DE BIOCONTROL.....	11
1.6	OSMOADAPTACIÓ.....	13
2	OBJECTIUS	15
3	MATERIALS I MÈTODES.....	17
3.1	MEDIS DE CULTIU.....	18
3.1.1	Medis de cultius i tampons.....	18
3.1.2	Preparació dels medis de cultiu.....	19
3.2	SOQUES BACTERIANES I CONDICIONS DE CULTIU	20
3.3	OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE L'ASSAIG	24
3.3.1	Material vegetal.....	24
3.3.2	Inoculació de l'agent de biocontrol.....	25
3.3.3	Selecció del mètode per a la determinació dels nivells poblacionals de <i>P. agglomerans</i> EPS 125 en la superfície de la poma	25
3.4	EFFECTE DE L'OSMOADAPTACIÓ EN LA SUPERVIVÈNCIA DE <i>P. agglomerans</i> EPS125 EN FERIDES I EN LA SUPERFÍCIE DE LA POMA EN DIFERENTS CONDICIONS.....	28
3.5	AVALUACIÓ DELS RESULTATS I TRACTAMENT ESTADÍSTIC.....	32
4	RESULTATS I DISCUSSIÓ	33
4.1	EFFECTE DE LES CONDICIONS DE CULTIU DE <i>P. agglomerans</i> EPS125 EN LA RELACIÓ ENTRE L'ABSORBÀNCIA I EL NOMBRE DE VIABLES.....	34
4.2	SELECCIÓ DEL MÈTODE DE MOSTREIG PER LA DETERMINACIÓ DELS NIVELLS POBLACIONALS DE <i>P. agglomerans</i> EPS125 EN SUPERFÍCIE DE POMA	35
4.3	SELECCIÓ DEL MÈTODE DE RECOMPTE PER DETERMINAR ELS NIVELLS POBLACIONALS DE <i>P. agglomerans</i> EPS125 EN SUPERFÍCIE DE POMA	36

4.4	EFFECTE DE L'OSMOADAPTACIÓ EN LA SUPERVIVÈNCIA DE <i>P.agglomerans</i> EPS125 EN FERIDES I EN LA SUPERFÍCIE DE POMES.....	37
5	CONCLUSIONS.....	44
6	BIBLIOGRAFIA	46

1 INTRODUCCIÓ

1.1 PRODUCCIÓ DE FRUITA DE LLAVOR

Els sectors de la producció de fruita i hortalisses a Espanya representen una de les pedres angulars de la seva agricultura i de l'economia en general. D'acord amb l'Anuari d'Estadística Agroalimentària del Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació d'Espanya, la superfície total en producció hortofructícola ascendeix a 1.560.000 ha aproximadament, distribuïdes en 267.200 ha en cítrics, 890.066 ha en fruiters no cítrics i 403.000 ha en hortalisses (Merino-Pacheco, 2006).

En referència als fruiters no cítrics, el préssec és el fruit amb més producció, seguit de la poma, i en tercer lloc la pera (Taula 1.1).

Taula 1. 1. Producció (en milers de tones) dels fruiters no cítrics més importants quantitativament a Espanya. Font: Merino-Pacheco, 2006

Províncies	Préssec	Poma	Pera	Plàtan	Advocat
Aragó	313	194	152	-	-
Múrcia	300	-	-	-	-
Catalunya	258	264	274	-	-
Andalusia	152	-	-	-	66.5
Extremadura	103	-	-	-	-
La Rioja	-	-	40	-	-
Canàries	-	-	-	409	-
Restat	150	277	164	-	7.5
Total Espanya	1.276	695	630	409	74

Pel que fa a la producció de fruita de llavor, es pot observar a la taula 1.1 que Catalunya és la principal comunitat autònoma productora de poma i pera a Espanya (aproximadament un 45% de la producció), seguida d'Aragó. Dins de Catalunya la principal província productora és Lleida, seguida per la província de Girona (aproximadament un 14%).

Tant en l'etapa de producció com en el període de postcollita (on s'inclou l'etapa d'emmagatzematge abans de que arribi a la seva venda al consumidor), es

produeixen pèrdues econòmiques importants degut a la incidència de determinades malalties fúngiques i bacterianes.

1.2 PÈRDUES EN POSTCOLLITA

En països desenvolupats s'estima que les pèrdues durant el període postcollita dels productes hortofructícoles oscil·len entre el 5 i el 25%, i en els països en vies de desenvolupament aquestes pèrdues poden augmentar fins el 20 i el 50%. Les causes del deteriorament en postcollita es poden classificar en: processos fisiològics interns, danys fisiològics causats per agents externs, danys físics (vies de penetració d'infeccions, que acceleren el deteriorament) i danys patològics.

Les principals pèrdues en postcollita són causades per fongs i bacteris que s'introdueixen en els teixits afectats per danys mecànics o fisiològics. Els principals fongs causants de podridures en postcollita són *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* i *Rhizopus stolonifer* (figura 1.1). El seu atac es veu afavorit per temperatures moderades i humitats relatives altes. La seva acció degradativa pot ser molt ràpida i ser transmesa de productes afectats a productes sans, per contacte superficial. El podriment dels fruits en postcollita repercuteix en l'agricultor al suposar pèrdues econòmiques durant el seu emmagatzament, distribució i comercialització. La podridura causada per *Penicillium expansum* és la més important en fruites de llavor i en condicions favorables pot arribar al 80-90% d'incidència (Snowdon, 1990). Les infeccions per *P. expansum* reben el nom de podridura blava i solen tenir lloc durant la collita i posteriors manipulacions en els llocs d'emmagatzematge. L'origen de les infeccions es pot trobar en l'ambient i/o en les solucions de rentat a que es sotmeten els fruits abans de la conservació. El fong penetra en els fruits a través de les ferides produïdes per la manipulació, o per les obertures naturals com les lenticel·les. Si bé *Penicillium* es desenvolupa més bé en ambients humits i càlids, la infecció pot donar-se a temperatures de 0 °C, on la podridura progressa més lentament (Ogawa et al. 1995).

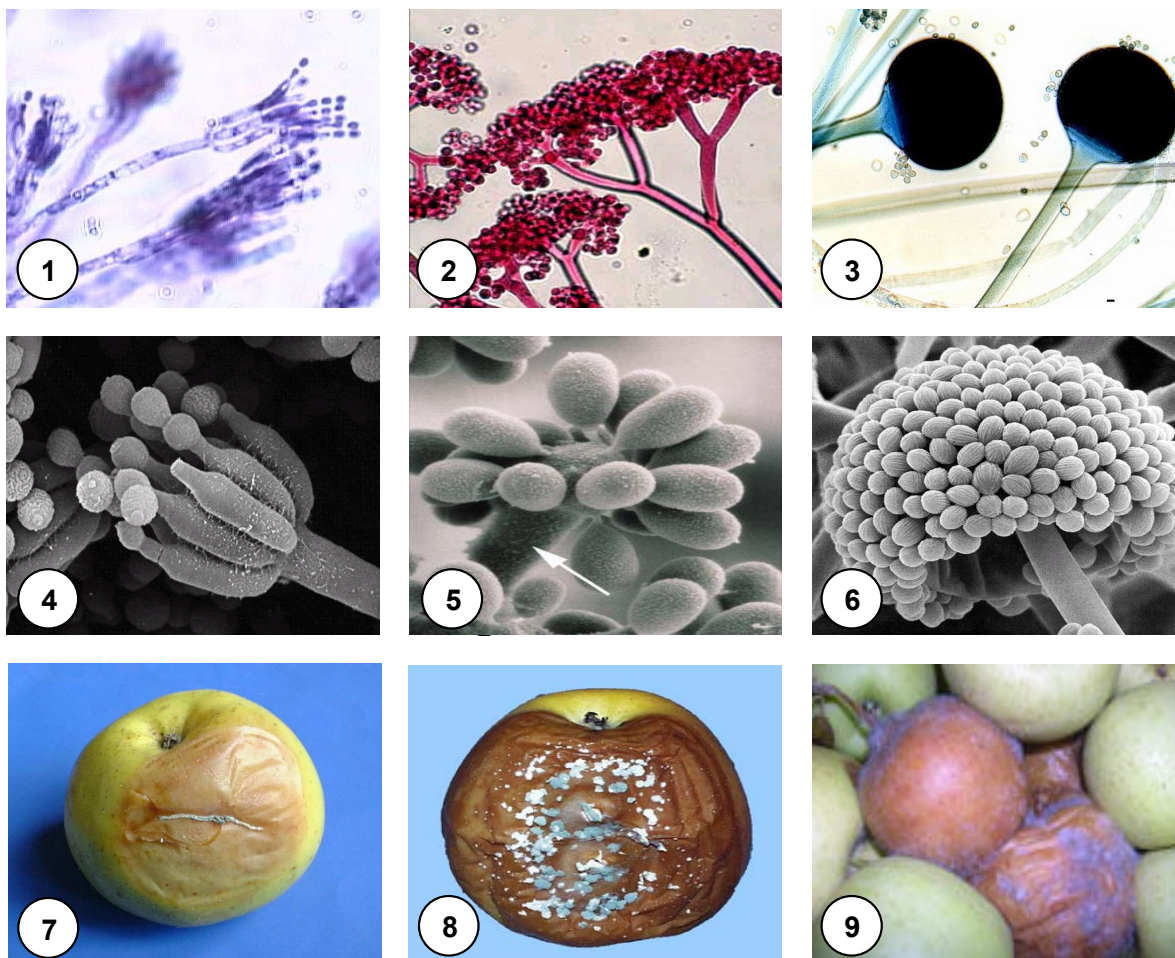


Figura 1.1 Micrografies realitzades al microscopi òptic de diferents fongs: *Penicillium expansum* (1); *Botrytis cinerea* (2); *Rhizopus stolonifer* (3). Fotografies realitzades al microscòpi electrònic de rastreig: *Penicillium expansum* (4); *Botrytis cinerea* (5); *Rhizopus stolonifer* (6). Fotografies de les podridures en pomes causades per *Penicillium expansum* (7); (www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Moho_azul/Penicillium_exp1.jpg;) *Botrytis cinerea* (8) *Rhizopus stolonifer* (9).

1.3 CONTROL DE LES MALALTIES EN POSTCOLLITA

Per controlar les podridures en postcollita s'utilitzen guies de bones pràctiques de maneig durant la collita i l'emmagatzematge. Malgrat tot, aquestes mesures no són suficients per evitar el desenvolupament de patògens i per tant ha estat necessari implementar altres mesures de control.

1.3.1 Control químic

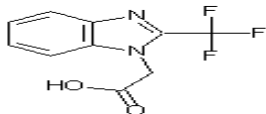
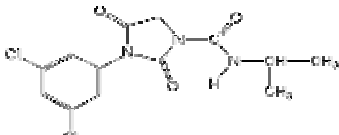
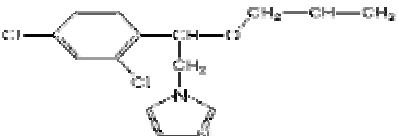
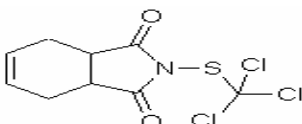
El control químic es pot considerar el mètode més utilitzat fins ara, i es basa en l'aplicació de compostos que protegeixen el fruit durant el període d'emmagatzematge. L'ús d'aquests productes juntament amb l'aplicació de les noves tecnologies de frigoconservació, han permès una important reducció de les pèrdues econòmiques en postcollita.

El principal inconvenient dels compostos químics és que la seva utilització s'està restringint en varis països i existeix una limitació de l'ús d'aquests productes per raons toxicològiques i ambientals (Wilson *et al.*, 1994; Wilson i Wisniewski ,1989). A més a més, cal tenir en compte l'increment de la resistència d'alguns patògens fúngics als fungicides utilitzats de manera comú, que fa que aquest mètode de control pugui esdevenir ineficaç a llarg termini.

Això ha comportat que en els darrers anys s'hagi produït una reducció progressiva dels fungicides autoritzats per al seu ús en postcollita. Actualment existeix un reduït nombre de principis actius disponibles per l'ús com a fungicides en postcollita. Els més utilitzats es mostren a la taula 1.2.

Aquesta situació obliga a la investigació i desenvolupament de mètodes de control alternatius i/o complementaris al control químic com ara el control biològic.

Taula 1. 2. Principals principis actius utilitzats com a fungicides en postcollita.

Fungicida	Actiu enfront	Estructura química
Benzimidazols	<i>Penicillium sp.</i> <i>B. cinerea</i>	
Iprodione	<i>Penicillium sp.</i> <i>B. cinerea. Alternaria sp.</i>	
Imazalil	<i>Penicillium sp.</i> <i>B. cinerea. Alternaria sp.</i>	
Captan	<i>Rhizopus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i>	

1.3.2 Control biològic

El control biològic es basa en la utilització de microorganismes que de manera natural són antagonistes enfront dels patògens. Aquest mètode de control desenvolupat en els darrers vint anys, es proposa com un mètode alternatiu o complementari al control químic. Les condicions controlades a que se sotmeten els fruits en el període d'emmagatzematge, fa que el biocontrol esdevingui una bona alternativa, ja que la no fluctuació dels paràmetres ambientals fa que hi hagin menys factors que puguin afectar el desenvolupament i/o supervivència del microorganisme.

A la taula 1.3 es mostren exemples de microorganismes que s'han mostrat efectius en el control de diferents patògens fúngics de postcollita.

Taula 1. 3. Microorganismes efectius en el control de patògens fúngics. Font: Olivé (2006).

Agent de biocontrol	Patogen	Espècie
<i>Acremonium breve</i>	Bc	Poma
<i>Bacillus subtilis</i>	Mo	Albercoc, nectarina
<i>Bacillus subtilis</i>	Pi	Cítrics
<i>Bacillus sp.</i>	Mo, Rs	Préssec, nectarina
<i>Candida guilliermondi</i>	Bc, Mo, Pi	Raïm, préssec i poma
<i>Candida oleophila</i>	Bc, Pi	Poma i cítrics
<i>Candida sake</i>	Bc, Pe, Pi	Poma, pera i cítrics
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Pe, Pi, Bc	Poma i cítrics
<i>Enterobacter cloacae</i>	Rs	Préssec
<i>Epicoccum nigrum</i>	Mo	Préssec
<i>Pantoea agglomerans</i>	Pe, Rs i Bc	Pera i poma
<i>Pantoea agglomerans</i>	Mi, Rs	Préssec, nectarina
<i>Pichia anomala</i>	Bc	Poma
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Pe, Bc, Mi	Poma i pera
<i>Pseudomonas syringae</i>	Pe	Poma, pera i cítrics
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Pe	Poma
<i>Pseudomonas syringae</i>	Pe	Poma
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Pe	Poma

Bc: *Botrytis cinerea*, Rs: *Rhizopus stolonifer*, Pi: *Penicillium italicum*, Mi: *Monilinia laxa*, Mo: *Monilinia*, Pe: *Penicillium expansum*

1.4 EL CONTROL BIOLÒGIC EN POSTCOLLITA

L'Acadèmia Nacional de les Ciències dels Estats Units defineix el control biològic com "l'ús d'organismes naturals o modificats, gens o productes gènics, per reduir els efectes d'organismes indesejables i per afavorir els organismes desitjables en cultius, arbres, animals, insectes i microorganismes beneficiosos" (NAS, 1987).

Hi ha varis mecanismes d'acció que permeten que un agent de control biològic (ACB) controli una malaltia, i moltes vegades és difícil determinar quin és el mecanisme emprat per l'ACB, ja que, normalment és més d'un mecanisme l'implicat en el biocontrol.

Els ACB, poden competir de manera directa pels nutrients i/o l'espai amb els patògens ja que estan millor adaptats per utilitzar els nutrients de la fruita que el patogen. Existeixen d'altres ACB que competeixen amb el patogen per l'espai d'infecció. Aquests, han de competir per l'espai i sobreviure i desenvolupar-se en la superfície o ferida del fruit, a baixes temperatures i pH o en condicions osmòtiques que no són òptimes pel creixement del patogen (Viñas, 1997). Per tant, quan major sigui la velocitat amb la que pugui absorbir els nutrients, major serà el seu creixement i ocuparà més espai, que per contra serà restat al patogen, i en conseqüència quedarà inhibit.

L'antibiosi consisteix en la destrucció d'un microorganisme mitjançant determinades substàncies produïdes per l'ACB. Aquests metabòlits poden ser antibiòtics, agents lítics, o enzims (Viñas, 1997). L'antibiosi ha estat un dels mecanismes d'acció més estudiats degut a que és un mecanisme fàcilment detectable en experiments *in vitro*. En aquests experiments, al posar en contacte l'antagonista i el patogen en una placa de medi de cultiu, s'observa que l'ACB inhibeix el creixement del patogen (Wilson, 1989).

Per últim hi ha la inducció de resistència en l'hoste. S'ha demostrat que durant la interacció de l'agent de biocontrol i l'hoste, poden produir-se processos de desenvolupament de resistència en l'hoste (Viñas, 1997). El descobriment que els fruits cítrics, altres fruits i vegetals responien a l'aplicació de cèl·lules antagòniques amb un increment de la producció d'etilè (Droby i Chalutz, 1994) van suggerir que es tractava d'un procés d'inducció de resistència en l'hoste (Spadaro i Gullino, 2003).

1.4.1 Avantatges i limitacions del control biològic

Si bé el control biològic presenta un seguit d'avantatges respecte els mètodes tradicionals, també s'han de tenir en compte un conjunt de limitacions. A la taula 1.4 es mostren de manera esquemàtica aquests avantatges i inconvenients.

Taula 1.4 Principals avantatges i inconvenients del control biològic envers el control químic

Avantatges	Inconvenients
Més segurs	Menys eficaços
Més persistents	Reduït espectre d'acció
Créixer i sobreviure en els punts d'infecció	Incapacitat pel control d'infeccions establertes
Compatible amb agricultura ecològica	

Els principals avantatges del control biològic envers els altres sistemes és que són més segurs en comparació amb els principals productes químics utilitzats actualment. També al tractar-se de microorganismes vius, poden ser més persistents al llarg del temps que els productes químics gràcies a la seva capacitat de sobreviure llargs períodes de temps en el material vegetal. Els agents microbians produeixen un efecte insignificant en el balanç ecològic, particularment perquè no destrueixen als enemics naturals de les espècies patògenes, a diferència d'alguns pesticides que a més a més, afavoreixen l'aparició de noves malalties. La utilització de microorganismes en el control de les malalties és molt sovint comparable amb els altres sistemes de control, inclosos els productes químics.

A més a més, els agents de control biològic poden créixer i sobreviure en el lloc on es produeixen les infeccions, la qual cosa és un avantatge respecte els productes sintètics que tenen un període d'actuació determinat i requereixen aplicacions repetides. Un dels avantatges dels ACB és que són totalment compatibles amb les pràctiques d'agricultura sostenible que són necessàries per conservar els recursos naturals de l'agricultura.

El principal inconvenient dels agents de biocontrol és que són menys eficaços i consistents en el control de patògens que els productes químics i donat que són microorganismes vius es troben influenciats per diferents factors tant abiòtics com biòtics, que poden provocar variacions en la seva capacitat de colonitzar el medi i per això la seva eficàcia contra els patògens és poc consistent. Una altra de les limitacions dels ACB és la dificultat d'acceptació per part dels consumidors per l'aplicació de microorganismes en els aliments. Aquesta idea no es nova, ja que des de temps molt antics, les fermentacions mitjançant microorganismes ha estat un mètode important per preservar els aliments. D'aquesta manera no hauria de ser problema que la

societat acceptés els agents de biocontrol si aquests arribessin a ser una alternativa segura i efectiva als fungicides sintètics (Viñas, 1997).

A més, el seu espectre d'acció sol ser reduït comparat als compostos químics degut a que és efectiu en hostes específics contra determinats patògens i sota condicions ambientals favorables.

Per últim, un dels majors obstacles pel desenvolupament d'aquests agents, és la seva incapacitat pel control d'infeccions establertes. L'aplicació dels agents en el camp de cultiu, pot protegir els fruits d'aquestes infeccions (Ippolito i Nigro, 2000). Per què sigui efectiu en precollita, els agents haurien de ser capaços d'utilitzar els nutrients a baixes concentracions, resistir als raigs UV i altes temperatures i condicions de sequedat, que són les condicions que es donen a camp (Spadaro i Gullino, 2004).

Així, la fruita emmagatzemada en cambres frigorífiques representa una oportunitat excel·lent per l'aplicació del control biològic, ja que la fruita es troba en unes condicions on es pot controlar perfectament paràmetres com la temperatura, humitat relativa i els gasos, que són els que afecten de manera directa les pèrdues en postcollita.

1.4.2 Característiques desitjables en un agent de control biològic

Per a seleccionar un bon agent de control i per a poder afrontar una bona eficiència, cal en primer lloc que aquest ACB sigui eficaç en la reducció de la malaltia. Tot i aquesta eficàcia també s'han de tenir en compte moltes altres característiques com ara la seva estabilitat genètica, l'efectivitat a baixes concentracions, i que sigui poc exigent pel que fa a requeriments nutricionals i adaptat a les baixes temperatures (ja que l'emmagatzematge sota condicions controlades ho fa a baixes temperatures),

A més a més, i per a que tingui un interès més gran per a la seva comercialització seria desitjable que fos efectiu enfront un gran nombre de patògens i en diverses fruites i vegetals. De cara a la seva producció biotecnològica, l'ACB ha de tenir capacitat de reproduir-se en medis de cultiu econòmics, i que permeti una bona formulació estable en el temps. Finalment, per a poder procedir a les etapes de

registre previs a la comercialització com a biofungicida, no ha de provocar toxicitat a persones ni animals.

Finalment, com ja s'ha esmentat amb anterioritat moltes vegades els ACB poden ser un tractament complementari als tractaments tradicionals i per això seria interessant que presentés compatibilitat amb altres tractaments químics o físics (Viñas, 1997).

1.4.3 La soca *Pantoea agglomerans* EPS125, agent de control biològic contra *Penicillium expansum*

Pantoea agglomerans és un eubacteri Gram negatiu amb flagel·lació peritrica amb morfologia de bacil, anaerobi facultatiu i amb capacitat de produir pigments grocs en determinats medis de cultiu.

En el grup de Patologia Vegetal de la UdG es va realitzar una prospecció d'agents de biocontrol per malalties de postcollita en pomes i peres, en la que es va seleccionar la soca *P. agglomerans* EPS125 que va mostrar ser altament eficaç en el biocontrol de varies podridures en postcollita.

La soca EPS 125 redueix significativament la podridura blava en poma sota diferents condicions d'emmagatzematge en fred i la seva eficàcia no difereix molt dels tractaments amb fungicides de síntesis (Francés, 2000)

1.5 MILLORA DE L'EFICÀCIA DE BIOCONTROL

Els agents de biocontrol no són la solució a tots els problemes de les pèrdues per podridures fúngiques en pre i postcollita. S'han de considerar com elements que poden combinar-se amb altres mètodes perquè aquests siguin efectius. Un exemple seria la de combinar-los amb pesticides i fungicides (Pusey, 1994). També es poden combinar amb altres mètodes ja coneguts com la temperatura (Spadaro *et al.*, 2002a), termoteràpia (Barkai-Golan i Phillips, 1991), raigs ultravioleta (Chalutz *et al.*, 1992), productes animals o vegetals (Aharoni *et al.*, 1993), infiltracions de calci (Janisiewicz *et al.*, 1998), bicarbonat sòdic (Teixidó *et al.*, 2001) o etanol (Spadaro *et al.*, 2002b).

Una altra estratègia per millorar l'eficàcia dels ACB rau en l'ús de barreges d'agents de biocontrol que han de ser complementaris entre ells i no competitiu, per tal de ser més efectius que no pas un agent de biocontrol que actuï sol. Aquests poden tenir un espectre d'activitat més ampli i augmentar l'eficàcia (Janisiewicz, 1998). Tot i això, el biocontrol en poscollita sol afrontar-se amb un sol agent de biocontrol, ja que la utilització d'una barreja d'ACB fa que s'hagin d'estudiar totes les interaccions possibles.

Per a la millora d'un sol ACB poden tenir-se en compte dues vies diferents, la millora genètica i la millora fisiològica de les soca.

-Millora genètica

La millora genètica pot utilitzar estratègies basades en la sobreexpressió de gens implicats en la producció de metabòlits que són importants per assolir el biocontrol, essent aquests gens presents de manera natural en la soca o bé emprant una estratègia que incorpori també aquests nous gens. També es poden obtenir soques manipulades que produeixin nous compostos antimicrobians, o efectuar manipulacions genètiques que modifiquin el moment de la seva producció.

No obstant, el desenvolupament pràctic dels ACB modificats genèticament, està limitada per les regulacions legals de la UE, respecte a la utilització de organismes modificats genèticament.

-Millora fisiològica

L'aplicació pràctica d'un ACB, resulta moltes vegades ineficaç degut a la seva limitada supervivència en les plantes, provocada per condicions ambientals desfavorables. Mitjançant la millora fisiològica es provoquen canvis en les cèl·lules dels agents de biocontrol que les fan resistents a les condicions d'estrès. Aquesta millora es realitza durant el procés de producció dels bacteris, i per tant es podria dir que consisteix en una preadaptació a condicions desfavorables.

El desenvolupament de productes comercials requereixen la seva producció industrial i en el cas de formulacions en pols és necessari deshidratar el producte per aconseguir

un producte estable (Burgues i Jones, 1998). No obstant, degut als danys provocats durant el procés de deshidratació, les pèrdues de viabilitat cel·lular poden ser de varis ordres de magnitud. Resulta evident que la millora de la supervivència i la capacitat d'adaptació a situacions desfavorables, durant les diferents fases de producció, conservació i després de la seva aplicació en els diferents ambients (terra, rizosfera, part aèria, etc.), constitueix un dels punts crítics a superar en el desenvolupament d'aplicacions pràctiques de tot ACB.

Alguns microorganismes sobreviuen en condicions de baixa disponibilitat d'aigua quan són preadaptats durant el seu cultiu, mitjançant un procés fisiològic d'osmoadaptació (Csonka, 1989; Csonka i Hanson, 1991; Miller i Wood, 1996).

1.6 OSMOADAPTACIÓ

L'osmoadaptació és un procés fisiològic d'adaptació a la baixa disponibilitat d'aigua, que consisteix en l'acumulació intracel·lular de soluts compatibles, osmolits o en l'estabilització de les membranes (Csonka, 1989; Csonka and Hanson, 1991; Miller i Wood, 1996).

Existeixen diferents osmolits o soluts compatibles que es poden acumular intracel·lularment per contrarestar els desequilibris osmòtics i mantenir la turgència cel·lular (figura 1.2). Aquests osmolits es poden sintetitzar de nou o bé es poden transportar des del medi cap a l'interior de la cèl·lula. Entre els principals compostos que poden ser utilitzats com a osmolits, hi ha sucres, poliols, heteròsids, aminoàcids o derivats d'aminoàcids.

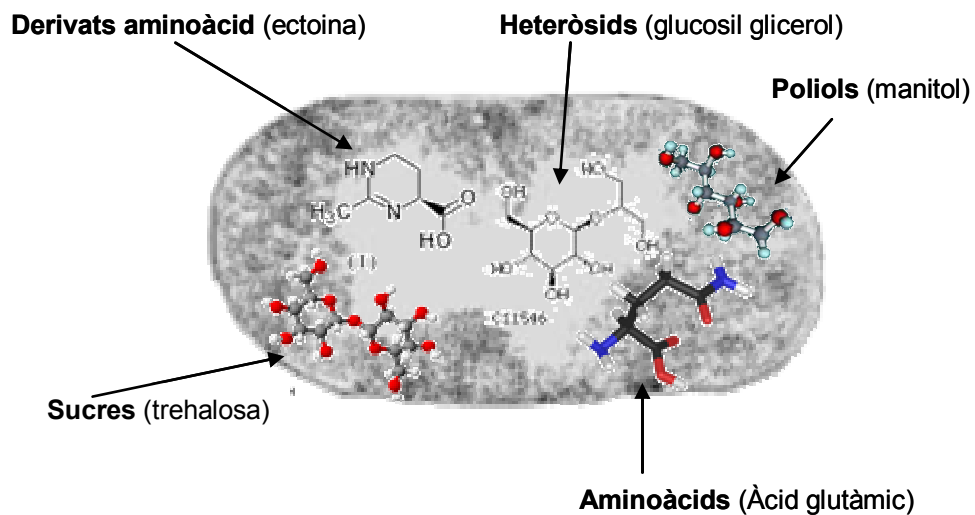


Figura 1. 2. Cèl·lula d'un bacteri amb alguns osmolits que es poden acumular intracel·lularment

Els soluts compatibles s'acumulen intracel·lularment fins a concentracions molt elevades sense inhibir cap procés i aconseguixen incrementar la tolerància de les cèl·lules enfront diferents condicions d'estrès com dessecament, temperatures elevades, congelació o elevada salinitat (Ramos *et al.*, 1997; Welsh i Herbert, 2000, Lamosa *et al.*, 2000)

2 OBJECTIUS

L'objectiu concret d'aquest treball rau en la determinació de l'eficàcia de la preadaptació de l'agent de biocontrol *Pantoea agglomerans* EPS 125 mitjançant la osmoadaptació per millorar la seva supervivència en la superfície de fruita. Per assolir aquest objectiu s'han plantejat els següents subobjectius:

1. Optimitzar les condicions de l'assaig pel que fa referència a la selecció del mètode per a la determinació dels nivells poblacionals de *P. agglomerans* EPS125 tant pel que fa referència al mètode de mostreig de la superfície del material vegetal (conjunt de petites superfícies circulars o superfícies rectangulars més grans) com de la selecció del tipus de sembra en placa (manual o automàtica).
2. Determinar l'efecte de l'osmoadaptació en la supervivència de *P. agglomerans* EPS125 en ferides i en la superfícies de pomes de la varietat Golden, sotmeses a diferents condicions d'humitat relativa durant el període d'incubació a una temperatura de 20 °C.

3 MATERIALS I MÈTODES

3.1 MEDIS DE CULTIU

3.1.1 Medis de cultius i tampons

Luria-Bertani, brou (LB)

Tryptona	10	g
Extracte de llevat	5	g
Clorur sòdic	10	g
Aigua destil·lada	1000	ml

- Autoclau a 121°C durant 20 min.

Luria-Bertani, Agar (LB)

Tryptona	10	g
Extracte de llevat	5	g
Clorur sòdic	10	g
Agar-agar	15	g
Aigua destil·lada	1000	ml

- Autoclau a 121°C durant 20 min.

Medi mínim

Glucosa	5.000	g
NH ₄ Cl	1.000	g
KH ₂ PO ₄	2.990	g
NaHPO ₄	2.410	g
NaCl	0.496	g
MgSO ₄	0.197	g
Aigua destil·lada	1000	ml

- Autoclau a 121°C durant 20 min.

Medi mínim + sal + glicina betaïna

Glucosa	5	g
NH ₄ Cl	1	g
KH ₂ PO ₄	2.990	g
NaHPO ₄	2.410	g
NaCl	40.910	g
MgSO ₄	0.197	g
Glicina betaïna (0.1 mM)	1	ml
Aigua destil·lada	1000	ml

- Autoclau a 121°C durant 20 min.

Tampó fosfat peptona

Na ₂ HPO ₄	7.0980	g
KH ₂ PO ₄	2.7218	g
Peptona	1	g
Aigua destil·lada	1000	ml

- Autoclau a 121°C durant 20 min.

Medi tampó d'aigua fisiològica

Es dissolien 9 g de NaCl en 1000 ml d'aigua destil·lada en una ampolla.

- Autoclau a 121°C durant 20 min.

3.1.2 Preparació dels medis de cultiu

Es van dissoldre els diferents components de cada medi en aigua destil·lada, dins d'una ampolla amb un iman a l'interior, i remogut per un agitador magnètic. Seguidament s'esterilitzava el medi a l'autoclau a 121°C durant 20 min. Acabat l'autoclau, es deixaven refredar els medis de cultiu que havien de ser sòlids dins un bany d'aigua destil·lada a una temperatura de 50°C. Un cop atemperats es van dispensar en plaques de Petri dins d'una campana de flux laminar.

Addició d'altres substàncies

- Rifampicina

En va preparar una solució de Rifampicina (50 µg /mL). Es dissolien 0.5 g de Rifampicina en 10 ml de metanol, obtenint una solució mare a una concentració de 50 mg/mL, ja que la Rifampicina no és soluble en aigua. Seguidament es guardava al congelador. S'afegia 1 mL de la solució a cada L de medi per obtenir una concentració de 50 µg/mL. Per això un cop el medi atemperat a 50°C es barrejava amb 1L de medi amb 1 ml de la solució de rifampicina.

- Glicina Betaïna (0.1 mM)

Es preparava la solució de Glicina-betaïna (0.1mM) i s'esterilitzaven per filtració dins la campana. Seguidament es guardava a la nevera per la seva millor conservació.

3.2 SOQUES BACTERIANES I CONDICIONS DE CULTIU

Es va utilitzar l'agent de biocontrol *Pantoea agglomerans* EPS 125, de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària de la UdG. En aquest treball es va emprar la soca EPS 125 R+, resistent a la rifampicina.

Es va partir de cultius de la soca *P. agglomerans* EPS 125 gliceritats i emmagatzemats a -80°C. Un cop descongelat el cultiu, amb l'ajut d'una nansa de Kille s'agafava una alíquota i se sembrava en estria en una placa de petri amb medi LB suplementat amb rifampicina. Tot això es va realitzar dins la campana de flux laminar per assegurar condicions d'esterilitat. Seguidament es va segellar amb cinta parafilm i s'incubava a 23°C durant 24 hores. Al cap de 24 hores, es tornava a sembrar l'agent de biocontrol a partir de la placa original en una nova placa del mateix medi i s'incubava durant 24 hores en les mateixes condicions. A partir d'aquestes plaques es van inocular els diferents medis per al seu creixement (figura 3.1).

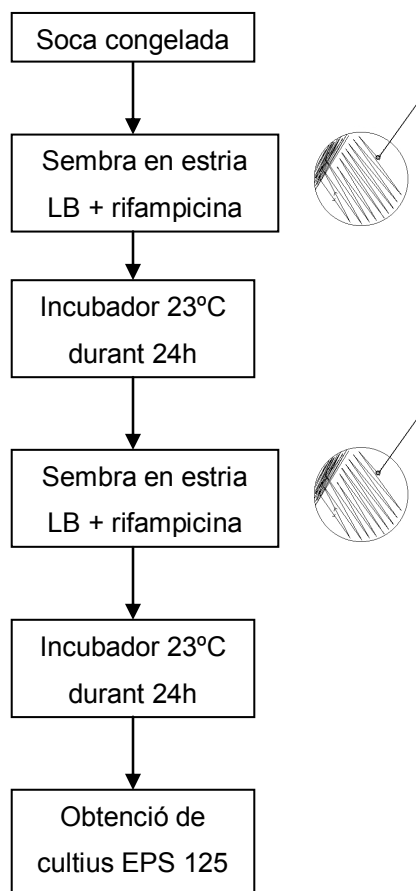


Figura 3. 1. Obtenció de cultius de *P. agglomerans* EPS 125

A partir d'aquest cultiu crescut en la placa de Petri, es va procedir a recollir unes colònies amb una nansa de KÖlle que es van dipositar en l'Erlenmeyer amb 50 ml dels diferents medis que es volien inocular, i es van deixar créixer en un agitador orbital a 120 r.p.m. a 22°C, fins assolir la fase estacionària.

Els medis utilitzats en aquest treball han estat medi LB com a medi complert i per poder determinar l'efecte de la preadaptació de les cèl·lules mitjançant osmoadaptació es va utilitzar el medi mínim (MM) com a control i el medi mínim salí suplementat amb glicina-betaïna (MMNaCl+GB).

Depenent del medi i com s'observa a la figura 3.2 els precultius i cultius de MM s'incubaven durant 48h, mentre que en el cas de l'LB i el MMNaCl+GB, s'incubaven solament 24h.

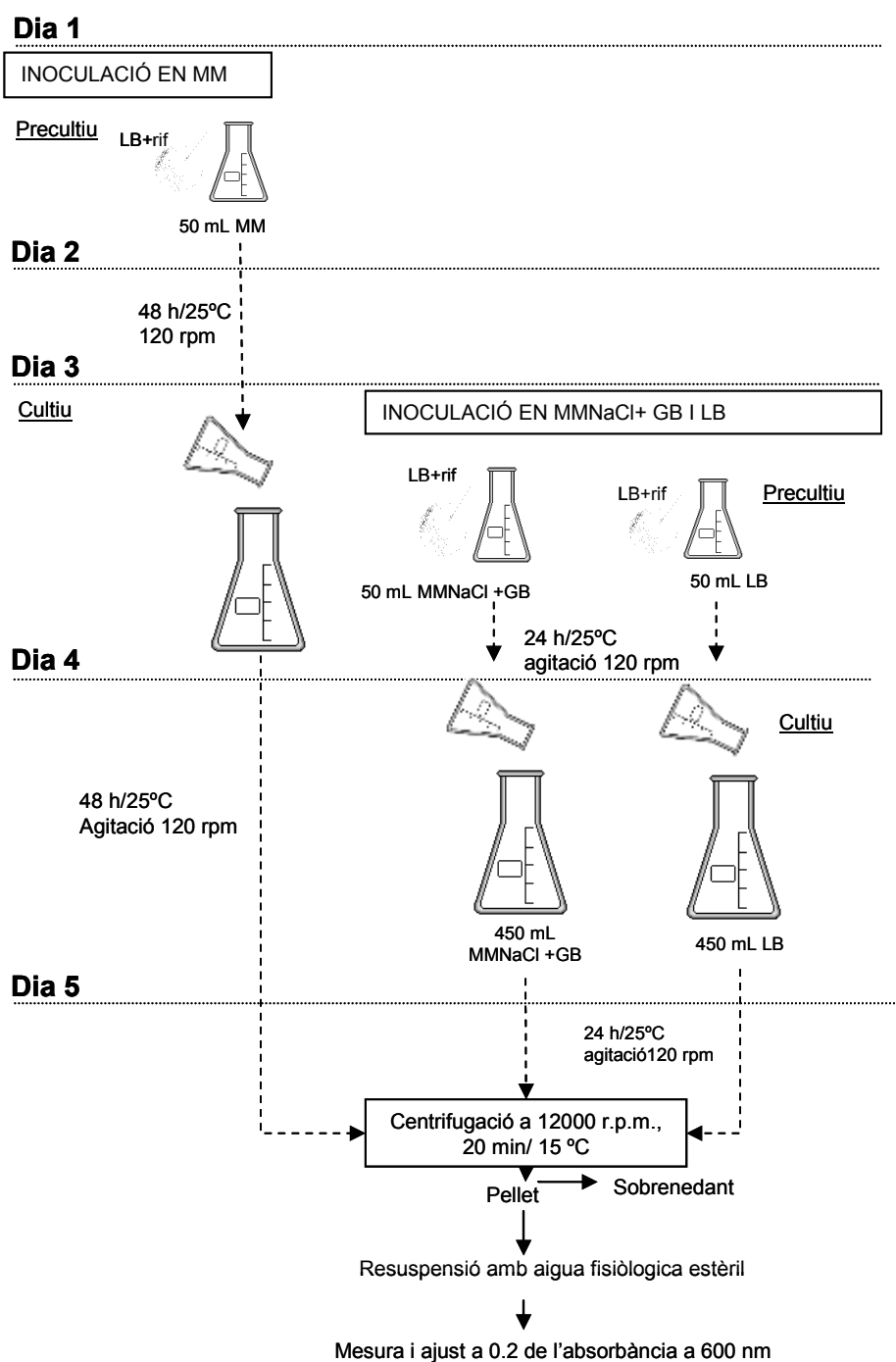


Figura 3. 2. Procediment seguit per obtenir els diferents cultius de *Pantoea agglomerans* EPS 125, en medi LB, MM i MMNaCl+GB, per a poder realitzar els assaigs.

Seguidament es van centrifugar els cultius a 12000 r.p.m. durant 20 min i a 15 °C. Es va llençar el sobrenadant i es van resuspendre les cèl·lules amb el mateix volum d'aigua fisiològica i posteriorment es va ajustar la concentració final a 10^8 ufc/mL.

Es van obtenir a partir dels tres medis de cultiu, solucions bacterianes ajustades a absorbàncies d'entre 0.20 a 0.30 a una longitud d'ona de 600 nm. Un de cop obtingudes aquestes absorbàncies es va procedir a realitzar un banc de dilucions decimals i a la seva sembra. Després d'una incubació de 24-48h a 25°C, es va procedir al recompte de les plaques i a obtenir els resultats expressats en ufc/mL. Amb els resultats obtinguts es va realitzar una ANOVA per determinar si hi havia influència del medi de cultiu en la relació entre l'absorbància i el recompte de viables.

3.3 OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE L'ASSAIG

En aquest apartat es va incloure la posta a punt dels mètodes de mostreig de material vegetal que s'utilitzarien per determinar els nivells poblacionals en superfície de poma de l'ACB i també dels mètodes de sembra en placa de Petri pel recompte de colònies bacterianes procedents de les mostres vegetals.

3.3.1 Material vegetal

Es van utilitzar pomes de la varietat Golden que provenien de la cooperativa Girona Fruits. Per realitzar l'assaig, les pomes que s'utilitzaven es seleccionaven en un punt òptim de maduració, sense ferides i el màxim d'homogènies possible, per intentar que no hi hagués variabilitat en els resultats.

Les pomes es van desinfectar per evitar que hi hagués algun agent indesitjable que interferís en els resultats. Primer es van rentar amb aigua amb lleixiu a una concentració del 5% (v/v) en clor actiu durant 3 min. Seguidament es va realitzar un rentat amb aigua de l'aixeta durant 3 min i finalment un darrer bany al cubell amb aigua destil·lada durant 3 min més.

Un cop desinfectats els fruits, es van deixar assecar a temperatura ambient al damunt d'un paper de filtre.

3.3.2 Inoculació de l'agent de biocontrol

Un cop obtingudes les suspensions de l'ACB procedents dels tres medis de cultiu a la concentració requerida segons s'ha explicat en l'apartat 3.2, i s'havia desinfectat el material vegetal, es van preparar els cubells amb les diferents suspensions per procedir a banyar el material vegetal. Per realitzar el tractament amb l'ACB es van submergir les pomes en els cubells durant 3 min.

Transcorregut aquest temps, les pomes es van col·locar en safates i posteriorment als corresponents incubadors, segons les condicions que es volien provar d'humitat relativa. La incubació dels fruits a les condicions d'humitat relativa que els pertocava es va realitzar en cambres d'ambient controlat (PGR-15, Conviron, Canada; SGC097.PFX.F, Fitotron, Sanyo Gallenkamp PLC, Regne Unit).

3.3.3 Selecció del mètode per a la determinació dels nivells poblacionals de *P. agglomerans* EPS 125 en la superfície de la poma

Es volia seleccionar el mètode de mostreig i de recompte de viables òptim per a determinar els nivells poblacionals de l'agent de biocontrol en la superfície de les pomes.

- **Selecció del mètode de mostreig**

Es van provar dos mètodes de mostreig de superfície de poma tractada per escollir quin era el més idoni per determinar el nivell poblacional dels bacteris. Els dos tipus de mostres que es van utilitzar van ser per una banda el conjunt de 6 cilindres d'1 cm de diàmetre per 0.5 cm de gruix extrets amb un trepant i per l'altra banda, dues tires superficials de poma de 5 cm de longitud per 1 cm d'amplada i 0.5 cm de gruix extretes amb un ganivet.

Per realitzar aquest assaig es va desinfectar el material vegetal tal com s'explica en l'apartat 3.3.1. Es van utilitzar suspensions del bacteri crescut en medi LB a una

concentració de 10^8 ufc/mL i es van tractar les pomes per immersió tal com s'explica en l'apartat 3.1.2.

Després, es van col·locar les pomes en safates de plàstic, amb paper absorbent i una mica d'aigua per aportar-hi humitat, i es van tancar amb una bossa de plàstic. Es van col·locar totes les safates en un incubador a una temperatura de 20°C i a una humitat del 60%, durant tots els dies de l'estudi.

A continuació, es va realitzar el mostreig de la superfície de poma mitjançant els dos mètodes al llarg del temps durant 14 dies realitzant un mostreig cada 2 dies amb un total de 8 mostres. Per cada mètode i data de mostreig es van realitzar 3 repeticions. Cada data de mostreig es mostrejaven 6 pomes (dues per tractament), de cada poma s'agafaven 3 cilindres d'1 cm de diàmetre per 0.5 cm de gruix, i una tira superficial de la pela de 5 cm de longitud per 1 cm d'amplada. D'aquesta manera, en les mostres de cilindres cada repetició estava formada per 6 cilindres provinents de dues pomes diferents (3 de cada poma) mentre que en les mostres de tires cada repetició estava formada per dues tires provinents de dues pomes diferents. Seguidament es van posar les mostres en una bossa de plàstic estèril amb 20 ml de tampó fosfat peptona i es van homogeneïtzar utilitzant un homogeneïtzador de pales (Masticator IUL Instruments) durant 1 min i 30s. Es va recollir la suspensió, i es van realitzar les dilucions oportunes per la posterior sembra en gota, en plaques amb medi LB + rifampicina.

Un cop es tenien les plaques sembrades es van segellar amb parafilm i es van incubar a 23 °C, durant 48 h. Finalment es va realitzar el recompte de colònies.

Per últim, es van posar totes les plaques a l'autoclau per esterilitzar abans de tirar-les a les escombraries.

• Selecció del tipus de sembra

Es volia comparar el mètode de recompte de viables tradicional mitjançant sembra en gotes de 40 µl i recompte manual amb el mètode automatitzat mitjançant sembra en espiral (Eddy Jet, IUL Instruments) i el comptador de colònies automàtic Counterstat (Counterstat flash, IUL Instruments). Per això es van utilitzar mostres amb un ampli

ventall de nivells poblacionals que havien sofert diferents tipus de tractament de preadaptació i d'incubació en material vegetal.

Per a determinar el nivell poblacional dels bacteris es van utilitzar mostres de superfície de pomes tractades amb *P. agglomerans* EPS125. Les pomes es van desinfectar tal com s'indica en l'apartat 3.3.1 i a continuació es van tractar per immersió amb EPS125 sotmesa a diferents tractaments: crecudada en LB, preadaptada en MMNaCl+GB i crecudada en MM tal com s'indica en l'apartat 3.2. A continuació, les pomes es van col·locar en safates amb alvèols dins d'incubadors amb dos tipus de humitat relativa: en humitat relativa alta (80%) i baixa (40%). Es van deixar incubar durant 15 dies i cada dos dies es van prendre mostres en un total de 8 dies diferents.

Per cada tractament (3), condició d'humitat (2) i data de mostreig (8) es van realitzar 3 repeticions. Cada repetició consistia en 2 tires de 5 cm per 1 cm de la superfície de 2 pomes. Les tires de superfície de poma es van col·locar en bosses de plàstic estèrils i 20 ml de tampó fosfat i es van homogeneïtzar amb un homogeneïtzador de pales (Masticator, IUL Instruments). Seguidament es van realitzar les oportunes dilucions fins aconseguir la concentració desitjada per poder sembrar i fer uns recomptes sense dificultats.

De cadascuna de les mostres es van determinar els viables per superfície de poma utilitzant els dos mètodes. Es va sembrar amb el sembrador automàtic en espiral i de manera manual en gota, en plaques de petri amb medi LB + rifampicina. En el sembrador automàtic es van sembrar dues plaques amb 50 µl cadascuna i en gota es van sembrar 3 gotes de 40 µl cada una. Posteriorment es van incubar les plaques a 23°C durant 48 h. Finalment es va realitzar el recompte utilitzant el mètode manual en el cas de les gotes i utilitzant un comptador de colònies automàtic en el cas del sembrador automàtic en espiral.

3.4 EFECTE DE L'OSMOADAPTACIÓ EN LA SUPERVIVÈNCIA DE *P. agglomerans* EPS125 EN FERIDES I EN LA SUPERFÍCIE DE LA POMA EN DIFERENTS CONDICIONS

Per a determinar l'efecte de l'osmoadaptació en la supervivència de *P. agglomerans* EPS125 en poma, es va realitzar un bioassaig en pomes de la varietat Golden. Els tractaments que es van comparar van ser les cèl·lules osmoadaptades amb cultiu en MMNaCl+GB, cèl·lules no osmoadaptades crescudes en MM i cèl·lules no osmoadaptades crescudes en medi LB. Les pomes tractades es van incubar en dues condicions d'humitat relativa diferents (40 i 90 %) i es van avaluar els nivells poblacionals del bacteri en la superfície (S) i també en dos tipus de ferides unes realitzades abans del tractament amb el bacteri (F1) i unes altres realitzades després del tractament amb el bacteri (F2).

El material vegetal es va desinfectar tal com s'explica en l'apartat 3.3.1, els fruits es van col·locar en safates i es van realitzar 3 ferides de 2 mm de diàmetre i 1 mm de profunditat en cada fruit utilitzant un trepant. A continuació es va fer el tractament per immersió amb el bacteri, tal com es descriu en l'apartat 3.3.2.

Per a determinar la concentració de *P. agglomerans* EPS 125 es van realitzar recomptes en placa en medi LB + Rif tant dels tubs on es barrejaven diferents quantitats de la suspensió original amb volums d'aigua fisiològica (fins assolir una absorbància a 600 nm de 0.2) com dels cubells on es va preparar la suspensió que s'emprava pel tractament.

Seguidament, es van col·locar les pomes en incubadors a la humitat relativa corresponent a cadascun dels tractaments de 90% a 20°C i 40% a 20°C tal com s'explica en l'apartat 3.3. Un dia abans de determinar els nivells poblacionals es van treure les pomes que s'utilitzarien en els posterior mostreig dels incubadors corresponents i es van realitzar 3 ferides addicionals de 2 mm de diàmetre i 1 mm de profunditat en cada fruit utilitzant un trepant. Aquestes ferides s'anomenen ferides 2 mentre que les realitzades a l'inici de l'assaig s'anomenen ferides 1. Els fruits es van tornar a posar als incubadors durant 24 h (figura 3.3)

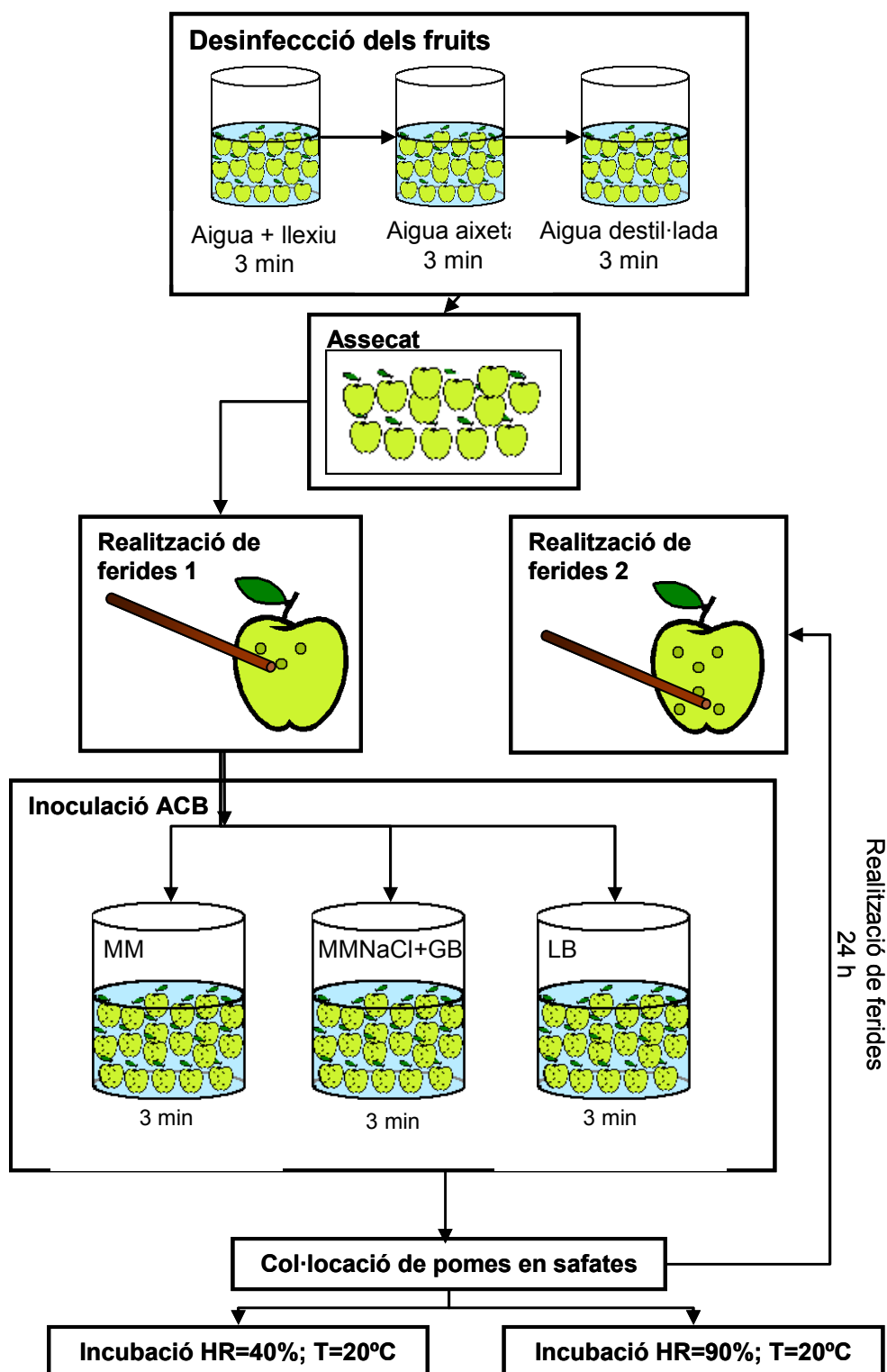


Figura 3. 3. Procediment per desinfecció, inoculació de l'ACB i incubació del material vegetal

Per cada tractament, condició d'incubació i data de mostreig es van realitzar 3 repeticions de 2 pomes cadascuna. Cada repetició consistia en 6 cilindres per les ferides realitzades abans del tractament amb els bacteris (3 per cada poma), 6 cilindres més per les ferides efectuades 24 h previs a cada mostreig (3 per cada poma) i 2 tires (1 per cada poma). (figura 3.4)

D'aquesta manera per cada data de mostreig hi havia 3 tractaments (LB, MM, MMNaCl+GB) per 2 condicions ambientals (40, 90 %HR) per 3 tipus de mostra de poma (ferida 1, ferida 2 i superfície) i 3 repeticions per cada per tant un total de 54 mostres a processar per cada data de mostreig.

Per determinar els nivells poblacionals de *P. agglomerans* EPS125 i per extreure els cilindres de les ferides, s'utilitzava un trepant d'1cm de diàmetre que inclogués la ferida de 2mm de diàmetre present a la mostra i un cop extret es tallava a la mida d'1cm. En el cas de la superfície es van utilitzar dos tires de 5cm de llargada per 1cm d'amplada utilitzant un ganivet.

Seguidament es van col·locar les mostres extretes en bosses de plàstic estèrils, es van afegir 20 mL de tampó fosfat peptona, les mostres es van homogeneïtzar amb un homogeneïtzador de pales durant 1min i 30s es va recollir la suspensió en un tub.

A continuació, es van realitzar dilucions de cada mostra en solució salina (9%) per tal de poder realitzar correctament el recompte de colònies un cop estiguessin sembrades. Un cop es tenien les dilucions desitjades, es van sembrar amb el sembrador automàtic en espiral en plaques d'agar LB + rifampicina. De cada tub de mostra es van sembrar 2 repeticions. Seguidament es van incubar les plaques a 23°C durant 48 h.

Finalment, es van determinar els nivells poblacionals de *P. agglomerans* EPS125 al llarg del temps, durant un període d'un mes. Es van apuntar els resultats obtinguts, i es van esterilitzar totes les plaques utilitzades amb l'autoclau, previ a la seva retirada a les escombraries. L'assaig es va realitzar dues vegades, per poder comparar els resultats.

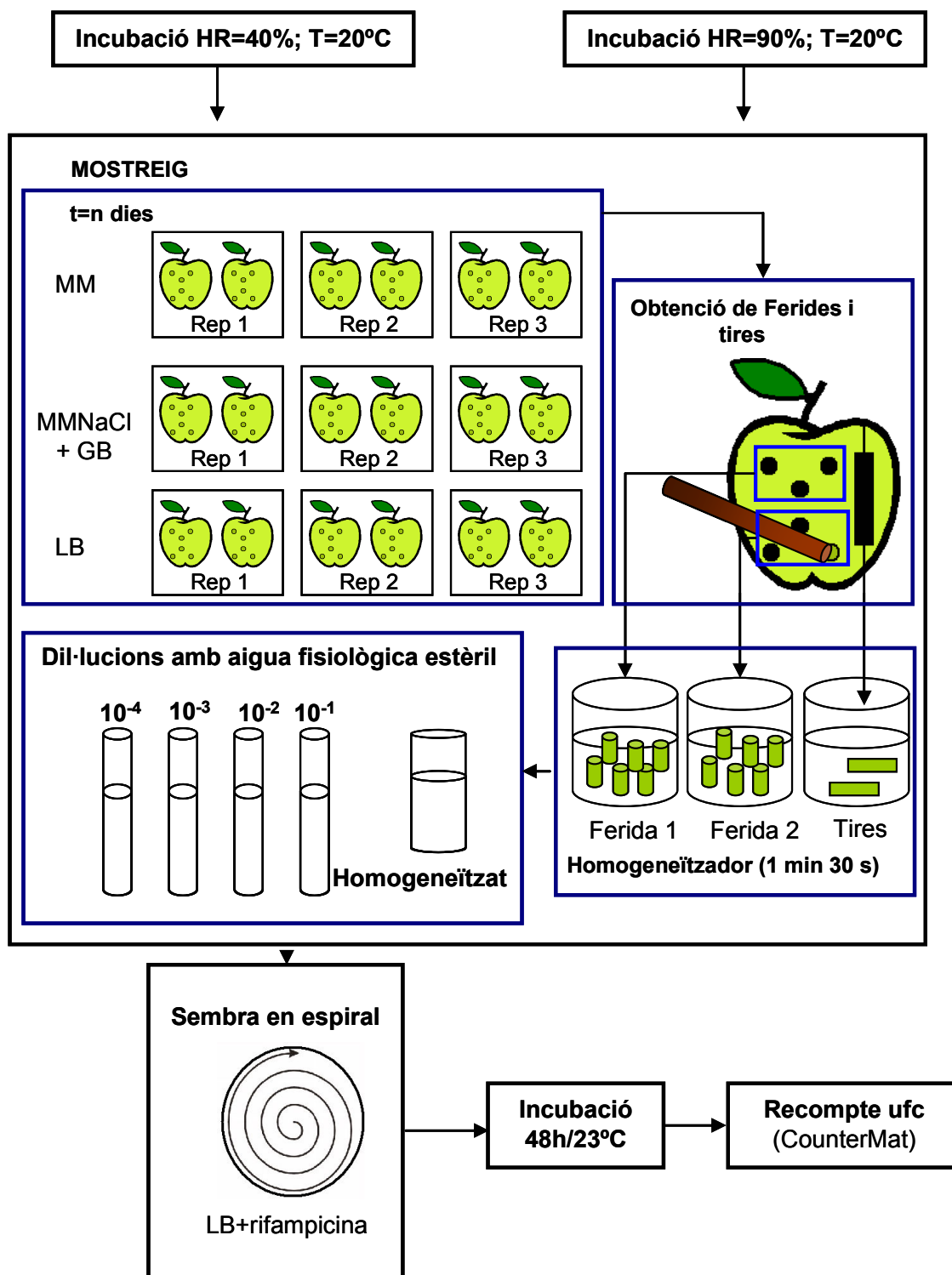


Figura 3. 4. Esquema d'obtenció de les mostres, dilucions, sembra i recompte de *P. agglomerans* EPS125.

3.5 AVALUACIÓ DELS RESULTATS I TRACTAMENT ESTADÍSTIC

Els nivells poblacionals en superfície de *P. agglomerans* EPS125 es van expressar en $\log_{10}$ ufc cm^{-2} , mentre que els nivells poblacionals per ferida es van expressar en $\log_{10}$ ufc per ferida. Es va calcular la mitjana logarítmica, la desviació estàndard i el interval de confiança amb una α de 0.05.

Per determinar si hi havia influència del medi de cultiu en la relació entre l'absorbància i el recompte de viables i també per provar si existien diferències entre els mètodes de mostreig utilitzat es va realitzar l'anàlisi de la variància. La separació de mitjanes es va realitzar segons el mètode Tukey $P \leq 0.05$. L'anàlisi estadístic es va realitzar utilitzant el procediment GLM del paquet estadístic SAS (Versió 8.2, SAS Institute Inc., NC, USA).

Per comparar els dos mètodes de recompte de viables tradicional i el mètode automatitzat es va realitzar per anàlisi de regressió utilitzant el programa sigmaplot (versió 9.0).

4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 EFECTE DE LES CONDICIONS DE CULTIU DE *P. agglomerans* EPS125 EN LA RELACIÓ ENTRE L'ABSORBÀNCIA I EL NOMBRE DE VIABLES

Es va voler determinar si les diferents condicions de cultiu (medis de cultiu diferents o diferents períodes de creixement dels bacteris) podrien afectar d'alguna manera en la relació entre l'absorbància i el recompte de viables. En aquest assaig es van utilitzar medis pobres com el medi mínim (MM) en el qual la taxa de creixement és molt baixa i que requereix períodes d'incubació molt alts per assolir la fase estacionària, també medis rics com LB en el qual la taxa de creixement és molt més gran i que per tant necessita molt menys temps per assolir la fase estacionària i el medi mínim amb sal i glicina betaïna (MMNaCl+GB) en el qual la taxa de creixement està entre les altres dues.

En la taula 4.1 es mostren els resultats de recomptes de viables obtinguts de suspensions d'una absorbància entre 0.2 i 0.3 obtingudes a partir de cultius en tres medis diferents.

Taula 4.1 Recompte de *P. agglomerans* EPS125 cultivada en diferents medis de cultiu a una absorbància entre 0.2 i 0.3.

MEDIS DE CULTIU (ufc/mL)		
LB	MM	MMNaCl + GB
$4.08 \cdot 10^8$	$4.00 \cdot 10^8$	$4.00 \cdot 10^8$
$2.66 \cdot 10^8$	$5.59 \cdot 10^8$	$6.66 \cdot 10^8$
$6.75 \cdot 10^8$	$5.83 \cdot 10^8$	$6.17 \cdot 10^8$

Els resultats de l'anova mostren que no hi ha diferències significatives entre els tres tractaments ($F=0.51$; $P=0.6220$). Totes les absorbàncies estudiades a una longitud d'ona de 600nm, equivalen entre 4 i $6 \cdot 10^8$ ufc/mL, que és la concentració de microorganismes que normalment utilitzem en els assajos per inocular les pomes.

Per tant podem utilitzar en assajos posteriors la mesura de l'absorbància entre 0.2 i 0.3 a 600 nm com a mètode per ajustar les concentracions de les suspensions de *P. agglomerans* EPS125 crescuda en medis de cultius molt diferents i períodes de creixement també molt diferents.

4.2 SELECCIÓ DEL MÈTODE DE MOSTREIG PER LA DETERMINACIÓ DELS NIVELLS POBLACIONALS DE *P. agglomerans* EPS125 EN SUPERFÍCIE DE POMA

Amb l'objectiu d'escollir un mètode ràpid i fàcil per a determinar els nivells poblacionals de *P. agglomerans* EPS 125 en la superfície de la poma, es van realitzar dues metodologies diferents. La primera consistia en extreure una tira de dimensions 5 cm llargada per 1 cm d'amplada, de pela de la poma, mentre que el segon descrit per altres autors (Bonaterra, 2005; Nunes *et al.*, 2001) consistia en extreure uns cilindres amb unes dimensions d'1cm de diàmetre per 0.5 cm de profunditat, de la superfície de la poma.

Taula 4.2 Relació entre els nivells poblacionals d'EPS125 en superfície de poma obtinguts mostrejant tires de la superfície i cilindres.

Mostres	Tipus mostra	Nivell poblacional (log ufc/cm ²)		
1	cilindre	3.11	± 0.16	b
	tira	3.94	± 0.07	a
2	cilindre	4.11	± 0.24	a
	tira	3.91	± 0.05	a
3	cilindre	4.35	± 0.17	a
	tira	3.68	± 0.06	b
4	cilindre	4.42	± 0.08	a
	tira	4.50	± 0.04	a
5	cilindre	4.03	± 0.17	a
	tira	3.85	± 0.02	a
6	cilindre	3.93	± 0.04	a
	tira	3.72	± 0.07	b
7	cilindre	2.98	± 0.15	b
	tira	4.24	± 0.08	a

Els resultats comparatius dels recomptes efectuats en diferents mostres extretes en diferents períodes de temps, es mostren a la taula 4.2. Es pot observar que en la majoria dels casos no hi ha diferències significatives entre els dos mètodes de mostreig. Tot i que en quatre casos si que es van observar diferències significatives, aquestes diferències no es poden relacionar amb el mètode utilitzat, ja que en dos casos el mètode de tires sobreestima i en els altres dos és en el mètode de cilindres en el que s'obté un resultat superior. Per tant

l'elecció del mètode de treball es va basar en la rapidesa i la facilitat per realitzar la metodologia de tires.

4.3 SELECCIÓ DEL MÈTODE DE RECOMPTE PER DETERMINAR ELS NIVELLS POBLACIONALS DE *P. agglomerans* EPS125 EN SUPERFÍCIE DE POMA

Es volia comparar el mètode de recompte automatitzat (espiral) amb el mètode de recompte tradicional (gota) amb l'objectiu de determinar els nivells poblacionals de l'EPS125 en superfície de poma amb més rapidesa. Per això es van utilitzar mostres amb diferents nivells poblacionals procedents de diferents tractaments i sotmeses a diferents condicions ambientals.

Per comparar els dos mètodes de sembra els valors obtinguts mitjançant la sembra en gota es van representar enfront els obtinguts de la sembra en espiral. Es van incloure tots els resultats obtinguts en els tres tractaments i en les dues condicions d'incubació. Com es pot observar en la figura 4.1 es va obtenir una bona correlació amb una $R^2 = 0.8804$ i una $P < 0.001$ i la recta que relaciona els nivells poblacionals obtinguts amb les dues metodologies de sembra i recompte és la següent:

$$\log_{10} \text{ufc/cm}^2 \text{ recompte en gota} = -1.5817 + 1.5604 \cdot \log_{10} \text{ufc/cm}^2 \text{ recompte en espiral}$$

A valors baixos de recomptes, la sembra en espiral dona recomptes superiors que en gota, mentre que a partir de recomptes superiors a 10^2 ufc/cm², els recomptes són força coincidents en els dos tipus de sembra. Per aquest motiu, es va decidir emprar en el treball la sembra en espiral emprant el comptador de colònies automàtic.

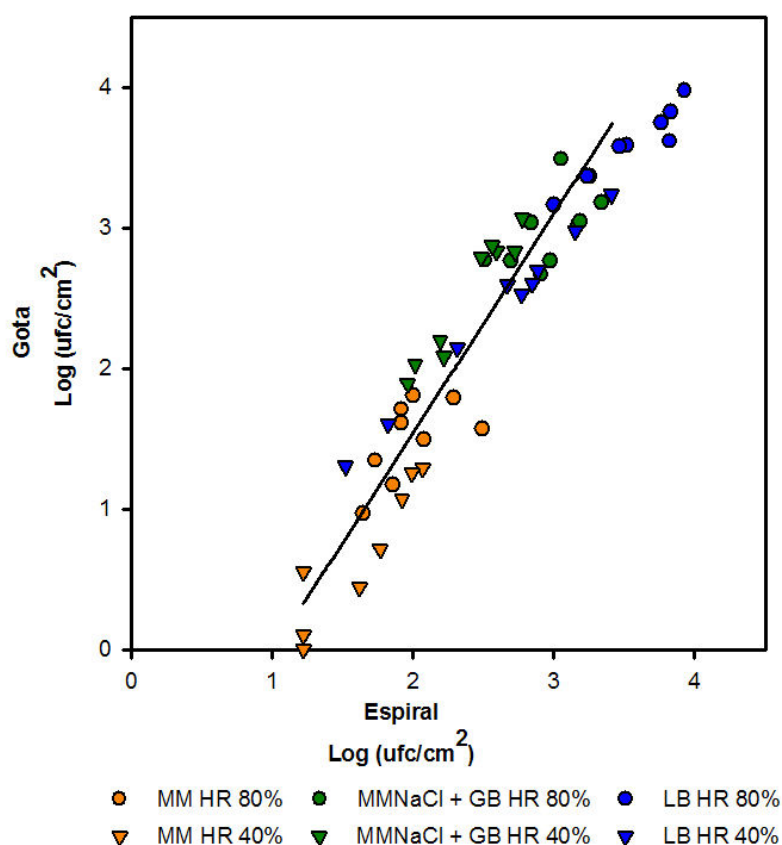


Figura 4.1 Relació entre els nivells poblacionals d'EPS125 en superfície de poma obtinguts realitzant el recompte automàtic per espiral i mitjançant gota.

4.4 EFECTE DE L'OSMOADAPTACIÓ EN LA SUPERVIVÈNCIA DE *P.agglomerans* EPS125 EN FERIDES I EN LA SUPERFÍCIE DE POMES

L'objectiu principal d'aquest assaig era determinar si mitjançant la preadaptació del bacteri per osmoadaptació s'aconseguia millorar la seva supervivència en la superfície de pomes, especialment quan aquestes estaven sotmeses en condicions d'estrès a baixa humitat relativa. Per això es van tractar les pomes amb *P. agglomerans* EPS125 cultivada en diferents medis de cultiu, dos en els que el bacteri no estava osmoadaptat (LB i MM) i un medi en que el bacteri estava osmoadaptat (MMNaCl+GB). Després de tractar les pomes es van sotmetre a dues condicions ambientals d'humitat relativa, una elevada (90%) en que no hi havia estrès i una baixa (40 %) en que si que hi havia estrès i on s'esperava una reducció

important dels nivells poblacionals dels bacteris. L'avaluació dels nivells poblacionals es va realitzar tant en ferides com també en la superfície. A més, es van realitzar dos tipus de ferides. La ferida 1 es va realitzar just abans del tractament amb els bacteris, en aquestes ferides els bacteris entren en el moment del tractament i estan relativament protegits ja que tenen les condicions òptimes de nutrients i es poden multiplicar. La ferida tipus 2 es va realitzar 24 h abans del mostreig per tant els bacteris que les colonitzen són els que es troben en la superfície just en el punt on es provoca la ferida i que poden multiplicar-se durant només 24 h, per tant aquest tipus de mostra constitueix una mostra d'enriquiment dels bacteris que es troben en la superfície 24h abans de realitzar el mostreig.

A la taula 4.3 es mostren els resultats obtinguts en els recomptes de les suspensions bacterianes procedents dels diferents tractaments, en els tubs on s'ajustava l'absorbància a 600 nm a 0.2 i els recomptes dels cubells on es realitzava la immersió de les pomes.

Taula 4. 3. Recomptes de les ufc/ml de les suspensions ajustades a una Absorbància de 0.2 a 600 nm, del tub original i els recomptes de les suspensions preparades per a fer els diferents tractaments en els cubells.

Medi	ufc/mL			
	Assaig 1		Assaig 2	
	Abs 0.2 tub	Cubell	Abs 0.2 tub	Cubell
MM	$3.1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$4.1 \cdot 10^8$	$3.5 \cdot 10^8$
MMNaCl + GB	$3.2 \cdot 10^8$	$2.1 \cdot 10^8$	$3.8 \cdot 10^8$	$1.4 \cdot 10^8$
LB	$2.9 \cdot 10^8$	$2.7 \cdot 10^8$	$4.2 \cdot 10^8$	$6.4 \cdot 10^8$

Com es pot observar els resultats obtinguts en els dos assajos en els tubs són coincidents, estan al voltant de $3 \cdot 10^8$ ufc/ml i de $4 \cdot 10^8$ ufc/ml en el primer i segon assaig respectivament. No obstant, en el moment de la preparació dels volums grans en els cubells, seguint les relacions de barreja de volum/volum de suspensió original i aigua fisiològica tamponada, els resultats difereixen. En el primer assaig, si bé el tractament MMNaCl+GB i en medi LB estan al voltant de $2 \cdot 10^8$ ufc/ml, el MM està a la meitat de la concentració desitjada (10^8 ufc/ml), mentre que en el segon assaig hi ha molta més variabilitat, estant el MMNaCl+GB a més baixa concentració i l'LB a la concentració més alta. Evidentment aquests resultats fan pensar que possiblement seria necessari en posteriors treballs realitzar l'ajust de l'absorbància en el cubell de tractament, per a poder garantir d'aquesta manera una uniformitat en la concentració bacteriana. Tot i que evidentment, és més difícil per a tenir

una bona homogeneïtzació de grans volums de suspensió, evitaria el fet de partir inicialment de concentracions diferents en els tres tractaments utilitzats.

A la figura 4.2 i 4.3 es mostren els resultats obtinguts en els recomptes de les ferides 1 i 2 i a la superfície de les pomes al llarg del temps dels dos assaigs realitzats.

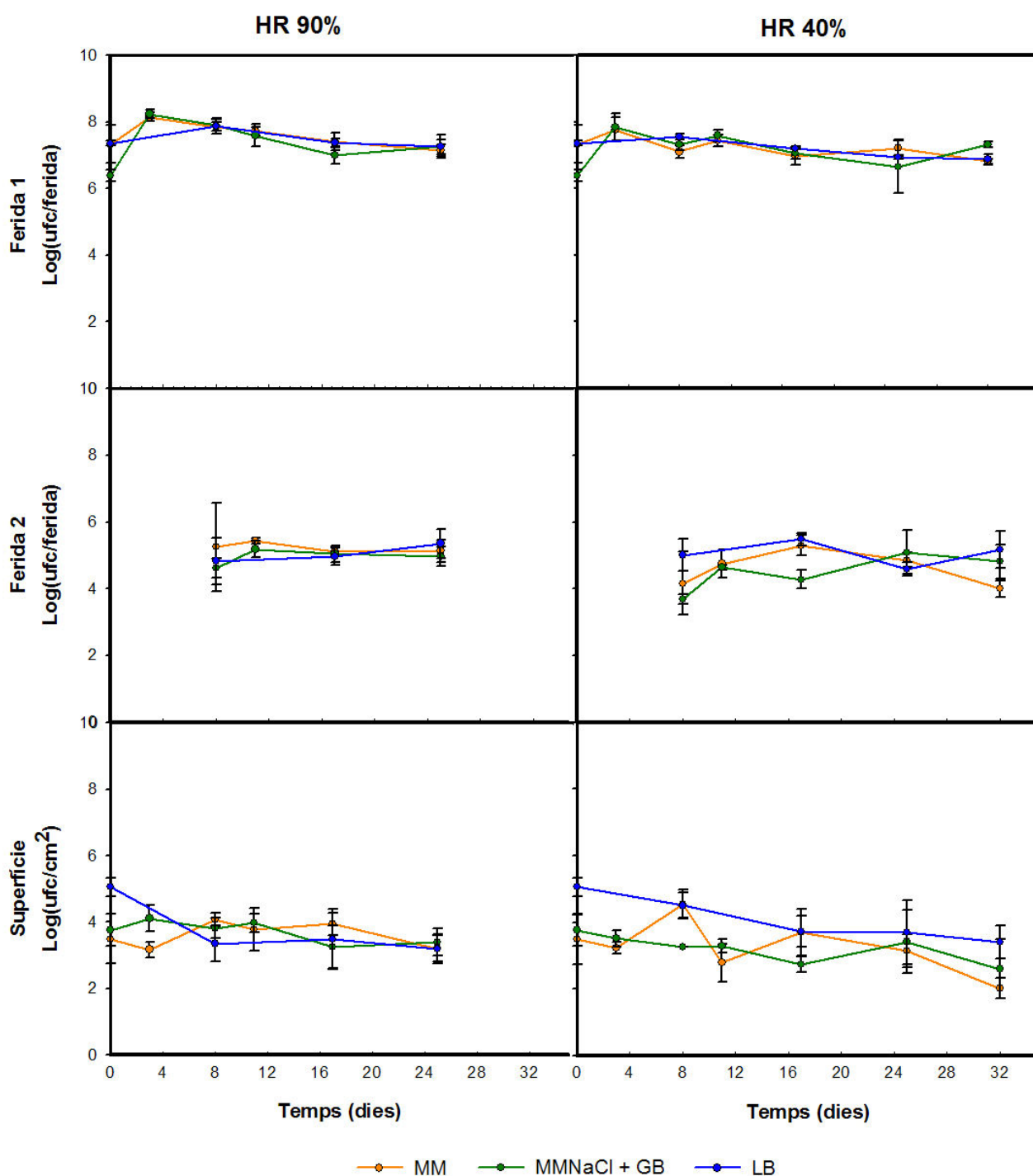


Figura 4.2 Nivells poblacionals de *P. agglomerans* EPS125 en els diferents tractaments en les ferides realitzades al inici de l'assaig (ferida 1), les realitzades 24 h abans del mostreig (ferida 2) i en la superfície de pomes a 20°C i a dues condicions d'humitat relativa (90 i 40 %). Resultats corresponents a l'assaig 1

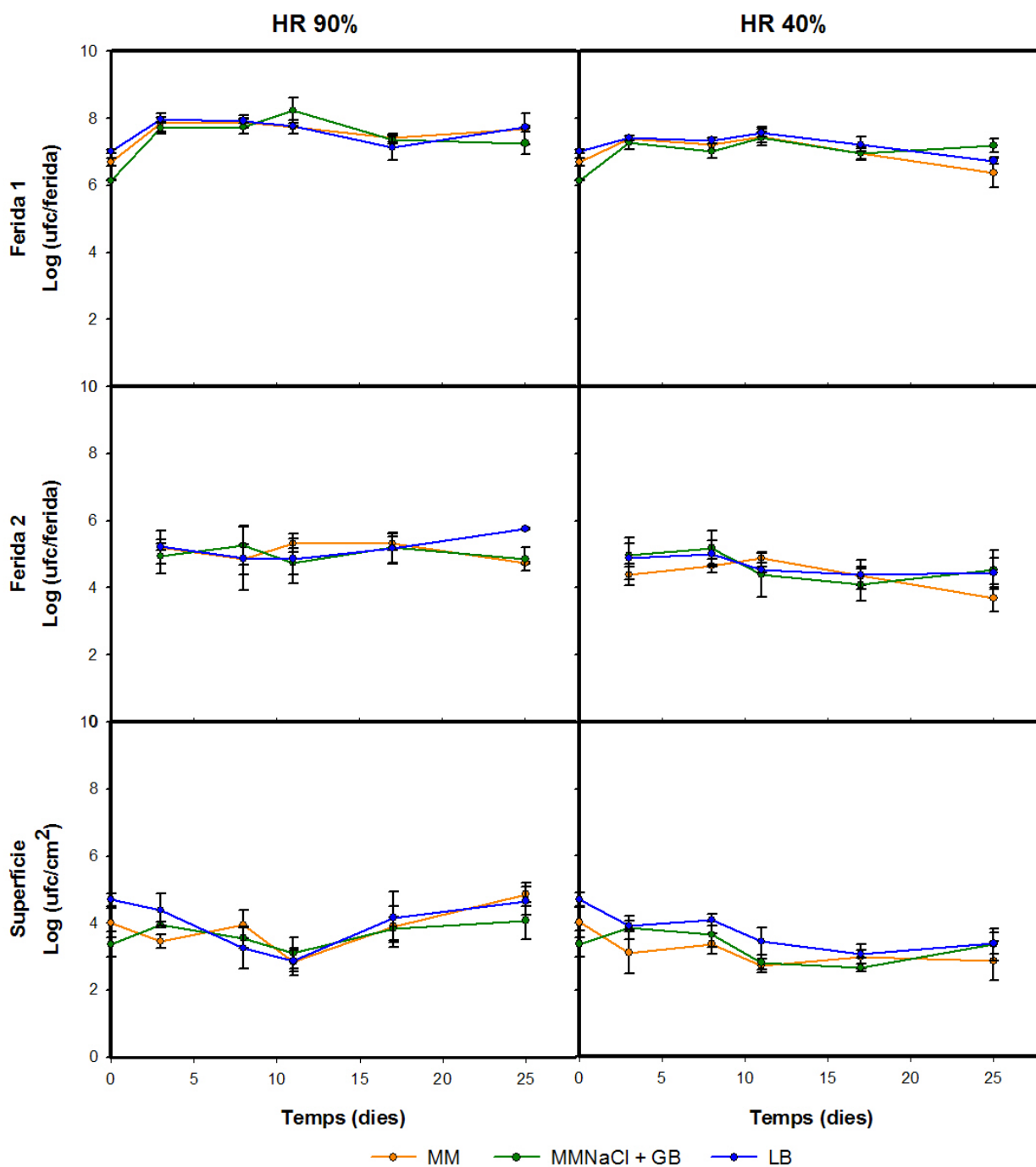


Figura 4.3. Nivells poblacionals de *P. agglomerans* EPS125 en els diferents tractaments en les ferides realitzades al inici de l'assaig (ferida 1), les realitzades 24 h abans del mostreig (ferida 2) i en la superfície de pomes a 20°C i a dues condicions d'humitat relativa (90 i 40 %). Resultats corresponents a l'assaig 1.

En els resultats dels nivells poblacionals obtinguts en les ferides 1 s'observa una elevada variabilitat en el primer punt de mostreig corresponent al moment posterior al tractament. Aquestes diferències es podrien atribuir als diferents recomptes observats en els cubells ja que coincideixen amb les diferències observades en les suspensions del tractament. Tot i això estan entre 10^6 i 10^7 ufc/ferida i a les 24 h assoleixen en tots els tractaments concentracions al voltant de 10^8 ufc/ferida en pomes sotmeses a humitat relativa elevada mentre que concentracions del voltant de 10^7 ufc/ferida en pomes sotmeses a humitats baixes. Possiblement els resultats obtinguts indiquen que la capacitat de càrrega en les ferides si que es veu influenciada per les condicions ambientals a les que està sotmès tant els bacteris com el material vegetal. Si observem els resultats en els dos assajos podem concloure que en les ferides els bacteris assoleixen una capacitat de càrrega màxima a les 24 h i mantenen aquesta població fins al final de l'assaig (30 dies) no observant-se diferències entre tractaments. Les diferents condicions d'humitat relativa a les que s'han sotmès les pomes no han fet que s'observessin diferències entre tractaments. Aquest creixement i estabilització de la població en ferides concorda amb els resultats obtinguts per altres autors (Nunes *et al.*, 2001) que van observar-ho en pomes sotmeses a condicions d'humitat relativa elevada amb la soca *P. agglomerans* CPA-2. Pel que fa a la manca de diferències entre els tres tractaments de preadaptació els resultats també coincideixen amb els obtinguts per Bonaterra i col. (2005) amb la mateixa soca emprada en aquest treball. Aquests resultats són els esperats donat que en les ferides les condicions ambientals són les òptimes pel desenvolupament dels bacteris donat la riquesa de nutrients i el contingut d'aigua present, independentment de les condicions ambientals exteriors.

Els nivells poblacionals de *P. agglomerans* que s'assoleixen en les ferides 2 (realitzades 24 h abans del mostreig) són una mostra enriquida dels bacteris que es troben en la superfície 24h abans de realitzar el mostreig i que han pogut multiplicar-se només durant 24 h. En els dos assajos podem observar que en les pomes sotmeses a elevada humitat relativa els nivells poblacionals es troben al voltant de 10^5 ufc/ferides mentre que al 40 % d'humitat relativa estan entre 10^4 i 10^5 ufc/ferida. Pel que fa referència al material sotmès a condicions de baixa humitat relativa observem que en el primer assaig hi ha gran variabilitat en els recomptes al llarg del temps entre els tres tractaments i en el segon assaig s'observa una disminució dels nivells poblacionals a partir del tercer mostreig que es dona per igual en els tres tractaments. Aquesta mesura és un reflex indirecte de la població que hi ha en la superfície i si que es podria pensar que les condicions d'incubació són determinants i per

això es produeix una lleugera davallada en els recomptes obtinguts a humitat relativa baixa. No s'observen diferències entre els tres tractaments de preadaptació en cap de les condicions assajades. Això seria esperable en condicions d'humitat relativa elevada en que els bacteris tenen condicions òptimes però no en les condicions d'humitat relativa baixa. Les condicions d'humitat relativa baixa provoquen un estrès als bacteris que redueix els seus nivells poblacionals en la superfície de les pomes i en aquestes condicions els bacteris preadaptats mitjançant osmoadaptació presumiblement haurien de sobreviure millor que els que no han estat preadaptats. Tot i això s'ha de pensar que al tractar-se d'un enriquiment dels bacteris que es trobaven en la superfície aquests resultats podrien emascarar les diferències que podrien existir realment en la superfície.

En la superfície de les pomes els nivells poblacionals oscil·len al llarg dels 30 dies a nivells entre 10^3 i 10^4 ufc/cm² a humitats relatives elevades i 10^2 i 10^4 ufc/cm². Els resultats obtinguts al llarg del temps són molt iguals en els dos assajos i en les dues condicions ambientals assajades als obtinguts en les ferides 2 tot i que els recomptes són evidentment inferiors i presenten més variabilitat. Això fa pensar que els recomptes en les ferides tipus 2, són realment un reflex dels nivells poblacionals presents en la superfície i per tant, seria útil en el cas de que els recomptes en superfície es trobessin per sota el nivell de detecció de la tècnica de mostreig de la superfície. No hi ha diferències entre els nivells poblacionals dels bacteris sotmesos als tres tractaments de preadaptació ni en el cas de les pomes sotmeses a humitat relativa elevada ni tampoc en les pomes sotmeses a humitat relativa baixa. Aquests resultats són els esperats i coincideixen amb els obtinguts per altres autors en les condicions d'humitat relativa alta ja que en aquestes condicions els bacteris no estan estressats i per tant la preadaptació mitjançant osmoadaptació no millora la supervivència perquè ja és molt bona (Bonaterra *et al.*, 2005). En canvi, els resultats difereixen pel que fa als nivells poblacionals de les pomes sotmeses a baixa humitat relativa ja que en el mateix estudi els nivells poblacionals del bacteri EPS125 disminueixen en pomes sotmeses al 40 % d'humitat relativa durant 15 dies fins a nivells de 10 ufc/cm² en bacteris no preadaptats mitjançant osmoadaptació mentre que els bacteris preadaptats mitjançant osmoadaptació només es redueixen fins a 10^3 ufc/cm². En el nostre cas aquestes diferències no es van observar. Això podria ser degut a que els nivells poblacionals de les pomes sotmeses a condicions de baixa humitat relativa no van disminuir suficientment com per poder trobar diferències entre els tractaments de preadaptació o no dels bacteris.

5 CONCLUSIONS

Les conclusions a les que s'ha arribat en aquest treball han sigut les següents:

- 1- Les condicions de creixement de *P. agglomerans* EPS125, en quant al medi de cultiu i condicions d'incubació no afecta a la relació entre l'absorbància i el nombre de viables.
- 2- Per a mesurar el nivell poblacional en la superfície de pomes Golden es poden utilitzar indistintament els dos mètodes de mostreig provats, ja que s'obtenen resultats semblants si s'empren un conjunt de petites superfícies circulars o mostres rectangulars més grans .
- 3- Hi ha una bona correlació entre el mètode de sembra i recompte automàtic i el mètode de sembra en gota i recompte manual per a determinar els nivells poblacionals de *P. agglomerans* EPS125 en la superfície de les pomes.
- 4- No s'han observat diferències en la supervivència de *P. agglomerans* EPS125 en ferides i superfície de pomes que posessin de manifest la millora fisiològica de la soca deguda a la preadaptació de l'ACB per osmoadaptació.
- 5- S'ha observat que els nivells poblacionals determinats en ferides realitzades 24 h abans del mostreig, constitueixen un enriquiment dels nivells poblacionals presents en la superfície. Per tant aquest tipus de mostreig podria ser útil en mostres en els que els nivells poblacionals fossin inferiors al nivell de detecció

6 BIBLIOGRAFIA

Aharoni, Y.; Copel, A. and Fallik, E. 1993. Hinokitiol (b-thujaplicin), for postharvest decay control on "Galia" melons. N.Z. J. Crop Hortic. Sci., 21, 165-169.

Barkai-Golan, R. and Phillips, D.J. 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. Plant Dis., 75, 1085-1089.

Bonattera, A.; Cabrefiga, J.; Camps, J. and Montesinos, E. 2007. Increasing survival and efficacy of a bacterial biocontrol agent of fire blight of rosaceous plants by means of osmoadaptation. FEMS Microbiol. Ecol., 61, 185-195.

Bonattera, A.; Camps, C. and Montesinos, E. 2005. Osmotically induced trehalose and glycine betaine accumulation improves tolerance to desiccation, survival and efficacy of the postharvest biocontrol agent *Pantoea agglomerans* EPS125. FEMS. Microbiol. Lett. 250, 1-8.

Bonattera, A.; Francés, J.M.; Badosa, E.; Cabrefiga, J. and Montesinos, E. 2002. Nueva cepa bacteriana biofungicida para el control biológico de podredumbres fúngicas en poscosecha de fruta. PHYTOMA España. 144, 91-94.

Burgues, H.D. and Jones, K.A. 1998. Trends in formulation of microorganisms and future research requirements. In: Formulation of Microbial Pesticides. Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments. Ed. Burgues, H.D. pp 311-331. London: Kluwer Academic.

Chalutz, E.; Droby, S.; Wilson, C.L. and Wisniewski, M.E. 1992. UV-induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. Phyto-chem. Phytobiol. B. Biol. 15, 367.

Csonka, L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev. 53, 121-147

Csonka, L.N. and Hanson, A.D. 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. Annu. Rev. Microbiol. 45, 569-606.

Droby, S. and Chalutz, E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: Biological control of postharvest diseases. Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, WV, USA, pp. 63-75.

Francés, J. 2000. Bases experimentales para la implementación de un control racional de podredumbres fúngicas y fisiopatías en posrecolección de pera en la zona frutícola de Girona. Tesis doctoral. Universidad Pública de Navarra.

Ippolito, A. and Nigro, F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Prot.* 19, 715-723.

Irtwange, S.V. 2006. Application of Biological Control Agents in Pre-and Postharvest Operations. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. Invited Overview No. 3. vol 8.

Janisiewicz, W.J.; Conway, W.S.; Glenn, D.M. and Sams, C.E. 1998. Integrating biological control and calcium treatment for controlling postharvest decay of apples. *HortScience.*, 33(1), 105-109.

Janisiewicz, W. (1/1999). Blue mold, *Penicillium* spp. Accessible a: www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Moho_azul/Penicillium_exp1.jpg; [consulta 27/12/2007]

Kuc, J. and Strobel, N.E. 1992. Induced resistance using pathogens and nonpathogens. *In* ES Tjamos, ed, *Biological Control of Plant Diseases*. Plenum Press, New York, pp 295-303

Lamosa, P.; Burke, A.; Peist, R.; Huber, R.; Liu, M.Y.; Silva, G.; Rodrigues-Pousada, C.; LeGall, J.; Maycock, C. and Santos, H. 2000. Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate: a new compatible solute from the hyperthermophile. *Archaeoglobus fulgidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1974-1979.

Merino-Pacheco, M. 2006. Producción de fruta y hortaliza. *Revista Horticultura* 190

Miller, K. J. and Wood. J.M. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 50, 101-136

National Academy of Sciences of the USA. 1987. Regulating Pesticides in Foods. The delaney paradox. Washington, DC, USA: National Academy Press. pp. 272

Nunes, C; Usall, J; Teixidó, N and Viñas, I. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 53-61.

Ogawa, J.M.; Zehr, E.I.; Bird, G.W.; Ritchie, D.F.; Uriu, K. and Uyemoto, J.K.(eds). 1995. Compendium of stone fruit diseases. APS, St Paul, Minnesota. pp. 98.

Olivé, S.M. 2006. Avaluació de l'especificitat d'un marcador molecular per a la detecció de l'agent de control biològic *Pantoea agglomerans* EPS125. Projecte/Treball final de carrera. Universitat de Girona.

Pusey, P.L. 1994. Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies. In: Wilson, C.L.; Wisniewski, M.E.(Eds). Biological control of postharvest diseases. Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, WV, USA, pp. 77-78.

Ramos, A.; Raven, NDH.; Sharp, R.J.; Bartolucci, S.; Rossi, M.; Cannio, R.; Lebbing, J.; Van der Oost, J.; de Vos W.M. and Santos, H. 1997. Stabilization of enzymes against thermal stress and freeze-drying by mannosylglycerate. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4020-4025.

Roy D.; Sleator, D. and Hill, C. 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolites in bacterial stress and virulence. FEMS Microbiol. Rev. 26, 49-76

Snowdon, A.L. 1990. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 1: General introduction and fruits. Pp. 302. Wolfe Scientific Ltd. Barcelona.

Spadaro, D.; Vola, R.; Piano, S. and Gullino, M.L. 2002a. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. Postharvest Biol. Technol. 24, 123-134.

Spadaro, D.; Piano, S.; Duverney, C. and Gullino, M.L. 2002b. Use of microorganisms, heat treatment, and natural compounds against Botrytis rot on apple. Proc. 2nd International Conference on the Alternative Control Methods Against Plant Pests and Diseases, Lille, France, 4-7 March 2002. Ed. AFFP, Paris, France, pp. 446-453.

Spadaro, D. and Gullino, M. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruits diseases. Int. J. Food Microbiol. 91, 185-194.

Teixidó, N.; Usall, J.; Palou, L.; Asensio, A.; Nunes, C. and Viñas, I. 2001. Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. Plant Pathol., 107(7), 685-694.

Viñas, I. 1997. Control biológico de las principales enfermedades fúngicas post-cosecha. PHYTOMA España, No. 90

Welsh, D.T.; Bourgues, S.; De Wit, R and Herbert, R.A. 2000. Seasonal variations in nitrogen fixation (acetylene reduction) and sulphate reduction rates in the rhizosphere of *Zostera noltii*: nitrogen fixation by sulphate reducing bacteria. *Marine Biology*. 125, 619–628.

Wilson, C.L. and Wisniewski, M.E. 1994. Biological control of postharvest diseases. Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, WV, USA, pp. 77-78.

Wilson, C.L. and Wisniewski, M.E. 1989. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: an Emerging Technology. *Annu. Rev. Phytopathol.* vol 27 pp. 425-41

Wisniewski, M.E.; Wilson, C.L. and Hershherger, W. 1989. Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacae*. *Can. J. Bot.* 67, 2317-2323.