

Càtedra
AgroBank



**TESI GUANYADORA DEL “II PREMI CÀTEDRA AGROBANK
A LA MILLOR TESI DOCTORAL”**



Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agrària
Departament de Tecnologia
d'Aliments

New advances in the control
of brown rot in stone fruit using
the biocontrol agent
Bacillus amyloliquefaciens CPA-8



Amparo María Gotor Vila

PhD Thesis
Lleida, July 12th 2017

RESUM DE LA TESI GUANYADORA DEL "II PREMI CÀTEDRA AGROBANK A LA MILLOR TESI DOCTORAL"

Autora: Dra. Amparo M^a Gotor Vila.

Directors: Dra. Neus Teixidó Espasa i Dr. Josep Usall Rodié.

Títol: *New advances in the control of brown rot in stone fruit using the biocontrol agent Bacillus amyloliquefaciens CPA-8.*

La podridura marró causada pel fong *Monilinia* spp. és responsable d'importants pèrdues en la postcollita de la fruita de pinyol, assolint el 80 % de la producció quan les condicions de temperatura i humitat són favorables pel desenvolupament de la malaltia, especialment en varietats de maduració tardana. Fins a la data, l'ús de fungicides sintètics segueix essent la forma més eficaç per prevenir malalties fúngiques, causants de tan greus pèrdues en la producció de diferents cultius. No obstant això, la llista de productes autoritzats a Europa per a ús en postcollita és molt limitada. A més a més, hi ha una gran consciència social respecte a la sostenibilitat de les pràctiques agrícoles, un increment en l'agricultura ecològica i la necessitat de prevenir l'aparició de soques fúngiques resistents a fungicides. Tot això ha promogut la recerca de mètodes alternatius que impliquin una reducció en el nombre d'aplicacions químiques en el camp.

Entre els mètodes de control, l'aplicació d'estratègies respectuoses amb el medi ambient, com ara les que utilitzen agents de biocontrol (ABCs) sols o en combinació amb tractaments fisicoquímics, s'ha tingut enormement en compte durant les últimes dècades per científics i empreses de tot el món. No obstant això, aquesta pràctica no s'aplica actualment de manera rutinària en la indústria fructícola.

Recentment s'ha demostrat la capacitat antagonista de la soca CPA-8 de *Bacillus amyloliquefaciens* (aïllat de la microbiota del préssec), el qual és capaç de controlar la podridura marró del préssec causada pel fong *Monilinia* spp. Aquesta habilitat es deu principalment a la seva capacitat de produir lipopèptids del grup de les fengicines. No obstant això, encara que existeix una gran varietat de treballs que descriuen diferents microorganismes eficaços en el control de malalties de postcollita, la quantitat de productes basats en ABCs disponibles al mercat, és considerablement baixa. Per tant, **l'objectiu principal d'aquesta tesi és completar el desenvolupament de l'ABC *B. amyloliquefaciens* CPA-8 per així obtenir un producte eficaç que proporcioni una estratègia comercialment viable en el control de la podridura marró de la fruita de pinyol.**

En primer lloc es van dissenyar dos marcadors per detectar i identificar molecularment l'ABC CPA-8. Per a tal propòsit, es va elaborar una col·lecció de 77 soques de

Bacillus spp., incloent individus amb diferent grau de similitud filogenètica. En una primera aproximació, el marcador SCAR-4 (basat en la metodologia RAPD) va amplificar un fragment semi-específic de 665 pb, el qual no només va donar positiu per la soca CPA-8, sinó també per unes altres 12 soques (totes elles morfològicament diferents a CPA-8 i fàcilment distingibles prèviament a l'amplificació de l'ADN). En conseqüència, es va desenvolupar un segon marcador (265 pb) molt més precís a partir del gen *RBAM 007760*. Aquest gen està implicat en l'adaptació ecològica del bacteri, principalment en l'adhesió superficial bacteriana i varia notablement entre espècies i fins i tot, soques similars. Paral·lelament, es va estudiar la particularitat genètica del gen *trp E*, però va quedar descartat durant el treball. Arran d'aquest estudi, els coneixements adquirits en la genètica de CPA-8 van permetre demostrar que aquesta soca està estretament relacionada amb espècies del grup *B. amyloliquefaciens* en lloc de *B. subtilis* (el qual va ser el seu primer nom en la literatura).

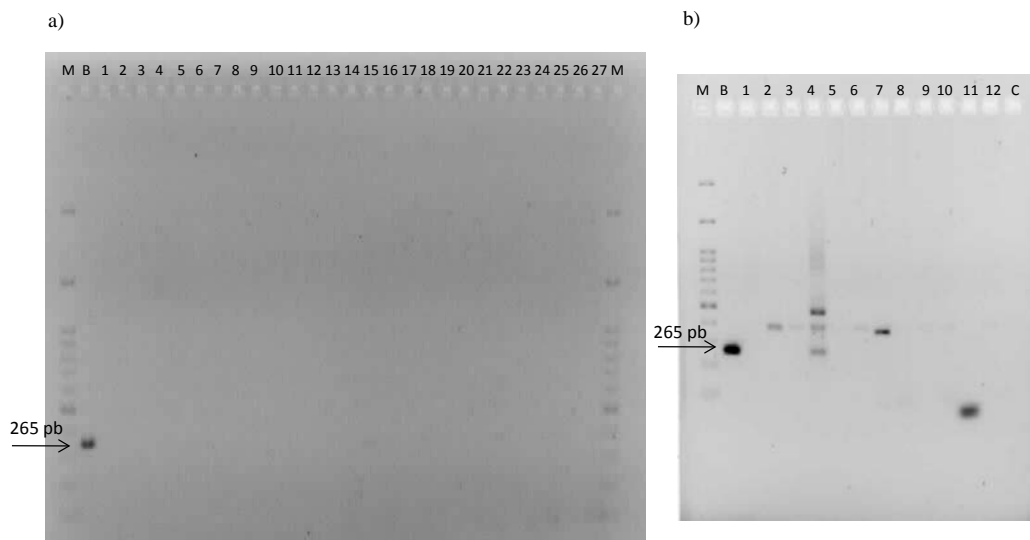


Figura 1. Exemple del marcador gen-específic de CPA-8 obtingut amb la parella d'encebadors F2/R2 del gen *RBAM 007760* (a). Exemple de com aquest marcador permet distingir entre les soques (no diana) positives pel marcador scar-4 (b). Les fletxes indiquen l'amplificació del marcador per CPA-8 en un subconjunt de soques de la col·lecció.

A continuació, i amb la intenció de conèixer millor el microorganisme en qüestió, es van realitzar una sèrie de treballs que van permetre caracteritzar en gran mesura la biologia i fisiologia de la soca CPA-8. Es va descriure la capacitat de CPA-8 per créixer en diferents condicions de temperatura- pH i de temperatura-activitat d'aigua (a_w). Les dades obtingudes mitjançant l'anàlisi espectrofotomètric del creixement bacterià (a partir de la llum absorbida a $\lambda = 700$ nm) van ser analitzades aplicant la modelització primària sigmoïdal de Baranyi & Roberts (1994), per tal de calcular la ràtio de màxim creixement (h^{-1}) i la durada de la fase de retard "lag" (h). Els resultats van revelar que, mentre que CPA-8 no va poder créixer a pH inferior a 4.5, el creixement òptim es va observar a 37 ° C i pH entre 7 i 5. A més a més, el tipus de solut utilitzat per reduir l' a_w (glucosa o glicerol) va tenir una gran influència en la a_w

mínima en la qual el bacteri va poder créixer. L' a_w més baixa pel creixement de CPA-8 en medi modificat amb glicerol i glucosa va ser de 0.950 i 0.960, respectivament. No obstant això, a 20 °C, CPA-8 no va ser capaç de créixer a menys de 0.990 a_w , independentment del tipus de solut utilitzat per modificar el medi.

Continuant amb la caracterització de CPA-8, també es van realitzar proves per determinar la seva susceptibilitat i/o resistència a diferents antibiòtics. Els resultats van indicar que CPA-8 era clarament resistent a la higromicina. A més a més, es va realitzar un assaig (basat en amplificació per PCR) per detectar la presència de gens enterotòxics (complex proteic HBL “Hemolisina BL” i complex proteic no hemolític “NHE”) propis de *Bacillus cereus* en CPA-8. Aquest estudi va suggerir que, tot i que el gen *nheA* va amplificar en CPA-8, això no és suficient per a l'expressió de toxicitat, suggerint així que aquesta soca no és un patògen de transmissió alimentària. *B. cereus* ha estat tradicionalment considerat com l'espècie més problemàtica del gènere *Bacillus* en la indústria alimentària per la seva capacitat de produir enterotoxines que poden provocar diarrea i vòmits en els consumidors. Aquest estudi va demostrar que el complex HBL no està present en CPA-8 i que, tot i que el gen *nheA* (del complex NHE) va amplificar en CPA-8, no és suficient per a l'expressió de toxicitat, suggerint que aquesta soca no és un patògen de transmissió alimentària.

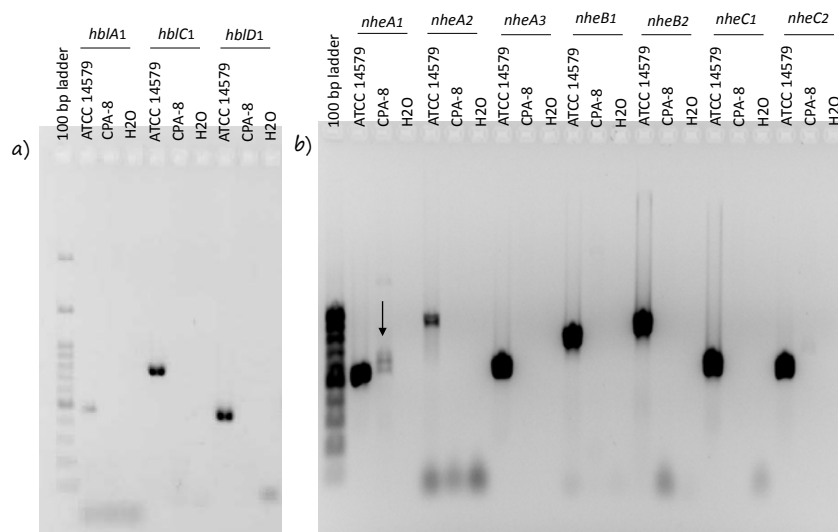


Figura 2. Productes amplificats a partir dels encebadors dels gens enterotòxics de *B. cereus*: a) complex HBL i b) complex NHE. Els gens diana estan indicats a la figura i el subíndex indica la bibliografia d'on s'han obtingut els encebadors i les condicions d'amplificació: (1) Hansen and Hedriksen, 2001; (2) Ngamwongsatit et al. (2008), and (3) Kumar et al. 2010, and. L'amplificació de CPA-8 pel gen *nheA1* s'indica amb una fletxa.

Continuant amb la caracterització de la soca CPA-8, es va contemplar la possibilitat que aquesta demostrés diferents modes d'acció al prèviament descrit (producció de fengicines). En aquest treball, es va demostrar l'efecte antifúngic dels compostos orgànics volàtils (VOCs) emesos per CPA-8 contra *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* i

Botrytis cinerea. Aquests compostos es van avaluar amb un assaig de doble placa petri per analitzar el seu efecte en el creixement del miceli i el nombre de colònies crescudes de cada patògen diana un cop co-cultivades amb diferents concentracions de CPA-8 (assajos *in vitro*); a continuació, també es va estudiar l'efecte dels VOCs en cireres inoculades artificialment amb els patògens esmentats (assajos *in vivo*). A més a més, els principals volàtils emesos per CPA-8 es van identificar mitjançant cromatografia de gasos en fase sòlida de microextracció (SPME) com 1,3 pentadiè, acetoïna (3-hidroxi-2-butanona) i tiofè.

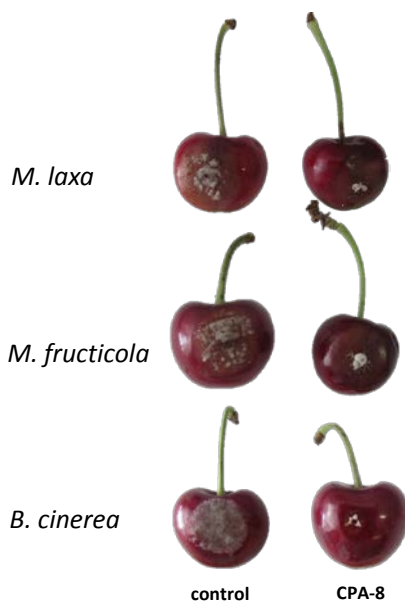


Figura 3. Efecte dels compostos orgànics volàtils emesos per la soca CPA-8 crescuda en medi TSA, de l'anglès Triptone Soy Agar, en cireres artificialment inoculades amb *M. laxa*, *M. fructicola*, i *B. cinerea*.

No obstant això, **i atenent al complex procés que comporta la comercialització de productes de biocontrol, un dels principals colls d'ampolla és el desenvolupament de formulacions que puguin ser emmagatzemades de manera estable sense perdre eficàcia.** La formulació d'un microorganisme ha de ser econòmica de produir, fàcil de distribuir, contenir suficients UFC i tenir una llarga vida útil (preferentment emmagatzemats a temperatura ambient i durant almenys 6-24 mesos). **Amb aquest propòsit, es va voler millorar el medi de producció utilitzat fins ara, avaluant tres fonts de nitrogen diferents.** El medi de cultiu basat en l'aïllat proteic de soja PROSTAR 510A (20 g L⁻¹) va proporcionar la millor corba de creixement de CPA-8, en comparació amb l'extracte bullit de farina de soja desgreixada (DSF) i l'extracte proteic PROSTAR 510A (10 g L⁻¹). D'aquesta manera es van evitar els inconvenients que causava el medi DSF cru (utilitzat en treballs previs a aquesta tesi), el qual implicava un alt índex de contaminació per l'alta càrrega microbiana de la farina a més a més de complicacions en la seva elaboració per la seva baixa solubilitat en aigua i la formació de grumolls.

Un cop millorat el medi, **es va estudiar la capacitat de CPA-8 per produir endòspores en les noves condicions de producció.** Aquestes estructures permeten al microorganisme sobreviure en condicions hostils, com ara la les elevades temperatures assolides en el procés d'assecat. Es va observar que la producció d'endòspores de CPA-8 està altament relacionada amb l'edat del cultiu (la quantitat produïda augmentava considerablement conforme el temps de cultiu era més llarg, de 24 a 72 h), arribant a obtenir una concentració superior a 10^8 UFC mL⁻¹.

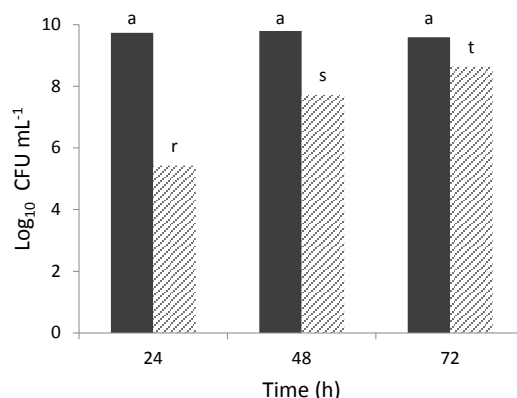


Figura 4. Producció d'endòspores de CPA-8 crescut en medi de cultiu amb la proteïna PROSTAR 510A 20 g L⁻¹ durant 24, 48 i 72 h. La figura mostra les UFC de CPA-8 abans (■) i després de ser exposades a un bany d'aigua a 80 °C durant 12 minuts (▨). Diferents lletres indiquen diferències estadístiques d'acord al test Tukey's HSD ($P < 0.05$).

El proper pas es va centrar en l'avaluació i comparació de tres tecnologies diferents per formular CPA-8: líquida, liofilització i assecat per llit fluïditzat-atomitació.

A més a més, es va avaluar l'efecte de diferents protectors en la viabilitat, l'estabilitat i l'activitat antagonista de CPA-8. Tot i que finalment es van obtenir concentracions satisfactòries tant pels productes líquids ($1.9 \cdot 10^9$ – $2.9 \cdot 10^9$ UFC mL⁻¹) com pels productes sòlids ($4.8 \cdot 10^9$ – $1.0 \cdot 10^{10}$ UFC g⁻¹), es va considerar que la tecnologia d'assecat per llit fluid-atomitació era la més adequada pel desenvolupament de productes basats en CPA-8 estables i eficaços per a posteriors aplicacions pràctiques. Aquesta tecnologia innovadora (usada generalment en la indústria farmacèutica) permet emprar temperatures no molt elevades per obtenir una quantitat considerable d'un producte de molt bona dispersió, sense la necessitat d'extrusió prèvia i d'una manera ràpida i econòmica. **Una vegada que es va definir el millor procés d'assecatge per formular CPA-8, va ser necessària una posterior optimització d'alguns paràmetres i així obtenir un major rendiment. En particular, aquest treball es va centrar en l'efecte dels protectors i dels materials de suport emprats durant la fluïdificació.** L'ús dels protectors 20 % de sacarosa més 10 % de llet en pols va resultar ser la millor combinació per formular CPA-8 tant quan es va emprar maltodextrina com a substrat com quan es va utilitzar el midó de patata. Aquests dos productes (que d'ara endavant es denominaran BA3 -formulats amb maltodextrina, i BA4 -formulats amb midó de patata-) van ser seleccionats per a posteriors

assajos de vida útil i eficàcia. Els resultats van revelar que la viabilitat del CPA-8 es va mantenir estable després de 15 mesos d'emmagatzematge a 4 i 22 °C, obtenint concentracions entre $7.8 \cdot 10^9$ i $1.2 \cdot 10^{10}$ UFC g^{-1} . D' altra banda, l'eficàcia d'aquests dos productes formulats davant de *Monilinia* spp. va ser demostrada en préssecs, nectarines, paraguaians, cireres, albercocs i prunes.

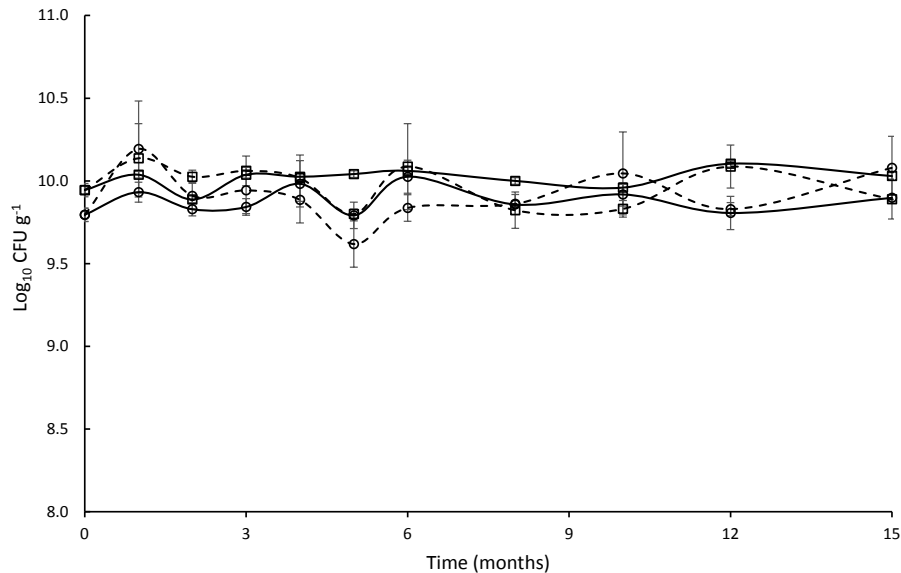


Figura 5. . Vida útil dels productes de CPA-8 després de ser emmagatzemats durant 15 mesos a diferents temperatures: producte BA3 emmagatzemat a 4 (○—) i 22 °C (○- -) i producte BA4 emmagatzemat a 4 (■—) i 22 °C (■- -). Els valors són la mitjana de tres determinacions i les barres indiquen la desviació estàndard.



Figura 6. Exemple de l'eficàcia dels productes de CPA-8 optimitzats en nectarines artificialment inoculades amb *M. laxa*. Esquerra: control, centre: producte BA3 i dreta: producte BA4

Posteriorment, es va estimar la dinàmica poblacional de CPA-8 a la superfície de nectarines i préssecs un cop tractats amb els productes formulats de CPA-8 (BA3 i BA4) i exposats a diferents condicions ambientals. CPA-8 va demostrar una àmplia tolerància a diferents valors extrems de temperatura, humitat relativa i pluja (essent aquest últim factor el

més restrictiu). La població mínima de CPA-8 obtinguda després de l'exposició va ser gairebé sempre superior a 10^4 UFC cm^{-2} de superfície del fruit, garantint així una gran cobertura del tractament (i per tant, major biocontrol). Els resultats també van indicar que els préssecs proporcionaven, generalment, un nínxol més adequat pel manteniment de CPA-8 sobre la superfície de la fruita que les nectarines. A més a més, les propietats dels dos productes formulats van influir enormement en la dinàmica poblacional de CPA-8 sobre la fruita, suggerint que el producte formulat BA4 va afavorir una major supervivència de CPA-8.



Figura 7. Muntatge per a la simulació de pluja en l'estudi de la dinàmica poblacional dels productes de biocontrol en la superfície de la fruita. El simulador consisteix en una caixa metàl·lica (100x50x20 cm) amb agulles hipodèrmiques a la base que generen un sistema de degoteig en funció de la pressió de la columna d'aigua continguda a la caixa.

Finalment, pel desenvolupament d'ABCs comercialment funcionals, cal realitzar assajos en condicions reals de camp, incloent experiments amb el cultiu complet (i no només en fruits). Per això, l'última part d'aquesta tesi va tenir com a objectiu avaluar el potencial de diferents formulacions de CPA-8 en el control de la podridura marró en camps comercials de préssec. **Específicament, es va estudiar la dosi de tractament de CPA-8, la dinàmica poblacional de CPA-8 un cop aplicat en camp i l'eficàcia de CPA-8 en el control de *Monilinia* spp., tant en la collita com en la postcollita.** Els resultats van demostrar que, depenent de la pressió de la malaltia (principalment condicionada per la meteorologia) es va obtenir un grau variable de control biològic. Sota una alta incidència de *Monilinia* spp. a camp (>50 %), només el tractament químic va controlar la malaltia a postcollita (a collita ni tan sols el químic demostrà gairebé efecte comparat amb el control). Altrament, quan la presència del patògen s'engloba dins dels límits estàndards registrats a la zona (5.3 i 17.3 % d' incidència de *Monilinia* spp. en collita i postcollita, respectivament), els tractaments basats en formulacions de CPA-8 demostraren ser eficaços. A la collita, els productes BA3 i BA4 van reduir considerablement la incidència de *Monilinia* spp. (encara que menys que els productes químics).

D'altra banda, el tractament amb el producte BA4 va reduir eficaçment la malaltia en postcollita i fins i tot estadísticament similar a les aplicacions químiques. **També es va avaluar l'eficàcia de CPA-8 un cop aplicat juntament amb altres ABCs.** En aquest cas es va escollir *Penicillium frequentans*, el qual ja havia estat descrit com antagonista de *Monilinia spp.* No obstant això, aquesta combinació no va augmentar l'eficàcia de CPA-8. A més a més, es va demostrar la persistència de CPA-8 a la superfície del fruit des que s'aplica el tractament fins a la collita i posterior postcollita.

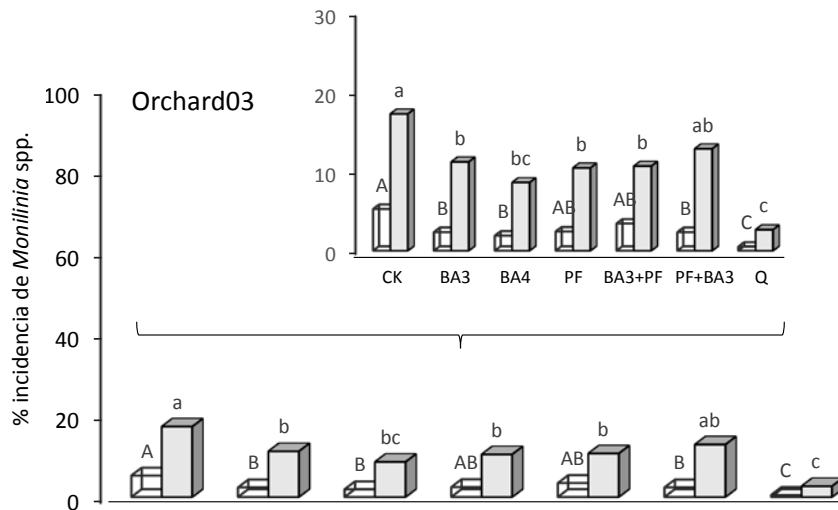


Figura 8. Eficàcia dels tractaments basats en CPA-8 (BA3 i BA4) sols o en combinació amb l'agent de biocontrol *P. frequentans* (PF) enfront de la incidència de *Monilinia spp.* (%) en collita () i postcollita (). Com a control es va avaluar arbres no tractats (CK) i tractats a base de productes químics (Q). Diferents lletres indiquen diferències estadístiques d'acord al test Tukey's HSD ($P < 0.05$).



Figura 9. Imatges corresponents a diferents fases dels assajos a camp: aplicació del tractament, avaluació dels resultats en període de collita i emmagatzematge de la fruita per la seva avaluació en postcollita

Finalment, aquesta tesi inclou **un exhaustiu estudi sobre la monitorització del comportament de la soca CPA-8 després de la seva aplicació** en un camp de paraguaià. Es van contemplar els fruits, les fulles i l'herba circumdant tant d'un arbre tractat com d'aquells que l'envolten a diferents distàncies. Amb aquest propòsit, es van utilitzar tècniques de gravimetria, papers hidrosensibles i l'estimació de la població de CPA-8 mitjançant tècniques de cultiu i moleculars. Aquest treball va demostrar una bona distribució, persistència i adaptació de la soca CPA-8 no només a camp sinó també en condicions de postcollita. Aquestes dades, a més a més de proporcionar informació per un millor disseny de programes per al control de la malaltia, proporcionen informació crucial per la fase de registre del producte.

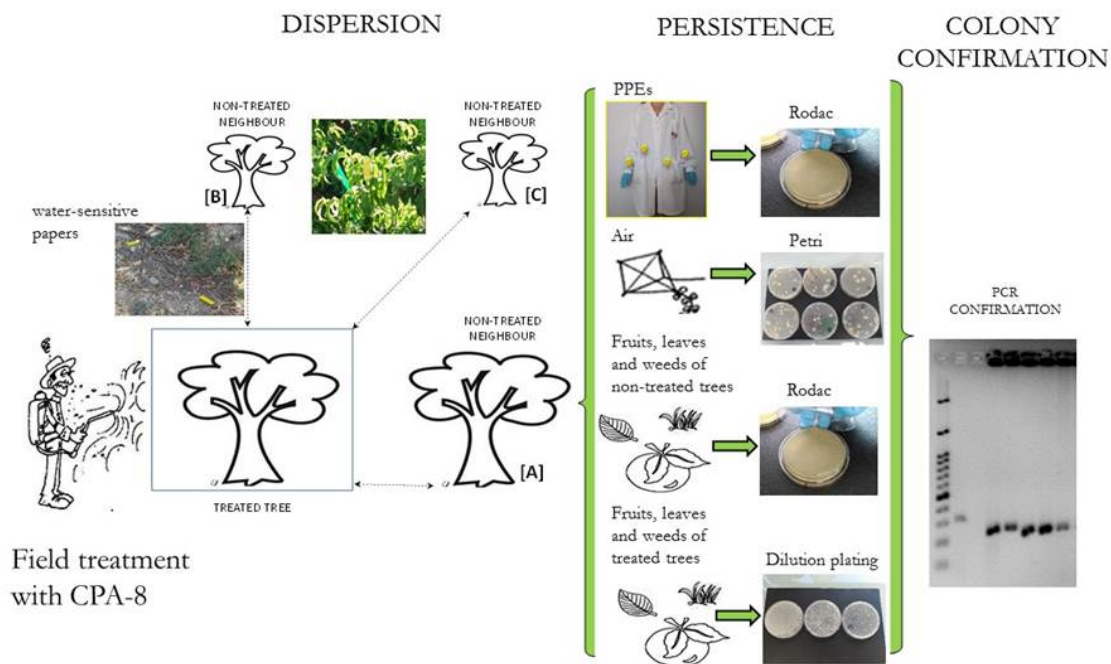


Figura 10. Esquema il·lustrat de la metodologia emprada per a l'estudi de la dispersió i adaptació de CPA-8 al camp.

Per últim afegir, tal com contempla la discussió de la tesi aquí resumida, que encara hi ha en curs interessants treballs que ens ajudaran a elucidar el comportament de la soca CPA-8. Breument comentar que l'estratègia d'aplicació a camp s'està validant en camps comercials distribuïts a França, Itàlia, Bèlgica i Espanya, principals països europeus productors de fruita de pinyol. A més a més, com a colofó als estudis sobre producció i formulació d'aquest microorganisme, s'estan avaluant diferents estratègies d'envasat, tenint en compte el material emprat, l'atmosfera de conservació, així com la temperatura per a la seva millor distribució i emmagatzematge.

En conclusió, les dades obtingudes en aquesta tesi permeten confirmar el potencial de l'ABC *B. amyloliquefaciens* CPA-8 com una alternativa eficaç en el control de *Monilinia* spp. S'han obtingut dos productes basats en CPA-8, els quals es troben en l'última etapa del seu desenvolupament comercial, a falta de la fase de registre. La integració d'aquests productes en els sistemes de cultiu habituals pot ser una estratègia prometedora per aconseguir un major nivell de control de la podridura marró, contribuint així en el maneig de les malalties de postcollita en fruita de pinyol en el marc d'una agricultura sostenible i/o ecològica.