

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA



**EFFECTIVIDAD DE *Candida sake* INCORPORADA A
RECUBRIMIENTOS BIODEGRADABLES EN EL CONTROL DE
Botrytis cinerea EN UVA**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTION DE LA SEGURIDAD Y CALIDAD
ALIMENTARIA**

Presentado por:

Lizzette Lady Pozo Irusta

Directoras:

Maite Cháfer Nácher

Lorena Atarés Huerta

EFECTIVIDAD DE *Candida sake* INCORPORADA A RECUBRIMIENTOS BIODEGRADABLES EN EL CONTROL DE *Botrytis cinerea* EN UVA

Lizzette Pozo, Anna Marín, Lorena Atarés, Maite Cháfer

RESUMEN

Se estudió la mejora de la efectividad del agente de biocontrol (ABC) *Candida sake* frente a *Botrytis cinerea* en uvas mediante su aplicación con recubrimientos comestibles (RC) obtenidos con distinta proporción de sólidos formadores de RC respecto al ABC. Las dispersiones formadoras de RC se prepararon con dos biopolímeros: almidón de patata pregelatinizado (AM) y caseinato sódico (NaC). Se utilizaron dos tipos de controles, unas muestras tratadas con agua y otras con *C. sake* dispersa en una solución acuosa (CS). Las concentraciones en sólidos de estas dispersiones fueron 2.50, 3.75 y 5.00 mg de sólidos formadores de RC mL⁻¹ (p/v), respecto a una concentración fija de antagonista de 5·10⁷ UFC mL⁻¹. Cada dispersión con el ABC se aplicó por pulverización sobre uvas y tras su secado se caracterizó la dinámica poblacional a las 24 h y 7 días de almacenamiento controlado a 20°C y 85%HR. En otra serie de muestras, se estudió la eficacia de estos tratamientos (ABC con RC) en el control de *B. cinerea*. Para ello, tras el secado de los RC, se aplicó una suspensión de *B. cinerea* con 10⁴ esporas mL⁻¹. Las muestras se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y humedad durante 7 y 9 días, y se llevó a cabo un examen visual de la superficie del fruto afectada para determinar la incidencia y severidad de la infección. Los resultados se expresaron como reducción de la incidencia y de la severidad, tomando como referencia las muestras control tratadas con agua. La aplicación del ABC junto con los RC consiguió mejorar la adherencia de *C. sake* a la superficie vegetal a las 24 h de almacenamiento. En cuanto a la efectividad en el control de la incidencia de *B. cinerea*, los tratamientos mejoraron en general respecto los resultados obtenidos con CS, y de forma muy significativa en el caso de utilizar AM como polímero formador de RC. En este sentido, las observaciones microestructurales mostraron una mayor integración de los agregados del antagonista en el seno de la matriz amilácea en comparación con la proteica.

Palabras clave: polímero, caseinato, almidón, concentración, agente de biocontrol, antifúngico, población, incidencia, severidad

RESUM

Es va estudiar la millora de l'efectivitat de l'agent de biocontrol (ABC) *Candida sake* front a *Botrytis cinerea* en raïm mitjançant la seva aplicació amb recobriments comestibles (RC) obtinguts amb diferents proporcions de sòlids formadors de RC respecte a l'ABC. Les dispersions formadores de RC es van preparar amb dos biopolímers: midó de creïlla pregelatinitzat (AM) i

caseïnat sòdic (NaC). Es van utilitzar dos tipus de controls, unes mostres tractades amb aigua i altres amb *C. sake* dispersa en una solució aquosa (CS). Les concentracions en sòlids d'aquestes dispersions van ser 2.50, 3.75 i 5.00 mg de sòlids formadors de RC mL⁻¹ (p/v), respecte a una concentració fixa d'antagonista de 5·10⁷ UFC mL⁻¹. Cada dispersió amb l'ABC es va aplicar per pulverització sobre el raïm i després del seu assecat es va caracteritzar la dinàmica poblacional a les 24 h i 7 dies d'emmagatzematge controlat a 20°C y 85%HR. En una altra sèrie de mostres, es va estudiar l'eficàcia d'aquests tractaments (ABC amb RC) en el control de *B. cinerea*. Per a això, després de l'assecatge dels RC, es va aplicar una suspensió de *B. cinerea* amb 10⁴ espores mL⁻¹. Les mostres es van incubar en mateixes condicions de temperatura i humitat durant 7 i 9 dies, i es va dur a terme un examen visual de la superfície del fruit afectada per determinar la incidència i severitat de la infecció. Els resultats es van expressar com a reducció de la incidència i de la severitat, prenent com a referència les mostres control tractades amb aigua. L'aplicació de l'ABC juntament amb els RC va aconseguir millorar l'adherència *C. sake* sobre la superfície vegetal a les 24 h d'emmagatzematge. En quant a l'efectivitat en el control de la incidència de *B. cinerea*, els tractaments van millorar en general els resultats obtinguts amb CS, i de forma molt significativa en el cas d'utilitzar AM com polímer formador de RC. En aquest sentit, les observacions microestructurals van mostrar una major integració dels agregats de l'antagonista en el si de la matriu amilàcia en comparació amb la proteïca.

Paraules clau: polímer, caseïnat, midó, concentració, agent de biocontrol, antifúngic, població, incidència, severitat

ABSTRACT

The effectiveness improvement of *Candida sake* as biocontrol agent (BCA) against *Botrytis cinerea* on grapes was studied by applying edible coatings (EC) obtained with different proportions of coating forming solids versus the BCA. Coating forming dispersions were prepared with two biopolymers: pregelatinized potato starch (AM) and sodium caseinate (NaC). Two types of controls, samples treated with water and other with *C. sake* dispersed in an aqueous solution (CS), were used. The solids concentrations of these dispersions were 2.50, 3.75 and 5.00 mg of coating forming solids ·mL⁻¹ (w/v), respect to a fixed concentration of antagonist of 5·10⁷ CFU mL⁻¹. Each dispersion with BCA was sprayed on grapes and after drying, population dynamics at 24 h and 7 days of controlled storage were determined at 20°C and 85%HR. In another serie of samples, the efficacy of these treatments (EC with BCA) to control *B. cinerea* was studied. To that end, when EC were dried, a *B. cinerea* suspension of 10⁴ conidia mL⁻¹ was applied. Then, the samples were incubated under the same conditions of temperature and relative humidity for 7 and 9 days, and a visual examination of the affected fruit surface was conducted to determine the incidence and severity of the infection. Results were expressed as reduction of the incidence and severity, referred to control samples treated with water. The

application of BCA with EC achieved an improvement the adherence of *C. sake* on grapes surface after 24 h of storage. With regards to he effectiveness to control the incidence of *B. cinerea*, the treatments generally improved the results obtained with CS, and most significantly in the case of using AM as coating forming polymer. In this sense, the microstructural observations showed greater integration of antagonist aggregates within the starchy matrix compared to protein matrix.

Key words: polymer, caseinate, starch, concentration, biocontrol agent, antifungal, population, incidence, severity

1. INTRODUCCION

En los últimos años, los sistemas de producción convencional de vegetales se han caracterizado por el uso de compuestos químicos durante los tratamientos pre y post-cosecha para el control de plagas. Sin embargo, las nuevas demandas por parte de los consumidores y los cambios legislativos exigen sistemas de producción de alimentos más sanos y respetuosos con el medio ambiente. Es por ello que en la actualidad existe una clara tendencia hacia la reducción o eliminación de los residuos químicos en los vegetales (Elad, 1996 y Spadaro *et al.*, 2005).

El control biológico consiste en la utilización de los organismos vivos (agentes de biocontrol o también denominados antagonistas) para reducir la densidad de inóculo de los patógenos y minimizar la pérdida de cultivos (Usall. *et al.*, 2000). Esta practica es una de las alternativas más eficaces a los fungicidas químicos para el control de enfermedades en agricultura (Cañamás *et al.*, 2011). No obstante, su aplicación comercial ha sido muy limitada debido a la baja tolerancia de los agentes de biocontrol (ABCs) frente a condiciones ambientales adversas. Por ello, el objetivo principal en el desarrollo e implementación de productos de control biológico está orientado a mejorar la supervivencia de los antagonistas y a controlar con éxito las enfermedades de postcosecha bajo una gama más amplia de condiciones y con una variabilidad mínima (Droby *et al.*, 2003).

Con el fin de mejorar el comportamiento de los ABCs en condiciones de estrés ambiental se han empleado varios métodos. La manipulación fisiológica ha sido una de las estrategias con la que se han obtenido resultados más interesantes (Abadias *et al.*, 2001; Liu *et al* 2012; Mokiou y Magan, 2008). Por otra parte, se ha observado que diversos aditivos pueden actuar como protectores durante las fases de preparación, conservación y aplicación de los productos a base de antagonistas. Estos aditivos pueden mantener la viabilidad de los ABCs con mayor eficacia y promover su eficacia de biocontrol a niveles comparables a los conseguidos con fungicidas postcosecha convencionales (Droby *et al.*, 2009). Por su parte, Cañamás *et al.*, 2008a; 2008b; 2011 y Calvo-Garrido *et al.*, 2013a observaron que la aplicación de ABCs con un recubrimiento comestible (RC) comercial mejoró la distribución y la uniformidad de los microorganismos en la superficie vegetal tratada, protegiéndolos más eficazmente de condiciones

ambientales adversas. La aplicación conjunta de ABCs y RCs comestibles ofrece muchas posibilidades, tanto por la gran variedad de matrices disponibles como por los diferentes beneficios que éstos podrían tener sobre los antagonistas.

Los RCs, que pueden definirse como finas capas de material aptas para el consumo alimentario que recubren la superficie de los alimentos (Vargas *et al.*, 2008), han sido ampliamente estudiados. Su principal función cuando son aplicados en frutas y verduras es extender su vida útil, actuando como barrera, no sólo frente al vapor de agua, sino también frente al oxígeno, dióxido de carbono y otros gases responsables de la maduración de los vegetales. Esto contribuye a reducir las pérdidas de peso que tienen lugar durante el almacenamiento y distribución y a enlentecer su actividad metabólica (Baldwin *et al.*, 2012). Otras funciones de los RCs son la prevención de daños físicos y la mejora de la apariencia de los productos (González-Martínez *et al.* 2011). Asimismo, convenientemente formulados, ofrecen la posibilidad de incorporar ingredientes beneficiosos para el producto, tales como agentes antimicrobianos o antioxidantes (Baldwin *et al.*, 1996; Perdonés *et al.*, 2012).

La uva se cultiva en la actualidad en regiones cálidas de todo el mundo, siendo los mayores productores Australia, Sudáfrica, Italia, Francia, España, Portugal, Turquía, Grecia, y en el continente americano California, Chile y Argentina. En España se cultivan alrededor de 5.200.000 toneladas de uva al año, de las cuales solamente el 6 % está destinado a su consumo en fresco, debido a la importancia de la industria vitivinícola en este país (FAO, 2015). La enfermedad producida por el hongo *Botrytis cinerea*, o moho gris, causa importantes pérdidas en este cultivo (Elmer y Reglinski, 2006; Zahavi *et al.*, 2000). Las heridas en los granos durante la postcosecha representan la principal fuente de infección por este hongo.

Algunos estudios han puesto de manifiesto que es posible proteger las uvas de la enfermedad del moho gris utilizando RCs antifúngicos en postcosecha (Romanazzi *et al.*, 2007; Sánchez-González *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2007). Por otro lado, en el contexto del control biológico, una amplia gama de levaduras han demostrado actividad antagonista frente a este patógeno (Elmer y Reglinski, 2006; Zahavi *et al.*, 2000). Entre las levaduras potenciales para su uso como ABCs contra *B. cinerea*, *Candida sake* ha demostrado en varios estudios ser eficaz en el control de la infección en uvas (Calvo-Garrido *et al.*, 2013a; 2014; Cañamás *et al.*, 2011) y también de la pudrición ácida (Calvo-Garrido *et al.*, 2013b).

Estudios previos cuyos resultados están pendientes de publicar, han demostrado que la aplicación de *C. sake* incorporada en RCs a base de diferentes biopolímeros consiguió mejorar su adherencia inicial en la superficie de uva, su supervivencia con el tiempo. Además, se ha observado también un efecto positivo de la presencia de RCs sobre la efectividad frente a *B. cinerea*. Entre los biopolímeros formadores de RCs inicialmente estudiados se seleccionaron aquéllos que permitieron obtener mejores resultados, con el fin de profundizar en el efecto de estos sobre la actividad de *C. sake*. Por una parte, una proteína de origen lácteo como el caseinato sódico (NaC) y, por otra, el almidón de maíz (AM) que, aunque no dio lugar a

resultados tan positivos, resulta interesante desde el punto de visto económico por su bajo coste y gran disponibilidad (Mali y Grossmann, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006).

El tipo y concentración de sólidos formadores de recubrimiento respecto al ABC incorporado pueden cambiar las condiciones en las que éste es aplicado y, consecuentemente, afectar a su actividad. Además, estos aspectos pueden afectar a otros puntos clave de la aplicación práctica del producto como la adherencia del microorganismo y el espesor del RC formado sobre la superficie del fruto. Por ello, inicialmente, se probaron los RCs seleccionados preparados en un amplio rango de concentraciones, desde 1.25 mg mL^{-1} hasta 25 mg mL^{-1} , con el fin de conocer si existía una concentración crítica que promoviera la viabilidad y efectividad del ABC. Los resultados fueron positivos prácticamente en todo el rango de concentraciones, especialmente cuando éstas fueron elevadas. Sin embargo, en términos prácticos, valores elevados de concentración no son deseables, ya que la formulación de un producto final implicaría una alta proporción de material no activo. Por ello, se planteó un nuevo estudio orientado a intentar reducir la concentración de sólidos formadores de RC que se incorporan con el ABC.

Existen algunas investigaciones aisladas pero se necesita una visión general con el fin de contar con información sobre el diseño más adecuado de los RCs comestible para optimizar la viabilidad y la eficacia de los antagonistas en condiciones prácticas. La naturaleza fisicoquímica de los componentes de RC así como la concentración de sólidos formadores de RC pueden afectar a la viabilidad y supervivencia de la ABCs y también su actividad contra el patógeno. Es importante tener en cuenta el establecimiento de interacciones específicas entre la matriz polimérica y el ABC y su influencia en su actividad de control biológico (Sánchez-González *et al.*, 2013).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de distintas concentraciones de sólidos formadores de RCs (AM y NaC) sobre la viabilidad y efectividad de *Candida sake* para el biocontrol de *Botrytis cinerea* en uva. Asimismo se estudió la distribución del antagonista sobre la superficie de la fruta con algunos RCs a través de un análisis microestructural.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Producción del inóculo de *Candida sake*

La cepa *Candida sake* fue aislada originalmente de la superficie de manzanas por el Centro UdL-IRTA (Lleida, España), y fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT-10817) en la Universidad de Valencia (Burjassot, España). La producción y formulación del cultivo se llevó a cabo de acuerdo con métodos descritos por Cañamás *et al.* (2011).

Partiendo de un subcultivo de *C. sake* mantenido en refrigeración en placas con el medio tripticasa-soja agar (TSA) (Scharlab, Barcelona,

España), se resembró la levadura en placas nuevas que se incubaron 25°C durante 48 h. Las células subcultivadas se suspendieron en agua estéril y se inocularon en una concentración de 10^4 UFC mL⁻¹ en un medio líquido obtenido con melazas de caña de azúcar y urea (40 g L⁻¹ y 1.2 g L⁻¹, respectivamente). El medio se mantuvo en agitación durante 48 h, a 150 rpm y 25°C. Transcurrido este tiempo, las células se separaron del medio por centrifugación a 8631 × g durante 10 min a 10°C y se recuperaron con agua estéril. De esta manera se obtuvo la suspensión de trabajo.

2.2. Obtención de las dispersiones formadoras de RC con *Candida sake*

Las dispersiones formadoras de RC (DFRC) se prepararon a base de NaC (Sigma – Aldrich, Madrid, España) y almidón de patata pregelatinizado (AM), suministrado por Roquette Laisa España, S.A., (Valencia, España). Ambos polímeros se dispersaron en agua desionizada a concentraciones de 2.50, 3.75 y 5.00 mg de sólidos formadores de RC mL⁻¹ a 25°C durante 2 h. Transcurrido este tiempo, las DFRC se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos con el fin de reducir su carga microbiana.

C. sake fue incorporada a partir de la suspensión de trabajo a cada una de las DFRC, tras enfriarlas, en una concentración final del $5 \cdot 10^7$ UFC mL⁻¹ (Cañamás *et al.*, 2011). A continuación, las DFRC se agitaron durante 15 minutos a 150 rpm para lograr una distribución homogénea de los microorganismos. Paralelamente, se preparó una dispersión control de *C. sake* en agua desionizada esterilizada (CS) a la misma concentración. Las DFRC con *C. sake* aplicadas se resumen en la tabla 1.

TABLA 1. Resumen de las dispersiones formadoras de recubrimiento con $5 \cdot 10^7$ UFC mL⁻¹ de *Candida sake* aplicadas sobre la superficie de uvas

Tratamiento	Concentración sólidos (mg mL ⁻¹)
NaC 1	2.50
NaC 2	3.75
NaC 3	5.00
AM 1	2.50
AM 2	3.75
AM 3	5.00
CS	-

2.3. Producción del inóculo de *Botrytis cinérea*

Un aislado de *Botrytis cinerea* procedente de uvas infectadas recogidas en un viñedo local en Lleida se utilizó en este estudio, ya que era el más virulento entre varias cepas analizadas (datos no mostrados). Antes de cada ensayo, el aislado de *B. cinerea* se cultivó en agar de dextrosa de patata (PDA) (Scharlab, Barcelona, España), durante 15 días a 20°C con un fotoperíodo diario de 14 h de luz solar cercano y 10 h de oscuridad para inducir la esporulación. Los conidios se rasparon del agar utilizando un asa estéril y se introdujeron en 10 mL de agua destilada estéril con un 0.01% de Tween 85 (p/v) (Sigma – Aldrich, Madrid, España). La suspensión se sonicó durante 5 min en un baño de ultrasonidos (Selecta, Abrera, Barcelona, España) para facilitar la dispersión conidial. Finalmente se ajustó su concentración a 10^4 esporas mL^{-1} (Cañamás *et al.* 2011) y esta suspensión se utilizó para infectar las uvas en los ensayos de efectividad.

2.4. Dinámica poblacional de *Candida sake* en uvas

En este trabajo se utilizaron uvas, variedad Moscatel, procedentes de cultivo ecológico. Se prepararon 3 repeticiones para cada DFRC, constando cada repetición de 5 granos de uva. Éstos fueron seleccionados en base a su estado de madurez y con ausencia de daños mecánicos o infección por mohos. Las muestras fueron colocadas por separado en rejillas de plástico y se pulverizaron durante 5 segundos con cada tratamiento, utilizando un aerógrafo. Las uvas se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora y a continuación las rejillas se colocaron en bandejas de plástico que se sellaron con papel film. Las muestras se llevaron a incubación a 20°C y 85% de humedad relativa durante 24 h o 7 días.

Para estudiar la dinámica poblacional de *C. sake* sobre la superficie de uvas, cada repetición se pesó y se transfirió a matraces Erlenmeyer con 100 mL de agua desionizada estéril con 0.01% (p/v) de Tween 85. Éstos se colocaron en un agitador rotatorio (Selecta, Abrera, Barcelona, España) a 150 rpm durante 20 minutos y seguidamente se introdujeron 10 minutos más en un baño de ultrasonidos, para lograr la máxima separación de la levadura de la superficie de los frutos. Diluciones en serie de los lavados se realizaron por duplicado y se sembraron en medio TSA preparado con sulfato de estreptomina (Sigma – Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 0.5 g L^{-1} , para evitar el crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron durante 48 h a 25°C y tras este tiempo se contaron las colonias de *C. sake* en base a sus características morfológicas. Los resultados se expresaron como log UFC por gramo de uva tratada.

2.5. Eficacia de *Candida sake* contra *Botrytis cinérea*

Del mismo modo que en el ensayo de dinámica poblacional, se emplearon 3 repeticiones de 5 granos de uva cada una, para la aplicación de las distintas DFRC con *C. sake*. En primer lugar, con la ayuda de un papel

de lija, se indujo la ruptura del tejido en la superficie de las uvas, a fin de facilitar la infección por parte del patógeno. Los RCs con *C. sake* fueron aplicados como se describe en el apartado 2.4, junto con el control CS y otro control de agua destilada estéril sin el antagonista. Una vez los tratamientos se hubieron secado, la suspensión de *B. cinerea* con 10^4 esporas mL^{-1} se aplicó con el aerógrafo por 5 segundos más y se dejó secar de nuevo. Las muestras se incubaron 20°C y 85% de HR durante 7 y 9 días.

La incidencia de la infección se evaluó de forma visual por conteo del número de granos que presentaron los signos típicos de la presencia *B. cinerea*. La severidad de la infección se estimó también visualmente y se expresó como el porcentaje de superficie afectada del fruto (Cañamás *et al.*, 2011). Los resultados se expresaron como el porcentaje de reducción de la incidencia y de la severidad de la infección referido al control de agua.

2.6. Análisis microestructural de los RCs que contienen *Candida sake* en la superficie de las uvas

El análisis microestructural de la superficie de uva con los RCs y $5 \cdot 10^7$ UFC mL^{-1} de *C. sake* se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido (JOEL JSM-5410, Japón). Las muestras se congelaron con nitrógeno y se observaron tras la aplicación de un recubrimiento de oro, usando un voltaje de aceleración de 10 kV. Se obtuvieron imágenes de la superficie de las uvas recubiertas para analizar la distribución de *C. sake* en la superficie de los frutos 24 h después de la aplicación. Paralelamente se tomaron también imágenes de uvas tratadas con *C. sake* en dispersión acuosa.

2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de la dinámica poblacional de *C. sake* y la incidencia de la infección por *B. cinerea* se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) utilizando Statgraphics Centurion XVI versión II (StatPoint Technologies, Inc.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Dinámica poblacional de *Candida sake* en uvas

La figura 1 muestra la dinámica poblacional de *C. sake* aplicada conjuntamente con RCs a base de NaC y AM con distintas concentraciones de sólidos. A las 24 h de la aplicación, no se apreciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los distintos tratamientos pero todos ellos mejoraron la adherencia del microorganismo obtenida con el tratamiento CS, con valores en torno a $6.3 \log$ (UFC g uva $^{-1}$). Podría decirse, por tanto, que los RCs, independientemente del tipo de biopolímero y de la concentración, son capaces de mejorar la adherencia inicial de *C. sake* sobre la superficie del fruto. Es importante conseguir un elevado número de levaduras que

sobrevivan en el momento de la aplicación ya que, de este modo, están más disponibles para colonizar la superficie de la fruta (McGuire y Dimitrioglou, 1999) y ejercer su actividad.

Tras 7 días de almacenamiento, el análisis estadístico indicó un incremento significativo de la población únicamente con los tratamientos CS y NaC 3 (5.00 mg mL^{-1}), con aumentos de 0.52 y $0.18 \text{ log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ de uva respecto a las 24 h, respectivamente. Con el resto de RC, la población se mantuvo estable en el caso de aquéllos obtenidos con NaC mientras que disminuyó con los RC de AM. Se observó, que algunas de las uvas utilizadas para los recuentos de 7 días presentaron contaminaciones por hongos, probablemente por tratarse de uvas procedentes de cultivo ecológico que, además se almacenaron en condiciones de temperatura y humedad idóneas para su desarrollo. Esto podría explicar el descenso de población observado con algunos de los RC ya que los hongos podrían utilizar los componentes de los RC como fuente de nutrientes dejando de estar éstos disponibles para la levadura, lo cual dificultaría su supervivencia.

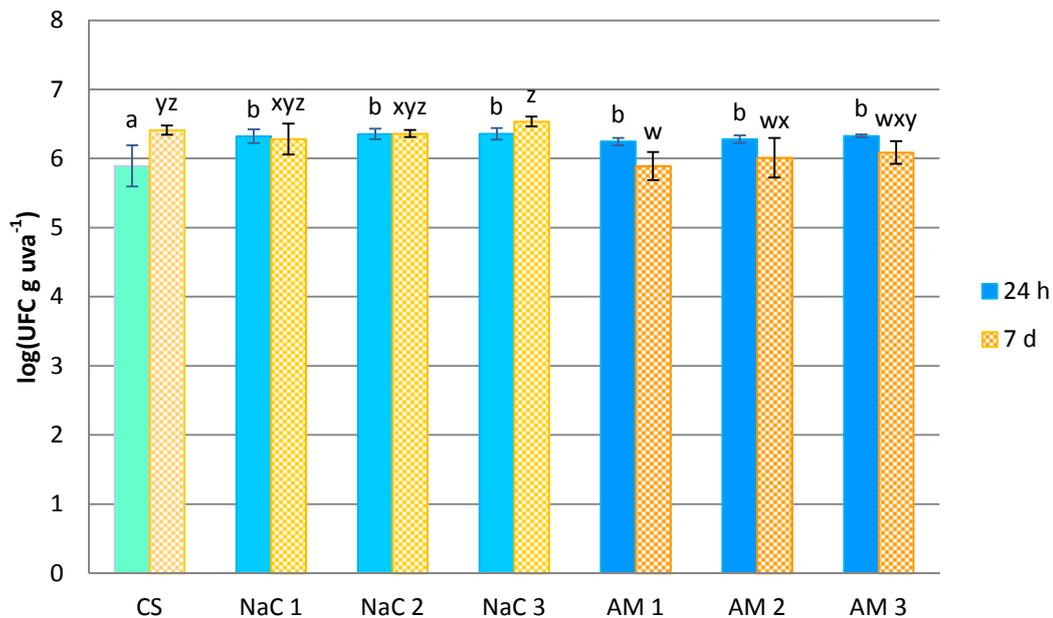


FIGURA 1. Dinámica poblacional de *Candida sake* incorporada a diferentes recubrimientos aplicados a la superficie de uvas para un tiempo de 24 horas y 7 días de almacenamiento. Donde CS: *C. sake* en dispersión acuosa, NaC: caseinato sódico, AM: almidón de patata pregelatinizado. 1, 2 y 3 son las concentraciones de sólidos por mL de DFRC (2.50, 3.75 y 5.00 mg respectivamente). Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes DFRC a cada tiempo: 24 h (a-b) y 7 d (w-z).

Un análisis estadístico multifactorial aplicado a los resultados de dinámica poblacional determinó que existe una influencia clara del tipo de polímero en la supervivencia de *C. sake*, a favor del NaC, pero que la concentración de sólidos formadores de RC no juega un papel significativo.

3.2. Eficacia de *Candida sake* frente a *Botrytis cinérea*

La eficacia de *C. sake* contra *B. cinerea* fue estimada visualmente a los 7 y 9 días de almacenamiento de las muestras y se puede observar en las figuras 2 y 3.

Respecto a la reducción de la incidencia de la infección de *B. cinerea*, los RC a base de AM dieron lugar a los mejores resultados tanto a los 7 como a los 9 días. Concretamente, los RC de AM 1 y AM 2 (2.50 y 3.75 mg sólidos mL⁻¹, respectivamente) consiguieron reducciones de la incidencia próximas al 40%, significativamente superiores ($p < 0.05$) a las obtenidas con el tratamiento CS. Comparando los dos tiempos de almacenamiento, a los 9 días se observó un descenso claro de la reducción de la incidencia como consecuencia del progreso de la infección. No obstante, la reducción de la incidencia se mantuvo estable con AM 2 con 3.75 mg sólidos mL⁻¹.

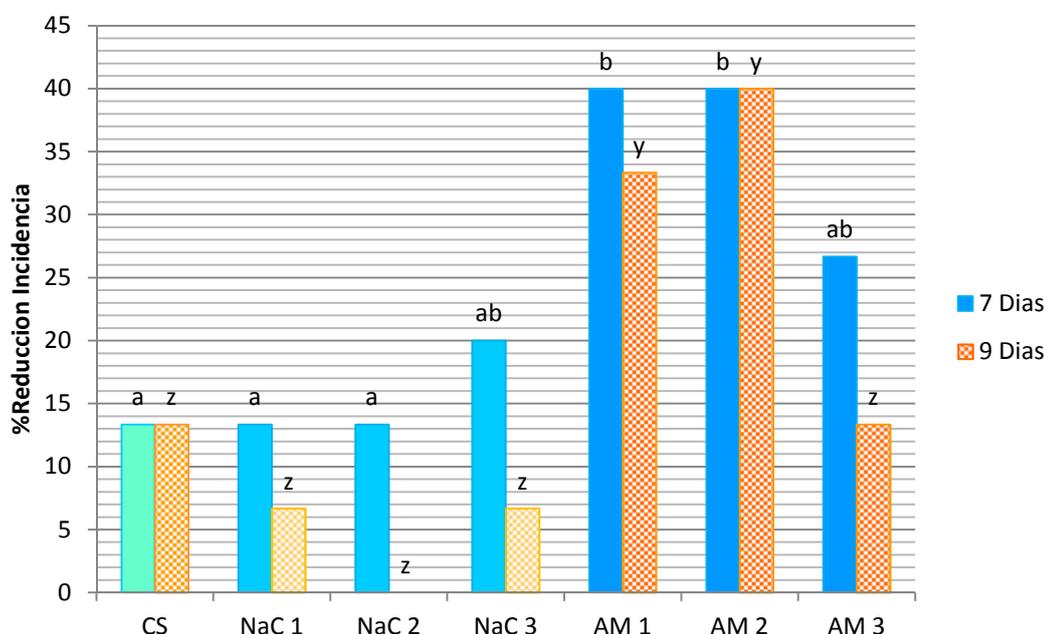


FIGURA 2. Eficacia de *C. sake* incorporada a diferentes recubrimientos aplicados a la superficie de uvas, en la reducción de la incidencia por *B. cinérea*. Donde CS: *C. sake* en dispersión acuosa, NaC: caseinato sódico, AM: almidón de patata pregelatinizado. 1, 2 y 3 son las concentraciones de sólidos por mL de DFRC (2.50, 3.75 y 5.00 mg respectivamente). Diferentes letras en las barras indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada tiempo: 7 días (a–b) y 9 días (y–z).

La reducción de la severidad de la infección conseguida con los distintos tratamientos a base de *C. sake* y RCs se muestra en la figura 3 a los 9 días de almacenamiento. El RC a base de AM con la concentración más baja de sólidos fue el que permitió conseguir una mayor reducción de la severidad (75% de reducción aproximadamente), mejorando significativamente ($p < 0.05$) el resultado obtenido por *C. sake* sin RC. Resultados similares fueron

encontrados por El Gaouth *et al.* (2000) que reportó que la combinación de la levadura *Candida satoiana* combinada con glicol-quitosano fue más que efectiva controlando el moho gris en manzana, que el ABC solo. Otro ejemplo es la eficacia mejorada del ABC *Cryptococcus laurentii* contra el deterioro fúngico en fresa al ser aplicado junto con un RC a base de alginato sódico (Fan *et al.*, 2009). Por otra parte, a pesar de que el RC NaC 3 con 5.00 mg sólidos mL⁻¹ no dio lugar a una disminución de la incidencia destacable, sí que mostró una reducción de la severidad elevada, con un valor en torno al 58%.

El análisis estadístico multifactorial de los resultados de incidencia únicamente mostró una influencia significativa del tipo de polímero en su reducción, con independencia de la concentración de sólidos. Sin embargo, la reducción de la severidad se vio influenciada no sólo por el tipo de polímero sino también por la concentración de sólidos formadores de RC. Así pues, el efecto de la concentración de sólidos fue distinto según los RC fueran de NaC o de AM. La mayor concentración de sólidos fue positiva en los RC basados en NaC, probablemente por la mayor supervivencia del ABC, y negativa en los RC con AM como matriz soporte, debido a que podría también ser un mejor nutriente para el patógeno.

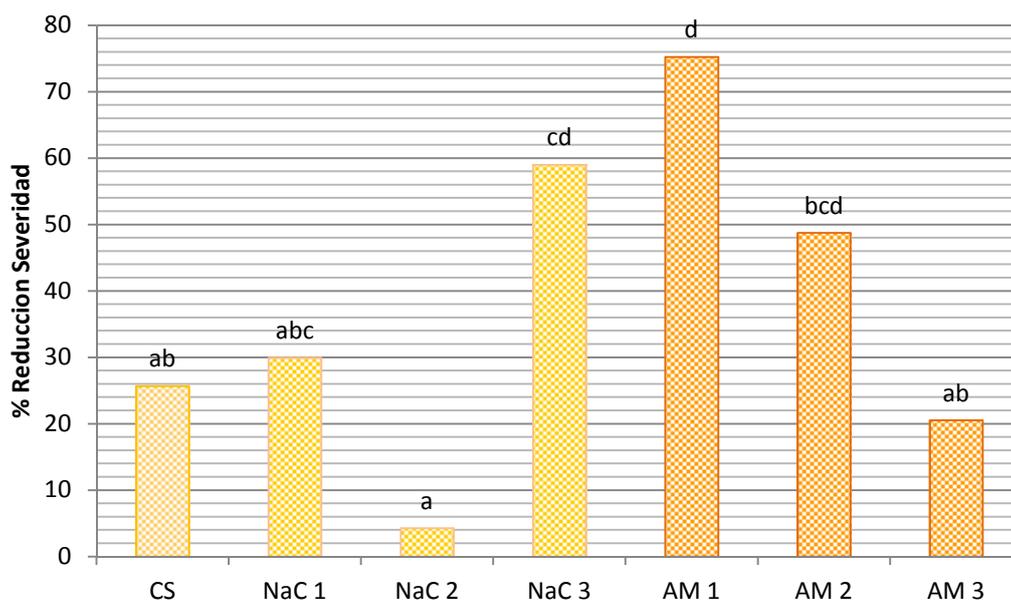


FIGURA 3. Eficacia de *C. sake* incorporada a diferentes recubrimientos aplicados a la superficie de uvas, en la reducción de la severidad por *B. cinerea*. Donde CS: *C. sake* en dispersión acuosa, NaC: caseinato sódico, AM: almidón de patata pregelatinizado. 1, 2 y 3 son las concentraciones de sólidos por mL de DFRC (2.50, 3.75 y 5.00 mg respectivamente). Diferentes letras en las barras indican las diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.3. Análisis microestructural de los RCs con *Candida sake* en la superficie de las uvas

En la figura 4 se observa la superficie de las uvas sin RC. Puede observarse una rugosidad característica de la capa cerosa epicuticular del fruto debido a su estructura amorfa y cristalina (Fava *et al.* 2011).

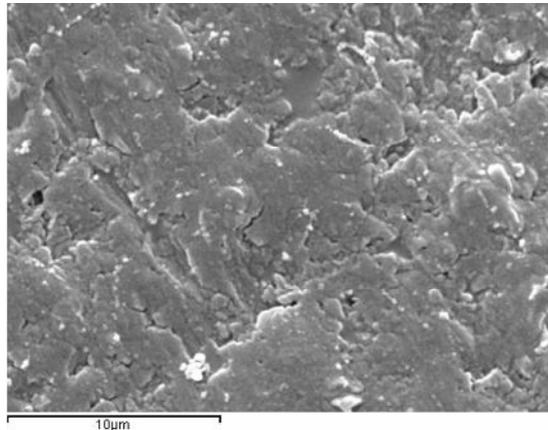
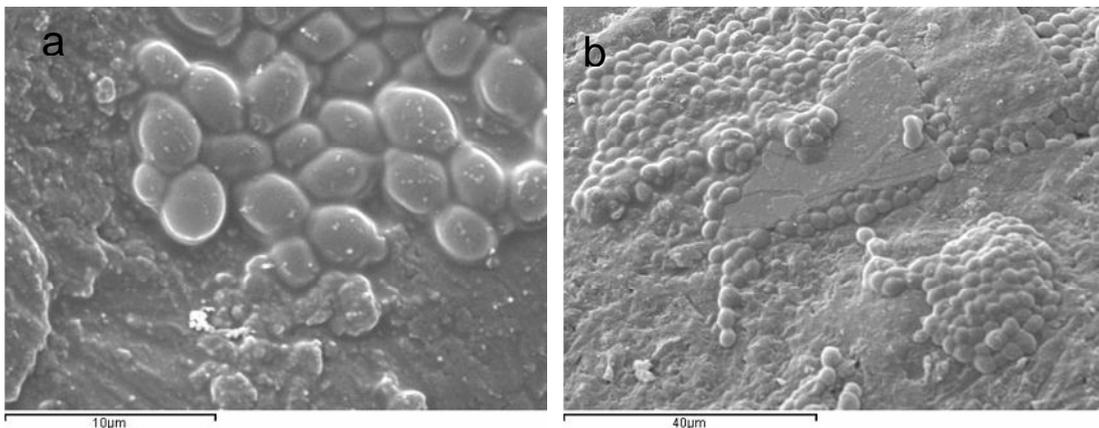


FIGURA 4. Imagen de la superficie de las uvas sin recubrimiento

En la figura 5 se muestra la superficie de uvas tratadas con *C. sake* dispersa en agua e incorporada a las diferentes DFRC. La incorporación de *C. sake* a las DFRC (desde la figura 5 d hasta la 5 i) dio lugar a superficies más lisas y uniformes en comparación con las uvas tratadas con *C. sake* dispersa en agua (figuras 5 a, b y c). Esto podría ser debido a que los RC suavizan la rugosidad de la capa cerosa de la uva. En general, la distribución de los RC fue poco homogénea, los cuales se distribuyeron de forma desigual sobre la superficie de los frutos. Esto se puso de manifiesto al observar, en una misma muestra, zonas recubiertas y sin recubrir.



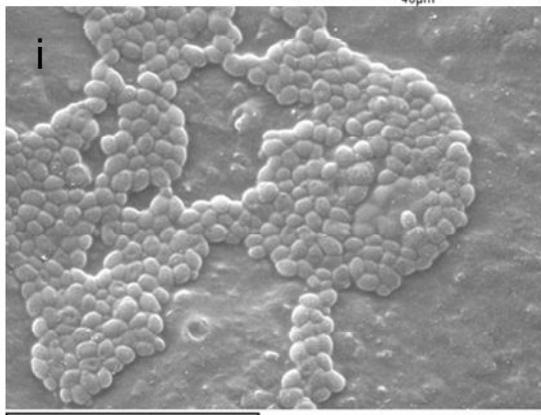
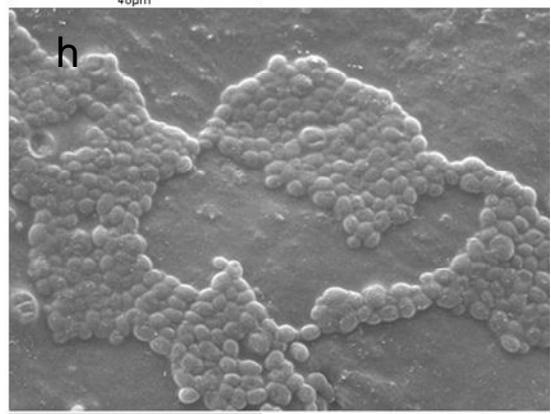
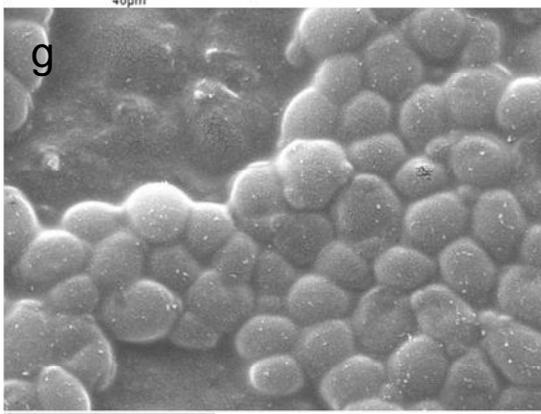
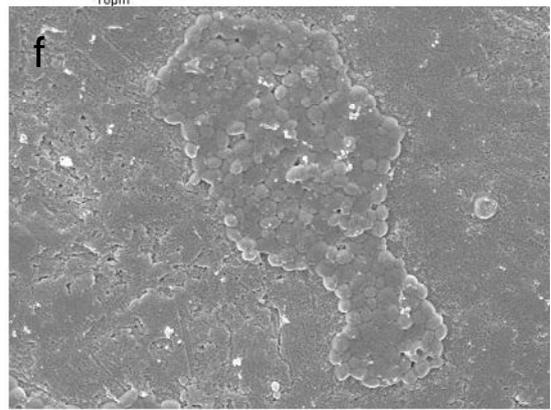
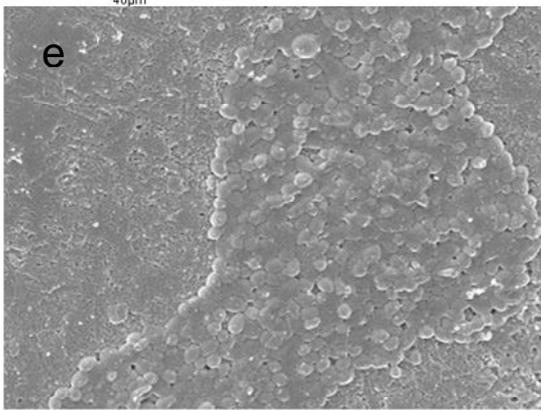
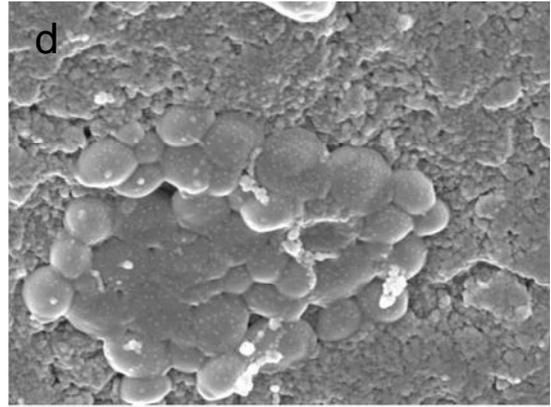
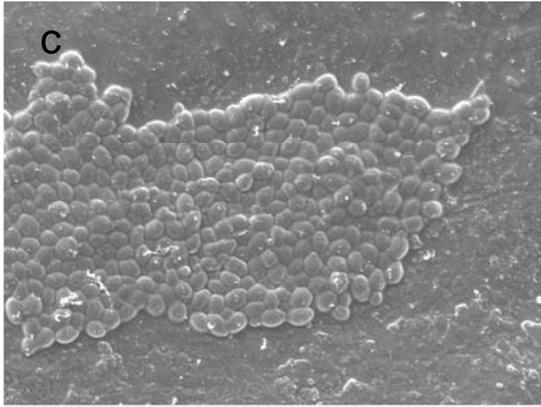


FIGURA 5. Imágenes de uva tratada con las formulaciones a base de *Candida sake* en dispersión acuosa (a, b, c) e incorporada a las DFRC de caseinato sódico (d, e, f) y almidón (g, h, i).

En las imágenes 5 d, 5 e y 5 f, con RCs a base de NaC puede observarse un aspecto superficial granuloso de las uvas, lo que parece estar relacionado con la estructura globular de esta proteína. Asimismo, se observó que las muestras tratadas con RC a base de proteínas tendieron a formar más agregados entre sí. Por su parte, el AM (5 g, 5 h y 5 i) dio lugar a un RC mucho más liso y homogéneo lo cual es coherente con la estructura de este polímero basado en cadenas largas de amilosa, con ramificaciones en el caso de la amilopectina.

En términos generales, pudo observarse que, independientemente del tipo de RC, las células presentaron una clara tendencia a formar agregados que, además, se podría ver favorecida por la pérdida de agua durante el secado del RC. Esto podría explicarse por la tendencia natural de los microorganismos a adherirse a superficies sólidas y formar “biofilms” (Domínguez-Manzano *et al.* 2012). En las imágenes 5 a, 5 b y 5 c, correspondientes a las uvas pulverizadas con *C. sake* en dispersión acuosa, los agregados fueron mayores y con más capas, mientras que en el caso de las imágenes de las uvas con los dos RC, parece apreciarse una monocapa con dos estructuras diferenciadas: una continua en el fondo que se corresponde con el RC, y otra en la que se diferencian los agregados del ABC.

Por otro lado, en las uvas tratadas con RC a base de NaC (5 d, 5 e y 5 f) las células parecieron estar recubiertas de forma más irregular y pudieron observarse pequeñas partículas globulares de proteína en su superficie. En cambio, con los RC de AM se apreció una mayor cobertura de las células. Este fenómeno podría deberse a la habilidad de las cadenas de polisacáridos para rellenar los huecos entre las células. En las imágenes 5 h y 5 i se observaron huecos que podrían deberse al desprendimiento de células *C. sake*, ya sea durante el proceso de criocongelación o por el secado del RC.

4. CONCLUSIONES

El tipo y concentración de sólidos del polímero en la DFRC afectó en diferente medida en la dinámica poblacional de *Candida sake* y en su eficacia para el control de *Botrytis cinerea* en uvas. La población de *C. sake* fue superior a las 24 h por efecto de los dos polímeros formadores de RC del ensayo, y con independencia del tipo de polímero. A los 7 días, los resultados se mantuvieron sin grandes cambios, observándose mejoras en NaC para la concentración más alta de sólidos (5.00 mg mL^{-1}). Por el contrario, las formulaciones de *C. sake* con AM fueron significativamente más eficaces en el control de *B. cinerea* que las de NaC, y a concentraciones más bajas de 5.00 mg mL^{-1} . En el caso de los tratamientos con NaC, las tendencias fueron inversas: mayor reducción de la incidencia al

aumentar la concentración en sólidos de la DFRC. En los resultados de severidad se mantuvo la tendencia observada. En el caso del polisacárido (AM) el mejor resultado de severidad se consiguió a la concentración en sólidos más baja ensayada (2.50 mg mL^{-1}), mientras que en la proteína (NaC) fue a la mayor concentración (5.00 mg mL^{-1}). El diferente efecto de la matriz en la dinámica poblacional y eficacia en el control, parece estar relacionado con la diferente preferencia del ABC y el patógeno por el polímero. En cuanto al efecto de la concentración en sólidos, está influenciado por el tipo de matriz, sugiriendo que las concentraciones óptimas cambiarán con el tipo polímero, ABC y patógeno.

Las observaciones microestructurales mostraron una clara tendencia de *C. sake* a la formación de agregados sobre la superficie del fruto. La diferente naturaleza de los polímeros afecta de forma notable en la agregación y distribución de *C. sake*, siendo la matriz amilácea la que mayor regularidad y compactación de los agregados celulares aporta a los recubrimientos en comparación con la proteína.

5. AGRADECIMIENTOS

Las autoras desean expresar su agradecimiento al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por su financiación en el proyecto RTA20120067-C02-02 así como al programa ERASMUS MUNDUS - proyecto BABEL.

6. REFERENCIAS.

- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., Magan, N. (2001). Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(2), 123-129.
- Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Chen, X., Hagenmaier, R.D. (1996). Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, 9, 151-163.
- Baldwin, E.A., Hagenmainer, R., Bai, J. (2012). *Edible coatings and films to improve food quality*. Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C., Teixidó, N. (2011). Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*, 56(2), 150-158.
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Usall, J., Casals, C., Solsona, C., Teixidó, N. (2008). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2: Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 86-95.
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Anguera, M., Teixidó, N. (2008). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2: Part II. Effectiveness of different cell formulations. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 96-106.
- Calvo-Garrido, C., Elmer, P. A. G., Viñas, I., Usall, J., Bartra, E., Teixidó, N. (2013a). Biological control of *Botrytis bunch* rot in organic wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant Pathology*, 62(3), 510-519.

- Calvo-Garrido, C., Viñas, I., Elmer, P., Usall, J., Teixidó, N. (2013b). *Candida sake* CPA-1 and other biologically based products as potential control strategies to reduce sour rot of grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 57(4), 356–361
- Calvo-Garrido, C., Viñas, I., Usall, J., Rodríguez-Romera, M., Ramos, M. C., Teixidó, N. (2014). Survival of the biological control agent *Candida sake* CPA-1 on grapes under the influence of abiotic factors. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), 800–811.
- Domínguez-Manzano, J., Olmo-Ruiz, C., Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R. (2012). Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during spanish style green table olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 230-238.
- Droby, S., Wisniewski, M., El Ghaouth, A., Wilson, C. (2003). Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biology and Technology*, 27(2), 127-135.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137-145.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Wilson, C. L. (2000). Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 19(1), 103–110.
- Elad, Y., (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology* 102, 719-732.
- Elmer, P. A. G., Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55(2), 155-177.
- Fan, Y., Xu, Y., Wang, D., Zhang, L., Sun, J., Sun, L., Zhang, B. (2009). Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria x ananassa*) preservation quality. *Postharvest Biology and Technology*, 53(1-2), 84–90.
- FAO: <www.fao.org>. [consulta 04-03-2015].
- Fava, J., Hodara, K., Nieto, A., Guerrero, S., Alzamora, S. M., Castro, M. A. (2011). Structure (micro, ultra, nano), color and mechanical properties of *Vitis labrusca* L. (grape berry) fruits treated by hydrogen peroxide, UV-C irradiation and ultrasound. *Food Research International*, 44(9), 2938-2948.
- González-Martínez, C., Cháfer, M., Sánchez-González, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2011). Edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. En: *Advances in Postharvest Treatments and Fruit Quality and Safety*. Nova Science Publishers, Inc., New York, 59-84.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Hershkovitz, V., Tian, S., Farrell, R. (2012). Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(3), 578-590.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E. (2003). Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7005–7011.
- McGuire, R. G., Dimitroglou, D. A. (1999). Evaluation of shellac and sucrose ester fruit coating formulations that support biological control of post-harvest grapefruit decay. *Biocontrol Science and Technology*, 9(1), 53–65.
- Mokiou, S., Magan, N. (2008). Physiological manipulation and formulation of the biocontrol yeast *Pichia anomala* for control of *Penicillium verrucosum* and *ochratoxin A* contamination of moist grain. *Biocontrol Science and Technology*, 18(10), 1063-1073.
- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70(0), 32-41.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39(8), 840-846.
- Romanazzi, G., Karabulut, O. A., Smilanick, J. L. (2007). Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 134-140.
- Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., Cháfer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without

- bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), 57-63.
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I., Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 92-98.
- Spadaro, D., Gullino, M.L., (2005). Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection* 24, 601-613.
- Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. (2000). Biological control of blue mold on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 58:83-92.
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D. J., González-Martínez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(6), 496-511.
- Xu, W., Huang, K., Guo, F., Qu, W., Yang, J., Liang, Z., Luo, Y. (2007). Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1), 86-94.
- Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutki, J., Ben-Arie, R., Droby, S. (2000). Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology*, 20(2), 115-124.