



Universitat de Girona

CARACTERITZACIÓ DE METABÒLITS PRODUÏTS
PER SOQUES DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*
EFECTIVES EN EL CONTROL BIOLÒGIC DE
FONGS FITOPATÒGENS

Jaume ALEMANY AGULLÓ

ISBN: 84-8458-122-5
Dipòsit legal: GI-69-2002



Universitat de Girona

**Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària
Institut de Tecnologia Agroalimentària**

TESI DOCTORAL

**CARACTERITZACIÓ DE METABÒLITS PRODUÏTS PER SOQUES DE
Pseudomonas fluorescens EFECTIVES EN EL CONTROL BIOLÒGIC DE
FONGS FITOPATÒGENS**

**Jaume Alemany Agulló
Girona, 2001**

Contingut

1. El control biològic

1.1. Introducció	1
1.2. El control biològic	4
1.2.1. Camps d'aplicació dels agents de biocontrol	7
1.2.2. Situació actual	9
1.3. <i>Pseudomonas fluorescens</i> i control biològic	10
1.3.1. Mecanismes de biocontrol de malalties de les plantes	12
1.3.1.1. Resistència induïda	13
1.3.1.2. Competència	14
1.3.1.3. Parasitisme	15
1.3.1.4. Antibiosi	16
1.4. Producció dels agents de biocontrol	21
1.4.1. Formulació dels agents de biocontrol	21
1.5. Antecedents	27
1.6. Objectius generals del treball	29

2. Caracterització de la producció de metabòlits secundaris amb activitat antibiòtica en soques de *Pseudomonas fluorescens*

2.1. Introducció	31
2.2. Objectius	36
2.3. Materials i mètodes	
2.3.1. Medis de cultiu	37
2.3.2. Conservació de les soques	40
2.3.3. Bioassaigs. Cerca d'activitat antibiòtica	40
2.3.3.1. Fongs indicadors	40
2.3.3.2. Antagonisme en cultiu dual en placa de Petri	42
2.3.3.3. Inhibició de la germinació de conidis en suspensió líquida	43
2.3.3.4. Assaig d'inhibició per difusió en agar	44
2.3.3.5. Bioautografia	44
2.3.4. Detecció i identificació de l'HCN en cultius de bacteris productors	46
2.3.4.1. Mètode del picrat alcalí	46
2.3.4.2. Assaig al toc o "spot test"	47
2.3.4.3. Mètode del Blau de Prússia	48

2.3.4.4. Assaig per espectroscòpia d'infraroig	48
2.3.5. Extracció i purificació de metabòlits secundaris a partir de soques productores	49
2.3.5.1. Producció i extracció de metabòlits	50
2.3.6. Aïllament i identificació dels metabòlits	55
2.3.6.1. Cromatografia de capa prima (CCP)	55
2.3.6.2. Cromatografia líquida flash en columna	56
2.3.6.3. Cromatografia líquida d'alta resolució (CLAR)	56
2.4. Resultats	
2.4.1. Antagonisme <i>in vitro</i> en medi sòlid	58
2.4.2. Bioassaigs en medi líquid	61
2.4.3. Detecció, producció, aïllament i identificació de metabòlits secundaris en soques productores	62
2.4.3.1. Detecció i identificació de la producció d'HCN	62
2.4.3.1.1. Assaigs de detecció i identificació d'HCN	63
2.4.3.1.2. Producció d'HCN en les soques de la col·lecció EPS	65
2.4.3.2. Detecció i identificació del 2,4-diacetilfloroglucinol	66
2.4.3.3. Detecció i identificació de l'àcid fenazina-1-carboxílic	68
2.4.3.4. Detecció i identificació de la pirrolnitrina	70
2.5. Discussió	72
2.6. Conclusions	78
3. Estudi de la producció d'àcid cianhídric en <i>P. fluorescens</i> EPS288	
3.1. Introducció	79
3.1.1. HCN i control biològic de malalties de les plantes	83
3.1.2. Detecció i quantificació de la producció d'HCN	84
3.2. Objectius	87
3.3. Materials i mètodes	
3.3.1. Desenvolupament i validació d'un sistema pel seguiment de la producció d'HCN per bacteris cianogènics	88
3.3.1.1. Desenvolupament d'un sistema de recollida d'HCN	88
3.3.1.2. Validació del sistema de recollida	89
3.3.1.3. Quantificació de l'HCN	91
3.3.2. Producció d'HCN per soques de <i>P. fluorescens</i>	92
3.3.2.1. Sembrar del cultiu	92

3.3.2.2. Seguiment de la cinètica de creixement i de producció d'HCN	92
3.3.2.3. Efecte del cabal d'aire	93
3.3.2.4. Efecte de la temperatura	93
3.3.2.5. Efecte de la composició del medi de cultiu	94
3.3.2.6. Comparació de la producció d'HCN entre les soques de <i>P. fluorescens</i> EPS288 i CHA0	94
3.3.3. Estudi dels paràmetres cinètics i de la producció d'HCN mitjançant un sistema automatitzat	95
3.3.3.1. Sembrar i incubació dels cultius	95
3.3.4. Tractaments de dades	96
3.4. Resultats	
3.4.1. Validació del sistema de recollida d'HCN	97
3.4.1.1. Efecte de la temperatura, cabal i pH en la recollida d'HCN d'una solució de KCN	97
3.4.1.2. Efecte del cabal d'aire en un cultiu productor d'HCN	99
3.4.2. Producció d'HCN en <i>Pseudomonas fluorescens</i> EPS288	102
3.4.2.1. Repetitivitat de la producció d'HCN a 25°C	102
3.4.2.2. Cinètica de producció d'HCN i efecte de la temperatura	103
3.4.2.3. Efecte del tipus de medi de cultiu	110
3.4.3. Comparació de la producció d'HCN entre les soques de <i>P. fluorescens</i> EPS288 i CHA0	112
3.4.4. Estudi de l'efecte del medi amb un sistema automatitzat de cultiu	112
3.5. Discussió	116
3.6. Conclusions	126
4. Estudi de la producció de 2,4-diacetilfloroglucinol en soques de <i>P. fluorescens</i>	
4.1. Introducció	127
4.1.1. Regulació de la síntesi	130
4.1.2. Quantificació del DAPG	132
4.2. Objectius	134
4.3. Materials i mètodes	
4.3.1. Quantificació del DAPG	135
4.3.1.1. Quantificació a partir de cultius en medi sòlid	135
4.3.1.2. Quantificació a partir de cultius en medi líquid	135

4.3.2. Estudi de la producció de DAPG	136
4.3.2.1. Cinètica de creixement i de producció	136
4.3.2.2. Efecte de l'addició de ferro i de glucosa	136
4.3.2.3. Efecte de la font de carboni	137
4.3.3. Paràmetres cinètics i producció de DAPG mitjançant un sistema automatitzat	138
4.3.4. Tractament de dades	138
4.4. Resultats	
4.4.1. Cinètica de creixement dels cultius i de la producció de DAPG	140
4.4.2. Efecte de l'addició de ferro en la producció de DAPG	142
4.4.3. Efecte de l'addició de glucosa en la producció de DAPG	148
4.4.4. Efecte del tipus de font de carboni	154
4.4.5. Estudi de paràmetres de creixement i producció de DAPG en microcultius	155
4.5. Discussió	166
4.6. Conclusions	176
5. Producció de DAPG i colonització de fruits i arrels per soques seleccionades de <i>P. fluorescens</i>	
5.1. Introducció	177
5.2. Objectius	181
5.3. Materials i mètodes	
5.3.1. Bioassaigs sobre material vegetal	182
5.3.1.1. Selecció de mutants de les soques de <i>P. fluorescens</i>	182
5.3.1.2. Producció de DAPG en fruits	182
5.3.1.3. Producció de DAPG en arrels	183
5.3.1.4. Bioassaigs d'inhibició d'infeccions causades per bacteris i fongs fitopatògens	184
5.3.1.5. Bioassaig de promoció del creixement en plantes	187
5.3.2. Estudi de la colonització d'arrels	188
5.3.2.1. Selecció i condicionament de les llavors	188
5.3.2.2. Inoculació i sembra de les llavors	189

5.3.2.3. Germinació de les llavors, creixement de les plantes i determinació de la població bacteriana a les arrels	190
5.3.3. Tractament de dades	191
5.4. Resultats	
5.4.1. Bioassaigs d'activitat sobre material vegetal	192
5.4.1.1. Producció de DAPG <i>in vivo</i>	192
5.4.1.2. Inhibició d'infeccions causades per bacteris i fongs fitopatògens	194
5.4.1.3. Efecte sobre el creixement de portaempelts de fruiters	195
5.4.2. Tractament de llavors i colonització d'arrels per soques de <i>P. fluorescens</i>	197
5.4.2.1. Creixement de les plantes	198
5.4.2.2. Creixement de les arrels	199
5.4.2.3. Colonització de llavors i arrels	204
5.5. Discussió	212
5.6. Conclusions	221
6. Bibliografia	223
7. Annexos	

Llistat de Taules

Capítol 1 Control biològic de les malalties de les plantes

Taula 1.1.	Metabòlits produïts per soques de <i>P. fluorescens</i> implicades en el biocontrol de malalties de plantes.	18
Taula 1.2.	Variables que poden afectar l'èxit dels agents de biocontrol vers els fitopatògens.	24
Taula 1.3.	Bacteris agents de biocontrol presents al mercat a nivell mundial.	25

Capítol 2 Caracterització de la producció de metabòlits secundaris amb activitat antibiòtica en soques de *Pseudomonas fluorescens*

Taula 2.1.	Relació de soques proveïdes per altres investigadors amb indicació dels metabòlits secundaris que produeixen.	50
Taula 2.2.	Antagonisme <i>in vitro</i> de les soques de <i>P. fluorescens</i> vers els fongs indicadors <i>S. vesicarium</i> i <i>P. expansum</i> en diferents medis de cultiu.	58
Taula 2.3.	Resultats del revelats de CCP i bioautografia amb <i>S. vesicarium</i> .	60
Taula 2.4.	Percentatge d'inhibició <i>in vitro</i> de la germinació de conidis d' <i>S.vesicarium</i> per la dilució 1/3 del sobrenedant de medi LB on havien crescut els bacteris.	62
Taula 2.5.	Resum de les soques de la col·lecció EPS productores d'HCN fent referència al biovar i al seu origen (planta i òrgan).	65
Taula 2.6.	Valor de Rf. de les bandes dels extractes orgànics de les soques EPS317 i Q2-87 i del DAPG en el revelat amb DSA	66
Taula 2.7.	Caracterització i confirmació de la producció de DAPG, i inhibició dels fongs patògens indicadors en soques <i>P. fluorescens</i> de referència i de la col·lecció EPS.	68

Capítol 3 Estudi de la producció d'àcid cianhídric en *P. fluorescens* EPS288

Taula 3.1.	Disseny experimental per a la validació del sistema de recollida d'HCN.	90
Taula 3.2.	Disseny experimental i resultats de la velocitat inicial d'evaporació d'HCN en la validació del sistema de recollida.	97
Taula 3.3.	Taula de l'ANOVA per l'efecte del <i>Cabal</i> , <i>pH</i> i <i>Temperatura</i> , en la velocitat inicial d'evaporació de l'HCN.	98
Taula 3.4.	Estimes dels efectes principals i de les seves interaccions en l'avaluació de la recollida d'HCN.	99

Taula 3.5.	Producció d'HCN en cultius de <i>P. fluorescens</i> EPS288 en funció del cabal d'aire i de la temperatura d'incubació.	100
Taula 3.6.	Producció d'HCN per la soca <i>P. fluorescens</i> EPS288 a 25°C sembrada a alta i a baixa concentració cel·lular inicial.	103
Taula 3.7.	Velocitat específica de creixement (μ) i temps de generació (τ) de la soca EPS288 a diferents temperatures.	107
Taula 3.8.	HCN acumulat a diferents temperatures d'incubació en funció de la concentració cel·lular inicial.	108
Taula 3.9.	Velocitat instantània de producció d'HCN i temps en què es va assolir el valor màxim.	109
Taula 3.10.	Producció d'HCN per la soca EPS288 en diferents medis de cultiu.	111
Taula 3.11.	Producció d'HCN, velocitat específica de síntesi i població de les soques EPS288 i CHA0 crescudes en el medi de Castric.	112
Taula 3.12.	Paràmetres cinètics i de producció d'HCN de <i>P. fluorescens</i> EPS288 en cultius monitoritzats amb Bioscreen.	114

Capítol 4 Estudi de la producció de 2,4-diacetilfloroglucinol en soques de *P. fluorescens*

Taula 4.1.	Producció de DAPG a diferents temps d'incubació i Velocitat Específica de Producció.	140
Taula 4.2	Taula de l'ANOVA que mostra l'efecte de <i>Soca</i> , <i>Complexitat</i> i <i>Consistència</i> del medi de cultiu i de l'addició de <i>Ferro</i> en la producció de DAPG.	142
Taula 4.3.	Producció de DAPG per les soques de <i>P. fluorescens</i> estudiades en diversos medis de cultiu en l'estudi de l'efecte de l'addició de ferro.	144
Taula 4.4.	Taules de l'ANOVA per a cada soca per l'avaluació de l'efecte de la <i>Complexitat</i> i <i>Consistència</i> del medi de cultiu i de l'addició de <i>Ferro</i> en la producció de DAPG.	145
Taula 4.5.	Valors de les estimes del efectes principals i de les seves interaccions en la producció de DAPG.	146
Taula 4.6.	Resum de l'efecte de l'addició de Ferro, de la Consistència i Complexitat del medi de cultiu en la producció de DAPG.	147
Taula 4.7.	Taula de l'ANOVA que mostra l'efecte de <i>Soca</i> , <i>Complexitat</i> i <i>Consistència</i> del medi de cultiu i de l'addició de <i>Glucosa</i> en la producció de DAPG.	149
Taula 4.8.	Producció de DAPG per les soques en diversos medis de cultiu en l'estudi de l'efecte de l'addició de glucosa.	150

Taula 4.9.	Taules de l'ANOVA per a cada soca en l'avaluació de l'efecte de la <i>Complexitat</i> , i la <i>Consistència</i> del medi de cultiu i de l'addició de <i>Glucosa</i> en la producció de DAPG	151
Taula 4.10.	Valors de les estimes dels efectes principals i de les seves interaccions en la producció de DAPG.	152
Taula 4.11.	Resum de l'efecte de l'addició de Glucosa, de la Complexitat i Consistència del medi de cultiu en la producció de DAPG.	153
Taula 4.12.	Producció de DAPG per diverses soques. Efecte de la font de carboni en el medi 21C.	155
Taula 4.13.	Taula de l'ANOVA que mostra l'efecte de <i>Medi</i> , <i>Soca</i> i <i>Mutant</i> , en el creixement màxim, en la velocitat específica de creixement i en la producció de DAPG.	158
Taula 4.14.	Creixement màxim assolit per les soques salvatges i mutants resistents a rifampicina en diversos medis de cultiu.	160
Taula 4.15.	Velocitat específica de creixement per les soques salvatges i mutants resistents a rifampicina en diversos medis de cultiu.	161
Taula 4.16.	Producció de DAPG per les soques salvatges i mutants resistents a rifampicina en diversos medis de cultiu.	162
Taula 4.17.	Soques que van assolir el valor màxim de cada un dels paràmetres determinats en funció del medi de cultiu.	163
Taula 4.18.	Medis de cultiu en els quals es va assolir el valor màxim de cada un dels paràmetres determinats.	165

Capítol 5 Producció de DAPG i colonització de fruits i arrels per soques seleccionades de *P. fluorescens*

Taula 5.1.	Població de bacteris Rif ⁺ i totals a les arrels de GF677 a diferents temps de mostreig.	192
Taula 5.2.	Producció de DAPG en ferides de fruits per soques de <i>P. fluorescens</i> .	193
Taula 5.3.	Eficàcia de soques de <i>P. fluorescens</i> en la inhibició de les infeccions causades per diversos fitopatògens.	194
Taula 5.4.	Promoció del creixement en els portaempelts GF677 i Marianna per soques de <i>P. fluorescens</i> .	196
Taula 5.5.	Metabòlits produïts, de la inhibició de la infecció sobre material vegetal i de la promoció del creixement per soques de <i>P. fluorescens</i> .	196
Taula 5.6.	Pes fresc mitja de les tomateres i de les pomeres als 72 dies de la sembra.	198
Taula 5.7.	Pes fresc mitjà de les pomeres i tomateres inoculades amb soques de <i>P. fluorescens</i> als 72 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada.	199

Taula 5.8.	Taula de l'ANOVA de l'efecte de Repetició, Experiment i Soca en el pes de les arrels de pomera i de tomatera.	200
Taula 5.9.	Pes mitjà de les arrels de pomeres i de tomateres als 72 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada.	203
Taula 5.10.	Relació entre la part aèria i la radical en pomeres i tomateres als 72 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada.	204
Taula 5.11.	Taula de l'ANOVA de l'efecte de l'Hoste, Experiment i Soca en la població establerta a les llavors en el moment de la sembra.	205
Taula 5.12.	Població de bacteris viables Rif ⁺ a les llavors de pomera i de tomatera a la sembra, en funció de la soca aplicada.	205
Taula 5.13.	Taula de l'ANOVA per l'efecte de <i>Soca i Hoste</i> en la població a les arrels a diferents temps de mostreig.	206
Taula 5.14.	Població de bacteris viables Rif ⁺ a les arrels de pomera i de tomatera als 37 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada.	207
Taula 5.15.	Població de bacteris viables Rif ⁺ a les arrels de pomera i de tomatera als 72 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada.	208
Taula 5.16.	Població total a les arrels de pomera i de tomatera als 72 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada.	209

ANNEXOS

Taula A.1.	Soques de <i>P. fluorescens</i> de la col·lecció EPS que produeixen HCN fent referència a la planta i òrgan d'origen.	I
Taula B.1a.	Taula de la significança de la Complexitat en funció de la Consistència quan s'ha addicionat Ferro al medi.	III
Taula B.1b.	Taula de la significança de l'efecte de la Complexitat en funció de la Consistència sense addició de Ferro al medi.	III
Taula B.2a.	Taula de la significança de l'efecte de la Consistència en funció de l'addició de Ferro en el medi GA.	IV
Taula B.2b.	Taula de la significança de l'efecte de la Consistència en funció de l'addició de Ferro en el medi KB.	IV
Taula B.3a.	Taula de la significança de l'efecte de l'addició de Ferro en funció de la Consistència en el medi GA.	V
Taula B.3b.	Taula de la significança de l'efecte de l'addició de Ferro en funció de la Consistència en el medi KB.	V
Taula C.1a.	Taula de la significança de l'efecte de la Complexitat en funció de la Consistència quan hi ha addició de Glucosa al medi.	VI
Taula C.1b.	Taula de la significança de l'efecte de la Complexitat en funció de la Consistència quan no s'addiciona Glucosa al medi.	VI

Taula C.2a.	Taula de la significança de l'efecte de la Consistència en funció de l'addició de Glucosa en el medi 21C.	VII
Taula C.2b.	Taula de la significança de l'efecte de la Consistència en funció de l'addició de Glucosa en el medi LB.	VII
Taula C.3a.	Taula de la significança de l'efecte de l'addició de Glucosa en funció de la Consistència en el medi 21C.	VIII
Taula C.3b.	Taula de la significança de l'efecte de l'addició de Glucosa en funció de la Consistència en el medi LB.	VIII
Taula D1.	Pes fresc mitjà de les arrels de pomera i de tomatera als dies 37, 52 i 72 després de la sembra a l'experiment A en funció de la soca aplicada.	IX
Taula D2.	Pes fresc mitjà de les arrels de pomera i de tomatera als dies 37, 52 i 72 després de la sembra a l'experiment B en funció de la soca aplicada.	IX
Taula E.1.	Població de bacteris viables Rif ^r a les arrels de pomera i tomatera als 52 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada.	X

Llistat de Figures

Capítol 1 Control biològic de les malalties de les plantes

Figura 1.1.	Interaccions entre els elements que intervenen en el control biològic de patògens de plantes.	4
Figura 1.2.	Principals metabòlits secundaris produïts per <i>P. fluorescens</i> .	12
Figura 1.3.	Ruta per la biosíntesi de l'àcid fenazina-1-carboxílic i derivats.	19
Figura 1.4.	Ruta per la biosíntesi de la pirrolnitrina.	21

Capítol 2 Caracterització de la producció de metabòlits secundaris amb activitat antibiòtica en soques de *Pseudomonas fluorescens*

Figura 2.1.	Esquema seguit per l'extracció i purificació del PCA.	53
Figura 2.2.	Inhibició <i>in vitro</i> del creixement d' <i>S. vesicarium</i> en medi extracte de malta.	59
Figura 2.3.	CCP de l'extracte orgànic de les soques EPS317, CHA0 i Q2-87 crescudes en agar KB i polvoritzades amb DSA.	61
Figura 2.4.	Assaig al toc per a la detecció d'HCN en la solució absorbidora i en microplaca per les soques EPS288 i EPS375.	63
Figura 2.5.	Espectre d'infraroig de la fase vapor d'un cultiu de la soca EPS288.	64
Figura 2.6.	Caracterització del 2,4-diacetilfloroglucinol.	67
Figura 2.7.	Caracterització de l'àcid fenazina-1-carboxílic.	69
Figura 2.8.	Estructura del 2-hexil-5-propilresorcinol i de la pirrolnitrina produïts per <i>P. fluorescens</i> BL915.	71
Figura 2.9.	Detecció de la pirrolnitrina per cromatografia de capa prima. Revelats amb vainillina i bioautografia.	71

Capítol 3 Estudi de la producció d'àcid cianhídric en *P. fluorescens* EPS288

Figura 3.1.	Biosíntesi d'HCN a partir de la glicina.	82
Figura 3.2.	Sistema de recollida de l'HCN produït per un cultiu de bacteris.	89
Figura 3.3.	Distribució del sistema per la incubació dels cultius i de recollida de l'HCN produït.	100
Figura 3.4.	Cinètiques de creixement i de recollida de l'HCN produït de la soca EPS288 a 25°C amb cabals de 0,5 L/min i 1,0 L/min.	101

Figura 3.5.	Corba de creixement i de producció d'HCN de la soca EPS288 a 5°C. Sembres a alta i a baixa concentració inicial.	104
Figura 3.6.	Corba de creixement i de producció d'HCN de la soca EPS288 a 20°C. Sembres a alta i a baixa concentració inicial.	105
Figura 3.7.	Corba de creixement i de velocitat específica de producció d'HCN de la soca EPS288. Incubacions a 5°C i a 20°C i sembra a alta concentració inicial.	106
Figura 3.8.	Concentració de bacteris viables a les 72 h d'incubació. Sembres a alta i a baixa concentració inicial.	107
Figura 3.9.	Relació entre la producció d'HCN i μ i amb $dHCN/dt$ a baixa concentració de sembra	110
Figura 3.10.	Corbes de creixement de la soca EPS288 obtingudes amb el bioscreen. Efecte de la font de carboni amb el medi 21C.	113
Capítol 4	Estudi de la producció de 2,4-diacetilfloroglucinol en soques de <i>P. fluorescens</i>	
Figura 4.1.	Ruta de biosíntesi del 2,4 diacetilfloroglucinol.	130
Figura 4.2	Cinètica de creixement i de producció de DAPG per les soques Q2-87, EPS808 i JBR 1-70.	131
Figura 4.3.	Corbes de creixement de diverses soques crescudes en medi LB + Glucosa.	156
Figura 4.4.	Corbes de creixement de la soca EPS808 en diversos medis de cultiu.	157
Figura 4.5.	Percentatge de varianza explicat per cada factor i per la seva interacció.	159
Capítol 5	Producció de DAPG i colonització de fruits i arrels per soques seleccionades de <i>P. fluorescens</i>	
Figura 5.1.	Ferides de les peres Conference i de les pomes Golden tractades amb les soques Q2-87, JBR 1-70 i EPS808.	193
Figura 5.2.	Aspecte dels plançons de pomera i de tomatera als 45 dies de la sembra.	197
Figura 5.3.	Pes de les arrels de les pomeres als 37 dies, 52 dies, i 72 dies, en els experiments A i B.	201
Figura 5.4.	Pes de les arrels de les tomateres als 37 dies, 52 dies, i 72 dies, en els experiments A i B.	202
Figura 5.5.	Percentatge de bacteris viables Rif ⁺ de les soques aplicades respecte a la població total en arrels de pomera i de tomatera als dos experiments als 37, 52 i 72 dies de la sembra.	211

Abreviacions

Les abreviacions utilitzades en aquest treball són:

A₆₀₀: Absorbància a 600 nm

ANCOVA: Anàlisi de la covariança

ANOVA: Anàlisi de la Variança

AOAC: American Organization of Analytical Chemists

AR: Alquil Resorcinol

BCA: Agent de Biocontrol

BN: Brou Nutritiu

BPCP: Bacteris Promotors del Creixement de Plantes

CCP: Cromatografia de Capa Prima

CLAR: Cromatografia Líquida d'Alta Resolució

CLFC: Cromatografia Líquida Flash en Columna

col: Col·laboradors

DAPG: 2,4-diacetilfloroglucinol

DSA: Diazotized Sulfanilic Acid (Àcid diazosulfanílic)

EPA: Environmental Protection Agency

FTIR: Espectroscòpia d'Infraroig amb Transformada de Fourier

Ggt: *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

h: Hores

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IAA: Àcid indolacètic

IPM: Integrated Pest Management

ISR: Resistència Sistèmica Induïda

IR: Espectroscòpia d'Infraroig

KB: King B

LB: Luria Bertani

MAPG: Monoacetilfloroglucinol

mg: Miligrams (10^{-3} g)

min: Minuts

mL: Mil·lilitres (10^{-3} L)

µL: Microlitres (10^{-6} L)

ODS: Octadecilsilà

PA: Per Anàlisi

PCA: Àcid fenazina-1-carboxílic

PCR: Reacció en Cadena de la Polimerasa

PDA: Agar Patata Dextrosa

p.eb.: Punt d'ebullició

Pf: *Pseudomonas fluorescens*

PFGE: Electroforesi de Camp Pulsant en Gel d'agarosa

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Plt: Pioluteorina

ppm: Parts per milió

Prn: Pirrolnitrina

PRS: Puríssim

RPCP: Rizobacteris Promotors del Creixement de Plantes

RMN: Ressonància Magnètica Nuclear

rpm:Revolucions per minut

SAR: Resistència Sistèmica Adquirida

ufc: Unitats formadores de colònies

UV: Ultraviolat

VIS: Visible

Capítol 1

El control biològic de les malalties de les plantes

1.1 Introducció

Es considera que la publicació del llibre la *Primavera silenciosa* de Rachel Carson el 1962, marcà l'inici de la conscienciació de la població mundial vers els efectes dels pesticides sobre el medi ambient. L'impacte del llibre va ésser considerable malgrat algunes inexactituds i conclusions no demostrables (De Waard i col., 1993; Knight i col., 1997). Així, termes com contaminació ambiental, seguretat en el menjar i de l'agricultor, i efectes no desitjats dels pesticides químics, són tots derivats dels seus efectes colaterals. Aquests són els principals problemes inherents als pesticides que estan impulsant la recerca i desenvolupament d'alternatives com els biopesticides, de manera que permetin un creixement sostenible de l'agricultura sense comprometre la conservació del medi ambient (Ragstdale i Sisler, 1994).

L'augment sostingut de la població mundial està provocant una demanda creixent d'aliments. Per tal de cobrir-la, caldria augmentar la superfície de conreu, amb el problema que això podria provocar -el més greu, la desforestació-, o bé augmentar la producció amb varietats més productives o disminuint les pèrdues degudes a les malalties o plagues que ataquen a les collites i provoquen fins un 30% de pèrdues (Novartis,1998). Actualment, per minimitzar aquestes pèrdues s'utilitzen els pesticides; per això, cal informar als consumidors per tal que entenguin aquest paper que proporcionen els pesticides (De Waard i col., 1993).

És conegut i acceptat que els pesticides permeten protegir una collita però no ho és tant que tenen diversos efectes adversos, tals com ser transportats pels vents, aigua i altres vectors de manera que poden produir un efecte no desitjat sobre altres organismes que en principi no eren diana i en llocs molt distants d'on s'han aplicat. Així, per diversos pesticides s'ha demostrat que tenen efectes nocius tant pels humans com per la fauna, induint malalties que en alguns casos posen en perill la continuïtat d'alguna espècie (Ragstale i Sisler, 1994).

Les millores en les tècniques analítiques han permès detectar nivells cada vegada més baixos de residus en aliments i en aigües, de manera que han proporcionat dades que justifiquen les majors restriccions que es van introduint en l'ús de pesticides i una major sensibilització entre la població sobre la necessitat de consumir productes que comportin poc risc per la salut (Carlson i Wetzstein, 1993).

Els pesticides moderns, en general, no presenten problemes de toxicitat aguda. És per això que els estudis sobre els efectes dels pesticides en l'home es fan per la toxicitat crònica i es concentren en el càncer (De Waard i col., 1993). En aquest marc, als USA es van detectar uns 70 pesticides en aigües subterrànies de 38 estats i la EPA (Environmental Protection Agency) calcula que anualment s'indueixen als USA entre 3000 i 6000 nous casos de càncer associats als residus presents en els aliments i de 50 a 100 relacionats directament amb l'aplicació de pesticides (Herrera i Chet, 1998).

Un altre dada a contemplar en aquest escenari és que els patògens contínuament desenvolupen resistències contra els pesticides que s'estan utilitzant (Baldwin i Rathmell, 1988; De Waard i col., 1993; Levy, 1998). Això comporta que s'hagin d'utilitzar nous productes, els quals alhora també actuen sobre altres organismes que no eren l'objectiu de la seva aplicació. Alguns d'aquests organismes són beneficiosos per l'entorn o tenen una bellesa singular, i llavors per protegir-los la legislació acaba limitant l'ús d'aquests productes (De Waard i col., 1993; Wilson i Jackson, 1997). Per evitar o disminuir l'aparició de resistències la solució efectiva és una aplicació racional dels pesticides i conèixer el mecanisme pel qual es desenvolupa la resistència (Baldwin i Rathmell, 1983; De Waard i col., 1993). Un aspecte que també limita l'aplicació de pesticides és la revocació del registre d'alguns dels més efectius, amb el consegüent augment de l'interès per altres alternatives més segures i en concret pel biocontrol (Wilson, 1997).

Aquesta situació difícilment és sostenible a llarg termini la qual cosa estimula l'estudi de noves estratègies per a la protecció dels conreus, allunyades d'aquest enfoc tradicional. Aquestes alternatives es preveuen tant a producció (Wilson, 1997), com a postcollita (El-Ghaouth, 1997; Viñas, 1997), on també hi ha els mateixos problemes de pèrdues per malalties i de presència de residus de pesticides, però amb l'avantatge que l'ambient controlat durant l'emmagatzematge pot ser favorable per la utilització de sistemes alternatius de protecció com serien els agents biològics.

Les indústries fabricants de pesticides, mogudes per la pressió social i dels governs, han realitzat un canvi en l'estratègia cercant arguments més ambientals i basats en l'aplicació racional dels productes per tal de mantenir el seu ús. Malauradament, els pesticides encara són necessaris en l'agricultura moderna i ho seguiran essent en el futur proper. Els fabricants argumenten que els pesticides són substàncies perilloses, tant pel medi ambient com per l'home, i que per això s'han d'utilitzar d'una manera segura. S'han d'aplicar amb cura i de la manera més eficient per protegir les collites, els animals, i deixar els menors residus possibles en els aliments i en l'ambient (Novartis, 1998). Amb totes aquestes recomanacions, la indústria sembla apostar per un ús racional i sostingut dels pesticides.

Aquest escenari ha propiciat la conscienciació per l'ús racional de la tecnologia actual i el desenvolupament de noves estratègies -com és el cas del Control Integrat- on es combinen estratègies racionals d'aplicació de pesticides amb el seguiment i control dels paràmetres que faciliten o alenteixen el desenvolupament de la malaltia – inòcul del patogen, tècniques de conreu,...- (Carlson i Wetzstein, 1993; Wilson, 1997).

Aquest seria el cas del Control Integrat o IPM -Integrated Pest Management-, estratègia amb la qual es busca maximitzar la producció i qualitat d'una collita i alhora disminuir els perills per la salut i pel medi ambient (Knight i col., 1997). En lloc de l'ús exclusiu de pesticides químics, s'utilitzen sistemes de control més ecològics com són rotació de cultius, depredadors naturals de les plagues, varietats resistents, o l'estimulació de les defenses naturals de les plantes, entre altres (Thomas, 1999). L'objectiu no és eradicar els patògens, insectes o males herbes sinó mantenir-los a nivells acceptables. En aquesta estratègia, els agents químics s'utilitzen de manera molt selectiva i només quan els altres mètodes s'han demostrat insuficients (www.gcpf.org).

Les estratègies de conreu afecten de diferent manera la dinàmica de les malalties, des de l'augment de patògens en el sòl degut a la disminució del llaurat per evitar l'erosió del sòl (Bockus i Shroyer, 1998), fins als efectes clarament beneficiosos que ha demostrat al llarg del temps la rotació de cultius, podent així aconseguir una millora en la qualitat dels productes agrícoles a un cost acceptable (Carlson i Wetzstein, 1993).

Pel desenvolupament de noves estratègies de control s'ha de tenir en compte també quin és l'entorn on treballen els agricultors i com escullen les millors tàctiques de

protecció, i a partir d'aquí construir models de decisió o protocols de tractament (Carlson i Wetzstein, 1993).

1.2 Control biològic

El concepte de biocontrol o control biològic s'utilitzava ja des de principis de segle per anomenar l'estratègia de control de malalties de plantes en la qual hi ha una disminució de l'inòcul o de l'activitat d'un patogen o d'una plaga mitjançant l'aplicació d'un o més organismes, inclòs l'hoste i exclòs l'home (Baker, 1987). En el control biològic s'estableix un sistema amb tres subjectes: l'*hoste*, -la planta o la fruita-, que és atacat pel *patogen*, el qual li provoca una malaltia, i l'*antagonista*, organisme que evita o disminueix la incidència de la malaltia. Hi ha múltiples interaccions entre aquests elements i també amb l'ambient que donen lloc a un sistema complex (Figura 1.1). Així, s'ha advertit que hi ha moltes espècies de bacteris amb potencial com a agents de biocontrol de les quals només se n'han explorat unes quantes (Weller, 1988).

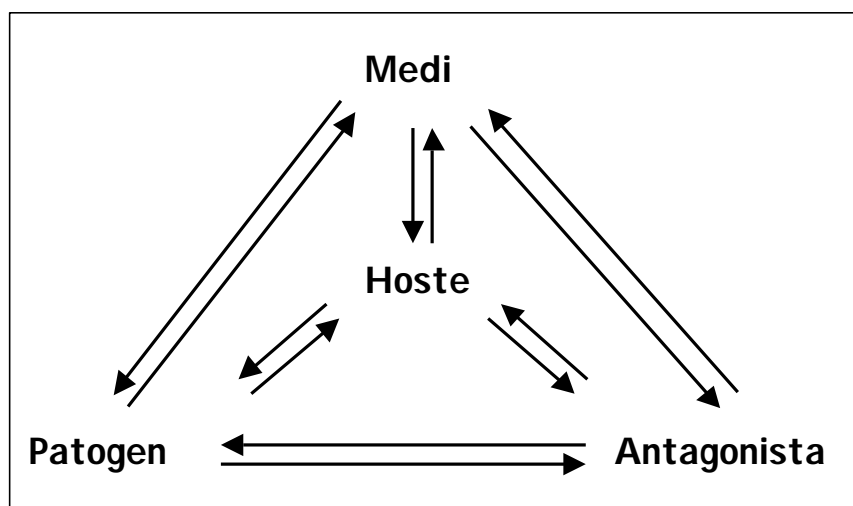


Figura 1.1. Interaccions entre els elements que intervenen en el control biològic de patògens de plantes.

Figure 1.1. Interactions among the elements that participate in the Biological control of plant pathogens.

Aquestes interaccions s'originen de manera natural en tots els ecosistemes agrícoles. Algunes vegades és visible una reducció de la incidència de la malaltia respecte a zones amb igual pressió com seria el cas dels sòls supressius vers el "take all" causat pel fong *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* descrits en el monocultiu del

blat als EEUU (Weller i col., 1988; Schisler i col., 1998) o vers la podridura del tabac (black root rot) causada pel fong *Thielaviopsis basicola* a Suïssa (Stutz i col., 1986). Altres sistemes, en els que s'ha estudiat el control biològic, són el control de males herbes amb fongs patògens de plantes (TeBeest, 1993), però segurament en el control de malalties fúngiques i bacterianes és on hi ha més referències i estudis. Whipps i McQuilken (1993) en fan una revisió amb múltiples exemples de funcionament tant a nivell d'investigació com a nivell comercial.

Al llarg dels temps, i encara actualment, hi ha petites matisacions entre els investigadors per definir el control biològic. S'ha definit com l'ús d'organismes vius per modificar l'ecosistema agronòmic i controlar una malaltia de la collita o per prevenir l'establiment d'una plaga (Dowling i O'Gara, 1994). S'ha originat una evolució del concepte a mida que es coneixien més les interaccions existents, fins a definir-lo com: *El control de malalties de plantes mitjançant un procés biològic o el producte d'un procés biològic* (Wilson, 1997).

Aquesta darrera definició inclou totes les interaccions entre hoste, patogen i antagonista i exclou el control químic. Altres conceptes que s'han utilitzat per explicar la millora en la salut de les plantes per acció de microorganismes són el de la *població microbiana relacionada amb la millora sanitària de les plantes*, o el de la Comunitat Microbiana Específica de la Rizosfera (Rhizosphere Specific Microbial Community) per descriure el conjunt de microorganismes de la rizosfera que promou la salut de les plantes d'un determinat cultiu (Vilich i Sikora, 1998).

En una revisió de la nomenclatura Bashan i Holguin (1998) es plantegen dues definicions que englobarien tots els bacteris beneficiosos per les plantes: "Biocontrol-BPCP" –Bacteris Promotors del Creixement de Plantes- per bacteris que suprimeixen el fitopatogen produint substàncies inhibidores o augmentant la resistència natural de la planta, i "BPCP" pels bacteris que afecten al creixement de la planta per altres mecanismes diferents a la supressió de microorganismes patògens. D'aquesta manera, es pot diferenciar entre bacteris que promouen el creixement de plantes per mecanismes tipus *Rhizobium*, que formen els nòduls en lleguminoses on hi ha fixació del nitrogen atmosfèric que assimilarà la planta, i els bacteris que el promouen per acció indirecta, bé eliminant l'acció dels patògens, bé estimulants les defenses de les plantes i fent-les més resistents a les malalties (Jackson i Taylor, 1996).

A partir d'aquesta nomenclatura s'actualitzaria el terme *agent de biocontrol* perquè no diferencia entre bacteris, llevats, fongs i altres organismes que tenen capacitat de controlar els patògens i s'actualitzaria el terme RPCP –Rizobacteris Promotors del Creixement de Plantes- que s'havia definit per aquells bacteris que utilitzats com a inòcul de llavors fan augmentar el creixement i el rendiment de les collites (revisat per Kloepper, 1992; Kloepper i col., 1980), i que colonitzen les arrels de manera agressiva (Weller, 1988), o com “Bacteris aïllats de la rizosfera que han demostrat incrementar la salut o el rendiment de les plantes” (Dowling i O’Gara, 1994).

Un altre terme que s'utilitza per anomenar als productes pel control de malalties i plagues d'origen no sintètic, però que en deriva, és el de biopesticida. Aquest terme que prové del concepte clàssic de pesticida, s'utilitza en les etapes de producció i comercialització i engloba des d'agents microbians, nemàtodes, virus, fins a pesticides derivats de plantes o feromones d'insectes (Menn i Hall, 1999).

En el nostre treball s'utilitzarà el terme (candidat a) “agent de biocontrol” per mencionar els bacteris utilitzats en tot el procés de recerca independentment que hagin mostrat acció en la millora del creixement de les plantes. Els bacteris de la col·lecció EPS han estat seleccionats en base a proves d'antagonisme *in vitro* o a proves de promoció del creixement de plantes, i les soques de referència estan considerades majoritàriament inhibidores de malalties o han estat seleccionades de sòls supressius.

Fins ara s'ha analitzat el sistema des del punt de vista de l'antagonista o del microorganisme beneficiós, però l'hoste té un paper important en aquestes interaccions. Es pot incidir sobre l'hoste per tal de seleccionar una població beneficiosa pel cultiu (Vilich i Sikora, 1998). D'aquesta manera el coneixement dels factors que regulen aquestes interaccions de part de l'hoste i del paper dels gens de la planta permetrà tenir una visió més completa de les interaccions planta-microorganismes que possibilitarà un millor control de les malalties de plantes i establir nous objectius per la millora de les collites en el marc de l'agricultura sostenible (Smith i Goodman, 1999).

La planta té una influència important en aquestes associacions desitjades i beneficioses, i les plantes han evolucionat genèticament per suportar i seleccionar aquestes interaccions (Smith i Goodman, 1999). Els mecanismes poden ser directes, per secreció de metabòlits que poden actuar com a fitohormones (àcid salicílic o àcid indol acètic) i/o indirectes suprimint els patògens (Dowling i O’Gara, 1994). En general,

aquesta no sol ésser una interacció invasiva del teixit de la planta com els rizobacteris o microritzes arbusculars, sinó superficial, sobre l'arrel (Smith i Goodman, 1999).

També el coneixement de la comunitat microbiana present en el sòl de la finca a tractar permetrà desenvolupar sistemes de producció que afavoreixin la diversitat i els mecanismes d'autoregulació per tal de millorar l'estat sanitari de les arrels de les plantes (Schroth i Hancock, 1982; Vilich i Sikora, 1998). Els microorganismes associats a plantes -rizobiota, flora arbuscular i RPCP-, afecten a la seva salut i desenvolupament, suprimint malalties, augmentant l'absorció de nutrients, fixant el nitrogen atmosfèric i promovent el creixement de la planta entre altres associacions. Hi ha una correlació entre l'estat sanitari de la planta i les característiques de la microbiota associada a la rizosfera.

Actualment s'utilitzen bàsicament dues estratègies per implementar el control biològic en un sistema. D'una banda, una aproximació bioaugmentativa i que implica l'ús d'inòculs microbians, generalment microorganismes que tenen un espectre d'acció determinat i que cal anar aplicant periòdicament per mantenir-ne l'eficàcia (Cook, 1993), y d'altra banda, una estratègia bioestimulatòria que mitjançant l'ús d'esmenes orgàniques tipus compost o bé fent rotació amb diferents plantes (varietats o espècies) busca estimular i seleccionar l'activitat antagonista de la microbiota autòctona (Cook i col., 1996; Vilich i Sikora, 1998; Nelson i Kraft, 2000).

1.2.1 Camps d'aplicació dels agents de biocontrol

L'aplicació dels agents de biocontrol és una estratègia de protecció de conreus que té elevades perspectives de creixement, però per poder implantar-se cal escollir aquells casos en que els agents biològics poden suplir als agents químics amb èxit (Powell, 1993).

Una opció interessant és que l'aplicació de microorganismes pel control de malalties pot ser d'utilitat als països en vies de desenvolupament, ja que en general en aquests països la collita no està sotmesa a la pressió pel rendiment i es podria alleugerir la seva dependència de l'importació de pesticides (Jones i col., 1993). Una altra opció seria la seva utilització en sistemes de producció protegits com els hivernacles (Bélanger i col., 1998), o en postcollita (Janisiewicz i Roitman, 1988; Smilank i Denis-Arrue, 1992; Janisiewicz, 1998; Viñas, 1997; Francés, 2000) on les condicions de temperatura i

humitat es poden controlar i malgrat ser un mercat més petit que la protecció a camp, les collites, com la fruita i la verdura solen tenir un alt valor afegit (Chalutz i Droby, 1998).

Per això, a priori, sembla que en les condicions controlades d'emmagatzamament hi ha més possibilitats d'èxit que no en el biocontrol a camp (Janisiewicz, 1998; Schisler i col., 1998).

El control de malalties en postcollita presenta algunes particularitats com al ser l'ambient controlat (temperatura, humitat, atmosfera,...) es pot afavorir a l'antagonista i que l'aplicació directament sobre l'hoste n'afavoreix la colonització, i que si es compleixen podria significar un camp d'aplicació dels bacteris agents de biocontrol (Chalutz i Droby, 1998). També hi ha algunes limitacions que poden retardar la seva aplicació, entre elles que cal un control molt proper al 100%, que la regulació per l'aplicació de microorganismes directament sobre productes de menjar és força estricta i que el mercat potencial és més petit comparat amb de protecció a camp (Chalutz i Droby, 1998).

Una característica desitjable en els agents de biocontrol és la seva compatibilitat amb els pesticides utilitzats habitualment, la qual cosa permetria la seva aplicació simultània podent baixar la quantitat de pesticida a aplicar (El-Ghaouth, 1997). S'ha demostrat que amb l'ús de la soca *P. fluorescens* EPS288 complementada amb l'aplicació de quantitats menors de fungicida, s'aconseguia un nivell de protecció no diferenciable del tractament habitual amb fungicides en condicions reals de frigoconservació (Francés, 2000).

En el cas de malalties localitzades al sòl, el control químic és, en alguns casos, ineficaç degut a què l'heterogeneïtat física i química del sòl impedeix que s'assoleixin concentracions efectives de pesticida. En aquests casos, l'ús d'agents de biocontrol, que poden colonitzar efectivament les arrels i no deixen residus podran ser una bona alternativa al control químic (Herrera i Chet, 1998). També, en el control de malalties de la gespa dels camps de golf el biocontrol té un potencial important. La gespa dels camps de golf és un dels sistemes planta-sòl on hi ha una manipulació més intensa; existeix una gran pressió sobre aquest ecosistema i l'aplicació massiva d'adobs i de pesticides ha creat problemes que es podran solucionar amb un enfoc més biològic i així assolir un ecosistema més sostenible (Nelson i Kraft, 2000).

Un altre camp d'aplicació dels agents de biocontrol és el mercat dels productes lliures de pesticides. Si aquest creix, el biocontrol pot tenir una gran empenta (Sivan i Chet, 1992).

1.2.2 Situació actual

L'aplicació comercial de bacteris com a agents de biocontrol no està encara gaire estesa, i representa només una petita porció, un 1,3%, de les vendes totals de pesticides i d'aquests el 90% són insecticides derivats del *Bacillus thuringiensis* (Bt). (Powell, 1993; Menn i Hall, 1999). No podem oblidar que per tal que el control biològic de les malalties i plagues de plantes tingui èxit cal que sigui viable econòmicament.

Entre els factors que limiten el seu ús comercial cal destacar les mancances pròpies dels agents biològics com són la falta d'un ampli espectre d'activitat, la baixa velocitat d'actuació, dificultats en la conservació i aplicació, entre altres, i els avantatges dels pesticides químics com activitat residual llarga i el seu baix cost relatiu (Sivan i Chet, 1992; Powell, 1993; Cook i col., 1996; Herrera i Chet, 1998; Coulter, 1999). Altres raons es troben en el plantejament del seu desenvolupament: s'assagen pocs candidats, els microorganismes es seleccionen en base a proves que no es reproduïxen a camp i no en base al seu futur desenvolupament comercial o contemplant factors de seguretat com són, toxicitat sobre organismes que no són diana o possibilitat de provocar al·lèrgies en humans i en animals (Fravel, 1988; Cook i col., 1996; Schisler i Slininger 1997). Per això es creu que els fungicides químics continuaran essent indispensables en el control de les malalties de plantes (Knight i col., 1997). No obstant, es creu que la recerca d'estratègies de control biològic de les infeccions fúngiques continuarà creixent juntament amb el menor ús de pesticides químics i una major conscienciació vers la protecció del medi ambient (Schroth i Hancock, 1982; Whipps i McQuilken, 1993).

Existeix una conscienciació social creixent sobre dels beneficis de l'agricultura sostenible, i això incentiva l'estudi d'una solució intermitja, com és la cerca de fungicides basats en metabòlits microbians els quals es modifiquen per millorar les seves característiques (Baldwin i Rathmell, 1988). Es desenvolupen fungicides amb nous mecanismes d'acció per minimitzar l'aparició de resistències (Baldwin i Rathmell, 1988; Knight i col., 1997), i també es formulen en combinacions, com el producte Switch (Novartis), que combina l'acció de fludioxonil (derivat de la pirrolnitrina) i de

ciprodinil (derivat de anilopirimidines). Aquest preparat es presenta com a tractament contra la *Botrytis cinerea* i altres fongs causants de malalties en verdures i raïm, i es postula que no és tòxic ni per abelles ni per altres insectes beneficiosos i que és adequat per incloure'l en programes de lluita integrada.

Als EEUU el govern ofereix incentius per tal de potenciar que hi hagi desenvolupament de nous productes basats en agents de biocontrol. Bàsicament hi ha regulacions menys estrictes que pels agents químics, de manera que les despeses d'investigació en temps i diners poden ser menors (Froyd, 1997; Brannen i Kenney, 1997).

Aconseguir un funcionament fiable de l'agent de biocontrol, amb una eficàcia semblant o igual que els agents químics, i de producció i amb formulacions econòmicament factibles són algunes de les premisses que la indústria exigeix per tal que un agent de biocontrol passi a tenir un interès comercial (Froyd, 1997, Brannen i Kenney, 1997).

L'èxit d'un agent de biocontrol pot ser també degut no a la seva elevada eficàcia sinó en poder utilitzar-se en un procés de Control Integrat en combinació amb fungicides sintètics com és el cas del Kodiak (*B. subtilis*) pel control de *Rhizoctonia* o *Fusarium* en cotó (Brannen i Kenney, 1997; Thomas, 1999) o de *Trichoderma* que també és compatible amb diversos pesticides (Sivan i Chet, 1992).

En base als coneixements actuals de les interaccions implicades s'han dissenyat protocols per la selecció (Handelsman i Stabb, 1996) i també en el control del "take-all" del blat que van fins a la producció a nivell comercial (Cook, 1993).

Darrerament i donada la complexitat de les interaccions i factors implicats en el biocontrol es considera interessant trobar quines característiques fenotípiques o genotípiques estan correlacionades amb la capacitat d'exercir biocontrol per diversos grups de microorganismes en condicions reals (Sujii i col., 1996; Ellis i col., 2000).

1.3 *Pseudomonas fluorescens* i control biològic

Uns dels microorganismes amb més expectatives com a agent de biocontrol són els bacteris de l'espècie *Pseudomonas fluorescens* (Weller, 1988). Aquests són bacils mòbils, amb un o més flagels polars, gram negatiu, quimioheteròtrofs, capaços d'utilitzar quasi totes les fonts de carboni; no formen espores i habitualment són aerobis

estrictes; es troben pràcticament en tots els ambients sòl, fulles, aigua, i sediments; produeixen pigments fluorescens de color groc-verd en medis pobres en ferro; finalment, estan implicats en múltiples processos biològics tals com deteriorament d'aliments o control biològic (Palleroni, 1984; O'Sullivan i O'Gara, 1992; Budzikiewicz, 1993). Actualment la classificació del gènere encara està en discussió i es basa tant en característiques fenotípiques com empremtes genètiques (Palleroni, 1984; Budzikiewicz, 1993; revisat per Badosa, 2001).

Els bacteris del gènere *Pseudomonas* són capaços de metabolitzar múltiples fonts de carboni i tenen una velocitat de creixement elevada la qual cosa fa que puguin competir a les arrels amb èxit amb els fongs, que tenen un creixement més lent (Kloepper, 1992). La capacitat per colonitzar l'arrel i de mantenir una elevada població és un factor important a tenir en compte a l'hora de seleccionar als agents de biocontrol (Herrera i Chet, 1998).

Aquests bacteris es caracteritzen també per produir una gran quantitat de metabòlits diferents, alguns dels quals tenen activitat antibiòtica (Leisinger i Margraff, 1979; Schroth i Handock, 1982; O'Sullivan i O'Gara, 1992; Budzikiewicz, 1993; Dowling i O'Gara, 1994). A la Figura 1.2 es mostren els principals metabòlits produïts per *P. fluorescens*. La producció d'aquests metabòlits està relacionada amb el metabolisme secundari que no és essencial per la vida dels microorganismes, i es caracteritza per utilitzar productes del metabolisme primari com a precursors per construir noves substàncies (Drew, 1977; Bantley, 1999). La definició de metabòlit secundari és vague i està relacionada amb substàncies no usades com a font d'energia o de reserva i que s'originen per vies ramificades del metabolisme primari (Budzikiewicz, 1993), o metabòlits produïts només per alguns grups de microorganismes amb un paper no essencial per la seva viabilitat (Hopwood i Merric, 1977). En aquesta disciplina es diferencien dues fases en el creixement bacterià, la trofofase -quan hi ha creixement bacterià per acció del metabolisme primari- i idiofase -quan el creixement es frena o acaba i les vies del metabolisme secundari s'activen i té lloc la síntesi dels metabòlits secundaris-. Aquesta darrera fase coincideix amb la fase estacionària (Hopwood i Merric, 1977; Kolter i col, 1993).

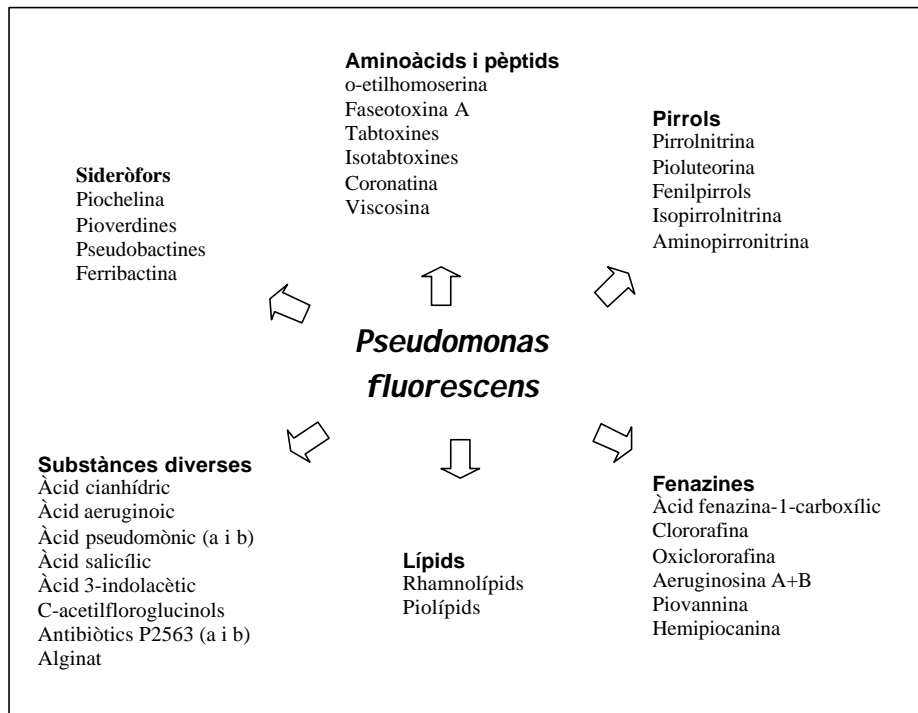


Figura 1.2. Principals metabòlits secundaris produïts per *P. fluorescens* (De Dowling i O'Gara, 1994).

Figura 1.2. Range of secondary metabolites produced by *P. fluorescens* (From Dowling i O'Gara, 1994).

L'interès per la utilització de *Pseudomonas* sp. com a agents de biocontrol es degut tant a la seva ubiqüitat com a la capacitat de colonitzar de manera efectiva les arrels de les plantes (Weller, 1988). Hi ha però alguns problemes que retarden encara el seu ús en la protecció de conreus contra malalties. Els principals són la manca de resultats en tots els tipus de sòls (Weller, 1988; Cook, 1993; O'Sullivan i O'Gara, 1992) i la persistència abans de la sembra quan no s'apliquen juntament amb les llavors (Suslow i Schroth, 1982).

1.3.1 Mecanismes de biocontrol de malalties de les plantes

El coneixement dels mecanismes pels quals els agents de biocontrol exerceixen el seu efecte beneficiós a les plantes és un dels aspectes que es considera cabal en la seva selecció i ús i per evitar en un futur la inconsistència de resultats en l'aplicació a camp pel control de malalties de plantes (Fravel, 1988; Kloepper, 1992; Cook, 1993; Köhl i Fokkema, 1998; Tronsmo i Hjeljord, 1998). El seu coneixement permetrà saber

quines manipulacions i sobre quins paràmetres s'ha d'incidir per tal d'assegurar l'eficàcia de l'agent de biocontrol (Thomashow i Weller, 1996; Chalutz i Droby, 1998). Malgrat això, en el cas de l'agent de biocontrol *Trichoderma* spp. encara no es coneix bé quins són els mecanismes implicats tot i el bon funcionament que demostra a camp (Tronsmo i Hjeljord, 1998), com tampoc en el biocontrol a postcollita el mecanisme d'actuació sembla un factor limitant pel futur desenvolupament de nous agents de biocontrol (Janisiewicz, 1998).

Diversos mecanismes se suposen responsables del funcionament dels Rizobacteris Promotors de Creixement de les Plantes (PGPR) com són resistència induïda, competència pels nutrients i l'espai, parasitisme, producció d'antibiòtics i de HCN, i darrerament es dóna importància també a la capacitat de colonització d'arrels i/o llavors i a la supervivència en el medi on s'han aplicat (Smith i Goodman, 1999; Nelson i Kraft, 2000; Herrera i Chet, 1998). En general, es pot dir que l'acció dels agents de biocontrol aplicats a les arrels és deguda a la supressió de la microbiota perjudicial o al menys a la disminució del seu efecte negatiu (Van Peer i Schippers, 1989). Quan un bacteri o fong actua com a agent de biocontrol l'antagonisme observat sol ésser el resultat de l'actuació de més d'un mecanisme (Ellis i col., 1999).

A continuació es comenten breument els diferents mecanismes que han estat descrits com implicats en processos de control biològic.

1.3.1.1 Resistència induïda

Les plantes tenen sistemes de defensa per fer front a les infeccions dels patògens. Aquests sistemes comprenen des de la defensa passiva, les barreres mecàniques o químiques com la lignificació, fins a sistemes actius com és la resposta hipersensible conseqüència de la invasió de qualsevol patògen. La resposta hipersensible es manifesta amb la mort cel·lular al voltant de la infecció impedit així l'avanç de la malaltia (Jackson i Taylor, 1996). En aquest moment es dispara també un sistema de resistència que afecta a tota la planta i la protegeix de posteriors atacs: és la resistència induïda. Aquesta, s'ha comparat amb l'immunització (Maurhofer i col., 1994; Sticher i col., 1997). És una protecció inespecífica que permet a la planta defensar-se d'un ampli ventall de patògens.

Es diferencien dos tipus de resistència induïda: la Resistència Sistèmica Adquirida (SAR) -quan és la resposta a l'agressió causada per patògens-, i la Resistència

Sistèmica Induïda (ISR) -quan la resposta és resultat de la interacció amb bacteris no patògens-. Entre aquests darrers, destaquen els PGPR majoritàriament *Pseudomonas* (Sticher i col., 1997; Van Loon i col., 1998), i també s'ha descrit la inducció per fongs *Fusarium* no patògens (Hasegawa i col., 1991a).

La SAR es caracteritza per l'acumulació d'àcid salicílic i de proteïnes relacionades amb la patogènesi, destacant les glucanases i les quitinases que permeten augmentar la resistència de la planta (Van Loon i col., 1998). L'àcid salicílic és el principal metabòlit implicat en l'activació de la resistència sistèmica, i un dels senyals que activa el sistema. És un procés complex en el que hi intervenen diverses substàncies (Durner i col., 1997; revisat per Sticher i col., 1997). La producció d'àcid salicílic, per bacteris de les arrels com el cas de l'agent de biocontrol CHA0 consta com un dels mecanismes d'inducció de la resistència en plantes, però també la producció del sideròfor pioverdina sembla tenir-hi un paper (Maurhofer i col., 1994; Maurhofer i col., 1998). També el tractament de la tomatera amb soques de *Bacillus* la protegeix del virus del motejat i el mecanisme és la ISR (Murphy i col., 2000).

El coneixement de la ISR ha proporcionat un nou sistema de protecció de les plantes, de manera que es desenvolupen productes que actuen estimulants les seves defenses, com el propenazol i altres (Sticher i col., 1997). En aquest sistema de defensa, la planta deixa d'ésser un subjecte passiu per ser un participant actiu (Cook i col., 1995). En el cas de malalties de la fillosfera (foliars) la ISR pot ser una bona alternativa de control als bacteris antagonistes, perquè s'evita l'ambient hostil que els afecta i que dificulta el seu funcionament (Wilson, 1997).

1.3.1.2 Competència

Es fa referència a la competència quan l'espai o els nutrients com el carboni, nitrogen o ferro són o poden esdevenir limitants pel creixement del patogen. També el fet d'ocupar efectivament l'arrel de la planta s'ha anomenat competència per la rizosfera (Sivan i Chet, 1992). L'habilitat per utilitzar múltiples fonts de carboni, o les que no utilitzin altres microorganismes, s'ha correlacionat amb la competència de determinades soques per la colonització de l'espai, tant de les arrels com de la fillosfera (O'Sullivan i O'Gara, 1992; Thomashow i Weller, 1996).

Entre els mecanismes de competència destaca la producció de sideròfors per captar el ferro del sòl. Allí, el ferro es troba a una concentració de 10^{-17} M a pH=7 però és

necessària una concentració de 10^{-6} M pel creixement dels microorganismes (Loper i Buyer, 1991; Budzikiewicz, 1993). En aquestes condicions limitants de ferro, molts organismes aerobis i facultatius excreten sideròfors al medi. Aquests són pèptids cíclics de baix pes molecular que actuen com a quelants formant complexos solubles amb el ferro que posteriorment els organismes productors recuperen del medi amb ajuda de receptors específics a nivell de membrana (Leong, 1986; Budzikiewicz, 1993).

L'elevada afinitat dels sideròfors pel Fe(III) és deguda a l'existència de tres llocs amb lligands bidentats, originant una estructura coordinada en sis punts (Gutterson, 1990). Aquests centres actius quelants estan força conservats i solen tenir estructura tipus catecol o hidroxamat (Gutterson, 1990).

La producció de sideròfors s'ha demostrat que, en alguns casos, estava implicada en el biocontrol, però en altres casos s'ha observat que no (Kloepper i col., 1980; Gutterson, 1990; Hamdan i col., 1991; Hasnad i col., 1991; Loper i Buyer, 1991; Kloepper, 1992; Costa i Loper, 1994). En els models d'actuació dels sideròfors en el control de patògens proposats per Gutterson (1990) i per O'Sullivan i O'Gara (1992) aquells facilitarien el biocontrol perquè no permetrien als patògens disposar de ferro pel seu creixement, però el seu efecte estaria limitat a sòls bàsics, perquè en els sòls àcids la solubilitat del ferro augmenta i llavors ja no és limitant. També s'ha observat que les soques productores de sideròfors i que a més poden utilitzar els produïts per altres microorganismes són molt competents en la colonització de les arrels (Loper i Henkels, 1999; Mirleau i col., 2000).

La producció de sideròfors és una característica de *P. fluorescens*, els quals produeixen pioverdines o pseudobactines que donen fluorescència groc-verda sota llum ultraviolada (Meyer i Abdallah, 1978; Leong, 1986; Budzikiewicz, 1993). La producció de sideròfors està també relacionada amb la patogenicitat d'alguns bacteris com *P. syringae* (Cody i Groos, 1987). També són sideròfors l'àcid salicílic i el seu derivat piochelina però l'efecte en el biocontrol pot quedar emmascarat pel seu efecte com a desencadenant de la SAR (Buysens i col., 1996).

1.3.1.3 Parasitisme

En el control biològic el terme parasitisme s'utilitza per referir-se a la destrucció de fongs patògens per l'acció d'enzims lítics que degraden les parets cel·lulars (Kloepper, 1992). Una altra possibilitat és el micoparasitisme que es dona quan un fong està en

íntima associació amb un altre fong del qual extreu algun o tots els nutrients no aportant-li cap benefici en contrapartida (Schroth i Hancock, 1981; Handelsman i Stabb, 1996).

És un mecanisme d'actuació que està poc estudiat i la major part dels estudis de micoparasitisme estan referits a *Trichoderma* spp perquè ataquen a una gran varietat de fongs responsables de moltes malalties de plantes d'importància econòmica arreu del món (Herrera i Chet, 1998). També està descrit que alguns rizobacteris sintetitzen enzims lítics com proteases, quitinases i glucanases que tenen efecte antifúngic (Lorito i col., 1993; Singh i col., 1999).

1.3.1.4 Antibiosi

L'antibiosi es defineix com una interacció entre organismes on un metabòlit, generalment de baix pes molecular, produït per un d'ells té un efecte nociu per l'altre, a baixes concentracions (Schroth i Hancock, 1981; Fravel, 1988; Gutterson, 1990). En general, aquesta substància sol ésser un producte del metabolisme secundari (Kolter i col., 1993). Per això, les soques productores de metabòlits secundaris són bones candidates a esdevenir agents de biocontrol. Els bacteris del gènere *Pseudomonas* són els que més destaquen per la diversitat d'antibiòtics que produeixen (Hopwood i Merric, 1977; Dowling i O'Gara, 1994).

La producció d'antibiòtics, és una característica que s'ha conservat arreu del món i que permet als microorganismes productors defensar els seus hàbitats (Cook i col., 1995). Hi ha evidències que la producció d'antibiòtics, tot i fer disminuir la velocitat de creixement respecte als mutants no productors, té efectes beneficiosos per la competència ecològica d'aquestes soques (Fravel, 1988; Mazzola i col., 1992; Dowling i O'Gara, 1994).

Per això, un dels mecanismes de biocontrol que està més estudiat, i que fins i tot és una de les característiques de selecció que generalment es considera desitjable dels agents de biocontrol, és l'antibiosi o producció de metabòlits secundaris amb activitat antibiòtica (Leisinger i Margraff, 1979; Gutterson, 1990; O'Sullivan i O'Gara, 1992; Budzikiewicz, 1993; Dowling i O'Gara, 1994; Fujimoto i col., 1995; Glick, 1995; Levy i Carmeli, 1995; Handelsman i Stabb, 1996).

Cal, però, esbrinar quin és el mecanisme d'actuació de l'antibiòtic per poder introduir aquesta estratègia en la protecció de malalties en agricultura (Fravel, 1988), ja que la producció dels antibiòtics depèn de múltiples factors tant biòtics com abiòtics, la qual cosa provoca que el funcionament dels agents de biocontrol no sigui del tot coherent en l'espai i el temps (Clark i col., 1995; Thomashow i Weller, 1996, Weller, 1988). Per això es postula que aquestes soques tenen elevades possibilitats d'èxit en ambients controlats com són els hivernacles i l'horta (Dowling i O'Gara, 1994) o en postcollita.

Per demostrar que un metabòlit té una implicació directa en el control biològic s'han utilitzat diverses estratègies entre les que destaquen que mutants no productors del metabòlit no inhibeixen el patogen *in vitro* i la seva eficàcia a camp és menor, que la complementació del mutant amb seqüències de la soca salvatge restaura l'eficàcia en biocontrol, i que el metabòlit purificat té propietats antimicrobianes i es pot detectar *in situ* quan hi ha presència de la soca antagonista (Dowling i O'Gara, 1994).

La producció de metabòlits secundaris està influenciada *in vitro* per les condicions de cultiu (Clark i col., 1995; revisat per Herrera i Chet, 1998; Nielsen i col., 1999). Molts microorganismes produeixen antibiòtics en cultius *in vitro* i també hi ha evidència que en produeixen en condicions naturals, essent aquest un factor decisiu en el seu antagonisme (Thomashow i col., 1990; Laville i col., 1992; Schnider i col., 1995; Bonsall i col., 1997; Raaijmakers i col., 1999).

La regulació de la producció dels antibiòtics té lloc a diversos nivells, i pel DAPG i PCA s'ha demostrat que és un procés que depèn de la concentració cel·lular, i que utilitza un mecanisme de quorum sensing amb un sistema de dos components per acció de sensors ambientals (ApdA o GacA) o factors sigma que actuen com a inductors (Pierson III i col., 1994; Cook i col., 1995; Fuqua i col., 1996; Greenberg, 1997; Laville i col., 1998). Tanmateix, cal dilucidar com afecten altres factors físico-químics i biològics en la regulació dels gens implicats en la seva síntesi per poder augmentar la capacitat d'acció dels agents de biocontrol (Wood i Pierson III, 1996).

A la Taula 1.1 es mostren alguns dels principals metabòlits secundaris produïts per *Pseudomonas* dels quals s'ha demostrat la seva participació en processos de biocontrol de malalties fúngiques. Entre aquests, els més estudiats són el diacetilfloroglucinol (2,4-diacetil-1,3,5-trihidroxibenzè) (DAPG), l'àcid fenazina-1-carboxílic (PCA), la pirrolnitrina (Prn), la pioluteorina (Plt) i el HCN, que seran objecte d'estudi en el present treball. Però també, hi ha altres com la tropolona (Lindberg i col.,

1980; Lindberg, 1981), l'oomicina A (Howe i Suslow, 1991), l'àcid dihidroaeruginòic (Carmi i col, 1994), la coronatina (Liyanage i col., 1995), biosurfactants ramnolípids- (Stanghellini i Miller, 1997) o la viscosinamida (Nielsen i col., 1999).

Taula 1.1. Metabòlits produïts per soques de *P. fluorescens* implicades en el control de malalties de plantes.

Table 1.1. Metabolites produced by *P. fluorescens* strains involved in the biocontrol of plant diseases.

Malaltia	Patogen	Metabòlit implicat	Referències
Take-all del blat	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	PCA DAPG	Thomashow i Weller, 1988 Vincent i col., 1991; Keel i col., 1992
Taca marronosa del blat	<i>Pyrenophora trici-repentis</i>	Pirrolnitrina	Referenciat a Dowling i O'Gara, 1994
Damping-off de cogombre	<i>Pythium ultimum</i>	Pioluteorina	Kraus i Loper, 1992
Damping-off de cotó i remolatxa sucrera en preemergència	<i>Pythium</i> spp. <i>Pythium ultimum</i>	Oomicina A Pioluteorina DAPG	Guttererson, 1990 Howell i Stipanovic, 1980 Shanahan i col., 1992b
Podridura negra d'arrels del tabac	<i>Thielabiopsis basicola</i>	HCN DAPG	Voisard i col., 1989 Keel i col., 1992
Flax wilt	<i>Fusarium oxysporum</i>	Pseudobactina B10	Kloepper i col., 1980
Damping-off en cotó	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pirrolnitrina	Howell i Stipanovic, 1979 Hill i col., 1994

Com a avantatge per l'ús d'aquests microorganismes es postula que el problema de l'aparició de resistències als pesticides químics es podria solventar amb la utilització dels agents de control biològics encara que siguin productors d'antibiòtics. Bàsicament, es descriuen dues raons per explicar que no es desenvolupin resistències. La primera que la major part dels agents de biocontrol produeixen més d'un antibiòtic, i algunes fins i tot quatre com Pf-5 i CHA0 -Plt, Prn, DAPG i HCN- (Howell i Stipanovic, 1980; Kraus i Loper, 1992; Keel i col., 1996), (veure Taula 2.1). La segona raó, que l'exposició dels patògens als antibiòtics només es dona en llocs concrets de l'arrel i durant un període de temps limitat, minimitzant així la pressió de la selecció de mutants (Thomahow i col., 1990; Handelsman i Stabb, 1996).

Àcid fenazina-1-carboxílic

Les fenazines són heterocicles que contenen nitrogen, substàncies generalment acolorides que es produeixen per la via de l'àcid shikimic (Hollstein i Marshall, 1972;

Georgakopoulos i col., 1994). La ruta per la biosíntesi de les fenazines es mostra a la Figura 1.3.

Entre les soques productores i que estan implicades en processos de biocontrol hi ha *P. fluorescens* 2-79 i *P. aureofaciens* 30-84 (Thomashow i Weller, 1988; Thomashow i col, 1990; Mazzola i col., 1992; Pierson III i Thomashow, 1992; Pierson III i col., 1995; Pierson III i Pierson, 1996). El PCA, juntament amb el DAPG estan implicats en el biocontrol del "take all" del blat causat per *G. graminis*, i la utilització de barreges de soques productores d'aquests antibiòtics sembla que augmentarà les possibilitats d'aplicació (Mazzola i col., 1995; Mathre i col., 1999).

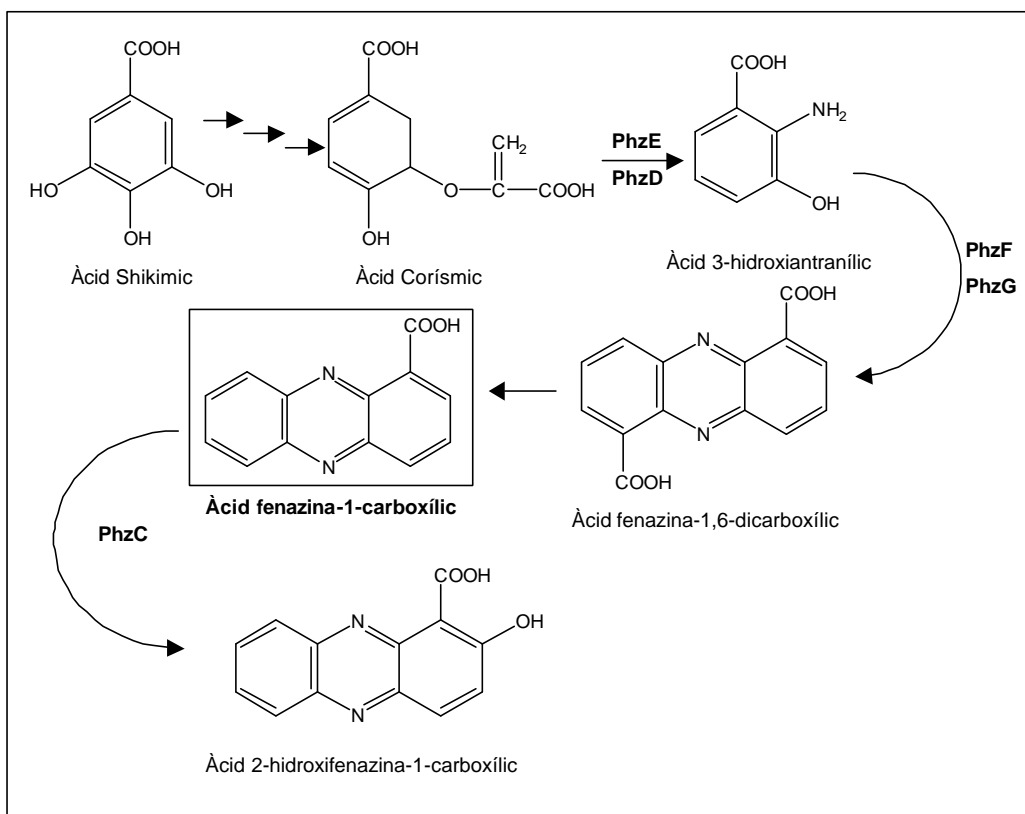


Figura 1.3. Ruta de biosíntesi de l'àcid fenazina-1-carboxílic i derivats. S'indiquen els enzims que catalitzen les reaccions de biosíntesi (De Mavrodi i col., 1998).

Figura 1.3. Biosynthetic pathways for phenazine-1-carboxylic acid and derivatives. The enzymes that catalyze the biosynthetic reactions are shown (From Mavrodi i col., 1998).

El locus biosintètic del PCA està ben caracteritzat (Thomashow i Pierson III, 1991; Pierson III i Thomashow, 1992; Mavrodi i col., 1998), consta de 5 gens *phz*ABCDF i es

conserva entre les soques productores de fenazines aïllades d'arreu del món (Pierson III i col., 1995, Mavrodi i col., 1998). La producció de PCA està regulada per un sistema de dos components PhxR/PhzI que respon a la concentració cel·lular per un mecanisme de "quorum sensing" similar al LuxR/LuxI de la bioluminiscència i d'altres antibiòtics (Pierson III i col., 1994 i 1998; Fuqua i col., 1994; Stead i col., 1996; Wood i Pierson III, 1996; Wood i col., 1997). La producció de PCA també està afectada per la producció d'exsudats (Pierson III i Pierson, 1996), per metalls (Slininger i Jackson, 1992) o el pH o temperatura (Georgakopoulos i col., 1994; Slininger i Shea-Wilbur, 1995). El coneixement d'aquests factors ajudarà a augmentar l'eficàcia d'aquests agents en condicions reals.

Pirrolnitrina

La pirrolnitrina es sintetitza per diverses espècies de *Pseudomonas* spp. a partir del triptòfan (Martin i col., 1972; Mahoney i Roitman, 1990; Van Peé i col., 1983; Van Peé, 1996; Hammer i col., 1997; Kirner i col., 1998). És una substància amb activitat antifúngica d'ampli espectre (Howell i Stipanovic, 1979; El-Banna i Winkelmann, 1998), la seva producció s'ha correlacionat amb la inhibició de *Penicillium expansum* en protecció a postcollita (Janisiewicz i Roitman, 1988).

Els gens implicats en la seva síntesi estan caracteritzats, *prnABCD*, i es coneix la seva funció (Hill i col., 1994; Hammer i col., 1997; Kirner i col., 1998). La ruta per la seva síntesi es mostra a la Figura 1.4.

Darrerament, com ja s'ha comentat anteriorment, la pirrolnitrina s'ha utilitzat com a punt de partida pel desenvolupament de pesticides semisintètics amb nous mecanismes d'actuació com el fludioxonil (Switch) o el fenpiclonil (Knight i col, 1997).

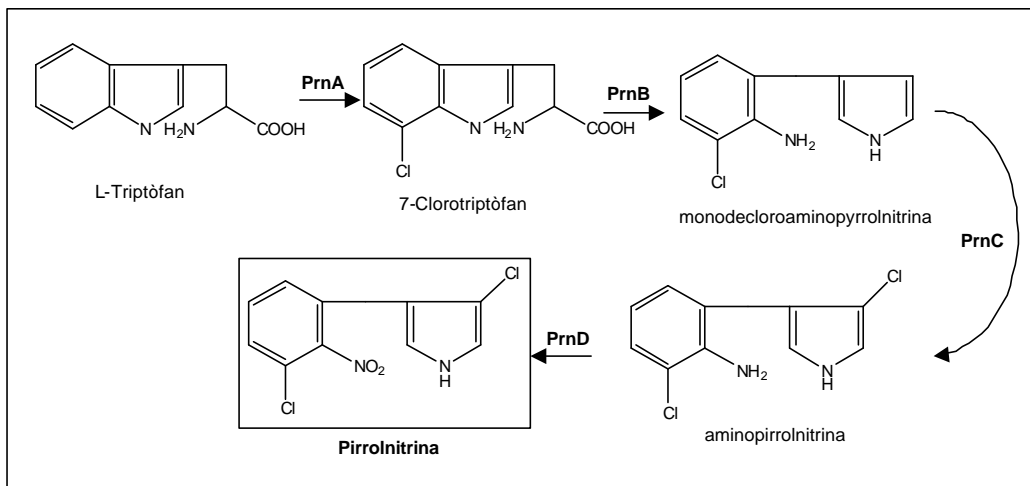


Figura 1.4. Ruta de biosíntesi de la pirrolnitrina. S'indiquen els enzims que catalitzen les reaccions de biosíntesi (De Kirner i col., 1998).

Figura 1.4. Biosynthetic pathways for pirrolnitrin. The enzymes that catalyze the biosynthetic reactions are shown (From Kirner i col., 1998).

1.4 Producció dels agents de biocontrol

Per tal que sigui viable la producció dels agents de biocontrol s'ha de planificar des d'un punt de vista econòmic, i ja en el procés de selecció s'hauria de pensar en la producció com a objectiu (Rhodes, 1993).

Els organismes utilitzats com a agents de biocontrol són múltiples i van des de virus, bacteris, fongs, a nemàtodes. Si ens centrem en els bacteris, es pot observar que el procés de producció està ben estudiat i el que cal optimitzar és la formulació (Slininger i Shea-Wilbur, 1995). Cal que la formulació ens permeti mantenir les cèl·lules viables o actives tant durant l'emmagatzematge com una vegada aplicats. En general, per ser efectius cal que puguin colonitzar el lloc on han d'exercir la seva acció i mantenir el mecanisme pel que són actius. Rhodes (1993) fa una revisió i recopilació dels requeriments necessaris i de les limitacions per la formulació dels agents de biocontrol.

1.4.1 Formulació dels agents de biocontrol

La formulació i aplicació efectives són passos necessaris per tal que els biopesticides tinguin èxit. La formulació és necessària per tal de conservar i de presentar el producte de manera utilitzable i així optimitzar la seva eficàcia, estabilitat i

seguretat en la seva aplicació. A més, ha d'ésser compatible amb l'agent de biocontrol i si és possible la seva eficàcia ha d'ésser superior a la de l'agent sense formular. El fet que els components actius siguin organismes vius fa que la formulació sigui un procés delicat. Cal mantenir-los inactius durant l'emmagatzematge i que torni a la seva activitat normal una vegada aplicats (Butt i col, 1999; Hofstein i Chapple, 1999).

Hi ha diferents sistemes de formulació, predominant els de via seca com, assecat per aire o liofilització. També existeixen formulacions olioses però en tots els casos s'ha comprovat una disminució de la viabilitat al llarg del temps més dràstica en el cas dels microorganismes que no formen espores. Per solventar-ho, s'estan desenvolupant diferents sistemes formulació entre els que destaquen la inclusió en matrius d'argiles, com caolin o talc, farines o de polímers orgànics, tals com l'alginat (Klopper i Schroth, 1981; Fravel i col., 1985; Bashan, 1986; Connick, 1988; Lumsden i col., 1995; Vidhyasekaran i col., 1997; Connick i col., 1998; Bashan i Gonzalez, 1999).

Per tal d'augmentar les possibilitats d'èxit caldria presentar els agents de biocontrol al mercat amb un format pràctic i amb uns requeriments d'emmagatzematge i de conservació no molt exigents. El producte ha de mantenir-se estable i actiu durant el temps suficient des de la fabricació a la venda (Brannen i Kenney, 1997). Un problema addicional que apareix és la necessitat de refrigeració que fa que tant el distribuïdor com l'usuari hagin de tenir instal·lacions adequades (Butt i col, 1999). Apareix aquí un dels principals obstacles per a l'acceptació dels agents de biocontrol, ja que per tal de tenir una viabilitat econòmica clara, s'hauria de poder conservar el producte el més proper al 100% de viabilitat inicial durant uns dos anys i a una temperatura entre -5°C i 30°C (Rhodes, 1993, Powell, 1993). Això limita les possibilitats de distribució i emmagatzematge pels canals usuals. En alguns casos, la cerca d'un sistema de conservació i aplicació dels agents de biocontrol ja forma part del procés de selecció (Schisler i Slininger, 1997; Bagnasco i col., 1998).

Fins fa poc, la formulació d'agents de biocontrol ha estat eclipsada per la recerca en la selecció de soques, en la quantitat d'inòcul i en la seva evolució al llarg del temps. Actualment hi ha un major interès en la formulació i per això arriben més productes al mercat (Rhodes, 1993). El disseny d'una formulació adequada per a cada producte apareix com un element clau en el programa de desenvolupament d'un biopesticida. I l'única manera d'obtenir coneixement de les particularitats d'un candidat és provant-lo

en una situació comercial real el més aviat possible del programa de desenvolupament (Hofstein i Chapple, 1999).

L'èxit dels biopesticides depèn en part de que s'assoleixi una formulació i un sistema d'aplicació efectius (Mathre i col., 1999; Moënne-Loccoz i col., 1999), que la seva aplicació sigui segura, que no requereixi processos complicats i que pugui utilitzar-se el material habitual (Rhodes, 1993), i que el procés d'escalat permeti tenir un producte amb una eficàcia equivalent a l'assolida en els assaigs realitzats al laboratori (Brannen i Kenney, 1997).

Actualment, només representen una petita fracció del total del mercat de pesticides, i la majoria són pel control d'insectes (Menn i Hall, 1999) entre les causes argumentades cal destacar l'especificitat en la diana, la inconsistència de resultats i la poca eficàcia (Butt i col, 1999).

Malgrat això, els biopesticides estan guanyant quota de mercat com a alternativa als pesticides químics en base a l'aparició de regulacions legals favorables, la pressió social que demana alternatives als pesticides químics, i el coneixement de les interaccions ecològiques implicades en l'ús dels biopesticides (Menn i Hall, 1999). Aquest darrer punt té especial importància pel fet que el principi actiu és un organisme viu que està subjecte a múltiples interaccions amb l'entorn, des del moment de la seva producció en massa fins a la seva aplicació, que condicionen la seva efectivitat.

A la Taula 1.2 es sintetitzen diversos factors que fan variar l'eficàcia dels agents de biocontrol i varien entre diferents regions i fins i tot en una mateixa finca. Això implica que sigui difícil garantir una robustesa en el funcionament que motivi a l'usuari. També es troben efectes a llarg i a curt termini que condicionen l'acció final de l'antagonista. Per això tots aquests factors s'han de tenir en compte en el desenvolupament dels agents de biocontrol. També aquest gran nombre de factors implicats ha propiciat que la investigació estigui preferentment dirigida cap a malalties del sòl i de postcollita, llocs on l'ambient és menys canviant que en l'exterior o les condicions estan controlades (Butt i col, 1999).

Taula 1.2. Variables que poden afectar l'èxit dels agents de biocontrol vers els fitopatògens (De Butt i col., 1999).

Table 1.2. Variables that may affect the success of biological control agents against plant pathogens (From Butt i col., 1999).

Supervivència a llarg termini	Velocitat i efecte
Físics	Agent de biocontrol
Tipus de sòl	Germinació i temps de recuperació
Potencial de matriu	Alliberament i formulació
Temperatura	Velocitat de creixement
pH	Moviment cap al lloc d'acció
Biòtics	Patogen
Capacitat de colonització	Velocitat de creixement
Competició	Protecció del nínxol ecològic
Estructures de supervivència	Producció de toxines
Genoma de l'hoste	
Resistència del patogen	

Els biopesticides que han aconseguit arribar a l'etapa comercial passant tots els obstacles del camí han inclòs en el seu programa de desenvolupament l'anàlisi de les necessitats i el potencial del mercat i també consideracions econòmiques com el cost de les mercaderies (Hofstein i Chapple, 1999).

A la Taula 1.3 es recullen alguns dels principals productes comercials basats en bacteris.

Taula 1.3. Bacteris agents de biocontrol presents al mercat mundial (De www.barc.usda.gov/psi/bpdl/bpdlprod/bioprod.html#Polygandron; Rhodes, 1993 i Lumsden i col., 1995).

Table 1.3. Comercial bacterial Biocontrol agents in the world market (De www.barc.usda.gov/psi/bpdl/bpdlprod/bioprod.html#Polygandron; Rhodes, 1993 i Lumsden i col., 1995).

Nom producte	Organisme actiu	Organismes diana/Malaltia	Cultius	Fabricant / Distribuïdor
Bactophyt	<i>Bacillus subtilis</i>	diversos fongs	vegetals	NPO vector Russia
Bio-save 100-1000	<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-10	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Mucor pyroformis</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	fruita de llavor (Bio-save 100) i cítrics (Bio-save 1000)	EcoScience Corp USA
Bio-save 110	<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-11	<i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>M. pyroformis</i> , <i>G. candidum</i>	fruita de llavor	EcoScience Corp USA
BlightBan A506	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	mal per congelació, <i>Erwinia amylovora</i> , i bacteris inductors de russeting	ametlla, poma, albercoc, aranyons, cirera, préssec, pera, patata, maduixa, tomata	Plant Health Technologies USA
Blue circle Cedomon	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> sp. leaf stripe, net blotch, <i>Fusarium</i> sp., spot blotch, leaf spot, i altres	llavors de vegetals cibada i ordi, també possible per blat i altres cereals	Stine microbials USA BioAgri AB Suecia
Companion	<i>Bacillus subtilis</i> GB03	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i>	i cultius d'horta i gespa	Growth Products, USA
Conquer Dagger	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas tolaasii</i> <i>Pytium ultimum</i> , <i>R. solani</i>	champinyons llavors de cotó	Mauri Foods., USA Ecogen Inc. USA
Deny Blue Precept)	(formerly Circle, <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>P. cepacia</i>) type Wisconsin	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , i malalties causades per lesions i nemàtodes	i userda, cibada, monjeta, clover, cotó, pèsols, melca, vegetals, i blat	Stine Microbial Products., USA
Epic	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>R. solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., i <i>Aspergillus</i> spp. que ataca arrels	cotó, llegums	Gustafson, Inc., USA
Galltrol-A	<i>Agrobacterium radiobacter</i> -84	tumor de coll causat per <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	fruita, avellana i plançons de plantes ornamentals	AgBioChem, Inc., USA
Intercept	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>R. solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Pythium</i> sp	blat de moro, vegetals, cotó	Soil Technologies Corp., USA
Kodiak, Kodiak HB, Kodiak AT	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>R. solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., i <i>Aspergillus</i> spp. que ataca arrels	cotó, llegums	Gustafson, Inc., USA

(Continua/ Continue)

Taula 1.3. Bacteris agents de biocontrol presents al mercat mundial (De www.barc.usda.gov/psi/bpdl/bpdlprod/bioprod.html#Polygandron; Rhodes, 1993 i Lumsden i col., 1995).

Table 1.3. Comercial bacterial Biocontrol agents in the world market (De www.barc.usda.gov/psi/bpdl/bpdlprod/bioprod.html#Polygandron; Rhodes, 1993 i Lumsden i col., 1995).

Nom producte	Organisme actiu	Organismes diana/Malaltia	Cultius	Fabricant / Distribuïdor
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	<i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria brassicola</i> , <i>Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp., and <i>Phytophthora</i> spp.	field, ornamental, and vegetable crops	Kemira Agro Oy, Finlandia
Nogall	Agrobacterium radiobacter	Agrobacterium tumefaciens	arbres	Bio-Care Technology Pty. Ltd., Australia
Norbac 84C	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	tumor de coll causat per <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	fruita, avellana, i plançons de planta ornamental	New BioProducts, Inc., USA
PSSOL	<i>P. solanacearum</i> (no patògena)	<i>P. solanacearum</i>	vegetals	Vyzkummyustov. Rep Xeca
Rhizo-Plus, Rhizo-Plus Konz	<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	<i>R. solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Sclerotinia</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Streptomyces scabies</i>	camp (patates, balt de moro), vegetals, i planta ornamental	KFZB Biotechnik GmbH, Alemanya
Serenade	Bacillus subtilis	mildius, taca de la fulla causada per <i>Cercospora</i> , foc bacterià i altres focs i podridura marró	cucurbitàcies, raïm, llúpol, vegetals, cacauet, fruita de llavor i de pinyol	AgraQuest, Inc., USA
Spot-Less	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> Tx-1	Dollar spot, Anthracnose, <i>Phythium aphanadermatium</i> , Michrochium patch (pink snow mold)	gespa	Eco Soil Systems, Inc., USA
System_3	<i>Bacillus subtilis</i> GB03 i pesticides químics	patògens de llavors	ordi, mongeta, cotó, cacauet, pèsol, arròs, soja	Helena Chemical Co., USA
VICTUS	<i>P. fluorescens</i> bv5	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	champinyons	Sylvan Kattanning USA

Segons Hofstein i Chapple (1999), un antagonista ha de complir una sèrie de requeriments per tal d'esdevenir un candidat a agent de biocontrol: controlar efectivament el patogen abans que causi danys importants, tenir un funcionament consistent en condicions reals, adaptable a programes de control integrat de malalties i tècniques usuals de treball a camp, tenir un preu competitiu respecte altres tractaments per la mateixa malaltia, compatible amb altres tractament químics i biològics dirigits a altres malalties, i finalment, no ser nociu per l'usuari, pel medi, o per la microbiota beneficiosa. Des de l'inici del programa de selecció per convertir un microorganisme en un agent de biocontrol comercial cal avaluar la seva adaptació a una estratègia de control que sigui aplicable.

Un dels inconvenients en el desenvolupament del AB és la dificultat de dirigir els organismes cap a processos industrials per la producció en massa i la seva posterior incorporació a formulacions conegudes per l'usuari (Jackson, 1997; Hofstein i Chapple, 1999).

El coneixement de l'etiologia de les malalties, l'assumpció actual que cap producte pot tractar-les per si sol, el progrés en el coneixement dels mecanismes d'acció, i l'aparició de resistències als pesticides són fets que han d'afavorir la recerca i el desenvolupament de biopesticides (Hofstein i Chapple, 1999).

1.5 Antecedents

Aquest treball que constitueix la defensa de la Tesi Doctoral s'ha realitzat en una col·laboració dels grups de recerca en **Bioteologia Agroalimentària** i en **Patologia de la Producció i Postcollita de Fruita**, pertanyents ambdós a l'Institut de Tecnologia Agroalimentària de la Universitat de Girona.

En aquest darrer grup de recerca es treballa en dues línies que inclouen la protecció integrada contra malalties bacterianes i fúngiques dels fruiters en producció i postcollita.

En la línia de recerca en **protecció integrada contra malalties** bacterianes i fúngiques dels fruiters es treballa en el desenvolupament i aplicació de noves tecnologies de control integrat de malalties d'importància econòmica de la pomera, perera i noguera. En producció són objecte d'estudi, entre altres, l'estemfiliosi de la perera (micosi causada pel fong *Stemphium vesicarium*) i el foc bacterià de la pomera i de la perera (causat pel bacteri *Erwinia amylovora*). L'objectiu principal de la línia es

centra en la minimització de l'ús d'antimicrobians de síntesi (bactericides i fungicides), i la implementació de tècniques de control biològic amb microorganismes antagonistes dels patògens que s'utilitzen com a biofungicides i biobactericides naturals.

La línia de recerca sobre **postcollita de fruita** estudia els factors de camp en la fase de producció de la poma i de la pera que afecten a la seva qualitat, conservació i resistència a les podridures fúngiques en frigoconservació, com la podridura blava (causada pel fong *Penicillium expansum*). L'objectiu principal consisteix en la reducció/eliminació dels tractaments a postcollita amb productes químics de síntesi, i la bioprotecció de la fruita amb l'aplicació de microorganismes autòctons dels fongs patògens.

L'enfoc de les dues línies de recerca és pluridisciplinar i es centra en tres blocs principals, entre els quals es destaca el Bloc de la **Biotecnologia Microbiana** que és on s'emmarca el present estudi. L'objectiu que hi ha plantejat és la caracterització i millora de microorganismes antagonistes per a la seva utilització com a agents de biocontrol de malalties de plantes (BCAs) o promotors de creixement (PGPRs).

1.6 Objectius generals del treball

En el present treball es va plantejar com a objectiu principal la caracterització dels metabòlits produïts per soques de *Pseudomonas fluorescens* de la col·lecció EPS que havien estat seleccionades com a candidates a agents de biocontrol.

Juntament a aquest objectiu principal van proposar-se'n de particulars que es desenvoluparan en els següents capítols:

- Caracterització de la producció de metabòlits secundaris amb activitat antibiòtica en soques de *P. fluorescens*.
- Estudi de la producció d'àcid cianhídric en *P. fluorescens* EPS288.
- Estudi de la producció de 2,4-diacetilfloroglucinol en soques de *P. fluorescens*.
- Producció de DAPG i colonització de fruits i arrels per soques de *P. fluorescens*.

Capítol 2

Caracterització de la producció de metabòlits secundaris amb activitat antibiòtica en soques de *Pseudomonas fluorescens*

2.1 Introducció

La selecció de microorganismes antagonistes de patògens de plantes per utilitzar-los com a part integrant de la producció agrícola, és un aspecte pel qual no s'ha trobat una solució exitosa. No està desenvolupada una estratègia definida per trobar els microorganismes més eficaços per al control de cada malaltia, i que al mateix temps, permeti que el sistema sigui econòmicament viable (Jackson, 1997). Quan es busquen antagonistes, la seva eficàcia no només s'hauria de basar en l'habilitat del candidat per disminuir els símptomes de la malaltia sinó també en la capacitat de produir un augment del creixement de la planta (Schrotch i Handcock, 1981). La selecció dels microorganismes que s'utilitzaran en el control de cada malaltia és un dels punts clau per tal d'assegurar-ne el funcionament.

També, cal conèixer quin és l'ambient en el que s'ha d'utilitzar l'agent de biocontrol i les interaccions amb el patògen diana, l'hoste i l'ambient (Emmert i Handelsman, 1999). El coneixement dels mecanismes implicats en la interacció patògen-antagonista-hoste (veure la Figura 1.1) i els factors abiòtics pels quals s'assoleix el control del patògen, és essencial per aconseguir un funcionament fiable de l'agent de biocontrol (Fravel, 1988; Cook, 1993; Glick, 1995; Levy i Carmeli, 1995; Zhou i Borland, 1998; Vidaver, 1999). Aquesta informació també permetria modificar les estratègies de conreu amb l'objectiu de controlar plagues i malalties (Fujimoto i col., 1995; Bockus i Shroyer, 1998).

L'etapa d'aplicació en condicions reals constitueix un obstacle que s'ha de superar per tal que el biocontrol arribi a ésser una alternativa als pesticides químics. Hi ha poca correlació entre les proves *in vitro* i el funcionament en condicions reals i tampoc hi ha consistència en el funcionament en condicions reals (Weller, 1988). S'han postulat

diverses raons per explicar-ho. Molts factors poden influir degut a les complexes interaccions entre l'hoste, l'antagonista i l'entorn. Destaquen la pèrdua de competència ecològica, la capacitat de sobreviure en la natura que depèn de múltiples factors i la seva pèrdua o disminució pot comprometre la seva supervivència (Weller, 1988), la capacitat de colonització variable tant en la mateixa com en diferent espècie d'hoste (Schippers i col., 1987; Weller, 1988), l'estructura de l'arrel i del seu comportament afecten als microorganismes (Foster, 1986; Sivasithamparam, 1998) o canvis en la composició dels sòls -Fe, argiles, pH,..- (Schippers i col., 1987).

La capacitat de colonització de les arrels és una característica desitjable en els bacteris i per tant un paràmetre a considerar en el procés de selecció (Schippers i col., 1987). S'ha comprovat que les característiques dels exsudats de les arrels i llavors de les plantes poden influir en la capacitat de colonització i de creixement dels agents de biocontrol (Jackson i Taylor, 1996). Aquestes també afecten a la producció de metabòlits implicats en el creixement de les plantes, com és el cas de la producció d'àcid indol acètic (IAA) -hormona que estimula el creixement de les plantes (Dowling i O'Gara, 1994; Glick, 1995)- per *P. fluorescens* M.3.1. en arrels de blat de moro (Benizri i col., 1998).

La composició dels exsudats canvia en funció de la planta i també per la composició del sòl. Per això, cal tenir informació qualitativa, quantitativa i del perfil d'utilització dels nutrients aportats pels exsudats per poder controlar el funcionament del microorganismes seleccionats com agents de biocontrol (Latour i col., 1996; Casey i col., 1998, Benizri i col., 1998). En alguns casos, els exsudats de les plantes i llavors no són suficients per proveir l'energia necessària pels agents de biocontrol. Llavors l'esmena del sòl amb compost adequadament madurat pot suplir aquesta manca i millorar l'eficàcia dels bacteris introduïts (Hoitink i Boehm, 1999). Però el temps entre aplicació del compost i la sembra, poden afectar als nutrients disponibles i a l'eficàcia del tractament (Vilich i Sikora, 1998).

També, la producció de substàncies amb activitat antibiòtica i la tolerància als pesticides habitualment utilitzats en la protecció de les collites són paràmetres de selecció (Cook, 1993; Fravel, 1988).

Actualment, s'estan buscant alternatives al sistema clàssic de selecció de bacteris en funció de proves d'antagonisme *in vitro* ja que el principal problema d'aquest procediment és que en general no hi ha relació entre l'antagonisme expressat *in vitro* i

el funcionament en condicions reals a camp (Weller, 1988). També amb els sistemes de cultiu *in vitro* només es poden cultivar un 10% dels bacteris de la rizosfera i d'aquests només el 10% tenen capacitat com a agents de biocontrol (Schrotch i Handcock, 1981 i 1982) amb la qual cosa només se selecciona una petita part dels bacteris presents.

recentment s'ha acceptat que la cerca d'antagonistes es realitzi en sòls supressius o a llocs on s'observa disminució o no es pot desenvolupar la malaltia, més que no anar-los a buscar *de novo*. L'aïllat salvatge estarà millor adaptat a la supervivència en condicions de camp (Hornby, 1983; Baker, 1987; Mew i Rosales, 1986; Weller, 1988). Hi ha altres avantatges en la selecció d'antagonistes autòctons com el fet que els costos de registre són més baixos en aquests casos (Jackson, 1997).

Aquest sistema tampoc proporciona èxit assegurat com es va observar en la selecció d'antagonistes de fongs en sòls autòctons que va permetre aïllar soques inhibidores del patogen *in vitro*, però els resultats *in vivo* no es van poder correlacionar amb resultats obtinguts *in vitro* (Bagnasco i col., 1998).

Per augmentar les possibilitats d'èxit en la selecció de microorganismes per utilitzar-los com a agents de biocontrol s'ha realitzat l'aïllament dels microorganismes en l'ambient en el qual es volen utilitzar o de diferents ambients i fent una selecció posterior mitjançant proves d'antagonisme *in vitro* vers els patògens d'interès (Weller, 1988; Cook, 1993). També, s'ha considerat afegir en el procés de selecció la realització de proves que simulin condicions més naturals com assaigs sobre fulla, en fruits immadurs o en planta en condicions controlades (Cook, 1993; Bonaterra, 1997; Schisler i Slininger, 1997; Schisler i col., 1998).

Actualment, es consideren altres característiques com a base de la selecció: s'han d'ordenar en base a bons paràmetres cinètics de creixement i bioeficàcia quan creixen en un medi líquid comercial (Schisler i Slininger, 1997); en l'optimització del medi de cultiu s'han de considerar no només el rendiment de l'agent de biocontrol, sinó també la seva estabilitat a la dessecació, a la formulació i la seva eficàcia, paràmetres que s'ha demostrat que estan afectats per la composició del medi de creixement (Jackson, 1997).

Darrerament, es considera més apropiat seleccionar bacteris que demostrin augment del creixement de les plantes i persistència a la rizosfera i modificar-los per

expressar altres funcions que millorin la seva capacitat d'exercir biocontrol (Glick, 1995; Timms-Wilson i col., 2000). Es poden utilitzar tècniques moleculars per tal de transferir trets beneficiosos com poden ser resistència a pesticides o producció d'antibiòtics a una soca que sigui bona colonitzadora i així poder assegurar la colonització de l'agent de biocontrol (Herrera i Chet, 1998; Vilich i Sikora, 1998).

Els nous sistemes han de tenir en compte interaccions entre depredadors i malalties, i pesticides i collites, des d'un enfoc regional donat que una malaltia no es circumscriu a una finca individual sinó que sovint ultrapassa regions i països com és el cas actual del foc bacterià que afecta a pereres i pomeres del nostre país després de ser-ne zona lliure durant molts anys (Montesinos i col., 1999).

Altres factors que tampoc faciliten el desenvolupament comercial dels agents de biocontrol són els elevats costos de producció (Jackson, 1997). Els agents de biocontrol han de ser efectius, econòmicament atractius, pràctics d'utilitzar, no tòxics, i ambientalment segurs per tal que siguin acceptats per les regulacions governamentals, indústria, usuaris i consumidors (Zhou i Boland, 1998). Amb l'experiència que hi ha en l'ús d'agents de biocontrol, en el futur es plantejarà la planificació de la selecció, de la producció, de la formulació i de l'aplicació dels organismes candidats per tal de maximitzar les possibilitats d'èxit (Powell, 1993).

L'ús de bacteris Gram + com a agents de biocontrol, els quals presentarien menys problemes associats amb la comercialització com són el dessecat i la formulació degut a la formació d'espores encara no estan molt estudiats (Emmert i Handelsman, 1999; Wilson, 1997). Una possibilitat que també és l'ús de fongs no patògens que siguin específics per la diana i aïllats de l'entorn. Aquests fongs produeixen espores que són generalment més estables que els bacteris, cosa que permet una millor formulació i conservació (Cook, 1993; Jackson, 1997).

Com a exemple, destacar el cas de *Trichoderma* fong pel que s'han desenvolupat proves genètiques per relacionar-les amb característiques interessants per usar-les com a agents de biocontrol (Herrera i Chet, 1998). Els fongs del gènere *Trichoderma* estan entre els més utilitzats com a agents de biocontrol tant a la part aèria com a les arrels (Herrera i Chet, 1998; Tronsmo i Hjeljord, 1998, Zhou i Borland, 1998).

Finalment, abans de registrar i de poder utilitzar un nou pesticida cal molts estudis de seguretat tant de salut humana i animal com ambiental amb uns costos molt elevats.

La limitació en l'ús de pesticides provoca d'una banda l'oportunitat per nous productes però també un augment dels costos d'amortització del registre (Carlson i Wetzstein, 1993). Es produeix una continua evolució de les regulacions i dels sistemes per un ús més segur dels pesticides. És per això que s'ha de desenvolupar un sistema integrat de gestió que combini tant estratègies de conreu com l'ús d'agents de biocontrol i també de pesticides químics.

Es pot concloure que hi ha diversitat d'opinions sobre les metodologies més adequades per a la selecció d'agents de biocontrol. Així, actualment, la selecció dels agents de biocontrol es fonamenta generalment en la cerca de soques que tenen alguna de les característiques comuna entre els agents de biocontrol com la producció d'antibiòtics, el patró d'utilització de fonts de carboni,... (Sujii i col., 1996, Ellis i col., 2000).

2.2 Objectius

Els objectius que es plantejaren en aquest capítol van ser:

- Estudi de l'antagonisme *in vitro* de les soques seleccionades com a candidates a agents de biocontrol de la col·lecció EPS i de les soques utilitzades com a referència cedides per diversos investigadors.
- Identificació i confirmació de la producció dels metabòlits secundaris àcid cianhídric, 2,4-diacetilfloroglucinol, àcid fenazina-1-carboxílic i pirrolnitrina per soques de la col·lecció EPS.

2.3 Materials i mètodes

En aquest apartat s'inclouen les metodologies encaminades cap a una primera caracterització de les soques candidates a agents de biocontrol, els medis de cultiu, els tipus de sembra i les proves per determinar l'antagonisme de les soques vers els fongs fitopatògens estudiats.

2.3.1 Medis de cultiu

Els medis de cultiu que s'han utilitzat, així com la seva formulació¹ es descriuen a continuació:

Luria-Bertani (LB) (Maniatis i col., 1982)

• Triptona (Oxoid)	10 g
• Extracte de Llevat (Oxoid)	5 g
• NaCl (Panreac PA)	10 g

Medi B de King (KB) (King i col., 1954)

• Proteosa-peptona (Difco)	15 g
• Glicerol (Fluka)	10 g
• K ₂ HPO ₄ (Panreac PRS)	1,5 g
• MgSO ₄ · 7 H ₂ O (Panreac PRS)	1,5 g

Medi Glucosa Asparagina² (GA) (Vanneste i col., 1992)

• Glucosa (Panreac PA)	20 g
• L-asparagina (Sigma)	0,3 g
• K ₂ HPO ₄	11,5 g
• KH ₂ PO ₄ (Panreac PRS)	4,5 g
• MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,12 g
• Acid Nicotínic (Sigma)	50 mg

Brou Nutritiu (NB)

• Nutrient Broth (Oxoid)	13 g
--------------------------	------

Medi Extracte de malta (Keel i col., 1989)

• Extracte de malta (Oxoid) pH=7	15 g
----------------------------------	------

¹ Les quantitats que es relacionen són per un litre de medi, si no s'especifica el contrari.

Nutrient Broth Yeast Extract (NBY) (Vidaver, 1967)

• Brou Nutritiu (Oxoid)	8 g
• Extracte de llevat (Oxoid)	2 g
• Glucosa	5 g
• K ₂ HPO ₄	2 g
• KH ₂ PO ₄	0,5 g
• MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25 g

La Glucosa i el MgSO₄ · 7 H₂O s'esterilitzen per filtració i s'afegeixen al medi ja estèril.

Brou Patata Dextrosa (PDB)

• Potato Dextrose Broth (Difco)	29 g
---------------------------------	------

Agar Patata Dextrosa (PDA)

• Potato Dextrose Agar (Difco)	29 g
--------------------------------	------

Medi Llevat Extracte de Malta (YM) (Banger i Thomashow, 1996)

• Extracte de Llevat	3 g
• Extracte de Malta	3 g
• Peptona (Oxoid)	5 g
• Glucosa	10 g

Medi Agar Tomata o V8 (Dhingra i Sinclair, 1987)

• Concentrat de Tomata (Oro di Parma)	10 g
• CaCO ₃ (Panreac, PA)	2 g
• Bacteriological Agar (Oxoid)	15 g

Medi Casamino Acids (CAS)

• Casein Hidrolisate Acid (Oxoid)	10 g
• Extracte de Llevat	5 g
• NaCl	10 g

Aigua peptonada/Tampó fosfat³

• KH ₂ PO ₄	2,7 g
• Na ₂ HPO ₄ (Panreac, PA)	7,1 g
• Peptona (Oxoid)	1 g

² GA+Fe quan es va suplementar amb 50 µM Fe (FeCl₃ · 6 H₂O)

³ Tampó fosfat si s'elimina la peptona.

Medi 21C (Gerhardt i col., 1981). Aquest medi consta de les següents solucions:

- Solució tampó 925 mL
- Solució de font de carboni 50 mL
- Solució de vitamines 5 mL
- Solució de sals 20 mL

Solució tampó (925 mL):

- NH_4Cl (Panreac, PRS) 1 g
- Na_2HPO_4 2,78 g
- KH_2PO_4 2,77g

S'esterilitza a l'autoclau

Font de carboni (50 mL), una de les següents (depenent de l'experiment):

- Eritrosa (Merck) 10 g
- Glucosa 10 g
- Glicerol (Fluka) 10 g
- Maltosa (Panreac, PA) 10 g
- Fructosa (Panreac, PA) 10 g

S'esterilitza per filtració i s'afegeix al medi estèril

Vitamines (50 mL):

- Biotina (Fluka) 0,1 mg
- Àcid nicotínic (Sigma) 10 mg
- Tiamina (Sigma) 5 mg

S'esterilitza per filtració i s'afegeix al medi estèril.

Sals (100 mL):

- Àcid nítriloacètic (Sigma) 1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,445 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, PRS) 0,333 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0,7 mg
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, PRS) 9,9 mg
- Solució 44 5 mL

pH final entre 6,6 i 6,8 neutralitzat amb KOH. S'esterilitza per calor i s'afegeix al medi estèril.

Solució 44 (50 mL):

- EDTA (Panreac, PA) 125 mg
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, PA) 547 mg
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, PA) 250 mg
- $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, PA) 77 mg
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, PA) 19,6 mg
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, PA) 10,15 mg
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 8,8 mg

Afegir gotes de H_2SO_4 6N per retardar la precipitació.

Quan es requeria fer el creixement en medi sòlid es van eferir 15 g d'agar (Oxoid nº 1) per litre de medi. Les solucions concentrades amb substàncies termolàbils es van esterilitzaven per filtració amb filtre de 0,45 µm (FC030/3 Schleicher & Schuell, Dassel, Germany).

2.3.2 Conservació de les soques

Les soques bacterianes utilitzades es guardaven congelades a -80°C (Jouan VX30, Astel S.A., Chateau Gantier, França) en microtubs amb brou LB i 20% de glicerol. Per tal d'evitar l'envelliment de les soques per múltiples repicats, es van congelar repicats de cada una de les soques en microtubs Eppendorf. La soca a conservar es va sembrar en diverses plaques d'agar LB, i s'incubà a 25°C durant 24 h (Incubator MIR 253, Sanyo, Japan). Posteriorment, la fracció cel·lular resuspesa en brou LB amb 20% de glicerol (Panreac PA), es repartí en diferents microtubs estèrils, que es deixaren durant 2 h a temperatura ambient i finalment es congelaren a -80°C. D'aquesta manera, per a cada prova es descongelà un vial nou.

Les soques proporcionades pels diferents investigadors (veure la Taula 2.1), després de comprovar la seva puresa, es van congelar seguint el mateix protocol anterior.

2.3.3 Bioassaigs. Cerca d'activitat antibiòtica

En aquests bioassaigs es va mesurar la capacitat de les soques antagonistes o dels metabòlits que produeixen per inhibir la germinació o el creixement de dos fongs indicadors. Aquests van ser els fongs fitopatògens *Stemphylium vesicarium* i *Penicillium expansum*, sobre els quals es volia exercir el biocontrol.

2.3.3.1 Fongs indicadors

Es varen realitzar tres tipus d'assaigs per detectar l'activitat antagonista: (1) antagonisme en cultiu dual en placa per la identificació de soques productores de metabòlits antifúngics difusibles, (2) detecció d'activitat biològica dels brous lliures de cèl·lules on havia crescut el bacteri, i (3) inhibició per substàncies extraïbles amb dissolvents orgànics.

El pas previ per fer el bioassaig va ésser l'obtenció d'una suspensió de conidis dels fongs. Aquests s'han d'obtenir en unes condicions que permetin que tot i la variabilitat inherent del mètode aquest sigui el més reproduïble possible.

El fong *S. vesicarium* es conservava a 4°C en tubs de PDA inclinats. Per fer el creixement se sembrà una porció de miceli del fong en plaques de PDA que es van incubar a 20°C i transferir setmanalment a plaques de medi fresc.

Per a la producció de conidis es va seguir la metodologia descrita per Montesinos i Vilardell (1992) i Bonaterra (1997). Es dipositaren porcions quadrades de la zona de creixement més externa del fong en el centre de plaques d'agar tomata. Aquestes plaques, segellades amb Parafilm per evitar l'evaporació d'aigua, es van incubar a 20°C amb un fotoperíode de 16 h de llum durant 10 dies. En aquestes condicions la producció de conidis és màxima.

El fong *P. expansum* també es conservava en les mateixes condicions. Per la producció de conidis es va incubar en plaques de PDA a 20°C amb fotoperíode de 12 h de llum. En aquestes condicions ja es produeixen conidis útils pels bioassaigs.

Per a la preparació de les suspensions de conidis es va disposar de tubs d'assaig amb 5 mL d'aigua estèril a la qual s'havia addicionat una gota de detergent Tween 20 (Sigma) estèril.

Per *S. vesicarium*, els conidis que s'havien produït a la placa d'agar tomata es van recollir tocant suaument la superfície de la zona de creixement concèntric amb un escobilló amb la punta de cotó, prèviament sucata en l'aigua. Seguidament, es rentà l'escobilló dins el tub d'assaig, repetint l'operació fins assolir una suspensió tèrbola. Aquesta suspensió de conidis es filtrà a través d'un tamís estèril de 0,2 mm de llum per eliminar les hifes. El filtrat que contenia els conidis es recollí en un tub estèril i es centrifugà a 1000 rpm durant 5 min (Sigma-203, B. Braun). El sobrenedant es descartà i es va resuspendre en igual volum d'aigua estèril. Per obtenir 5 mL d'una suspensió de 10^6 conidis/mL van caldre unes 5-8 plaques de fong.

Per a la preparació de la suspensió de conidis de *P. expansum* es va fregar suaument la superfície de la zona on havia crescut el fong amb un escobilló mullat en l'aigua sabonosa i seguidament es rentà dins al tub només una vegada.

Per ajustar la concentració desitjada (conidis/mL) els conidis es van comptar amb un hematocitòmetre o cel·la de Thoma i la suspensió es diluí convenientment amb aigua estèril fins tenir la concentració desitjada.

La suspensió es conservà refrigerada a 4°C fins el moment de la utilització, com a màxim 4 h en el cas d'assaigs d'inhibició amb sobrecapa d'agar (veure l'apartat 2.3.3.2). Per contra, en la determinació de la inhibició de la germinació de conidis en solució, la preparació de la suspensió ha de fer-se immediatament abans de l'assaig (veure l'apartat 2.3.3.3).

2.3.3.2 Antagonisme en cultiu dual en placa de Petri

Per les proves d'antagonisme es varen preparar plaques de Petri (3V Bibby Sterilin Ltd., Stone, Staffordshire, UK) amb els diferents medis a assajar (LB, LB+1% Glucosa, Malta i PDA). Posteriorment, s'hi va dipositar una sobrecapa d'agar tou del mateix medi amb el fong indicador immobilitzat a una concentració de 10^4 - 10^5 conidis/mL.

Per la preparació d'aquesta sobrecapa es va seguir la metodologia descrita prèviament (Montesinos i col., 1996; Bonaterra, 1997), preparant el medi de cultiu de manera habitual però utilitzant una concentració d'agar menor, al 0,7% (agar tou). Es van dipositar 4 mL del medi fos en tubs roscats que, una vegada esterilitzats, es van mantenir a 40°C dins d'un bany d'aigua. A continuació, es van afegir 100 µL d'una suspensió dels conidis indicadors dins a cada tub, s'agitaren amb el vòrtex i, el contingut de cada tub es distribuí homogèniament sobre una placa d'agar del mateix medi.

Les soques a assajar es varen sembrar tocant suaument la superfície de l'agar amb un escuradents estèril prèviament inoculat, tocant la superfície d'una colònia. Les plaques foren incubades a 25°C durant 48 a 72 h. Cada soca i medi van ser sembrades per triplicat.

El grau d'inhibició en cada medi fou mesurat com l'halo on no hi havia creixement del fong indicador al voltant de la soca antagonista entre la zona de creixement del bacteri i del fong. Com a valor de l'halo d'inhibició es va considerar el promig dels triplicats.

2.3.3.3 Inhibició de la germinació de conidis en suspensió líquida

Amb aquest assaig volia determinar-se si el medi de cultiu lliure de cèl·lules, on havia crescut la soca candidata a agent de biocontrol tenia capacitat per inhibir la germinació de conidis del fong indicador *S. vesicarium*. Si la inhibició de la germinació dels conidis era deguda a alguna substància excretada al medi es podia detectar amb aquesta tècnica.

Es va seguir la metodologia descrita per Montesinos i col. (1996), consistent en prendre 1,5 mL dels brous a assajar en microtubs tipus Eppendorff i centrifugar-los a 5000 rpm durant 20 min (Sigma 203, B. Braün). Els sobrenedants, filtrats a través d'un filtre estèril de 0,45 µm de diàmetre de porus (HWA, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) per tal d'eliminar les cèl·lules, es van recollir en un microtub estèril. Prèviament, s'havia comprovat que aquest tamany de porus era suficient per l'esterilització dels brous.

En alguns casos es va realitzar un tractament tèrmic dels sobrenedants exposant-los durant diferents períodes de temps en un bany d'aigua a la temperatura escollida (50°C i 90°C) per avaluar si hi havia pèrdua d'activitat antagonista per acció de la calor.

Els sobrenedants es van diluir successivament dins els pouets d'una microplaca tipus ELISA utilitzant com a diluents el medi de cultiu o bé tampó fosfat. El control positiu de germinació va ser el mateix medi de cultiu o el tampó fosfat si aquest es feia servir com a diluent. Cada mostra es va fer per triplicat.

A continuació, a cada pouet es dipositaren 20 µL d'una suspensió de conidis de *S. vesicarium* acabada de preparar amb la concentració ajustada a 10⁶ conidis/mL. Les plaques es van incubar a 25°C a la foscor durant 4 h, després de les quals es va llegir el percentatge de germinació a cada pouet.

La lectura de la germinació de conidis va fer-se amb el microscopi de contrast de fases a 400 augments (Model BH-2, Olympus Optical Co., Japan) prenent 20 µL del contingut del micropouet. Es van comptar aproximadament 100 conidis en lectures a tres camps diferents, determinant el nombre de conidis que havien germinat i els que no. Es considerarà que un conidi estava germinat quan els tubs germinatius eren més llargs que l'amplada del conidi.

El percentatge d'inhibició de la germinació (I) es va expressar com (Bonaterra, 1997):

$$I = \left(1 - \frac{\text{conidis germinats mostra} \times \text{conidis totals al control no tractat}}{\text{conidis germinats control no tractat} \times \text{conidis totals a la mostra}} \right) \times 100$$

2.3.3.4 Assaig d'inhibició per difusió en agar

L'assaig de difusió amb discs de paper de filtre es va utilitzar per determinar si l'extracte orgànic d'una soca tenia activitat antifúngica o bé per mesurar l'activitat dels antibiòtics sintetitzats o purificats.

Per fer l'assaig es van dipositar les substàncies a assajar en discs de paper de filtre estèrils (Antibiotiktest discs, 9 mm Ø, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Aquests es van deixar assecar sota flux d'aire estèril fins que el dissolvent es va evaporar completament.

Com a control de germinació es van dipositar discs que s'havien empapat amb el mateix dissolvent de l'extracte orgànic.

La prova es va realitzar en el medi PDA amb una sobrecapa d'agar PDA tou amb el fong indicador immobilitzat a una concentració de 10^4 - 10^5 conidis/mL. Els discs abans preparats es dipositaren sobre l'agar i s'incubaren de 48 a 72 h a 25°C a la foscor.

La capacitat antagonista es va mesurar com l'halo al voltant del disc on no hi havia creixement del fong indicador.

2.3.3.5 Bioautografia

Per tal de localitzar i identificar una substància amb activitat antifúngica present en l'extracte orgànic de cultius lliures de cèl·lules de la soca estudiada es va realitzar l'antibiograma directament sobre la placa de cromatografia de capa prima (CCP). Aquesta tècnica permet localitzar les substàncies que presenten activitat biològica en un extracte orgànic que s'ha separat en els seus components.

El mètode utilitzat per realitzar aquest experiment parteix d'una adaptació dels diferents mètodes descrits prèviament per diversos autors (Homans i Fuchs, 1970; Lazarovits i col., 1982; Burkhead i col., 1995; Ishimaru i col., 1988; Hasegawa i col., 1991b; Balinova, 1995).

El mètode desenvolupat en el nostre treball té l'avantatge de poder treballar en unes condicions que no requereixen instal·lacions especials de seguretat (no disponibles en els nostres laboratoris), donat que en les condicions que es fa la prova es minimitza el perill de dispersió del patògen a l'ambient. Com a desavantatge, cal esmentar que no es pot realitzar amb fongs que siguin sensibles a la temperatura (aprox 40°C, que és la de fusió de l'agar). En aquesta prova, no va utilitzar-se el fong *P. expansum* perquè no creixia sobre la placa cromatogràfica.

Per a la preparació de les plaques de CCP, es van dipositar de 3 a 5 µL de cada un dels extractes orgànics a assajar -en una única taca- (veure l'apartat 2.3.5) a 1,5 cm de l'extrem inferior d'una placa cromatogràfica de 10x3 cm (Alufolien Silicagel 60 Merck, Germany). Les plaques van desenvolupar-se utilitzant diversos dissolvents tant individualment com en barreges binàries, de manera que els components de la mostra quedessin a diferents alçades, i el més separats possible. Els dissolvents utilitzats van ser acetat d'etil (Panreac PA), acetona (Panreac PA), hexà (Riedel de Hæn PA), metanol (Panreac PA), toluè (Panreac PA), triclorometà (Panreac PAI), i àcid acètic (Panreac PA) com a acidificant.

Una vegada desenvolupades les plaques el dissolvent s'evaporà sota un corrent d'aire estèril. Quan s'utilitzà àcid acètic en la fase mòbil el temps d'evaporació va ser més llarg. Una vegada seques, es tallaren per l'origen i per l'extrem superior de la zona mullada, i es dipositaren a la superfície de plaques de Petri amb medi PDA.

A sobre de la placa cromatogràfica es diposità, amb cura, una sobrecapa d'agar PDA tot amb el fong indicador a una concentració de 10^4 - 10^5 conidis/mL. En proves preliminars, s'observà que en aquestes condicions la sensibilitat era bona. Com a control negatiu va utilitzar-se una placa de CCP impregnada en el mateix dissolvent, el qual s'evaporà abans de dipositar el fong.

Posteriorment, les plaques es van incubar a 25°C a la foscor durant tres dies i un dia més en llum per tal que enfosquessin -degut a la formació de conidis pel fong indicador-. D'aquesta manera, les zones d'inhibició corresponents a les substàncies que inhibeixen la germinació del fong es visualitzaren com a zones blanques d'inhibició sobre fons fosc.

Es va determinar el Rf dels halos d'inhibició de la placa cromatogràfica com la relació de la distància del mig de l'halo a la base de la placa cromatogràfica dividit per la longitud total de la placa cromatogràfica.

Els Rf dels halos d'inhibició es van comparar amb els Rf dels productes obtinguts en les plaques revelades i visualitzades amb diferents sistemes (veure l'apartat 2.3.6.1).

2.3.4 Detecció i identificació de HCN en cultius de bacteris productors

La identificació de soques productores de HCN de la col·lecció EPS és necessària perquè pot contribuir a acotar el mecanisme d'actuació de les soques candidates a agents de biocontrol.

Es van utilitzar diversos mètodes per a la detecció i identificació del HCN. Algunes de les proves ja estan desenvolupades pel seu ús en microbiologia, mentre que d'altres es van adaptar per aquest treball.

2.3.4.1 Mètode del picrat alcalí

Per a la realització d'aquesta prova es van preparar tubs roscats amb 4 mL d'agar LB i tires de paper Whatman nº1 impregnades amb picrat alcalí.

Per a la preparació dels tubs es van dipositar 4 mL d' agar LB, prèviament escalfat fins a ebullició per dissoldre l'agar, a cadascun dels tubs. Una vegada esterilitzats a l'autoclau, 20 min a 121°C, es van refredar deixant-los en posició vertical. Aquests tubs estèrils es poden conservar a la nevera a 4°C durant 15 dies.

La preparació de les tires de picrat alcalí es va fer segons el mètode de Sneath (1966) i de Castric (1974). Les tires de paper s'impregnaren, en una solució d'àcid pícric de 0,5 g/L (Fluka), i una vegada seques es van mullar en una solució de Na₂CO₃ al 10% (Panreac PA) deixant-les assecar sota un corrent d'aire estèril. Aquestes tires es conserven sense problemes durant una setmana dins un pot opac i en ambient fresc i sec.

Els bacteris a assajar es van sembrar per picada en els tubs a partir de cultius crescuts en agar LB, i seguidament es van tapar tot introduint-hi una tira de picrat alcalí evitant que toqués a les parets del tub o a la superfície de l'agar. Les soques es van incubar a 25°C durant 2-3 dies. Cada soca es va sembrar per triplicat.

Com a criteri general, es considerarà que una soca era productora de HCN si després de 2-3 dies la tira de picrat alcalí de dins el tub havia canviat del color groc original a taronja-vermell (color teula).

Com a control negatiu, es va utilitzar la soca de referència *P. fluorescens* SBW 25 no productora de HCN i com a control positiu la *P. fluorescens* CHA0.

2.3.4.2 Assaig al toc o “spot test”

Aquesta prova permet la detecció de més de 50 µg HCN/L (0,05 ppm) en aigües residuals. El mètode que s'ha utilitzat en el present treball és una adaptació del descrit en l'apartat 4500 CN K. *Spot Test for Sample Screening* (APHA, 1984).

Els bacteris dels quals es volia determinar la capacitat de produir HCN es van cultivar en un tub d'assaig amb 4 mL de brou LB durant 48 h a 25°C i en agitació orbital a 125 rpm (Agimatic, J. P. Selecta, Abrera, Barcelona). Es va prendre una alíquota del brou dins un microtub eppendorf i es va centrifugar a 5000 rpm durant 10 min (Selecta-203, B. Braun). El brou clarificat de cèl·lules era la mostra ja preparada per a la realització de l'assaig al toc. Es va fer un triplicat de cada una de les soques.

Com a controls negatius van utilitzar-se brou LB, brou LB en el qual havia crescut una soca no productora de HCN (*P. fluorescens* SBW25) i aigua destil·lada; com a controls positius, brou on havia crescut una soca productora de referència (*P. fluorescens* CHA0) i brou LB al qual s'havia addicionat KCN per tenir 0,1 µg HCN/mL brou.

La prova va consistir en dipositar 100 µL de cada mostra en els pouets d'una placa de porcellana, afegint-hi seqüencialment 50 µL de Na₂HPO₄ 1 M, 1 gota de Cloramina T (1 g Cloramina T (Merck)/ 100 mL aigua) i 2 gotes del reactiu Piridina-Barbitúric. El viratge cap a un color rosa indicava la presència de HCN.

Per la preparació del reactiu Piridina-Barbitúric s'introduïren 15 g d'àcid barbitúric (Fluka) dins un erlenmeyer de 250 mL, addicionant una petita quantitat d'aigua per remullar i afegint seguidament 75 mL de Piridina (Panreac PA). Després de remenar fins a quedar una suspensió homogènia s'addicionaren amb cura, tot agitant, 15 mL de HCl concentrat (Panreac PA). Aquesta suspensió, després de refredar-se a temperatura ambient, s'enrasà a 250 mL amb aigua destil·lada.

El reactiu Piridina-Barbitúric és transparent i de color lleugerament ataronjat i es conserva sense problemes a les fosques a temperatura ambient durant una setmana.

En les proves de detecció de la producció de HCN a les microplaques del lector automatitzat Bioscreen (veure l'apartat 3.3.3) els reactius es dipositaren directament dins els pouets de la microplaca agitant-la després de cada addició.

2.3.4.3 Mètode del blau de Prússia

Aquesta prova va realitzar-se a les soques de les quals es volia confirmar la producció de HCN per un mètode alternatiu.

Es va prendre 1 mL de la solució bàsica resultant de bombollejar l'aire que s'havia fet circular per un cultiu de la soca productora (veure l'apartat 3.3.2.2), se li va afegir una punta d'espàtula de CaCl_2 (Panreac PA) per precipitar CaCO_3 i es va centrifugar a 5000 rpm (Sigma 203, B.Braun). A la solució clarificada es va realitzar la prova per a la formació del Blau de Prússia (Burriel i col., 1983). La prova consistia en prendre 0,5 mL de la solució absorbidora bàsica als quals es van afegir 4 o 5 gotes d'una solució diluïda de FeSO_4 (Panreac PA) acabada de preparar i seguidament s'escalfà suaument el tub fins a ebullició. Quan es va haver refredat, s'acidificava amb HCl i l'aparició d'un precipitat blau en afegir unes gotes de solució de FeCl_3 confirmava la presència de CN⁻. Aquest precipitat a baixes concentracions de HCN és de color verd.

Com a controls positius es van utilitzar la solució bàsica procedent de la soca productora *P. fluorescens* CHA0 i una solució bàsica a la qual s'havia afegit KCN. Com a controls negatius es van utilitzar una solució bàsica a la que s'havia bombollejat aire i una solució bàsica procedent de la soca no productora *P. fluorescens* SBW25.

2.3.4.4 Assaig per espectroscòpia d'Infraroig

Aquesta prova es va realitzar a les soques que havien donat positiu a la prova del picrat alcalí i de les quals es volia confirmar la producció de HCN. Aquesta prova es va utilitzar perquè el límit de detecció de la prova del blau de Prússia es va trobar que era elevat i l'espectre d'infraroig permet identificar-lo amb certesa, amb elevada sensibilitat i d'una manera ràpida i senzilla.

Es van realitzar dues proves espectroscòpiques, una de la fase gasosa de capçalera del cultiu d'un bacteri productor i una altra, del gas recollit en la solució

alcalina on s'havia bombollejat l'aire que havia circulat per l'interior d'un cultiu (veure l'apartat 3.3.2.2).

Per fer l'espectre de la fase gasosa de capçalera, van incubar-se 50 mL de cultiu del bacteri en brou LB dins un erlenmeyer de 250 mL en agitació a 125 rpm durant 24 h a 25°C. Amb una xeringa de 100 mL es va treure una mostra de la fase gasosa de la zona lliure de dins l'erlenmeyer, atravesant el tap de cotó, dipositant-la dins una cel·la de IR per gasos. A continuació, es va realitzar l'espectre d'IR (FTIR Mattson, UK) prenent com a referència l'espectre recollit d'una mostra d'una soca no productora de HCN crescuda en les mateixes condicions. Com a control positiu, es va utilitzar la soca de *P. fluorescens* CHA0 i com a control negatiu la SBW25.

Per realitzar l'espectre de la solució alcalina es van afegir 5 g de CaCl_2 a 50 mL de la solució bàsica procedent del cultiu del bacteri (veure l'apartat 3.3.2.2). El precipitat blanc, majoritàriament de CaCO_3 , es va eliminar centrifugant a 3000 g durant 10 min (RC-5CPlus, Sorvall). Dins una ampolla amb un tap amb sèptum es van dipositar 5 mL del sobrenedant. A continuació, amb l'ampolla tapada, es va afegir 1 mL de H_2SO_4 5 M amb ajuda d'una xeringa. El gas resultant es va recollir amb una xeringa, i dipositat en un cel·la per gasos de 10 cm de pas de llum, la qual va utilitzar-se per fer l'espectre d'IR. Com a referència, es va utilitzar el gas després de la solució alcalina procedent d'una soca no productora de HCN sotmesa al mateix tractament.

El CO_2 pot interferir en aquesta determinació per la proximitat d'algunes bandes d'absorció específiques. Aquesta interferència era important sobretot a concentracions baixes de HCN i per tant es va haver d'eliminar. Per eliminar-la l'espectre de la fase gasosa resultant d'acidificar una solució de NaHCO_3 (o bé amb el gas del cultiu d'una soca no productora) es va restar de l'espectre de la soca problema ("background" en l'aparell).

2.3.5 Extracció i purificació de metabòlits secundaris a partir de soques productores

Per realitzar aquest experiment es van utilitzar les soques de la col·lecció EPS a les quals s'havia localitzat una banda de PCR coincident amb el gens del DAPG, del PCA o de la Pm (Badosa, 2001). D'aquestes soques es va estudiar la producció de l'antibiòtic en diferents medis i condicions.

A la Taula 2.1 es relacionen les soques de referència cedides per altres investigadors, que són productores de cada un dels antibiòtics estudiats, i que han estat utilitzades en el present treball.

Taula 2.1. Relació de soques proveïdes per altres investigadors amb indicació dels metabòlits secundaris que produeixen.

Table 2.1. Bacterial strains provided by some scientists showing the secondary metabolites the strains produce.

Nom de la soca	Metabòlits	Procedència	Referències
<i>P. fluorescens</i> CHA0	DAPG, PIt, HCN, Prn	G. Défago, Suïssa	Voisard i col., 1989
<i>P. fluorescens</i> Q2-87	DAPG, HCN	L. Thomashow, USA	Vincent i col., 1991
<i>P. fluorescens</i> Q4-87	DAPG, HCN	L. Thomashow, USA	Keel i col., 1996
<i>P. fluorescens</i> PS15	DAPG, HCN	M. Nielsen, Dinamarca	Nielsen i col., 1998
<i>P. fluorescens</i> PS31	DAPG, HCN	M. Nielsen, Dinamarca	Nielsen i col., 1998
<i>P. fluorescens</i> JMP 12-84	DAPG, HCN	J.M. Raaijmakers, USA	Com. personal
<i>P. fluorescens</i> JBR 1-70	DAPG, HCN	J.M. Raaijmakers, USA	Com. personal
<i>P. fluorescens</i> BL915	Prn, AR, HCN	S. Hill, USA	Gaffney i col., 1994
<i>P. fluorescens</i> WB-1	Àcid Salicílic, HCN	W. Fakkouri, Alemanya	Com. personal
<i>P. fluorescens</i> WB-52	Àcid Salicílic, HCN	W. Fakkouri, Alemanya	Com. personal
<i>P. fluorescens</i> 2-79	PCA	L. Thomashow, USA	Thomashow i col, 1990
<i>P. fluorescens</i> SBW25	Control negatiu	J. Whipps, UK	Lilley i Bailey, 1997a

AR: alquil resorcinol, DAPG: 2,4-diacetilfloroglucinol; PIt: pioluteorina; Prn: pirrolnitrina; PCA: àcid fenazina-1-carboxílic.

Per identificar els gens que codifiquen per la síntesi de DAPG en soques de *P. fluorescens* van utilitzar-se els encebadors descrits per Raaijmakers i col. (1997), fent la PCR de totes les soques de *P. fluorescens* de la col·lecció, utilitzant com a control positiu les soques *P. fluorescens* Q2-87 i JBR 1-70 (Badosa, 2001).

Per localitzar soques productores de PCA es va fer la PCR amb els encebadors PCAa i PCAb (Raaijmakers i col, 1997) de les soques *P. fluorescens* de la col·lecció EPS utilitzant com a control positiu la soca *P. fluorescens* 2-79 (Badosa, 2001).

Per la cerca de soques productores de Prn van utilitzar-se els encebadors desenvolupats per Badosa (2001) i es va fer la PCR de les soques de la col·lecció EPS utilitzant les soques BL915 i CHA0 com a controls positius.

2.3.5.1 Producció i extracció de metabòlits

Per confirmar la producció dels metabòlits secundaris DAPG, PCA i Prn, en primer lloc es varen fer proves de producció, aïllament i caracterització utilitzant les soques de referència i, posteriorment, es van estudiar les soques de la col·lecció EPS que s'havien localitzat per PCR.

Diacetilfloroglucinol

Els cultius per la confirmació de la producció de DAPG es van fer en medi sòlid amb els medis LB, LB+1% glucosa, extracte de malta i KB sòlid. Com a controls positius, es van utilitzar les soques CHA0 i Q2-87 i com a control negatiu la soca SBW25.

La preparació de l'inòcul es va fer a partir de les soques conservades a -80°C. Les soques se sembraren en plaques de Petri amb agar LB i s'incubaren 24 h a 25°C. A partir d'aquest cultiu, es va resuspendre una nança de Kolle carregada amb la fracció cel·lular en 4,5 mL de tampó fosfat, dipositant a continuació 100 µL d'aquesta suspensió per cada placa del medi corresponent, i distribuint-los homogèniament en superfície. Les plaques van incubar-se durant 48 h a 25°C.

L'extracció en medi sòlid es va realitzar adaptant mètodes ja descrits (Keel i col., 1992; Bonsall i col., 1997). Una vegada eliminada la massa cel·lular de la superfície de la placa, es va tallar l'agar en quadrats d'aproximadament 0,5 cm de costat que es dipositaren en un matràs Erlenmeyer de 250 mL de capacitat. Es van fer dues extraccions consecutives afegint 10 mL d'una solució d'acetona al 80% per cada placa i agitant el matràs durant 15 min en un agitador oscil·lant (Vibromatic, J.P. Selecta S.A., Abrera -Barcelona-, Espanya) a 250 rpm. Els trossos d'agar van eliminar-se filtrant la suspensió a través d'una malla.

Els filtrats resultants es van combinar i centrifugar durant 5 min a 6000 rpm (RC-5CPlus, Sorvall) per eliminar les cèl·lules i les restes d'agar. El sobrenedant clarificat es va evaporar a baixa pressió fins a la quarta part del seu volum inicial en un rotavapor amb bany d'aigua a 40°C (Buchi, Suïssa). Aquesta solució es va acidificar fins a pH 2 amb HCl 2 M, afegint a continuació suficient NaCl per tenir una solució al 10%. Van fer-se dues extraccions consecutives amb la meitat de volum d'acetat d'etil. Les fases orgàniques emulsionades es centrifugaren a 5000 rpm durant 10 min (RC-5CPlus, Sorvall) per trencar l'emulsió. La fase orgànica, filtrada a través de Na₂SO₄ anhidre (Panreac PA) s'evaporà a baixa pressió a 35°C fins a sequedat. Finalment el residu es va resuspendre amb acetat d'etil (Panreac PA) i es guardà en vials a la foscor.

Donada la sensibilitat del DAPG a la llum, durant tot el procés de producció, extracció i anàlisi, es va evitar al màxim l'exposició a la llum utilitzant recipients de vidre color topazi o recobrint-los amb paper d'alumini.

Per les proves amb DAPG, es va obtenir patró per síntesi química seguint el mètode descrit per Dean i Robertson (1953). En aquest mètode el DAPG i el MAPG s'obtenen conjuntament. La seva separació i purificació es va aconseguir per la menor solubilitat del MAPG en CHCl_3 . El residu procedent del matràs de síntesi, rentat i assecat, es diposità en un embut tapat amb llana de vidre i es rentà amb CHCl_3 . La solució resultant s'evaporà a sequetat repetint el procés amb el residu sòlid obtingut, rentant-lo amb el mínim volum de CHCl_3 fins aconseguir un patró d'elevada puresa (>95%). L'enriquiment en DAPG de la solució de rentat es va comprovar per CCP, revelant amb DSA, o bé per cromatografia líquida d'alta resolució -CLAR- (veure l'apartat 2.3.6.3).

Àcid fenazina-1-carboxílic

Per confirmar la producció de PCA es van fer cultius en medi líquid prenent com a control negatiu la soca de *P. fluorescens* SBW25 i com a control positiu la soca Pf2-79. El PCA produït per aquesta darrera soca, una vegada purificat, va utilitzar-se com a patró en les proves d'identificació i de quantificació. Es va assajar la producció en els medis líquids KB, NBY i LB + 1% Glucosa.

La producció del PCA es va fer seguint el mètode descrit per Mazzola i col. (1995). Les soques que havien donat positiva la prova de PCR per la localització dels gens del PCA i la de referència van sembrar-se en agar LB i es van incubar durant 24 h a 25°C. Seguidament, cada una de les soques es va sembrar en 25 mL dels medis a assajar i van incubar-se en agitació orbital a 125 rpm durant 24 h a 25°C (Hotcold-E, J.P. Selecta, Abrera, Barcelona, Espanya). Aquests cultius es van centrifugar a 8000 g (RC-5Cplus, Sorvall) durant 5 min. El sobrenedant es descartà i el sediment es va resuspendre en igual volum del medi a assajar. Aquesta suspensió s'utilitzà per l'escalat dels cultius inoculant-ne 1 mL en 200 mL de medi fresc dins erlenmeyers d'1 L, i incubant-los a 25°C en agitació orbital a 125 rpm durant 5 dies.

L'extracció del PCA va realitzar-se segons el mètode de Chang i Blackwood (1969), adaptada per Van Pée i col. (1983) que està esquematitzada a la Figura 2.1. La fase orgànica del final, que contenia el PCA, es va separar i evaporar quasi a sequetat amb rotoevaporador al bany d'aigua a 40°C, finalitzant l'evaporació del dissolvent i mantenint el buit dins un dessecador a temperatura ambient. El residu que s'obté correspon a PCA purificat. Es va comprovar la seva puresa per CCF i per ^1H -RMN.

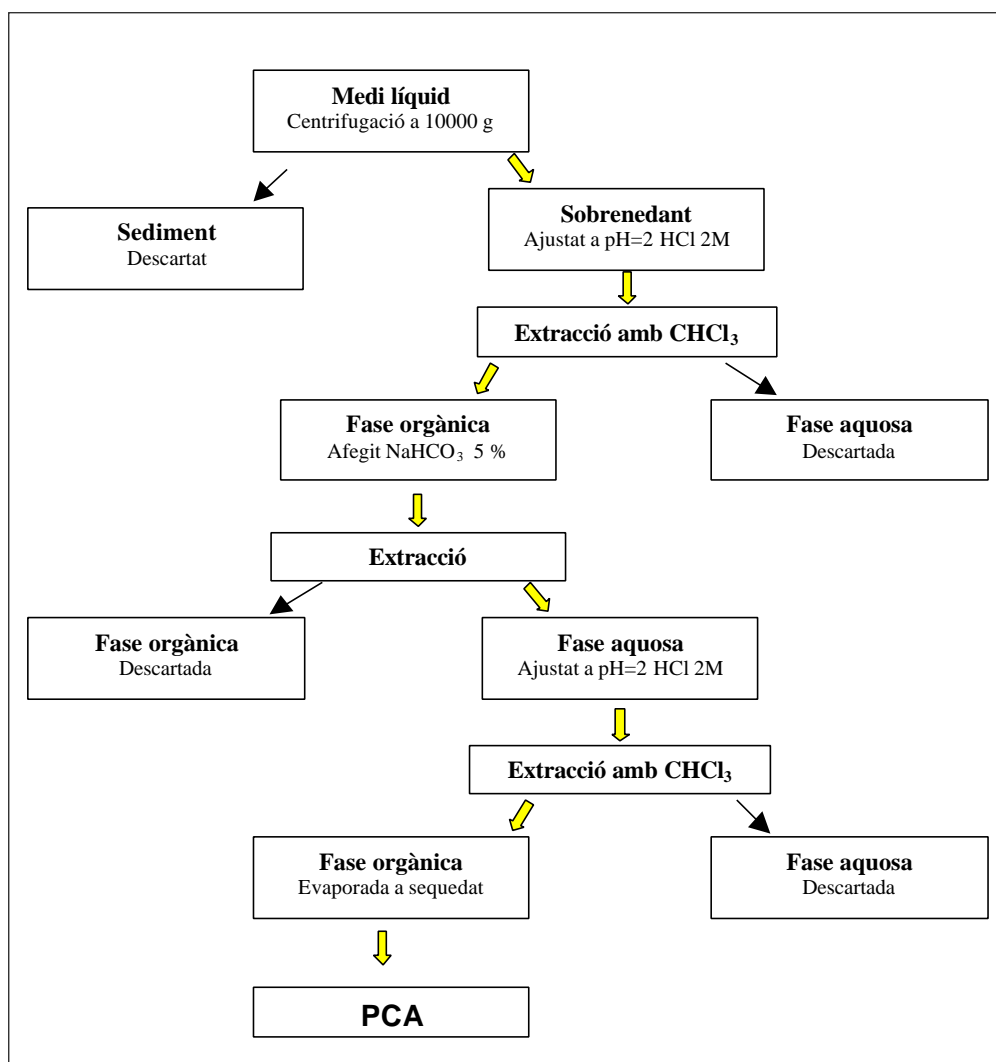


Figura 2.1. Esquema del procés d'extracció i purificació del PCA.

Figure 2.1. Layout for PCA extraction and purification.

La determinació de la producció de PCA per les soques de la col·lecció EPS es va fer amb CLAR a partir de cultius en brou dels medis KB, LB i YM, incubats a 25°C en agitació orbital a 125 rpm durant 5 dies.

Per aquesta anàlisi, es va realitzar una microextracció del brou adaptada de diversos mètodes descrits prèviament (Pierson III i Thomashow, 1992; Slinger i Jackson, 1992; Slinger i Shea-Wilbur, 1995; Mavrodi i col., 1998).

El brou es centrifugà a 5000 rpm (Sigma 203, B.Braun), i seguidament a 1 mL del sobrenedant dipositat en un tub Eppendorff, al qual s'afegiren 50 mg de NaCl, 50 µL de HCl 2 M i 0,5 mL d'acetat d'etil, agitant-lo amb vòrtex durant 1 min per fer l'extracció. Seguidament, es centrifugà per trencar l'emulsió. Es van prendre 0,4 mL de la part orgànica superior, s'evaporaren al buit i es van resuspendre amb fase mòbil, injectant-les posteriorment a CLAR (veure l'apartat 2.3.6.3). El PCA va detectar-se a longitud d'ona de 254 nm comprovant l'espectre en el rang de 250 a 800 nm i prenent el PCA patró com a referència.

Pirrolnitrina

Per a la producció de Prn va utilitzar-se la soca *P. fluorescens* BL915 com a control positiu. Les soques de les quals es volia determinar la producció de Prn es van sembrar en medi sòlid LB, incubant-les durant 24 h a 25°C. Aquests cultius es van utilitzar per sembrar 200 mL de brou LB en erlenmeyers d'1 L, que es van mantenir en agitació orbital a 125 rpm a 25°C durant 4 dies.

L'extracció dels brous va fer-se adaptant diverses metodologies descrites prèviament (Van Pée i col., 1983, Burkhead i col., 1994, Cartwright i col., 1995) i donada la fotosensibilitat de la Prn va evitar-se l'exposició a la llum durant tot el procés.

A 200 mL del cultiu se'ls van afegir 100 mL d'acetat d'etil i es van aplicar ultrasons, a una potència de 100 W, durant 2 min en polsos de 0,8 s (Labsonic U, B. Braun Biotech). La suspensió resultant es va centrifugar a 8000 g (RC-5CPlus, Sorvall) per separar les fases, recuperant la fase orgànica i repetint l'extracció amb la fase aquosa i el sediment una segona vegada. Les fases orgàniques combinades es van filtrar a través de Na₂SO₄ anhidre i, seguidament van evaporar-se a baixa pressió al rotoevaporador amb bany d'aigua a 40°C fins a sequedat. El residu es va resuspendre en acetat d'etil (extracte orgànic) conservant-lo a la foscor en un vial color àmbar.

Es van fer cromatografies en capa prima de l'extracte orgànic amb diferents dissolvents i revelats amb vainillina per identificar el metabòlit (veure l'apartat 2.3.6.1). Es van fer també bioautografies amb *S. vesicarium* com a indicador per localitzar les substàncies bioactives (veure l'apartat 2.3.3.5).

2.3.6 Aïllament i identificació dels metabòlits

Mitjançant tècniques cromatogràfiques, es van separar de les diferents substàncies constituents dels l'extractes orgànics obtinguts a l'apartat anterior on se suposava que hi havia el/s metabòlit/s amb activitat antibiòtica. Per localitzar les diferents substàncies d'interès, es van realitzar revelats tant químics com biològics.

Per a cada un dels metabòlits, es va determinar l'espectre de ^1H -RMN (AVANCE 200, Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten, Germany), de IR (Galaxy Series FTIR, Mattson Instruments Inc., Madison, Wisconsin), i d'UV-VIS (Model UV-160A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.3.6.1 Cromatografia de capa prima (CCP)

Per a la separació i detecció dels metabòlits, es van dipositar 3 μL de l'extracte orgànic en una placa cromatogràfica de capa prima (Alufolien Silicagel 60 F_{254} Merck). Les plaques es van desenvolupar amb diferents solvents orgànics (acetat d'etil, triclorometà, acetona, metanol, hexà, toluè i àcid acètic) i també amb barreges de dos i tres dissolvents en diferents proporcions per tal de disposar d'una àmplia gamma de polaritats.

Per a la localització dels metabòlits es van realitzar diferents revelats:

- Visualització sota llum UV de 365 nm (bandes fluorescents) i de 254 nm (bandes d'absorció).
- Polvorització amb solució àcida de Fe^{3+} (FeCl_3 en HCl 0,1 M). Amb aquest reactiu es revelen els grups fenol (DAPG, MAPG i Plt) donant coloració vermellova.
- Polvorització amb el reactiu de Pauli o DSA⁴ que reacciona amb substàncies aromàtiques. El DAPG es revela de color groc, el MAPG de color vermell-taronja, el Prn de color marró i el PCA no es revela.
- Polvorització amb reactiu de Vainillina⁵. El DAPG no es revela, el MAPG es revela de color vermell-taronja, el Prn de color violeta i el PCA no es revela.
- Bioautografia o assaig de germinació de conidis. Es visualitzen les substàncies biològicament actives com a zones blanques envoltades de fong. Veure l'apartat 2.3.3.5.

⁴ Per preparar el reactiu de Pauli o DSA (Àcid sulfanílic diazotitzat) es dissol una punta d'una microespàtula d'àcid sulfanílic diazotitzat (Fluka) en 25 mL d'una solució al 50% d'etanol en aigua. Aquesta solució es conserva durant una setmana a la nevera. Es polvoritza sobre la capa prima i es visualitza sense escalfar.

⁵ El reactiu de Vainillina es prepara dissolent 1 g Vainillina (Sigma) en 25 mL de H_3PO_4 (Panreac PA), 35 mL d'etanol i aigua fins a 100 mL. Es polvoritza la placa i es revela escalfant en una estufa a 120°C durant 5 min.

Per comprovar a quina substància corresponia la banda activa es diposità una línia de mostra (de 10 a 20 μL) en la placa cromatogràfica i una vegada desenvolupada i evaporat el dissolvent es rascà a l'alçada corresponent a la banda activa. Aquesta pols de sílice es diposità en un vial amb fase mòbil i s'agità amb vòrtex, centrifugant seguidament a 5000 rpm durant 5 min (Sigma 203, B. Braun). Es va descartar el residu i el sobrenedant es va filtrar amb filtre de nylon (Millex HN, Millipore Bedford, USA) per injectar-lo al CLAR. En base al temps de retenció i a l'espectre es va poder identificar la substància a la que corresponia la banda activa.

2.3.6.2 Cromatografia líquida flash en columna (CLFC)

Per realitzar les tècniques espectroscòpiques de ^1H -RMN, IR o UV-VIS cal disposar de 5 a 10 mg de la substància activa purificada. La purificació de la quantitat necessària es va fer a partir de l'extracte orgànic obtingut d'un cultiu de la soca corresponent (veure apartat 2.3.5.1) i utilitzant com a mètode de separació la CLFC. Com a fase estacionària es va utilitzar sílice (Silicagel 60, 240-400 mesh. Fluka) i com a fase mòbil la que donava millor separació en les proves amb CCF.

L'extracte orgànic en solució o absorbit en sílice va dipositar-se a l'inici de la columna cromatogràfica (40 cm x 2,5 cm) on hi havia dipositats 25 cm d'alçada de fase estacionària. La fase mòbil es va eluir aplicant una lleugera pressió, i recollint fraccions de 5 mL de les quals es feien CCP que es van revelar amb DSA o Vainillina fins que es visualitzà el metabòlit d'interès. Les fraccions que contenien el metabòlit s'ajuntaren i es van evaporar al buit fins a sequedat. El residu, després de comprovar-ne la puresa es mantenia al buit en un dessecador durant 12 h abans de fer la determinació espectroscòpica.

2.3.6.3 Cromatografia líquida d'alta resolució (CLAR)

En aquest treball, la tècnica CLAR s'ha utilitzat per a la quantificació i pel seguiment de la producció dels metabòlits DAPG i PCA produïts per les diferents soques.

El sistema cromatogràfic emprat constava dels següents mòduls (Waters, Mildford, Madison, USA):

- Bombes model 480 i controlador model 610
- Detector UV a longitud d'ona fixa model 484, o detector de díodes en fila model PAD 996 amb recollida de l'espectre a l'interval de 210-400 nm i detecció a 270 nm pel DAPG i MAPG i a 254 nm pel PCA.
- Ordinador amb sistema Millennium 32[®] que controla les bombes, i la recollida i tractament de les dades

Les condicions de treball van ser:

- Columna Tracer Hypersyl ODS (15 x 0,46 cm), tamany de partícula 5 µm, i precolumna Waters Hypersyl ODS (0,5 x 0,46 cm)
- Volum d'injecció fix de 20 µL (Reodine o injector automàtic model 717 Plus)
- Fase mòbil acetonitril:àcid tricloroacètic (Panreac PA) en H₂O (40:60), pH final 2,8. Aquesta fase mòbil es va utilitzar tant en la determinació de DAPG com de PCA.
- Cabal de treball 0,8 mL/min

Per determinar l'efecte de la matriu en la detecció i quantificació dels metabòlits es van fer corbes de calibrat utilitzant diverses matrius, corresponents als medis de cultiu assajats.

2.4 Resultats

2.4.1 Antagonisme *in vitro* en medi sòlid

Els resultats de les proves d'antagonisme *in vitro* de les soques utilitzades en aquest estudi vers els fongs indicadors *S. vesicarium* i *P. expansum* en diferents medis de cultiu es resumeixen a la Taula 2.2.

Taula 2.2. Antagonisme *in vitro* de les soques de *P. fluorescens* vers els fongs indicadors *S. vesicarium* i *P. expansum* en diferents medis de cultiu.

Table 2.2. *In vitro* antagonism of selected *P. fluorescens* strains against the fungal pathogens *S. vesicarium* and *P. expansum* in different growth media.

Soca	<i>S. vesicarium</i>				<i>P. expansum</i>			
	LB	LB+GI	PDA	Malta	LB	LB+GI	PDA	Malta
CHA0	+++	++	-	+	+++	+++	-	+
Q2-87	+	-	+	++	-	-	+	-
Q4-87	-	-	-	-	-	-	++	+
PS15	-	-	+	-	-	-	+	+
PS31	+	-	+/-	++	+	-	+/-	+
JMP 12-84	++	+/-	+/-	+	-	-	+/-	+
JBR 1-70	+	+/-	+	++	-	-	+	+
BL915	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
WB1	-	-	-	-	+++	+++	-	-
WB52	-	-	-	-	+++	+++	-	-
Pf 2-79	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
EPS263	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
EPS317	+	+	++	+	+	+	+	+
EPS288	+/-	++	+++	++	+++	++	-	+
EPS375	++	+	+	-	+	+	-	+
EPS808	+	+	++	+	-	-	+	-
SBW25	+	+	-	-	-	-	-	-

GI: glucosa; +++ > 5 mm, ++ 2 a 5 mm, + < 2 mm, +/- dubtós, - no inhibició; nd: no determinat

La inhibició era dependent del medi de creixement i del patògen diana. En *S. vesicarium* la inhibició depenia més de la soca mentre que en *P. expansum* la inhibició era més dependent del medi.

La inhibició en *S. vesicarium* s'observà com un halo lliure de creixement i una corona blanca al voltant (veure la Figura 2.2) i la resta era zona de creixement sobre fons marró, mentre que en *P. expansum* s'observà un halo envoltat de creixement verd.

La soca EPS317 és l'única que va inhibir a tots dos patògens en tots els medis però amb poca intensitat. Les soques WB1 i WB52 només van inhibir a *P. expansum* en medi LB i LB suplementat amb glucosa.

La soca SBW25 utilitzada com a control negatiu per la producció d'antibiòtics va inhibir lleugerament a *S. vesicarium* en els medis LB i LB suplementat amb glucosa. El medi malta i PDA són en els que més bacteris van inhibir als fongs. Les soques CHA0, JMP 12-84, JBR 1-70 i EPS375 van mostrar inhibició en la majoria dels medis, mentre que la resta de soques van tenir un comportament irregular.

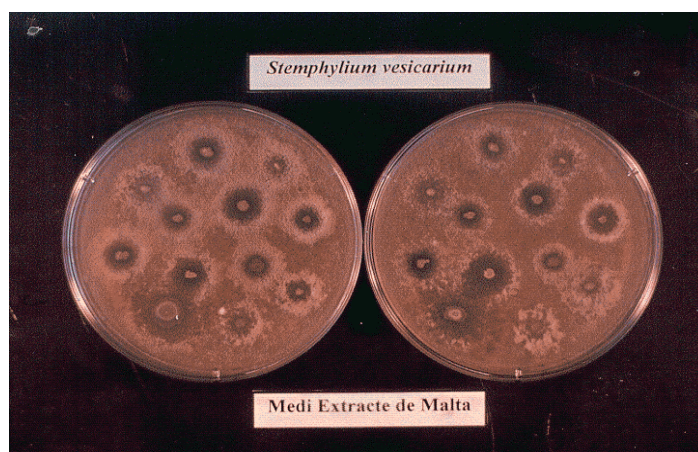


Figura 2.2. Inhibició *in vitro* del creixement de *S. vesicarium* en medi extracte de malta.

Figure 2.2. In vitro inhibition of *S. vesicarium* in malt extract growth media.

Les bioautografies dels extractes orgànics de les diferents soques productores de metabòlits secundaris DAPG, PCA i Prn, es van realitzar paral·lelament a la identificació de les substàncies per revelats amb DSA, vainillina i Fe^{3+} . Les plaques cromatogràfiques es van desenvolupar en diferents fases mòbils per tal de canviar la posició relativa de les bandes. D'aquesta manera, es va seguir la posició de les bandes d'inhibició i els revelats (veure la Figura 2.9), assignant els revelats i les bandes d'inhibició als metabòlits esmentats.

A la Taula 2.3 es presenta el resum dels diferents metabòlits identificats per a cada soca així com els resultats dels revelats i de l'antibiograma amb *S. vesicarium* utilitzant com a fase mòbil CHCl_3 : Acetona (2:1). Aquesta va ésser la fase mòbil amb la que millor separació es va aconseguir.

Taula 2.3. Resultats dels revelats de CCP i bioautografia amb *S. vesicarium*. Només s'indiquen les bandes que han estat identificades. Fase mòbil CHCl₃ : Acetona (3:1).

Table 2.3. Results of developed TLC plates and bioautography with *S. vesicarium*. Only identified bands are shown. Solvent CHCl₃ : Acetone (3:1).

Soca	Metabòlit	FeCl ₃ ⁽¹⁾	Vainillina		DSA		Bioassaig d'nhibició
			Rf	Color	Rf	Color	Rf
EPS317	DAPG	+	0,43	Teula	0,43	Taronja	0,5
	MAPG	+	-	-	0,15	Groc	-(²)
EPS808	DAPG	+	0,45	Teula	0,45	Taronja	0,5
	MAPG	+	-	-	0,17	Groc	-
CHA0	DAPG	+	0,43	Teula	0,43	Taronja	0,5
	MAPG	+	-	-	0,15	Groc	-
	Prn	-	0,7	Violeta	-	-	-
	Plt ⁽³⁾	+	-	-	0,35	Teula	0,3
Q2-87	DAPG	+	0,45	Teula	0,45	Taronja	0,4
	MAPG	+	-	-	0,15	Groc	-
Patró	DAPG	+	0,44	Teula	0,44	Taronja	0,45
	MAPG	+	-	-	0,14	Groc	0,14
EPS263	PCA	-	-	-	-(¹)	-	0,3
	Prn ⁽⁴⁾	-	0,80	Violeta	-	-	nd
Pf 2-79	PCA	-	-	-(¹)	-	-	0,35
BL915	Prn	-	0,65	Violeta	-	-	0,65
	AR	-	0,70	Marró	0,70	Teula	0,72
	Prn ⁽⁴⁾	-	0,80	Violeta	nd	nd	nd
EPS894	PCA ⁽⁴⁾	-	-	-	-	-	0,35
EPS895	PCA ⁽⁴⁾	-	-	-	-	-	0,35
EPS945	PCA ⁽⁴⁾	-	-	-	-	-	0,35

(1) +/- es revela/no es revela; (2) - no inhibició; (3) crescuda en agar KB; (4) Desenvolupament en CHCl₃ : Àcid acètic (95:5); nd: no determinat. AR: alquil resorcinol.

(1) +/- - developes/ do not developes (2) no inhibition; (3) grown on KB agar; (4) Solvent CHCl₃ : Acetic acid (95:5); nd. not assayed. AR: alkyl resorcinol.

En els revelats va observar-se una bona concordança entre les diferents tècniques utilitzades que va permetre la localització dels metabòlits estudiats.

En la bioautografia es va observar que el DAPG inhibia la germinació de *S. vesicarium* mentre que no es va observar inhibició pel MAPG produït possiblement per la poca producció en les condicions assajades.

Cal remarcar que en l'assaig d'inhibició per PCA de la Taula 2.3, l'halo correspon al producte purificat i no a l'extracte orgànic com en el cas de DAPG o de la Prn.

A la Figura 2.3 es mostren les plaques de CCP dels extractes orgànics de les soques EPS317, CHA0 i Q2-87 crescudes en agar KB. Aquestes plaques van desenvolupar-se en dues fases mòbils per obtenir diferents separacions de les substàncies presents. Va observar-se que la soca CHA0 no produïa ni DAPG ni MAPG en agar KB, mentre que sí van produir-ne les soques EPS317 i Q2-87. La soca CHA0 està descrit que en KB produeix pioluteorina que es revela amb DSA, de manera que es va suposar que la banda revelada a Rf 0,35 amb la fase mòbil CHCl_3 :Acetona (2:1) i a Rf 0,1 en Hexà:Acetona (3:1) corresponia a aquesta substància.

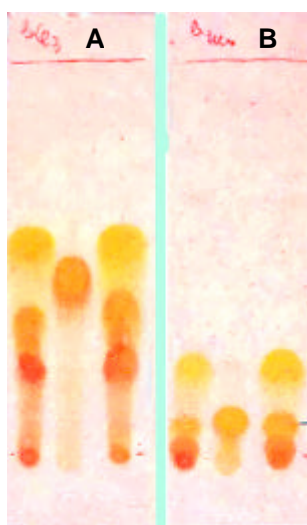


Figura 2.3. CCP de l'extracte orgànic de les soques EPS317, CHA0 i Q2-87 (d'esquerra a dreta) crescudes en agar KB, i polvoritzades amb DSA. **A:** CHCl_3 :acetona (2:1) i **B:** Hexà:acetona (3:1).

Figure 2.3. TLC of organic extract from strains EPS317, CHA0 and Q2-87 (from left to right) grown on KB agar, and sprayed with DSA. **A:** CHCl_3 :acetone (2:1) and **B:** Hexane:acetone (3:1).

2.4.2 Bioassaigs en medi líquid

Es van fer assaigs d'inhibició de la germinació de conidis de *S. vesicarium* en caldo LB amb les soques EPS288, EPS375, JBR 1-70 i PS15, observant-se que els extractes crus i les dilucions del brou a la meitat inhibien totalment la germinació dels conidis en totes les soques, mentre que a la dilució a la tercera part la inhibició ja no era total. En els brous sotmesos a tractament per temperatura el comportament observat era anàleg.

A la Taula 2.4 es presenten els resultats d'inhibició de la germinació dels brous diluïts a la tercera part.

Taula 2.4. Inhibició *in vitro* de la germinació de conidis de *S. vesicarium* (%) per la dilució 1/3 del sobrenedant de medi LB on havien crescut els bacteris. Tractaments de calor per diferents temps.

Table 2.4. Percentage of *in vitro* inhibition of *S. vesicarium* conidia by 1/3 diluted filtrates of LB broth where the strains had grown. Hot treatments at different sampling time.

Soca	ST	Temperatura (°C)			
		50		90	
		20 min	40 min	20 min	40 min
EPS288	100	25	25	10	10
EPS375	85	15	15	5	5
JBR 1-70	40	25	20	15	10
PS15	45	20	15	15	5

ST: Sense tractament tèrmic; Without hot treatment.

El brou on havia crescut la soca EPS288 és el que va mostrar una major inhibició de la germinació dels conidis. També els brous de la soca EPS375 mostraren una elevada inhibició de la germinació dels conidis, mentre que els brous de les soques JBR 1-70 i PS15 van mostrar menys capacitat d'inhibició.

La inhibició de la germinació dels conidis va disminuir per l'exposició dels filtrats a temperatures elevades independentment de la soca. Els filtrats de les soques EPS288 i EPS375 van ser els que van mostrar una disminució més gran per exposició a la temperatura, mentre que en els filtrats de les soques JBR 1-70 i PS15 la disminució va ésser menor.

2.4.3 Detecció, producció, aïllament i identificació de metabòlits secundaris en soques productores

Una vegada identificades les soques de la col·lecció EPS que tenien els gens corresponents per la producció dels antibiòtics DAPG, PCA i Prn (Badosa, 2001), es va procedir a la confirmació de la seva producció a nivell bioquímic.

2.4.3.1 Detecció i identificació de la producció d'HCN

En aquest apartat s'avaluen les diferents tècniques utilitzades per a la detecció i identificació d'HCN i es mostren els resultats de la seva aplicació en l'estudi de diverses soques de la col·lecció EPS.

2.4.3.1.1 Assaigs de detecció i identificació de l'HCN

Assaig del picrat alcalí

En primer lloc es van estudiar les possibles interferències d'altres substàncies volàtils com NH_3 i H_2S , observant-se que a elevades concentracions no interferien en el canvi de color de la tira de picrat. Es va realitzar un control positiu amb una solució de KCN de 1 ppm a la que es va afegir H_2SO_4 comprovant el viratge a vermell teula.

La prova del picrat alcalí es va realitzar a totes les soques de la col·lecció EPS considerant com a positives aquelles en les quals la tira de picrat canviava dels color groc inicial a color vermell teula en els tres replicats i com a dubtoses quan el canvi era feble o no s'observava en algun dels replicats.

A les soques que van donar positiu en aquesta prova i que eren d'interès com a agents de biocontrol se'ls va fer la prova normalitzada d'assaig al toc.

Prova d'assaig al toc

La prova de l'assaig al toc va permetre la confirmació de la producció de HCN per les soques que havien donat positiu o dubtós en la prova del picrat.

Amb aquest mètode el límit de detecció va ésser de $0,1 \mu\text{g HCN/mL}$ en una solució transparent i de $0,5 \mu\text{g HCN/mL}$ en brou LB (veure la Figura 2.4). Es va comprovar que la glicina no interferia en el desenvolupament del color. Aquest aminoàcid està descrit com a precursor immediat del HCN, i com a producte del metabolisme dels bacteris i també podia estar present en alguns dels brous formulats amb hidrolitzats proteïcs.

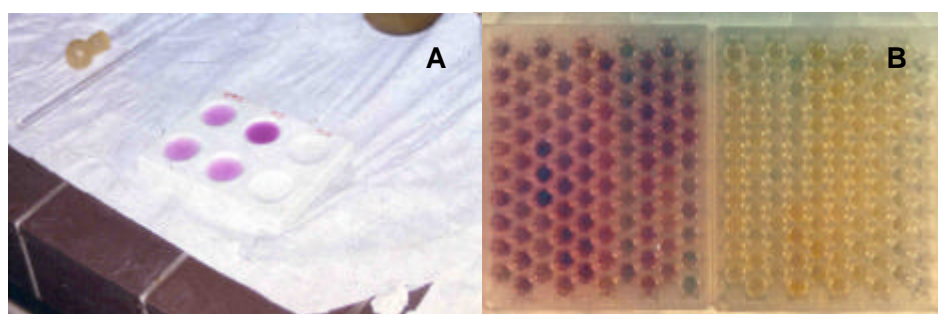


Figura 2.4. Assaig al toc per la detecció d'HCN en la solució absorbidora (A) i en microplaca de la soca EPS288 productora -esquerra- i de la EPS375 no productora -dreta- (B)

Figura 2.4. Spot test for HCN detection with basic absorption solution (A) and microplate of EPS288 strain, produces HCN -left-, and EPS375 which doesn't produce HCN -right- (B).

Espectroscòpia d'infraroig

En aquesta tècnica, el límit de detecció utilitzant una solució bàsica de KCN es va situar en $1 \mu\text{g HCN/mL}$ de solució. Va comprovar-se també que la glicina no interferia en l'espectre de l'HCN.

Per confirmar que una soca era productora d'HCN es realitzaren dues proves amb espectroscòpia d'IR. D'una banda, l'espectre d'IR del gas que hi ha en l'espai lliure de l'erlemeyer on havia crescut la soca EPS288 o la CHA0, que va mostrar el pic d'absorció característic de l'HCN gas a 712 cm^{-1} en ambdues soques (veure la Figura 2.5), i d'altra banda, també va observar-se el pic característic de l'HCN en fer la determinació espectroscòpica del gas obtingut després d'acidificar la solució alcalina on s'havia bombollejat el gas procedent dels cultius de les soques anteriors.

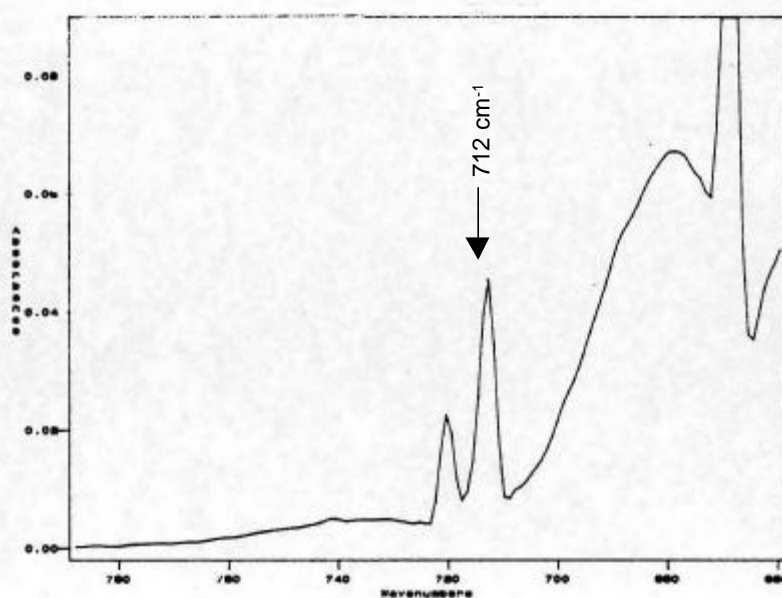


Figura 2.5. Espectre d'infraroig de la fase vapor d'un cultiu de la soca EPS288. El pic de 712 cm^{-1} correspon a HCN.

Figure 2.5. Infrared spectra of the free space of a strain EPS288 culture. The band at 712 cm^{-1} belongs to HCN.

Blau de Prússia

Aquesta prova es va realitzar amb les solucions absorbidores alcalines obtingudes de bombollejar l'aire que es feia circular per dins de cultius de les soques productores.

L'assaig es va fer amb les soques EPS288 i CHA0, crescudes en brou LB. El color blau característic va aparèixer en afegir cations Fe^{2+}/Fe^{3+} a les solucions alcalines de les soques esmentades.

En aquesta prova va verificar-se que la quantitat mínima d'HCN detectable era de 10 μg HCN/mL. També es va comprovar que la glicina no interferia en el desenvolupament del color.

2.4.3.1.2 Producció d'HCN en les soques de la col·lecció EPS

La producció d'HCN per les soques de la col·lecció EPS va avaluar-se mitjançant la prova del picrat alcalí. A les soques que van donar resultats dubtosos i a algunes de les positives se'ls va fer la prova de l'assaig al toc, i en tots els casos que havien donat positiu o dubtós a la prova del picrat, van donar positiu en l'assaig al toc.

Va confirmar-se que la producció d'HCN és característica *P. fluorescens*, ja que només va detectar-se producció en soques d'aquesta espècie, mentre que no es va detectar producció en cap dels aïllats de *Erwinia herbicola*. Així, el 37% de les soques de la col·lecció EPS eren productores d'HCN.

A la Taula 2.5 es resumeix la distribució de soques de *P. fluorescens* de la col·lecció EPS que van donar positiva la prova del picrat alcalí (Annex A). Es fa esment del biovar al qual pertanyen segons el criteri de Palleroni, així com de la planta i de l'òrgan on van ser aïllades (Bonaterra, 1997).

Taula 2.5. Resum de les soques de la col·lecció EPS productores de HCN, fent referència al biovar i al seu origen (planta i òrgan).

Table 2.5. Summary of EPS collection strains that produce HCN. Biovar and isolation origin (plant and organ) are collected.

Biovar	Total aïllats	Produeixen HCN	Origen					
			Planta			Òrgan		
			<i>Fabaceae</i>	<i>Rosaceae</i>	Altres	Arrel	Fulla	Borró
I	54	2	0	2	0	1	0	0
II-IV	2	1	0	0	1	1	0	0
III	14	2	2	0	0	2	0	0
V	146	75	27	20	28	68	2	6

Les soques del biovar V agrupen el 95% del total d'aïllats que produeixen HCN de la col·lecció EPS. Entre els òrgans d'origen, el 90% de les soques productores d'HCN

procedeixen de l'arrel (rizosfera), mentre que la resta dels aïllats són de la part aèria i procedeixen tant de fulla com de borrons (filosfera) i són minoritaris entre els productors d'HCN.

La producció d'HCN també es va confirmar en les soques de referència cedides per altres investigadors que, llevat de les soques SBW25 i Pf2-79, la resta són productores (veure la Taula 2.1).

2.4.3.2 Detecció i identificació del 2,4-diacetilfloroglucinol

En l'anàlisi de PCR per a la detecció del gen *phlD*, es va trobar que les soques EPS317, EPS808 tenien una banda coincident amb el fragment amplificat en les soques control CHA0 i Q2-87 productores de DAPG.

Per a l'extracció, aïllament i identificació de DAPG es van escollir les soques *P. fluorescens* Q2-87 i la EPS317, crescudes en agar KB i en agar YM. Per CCP desenvolupada amb diferents dissolvents i revelada amb DSA es va comprovar que en l'extracte orgànic del medi on havien crescut les soques hi havia una banda de color groc-taronja coincident amb la obtinguda pel DAPG patró utilitzat com a referència (veure la Taula 2.6). Es va comprovar que en funció de la fase mòbil utilitzada canviava l'Rf de les bandes de l'extracte orgànic de les soques i del patró de DAPG.

Taula 2.6. Valor de Rf de les bandes dels extractes orgànics de les soques EPS317 i Q2-87 i del patró DAPG en el revelat amb DSA.

Table 2.6. Rf value of bands developed with DSA from organic extracts of EPS317 and Q2-87 strains that were coincidental with DAPG standard.

Fase mòbil	Soca				DAPG pur
	EPS 317		Q2-87		
	KB	YM	KB	YM	
Hexà : Acetona (3:1)	0,2	0,24	0,24	0,23	0,22
Cloroform : Acetona (2:1)	0,56	0,57	0,53	0,54	0,55

Per tal d'identificar el DAPG es va realitzar una CLCF de l'extracte orgànic de la soca Q2-87 utilitzant una barreja de CHCl₃:Acetona (2:1) com a fase mòbil. Una de les fraccions aïllades va ésser analitzada per RMN i mostrà un espectre idèntic al del DAPG patró obtingut per síntesi química (veure la Figura 2.6C).

A la Figura 2.6 es mostren els espectres de RMN i IR del DAPG obtingut per síntesi química i de les soques de referència i de la col·lecció EPS. L'espectre de H¹-RMN tant

de la fracció aïllada com del patró presentaren els següents pics: a 2,74 ppm (6H, singlet (s)) corresponent a H metílics; a 5,83 ppm (1H, s) corresponent a H aromàtic; i el de 16,12 ppm (1H, s) corresponent a H fenòlic, molt àcid i que s'intercanvia parcialment amb el dissolvent. L'espectre UV-VIS en CHCl_3 va mostrar les bandes d'absorció a 331 i 272 nm. Per IR es va observar una banda intensa a 1642 cm^{-1} corresponent al grup carbonil i a doble enllaç, i unes bandes a 3500 cm^{-1} corresponents al grup -O-H molt associat (veure la Figura 2.6B).

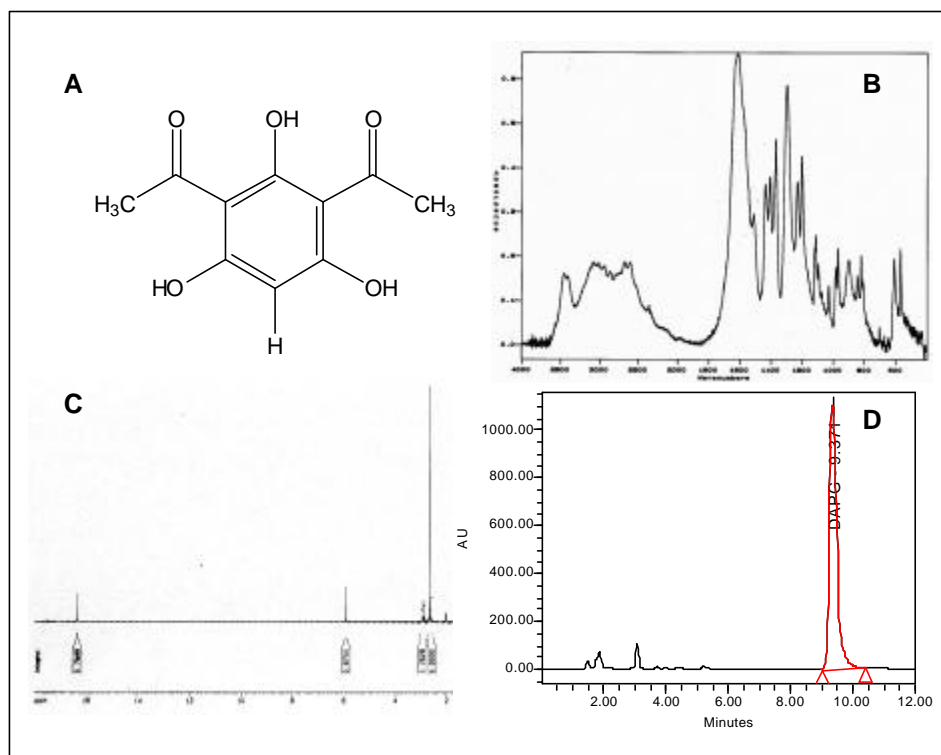


Figura 2.6. Caracterització del 2,4-diacetilfloroglucinol. (A) molècula de DAPG, (B) espectre d'IR, (C) espectre de ^1H -RMN i (D) cromatograma de CLAR de l'extracte orgànic de la soca EPS317.

Figure 2.6. 2,4-diacetylphloroglucinol characterization. (A) DAPG molecule, (B) IR spectrum, (C) ^1H -RMN spectrum (D) HPLC chromatogram of organic extract of EPS317 strain.

Aquest mateix procés es va realitzar per les soques EPS317 i EPS808 aïllant una fracció que per CLAR es va observar que corresponia a DAPG, comprovant que efectivament ambdues soques produeixen DAPG en diversos medis. Per CLAR amb seguiment a 270 nm el DAPG es va detectar als 9,37 min separat d'altres substàncies (veure la Figura 2.6D).

A la Taula 2.7 se sintetitzen els resultats de la caracterització de les soques utilitzades en aquest treball de les quals es va demostrar la producció de DAPG. Quan no hi havia banda de PCR del gen *phlD* tampoc es va observar la producció de DAPG. Es va comprovar també la inhibició de les soques vers els fongs indicadors *S. vesicarium* i *P. expansum* en medi PDA. La prova de producció de fluorescència i del pigment marró en medi KB va realitzar-se a les soques de referència, a les del socari EPS que havien donat positiva la prova de la PCR i a algunes de les que l'havien donat negativa.

Taula 2.7. Caracterització i confirmació de la producció de DAPG i inhibició dels fongs patògens indicadors en soques *P. fluorescens* de referència i de la col·lecció EPS.

Table 2.7. Tests for confirming DAPG production and inhibition of fungal pathogens by *P. fluorescens* strains used as reference and from EPS collection

Soca	Fluorescència	Pigment vermell	Banda PCR	DAPG	Inhibició <i>S. vesicarium</i>	Inhibició <i>P. expansum</i>
CHA0 (c)	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No
Q2-87 (c)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
EPS263	Sí	No	No	No	nd	nd
EPS317	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
EPS375	Sí	No	No	nd	Sí	No
EPS808	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
JBR 1-70	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
JBR 12-84	Sí	Sí	Sí	nd	Sí/No	Sí/No
BL915	Sí	No	No	nd	nd	nd
PS15	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
PS31	Sí	Sí	Sí	nd	Sí/No	Sí/No
Pf 2-79	Sí	No	No	nd	nd	nd
SBW25	Sí	No	No	No	No	No

(c) Control, nd: no determinat / not tested.

Totes les soques van produir pigments fluorescents en medi KB, però la síntesi del pigment marró típic de les que produeixen DAPG només es va observar en les que van mostrar amplificació de la banda corresponent al gen *phlD* per PCR. Aquestes soques van produir DAPG en medi NBY. No va observar-se una correlació clara entre la producció de DAPG i l'antagonisme *in vitro*.

2.4.3.3 Detecció i identificació de l'àcid fenazina-1-carboxílic

La producció de PCA es va comprovar amb la soca Pf 2-79 en medi líquid KB i es va obtenir una substància en forma de pols groga de la qual es va elucidar la seva estructura mitjançant ^1H -RMN, IR (veure la Figura 2.7) i el seu espectre d'UV-VIS.

L'espectre de RMN va presentar pics a 9,01 ppm (1H, doble d) corresponent a H_e; a 8,6 ppm (1H, doble d) corresponent a H_g; a 8,3 ppm (2H, complexa) corresponent als H_d i H_a; a 8,1 ppm (1H, s) corresponent a H_f, i a 8,05 ppm (2H, complexa) corresponent als H_b i H_c. L'espectre d'IR va presentar bandes d'absorció intensa a 1740 cm⁻¹ corresponent al grup C=O de l'àcid i una ampla entre 2900 i 2500 cm⁻¹ (Figura 2.7B). L'espectre de UV-VIS en CHCl₃ tenia màxims d'absorció a 251 nm (intens) i 370 nm (ample) i en la fase mòbil utilitzada per CLAR va mostrar màxims a 248 nm i a 370 nm (no es mostren). Aquesta substància es va identificar com a PCA i es va utilitzar com a patró de referència.

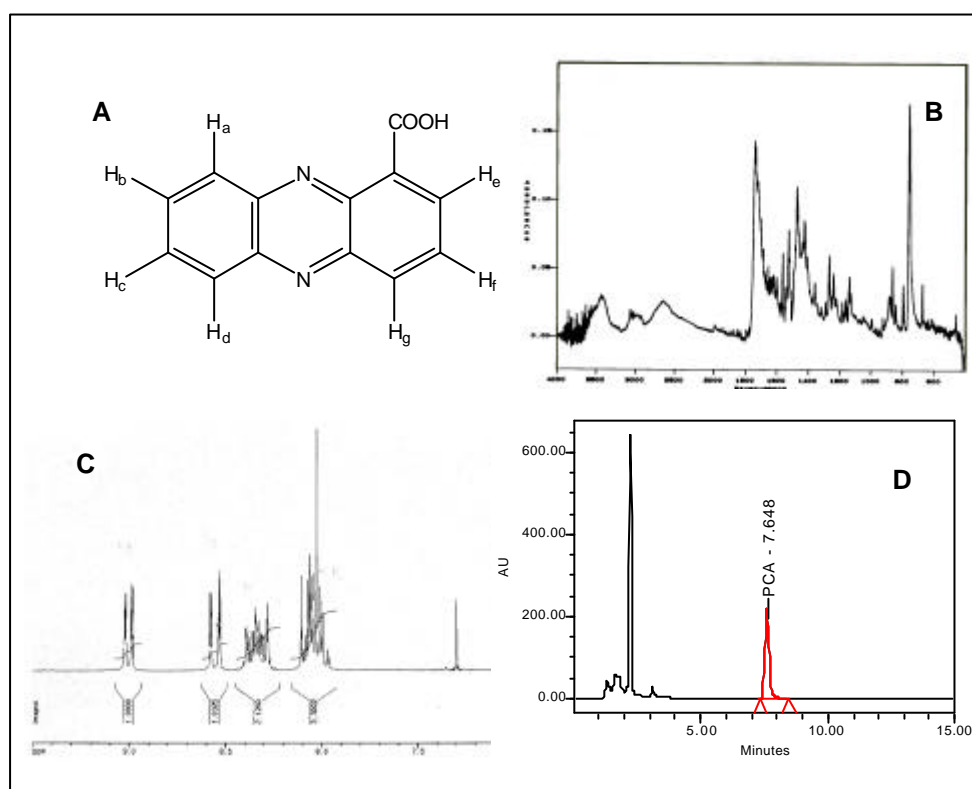


Figura 2.7. Caracterització de l'àcid fenazina-1-carboxílic. (A) molècula de PCA, (B) espectre d'IR, (C) espectre de H¹-RMN i (D) cromatograma de CLAR de l'extracte orgànic d e la soca EPS263.

Figure 2.7. Phenazine-1-carboxylic acid characterization. (A) PCA molecule, (B) IR spectrum, (C) H¹-RMN spectrum, (D) HPLC chromatogram of organic extract of EPS263 strain.

Mitjançant PCR s'havia observat que la soca EPS263 presentava una banda coincident amb la soca de referència Pf 279. La soca EPS263 es va cultivar en els medis KB, NBY, LB+Glucosa i YM i fent l'extracció descrita (veure la Figura 2.1) es va

aïllar una substància sòlida en forma de pols groga. Aquesta substància era idèntica per RMN, IR i CLAR al PCA produït per la soca Pf 2-79.

Va demostrar-se també la producció de PCA per les soques EPS894, EPS895 i EPS945 obtingudes en aïllaments posteriors que presentaven una banda de PCR coincident amb les soques Pf 2-79 i EPS263. Per la determinació de la producció de PCA en aquestes soques es van cultivar en els medis KB, NBY, LB+Glucosa i YM. L'extracte orgànic es va injectar en CLAR i es va observar que, en tots els casos, en el seguiment a 254 nm hi havia un pic a 7,6 min, l'espectre del qual coincidia amb el del PCA patró i de la soca *P. fluorescens* 2-79 que sortien al mateix temps (veure la Figura 2.7D).

2.4.3.4 Detecció i identificació de la pirrolnitrina

L'extracte orgànic de la soca BL915 crescuda en brou LB es va fraccionar mitjançant CLFC i es van obtenir dues fraccions.

Una primera fracció, amb una substància que revelada amb vainillina donava color marró i color teula revelant amb DSA (veure la Taula 2.3 i la Figura 2.9B). En l'anàlisi per ^1H -RMN d'aquesta fracció amb CD_3OD s'observaren els pics a 6,32 ppm (2H, s) corresponents als H_4 i H_6 ; a 2,7 ppm (multiplet) corresponent a metilens adjacents a l'anell aromàtic; a 1,6 ppm (multiplet) corresponents a metilens olefínics i a 1,1 ppm (multiplet) corresponents a metils terminals, i es va identificar com a alquil resorcinol (veure la Figura 2.8A).

Una segona fracció, contenia una barreja d'alquilresorcinol anterior i una altra substància que es va identificar com a Prn (veure la Figura 2.8B). Aquesta substància va mostrar una mobilitat en CCP menor que es va revelar de color lila amb vainillina (veure la Taula 2.3 i la Figura 2.9B) i l'anàlisi per ^1H -RMN (no es mostra) -eliminant els pics de l'alquilresorcinol- va presentar els pics a 7,72 ppm (3H, s) corresponents als H_4 , H_5 i H_6 ; a 7,03 ppm (1H, d) corresponent a H_2 i a 6,94 ppm (1H, d) corresponent a H_3 (veure la Figura 2.8B).

Per CCP dels extractes orgànics dels medis KB, NBY, LB i LB+1% glucosa on havien crescut les soques EPS263 i CHA0 es va observar que produïen una substància que migrava conjuntament amb la Prn de la soca BL915 (veure la Figura 2.9A) i que

revelada amb vainillina donava també coloració violeta. Aquestes soques s'han considerat també com a productores de Prn.

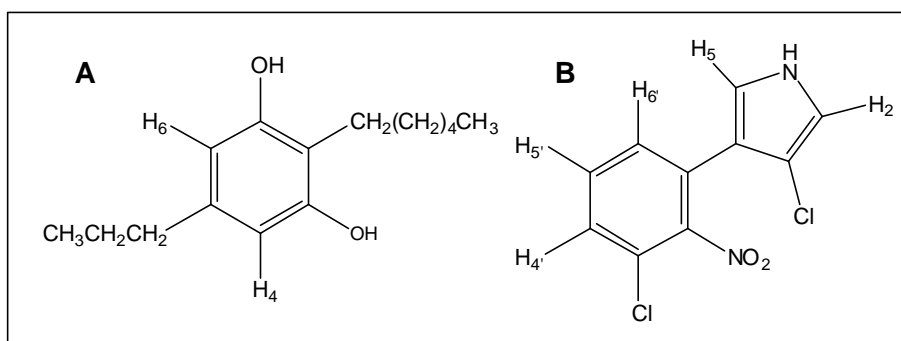


Figura 2.8. Estructura del 2-hexil-5-propilresorcinol (A) i de la pirrolnitrina (B) produïts per *P. fluorescens* BL915

Figure 2.8. Structure of 2-hexyl-5-propylresorcinol (A) and pyrrolnitrin (B) produced by *P. fluorescens* BL915.

En la bioautografia es va observar que la banda corresponent a la Prn inhibia a *S. vesicarium* i que per sobre hi havia una lleugera inhibició, possiblement corresponent a l'alquil resorcinol (veure la Taula 2.3 i la Figura 2.9C).

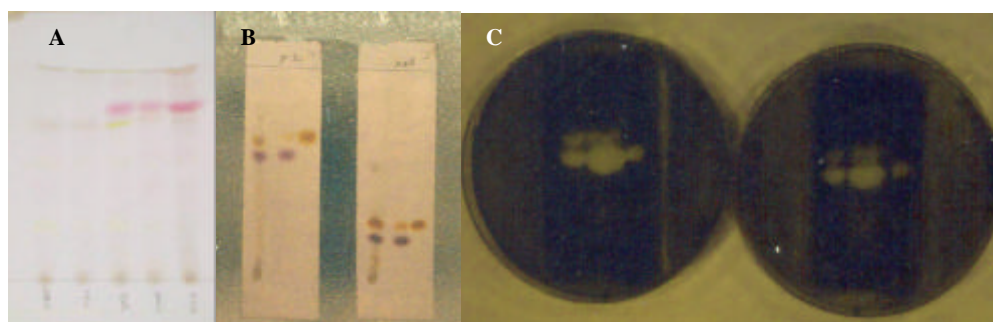


Figura 2.9. Detecció de la Prn per CCP, revelats amb vainillina (taques lila). **(A)** CCP d'extractes de les soques SBW25, EPS317, EPS263, CHA0 i BL915 (d'esquerra a dreta) fase mòbil CHCl_3 :Ac. acètic (95:5). **(B)** CCP d'extracte cru i de fraccions de l'extracte orgànic de BL915 desenvolupades amb CHCl_3 :Acetona (2:1) -esquerra- i amb Hexà:Acetona (3:1) -dreta-. **(C)** Bioautografia de la placa anterior (B) desenvolupada amb CHCl_3 :Acetona (2:1).

Figure 2.9. Detection of Prn with TLC tests, sprayed with vanillin (violet spots). **(A)** TLC of crude organic extracts of strains (from left to right) SBW25, EPS317, EPS263, CHA0 i BL915, developed with CHCl_3 : Acetic acid (95:5). **(B)** TLC of crude and fractionated organic extract of BL915 developed with CHCl_3 :Acetone (2:1) and Hexane:Acetone (3:1). **(C)** Bioautography of TLC plates from figure B developed with CHCl_3 :Acetone (2:1).

2.5 Discussió

Entre les soques candidates a agents de biocontrol vers l'estemfiliosi de la perera, EPS375 era la que seguia a la EPS288 quant a capacitat antagonista en els assaigs *in vitro* i en fulla (Montesinos i col., 1996; Bonaterra, 1997). Aquesta soca és un aïllat de la part aèria, de borró de perera i pertany al biovar V, fa halus d'inhibició en bioassaigs en placa amb el fong *S. vesicarium* com a indicador, en els medis GA, GA+Fe i LB i amb el fong *Penicillium spp.* com a indicador, mostra antagonisme en els medis PDA i GA (Bonaterra, 1997).

En el present treball s'ha comprovat que la soca EPS375 també va mostrar antagonisme en placa vers aquests patògens en LB i LB+Glucosa i en extracte de malta, mentre que en PDA els resultats no van coincidir amb els obtinguts per Bonaterra (1997). En els resultats de les proves d'antagonisme dels filtrats del cultiu es va observar que hi havia inhibició de la germinació de conidis de *S. vesicarium* i que la inhibició disminuïa amb la temperatura. Un sistema anàleg a aquest també l'havien utilitzat Gutterson i col. (1986) per la cerca d'antibiòtics excretats al medi de cultiu.

Aquests resultats van orientar que l'estudi del mecanisme d'actuació de la soca EPS375 es dirigís cap a la cerca de substàncies excretades al medi com a responsables de l'antagonisme, havent comprovat que aquesta soca no era productora de HCN. En els brous en els quals s'havia observat antagonisme es van fer extraccions amb solvents orgànics tant en presència com en absència de cèl·lules i a diferents pH i no es va trobar activitat antagonista en cap dels extractes orgànics. A més, per aquesta soca no es va trobar cap dels gens per la síntesi dels antibiòtics estudiats.

La substància responsable de la inhibició *in vitro* de la soca EPS375 difon en agar però no és extraïble amb solvents orgànics o no es detecta la seva activitat. Amb aquestes dades es creu que la substància responsable de l'antagonisme pot ser un pèptid, substància que romandria en la fase aquosa no estudiada, o també enzims hidrolítics tipus quitinases o glucanases. Recentment, Yoshida i col. (2001) han aïllat un pèptid amb activitat antibiòtica a partir d'onze litres de brou i amb un procés d'extracció completament diferent a l'emprat en el nostre treball, la qual cosa explicaria la manca de resultats en l'extracció de substàncies responsables de l'activitat observada en els brous.

En l'antagonisme *in vitro* de les soques de la col·lecció EPS eren les que van mostrar un major antagonisme vers *S. vesicarium* independentment del medi. La justificació seria que aquestes soques havien estat seleccionades, en part, com a candidates a antagonistes vers aquest patogen. Addicionalment, les soques JMP 12-84 i JBR 1-70 també van mostrar antagonisme independent del medi utilitzat.

Totes les soques assajades, llevat de la EPS375, que com ja s'ha comentat es desconeixen els metabòlits implicats en l'antagonisme, produeixen més d'un metabòlit amb activitat antibiòtica. Es coneix que el medi de cultiu condiciona els metabòlits que se sintetitzen preferentment i la quantitat que se'n produeix (James i Gutterson, 1986). Això explica que l'antagonisme sigui dependent del medi i llavors la variabilitat en l'antagonisme de *P. expansum* s'explicaria per ser més sensible a unes substàncies que a les altres.

La inhibició de la germinació dels conidis pels brous frescos i tractats tèrmicament és deguda a alguna substància excretada al medi. La soca EPS288, produeix HCN, i l'exposició a temperatures elevades podia haver provocat una disminució de la concentració amb la conseqüent disminució d'activitat inhibidora.

Es desconeix quins metabòlits actius produeix la soca EPS375, s'ha comprovat que no produeix HCN, DAPG, Prn, ni PCA. Els brous en els quals havia crescut aquesta soca tenien una elevada activitat inhibidora de la germinació dels conidis que va disminuir clarament després d'escalfar-los. Aquests resultats serien consistents amb la producció d'una substància d'origen peptídica que sigués termolàbil. Però aquesta especulació queda subjecte a posteriors investigacions. Finalment, l'antagonisme observat en PS15 i JBR 1-70 no podria atribuir-se a la producció de DAPG perquè aquestes soques difereixen molt en la quantitat de DAPG que produeixen. En LB la soca PS15 no en produeix però la soca JBR 1-70 té una producció de 150 ppm, i van diferenciar-se poc en els resultats d'inhibició. I s'havia observat en les bioautografies que el DAPG inhibia a *S. vesicarium*. D'altra banda, ambdues soques produeixen HCN. Per això es pot pensar que possiblement sigui aquest el responsable de la inhibició de la germinació dels conidis en els brous.

En la cerca de soques productores de HCN, la prova del picrat alcalí va permetre d'una manera relativament ràpida identificar les soques productores de HCN a la col·lecció EPS. A algunes de les soques positives i a les dubtoses se'ls va realitzar l'assaig al toc i es va confirmar la producció de HCN. Per espectroscòpia d'infraroig (IR)

es va poder confirmar la producció de HCN en algunes de les soques positives, observant que aquesta tècnica tenia bona sensibilitat (1 ppm HCN), però la seva laboriositat no va permetre tractar un nombre elevat de mostres. La prova del Blau de Prússia va mostrar una baixa sensibilitat (10 ppm HCN) que, juntament amb la seva laboriositat fa que aquesta prova tampoc sigui una bona opció per la confirmació de la producció de HCN en un nombre elevat de mostres.

D'altra banda, la prova normalitzada d'assaig al toc va mostrar una elevada sensibilitat, 0,1 ppm de HCN a la solució absorbidora, i 0,5 ppm de HCN en el brou i aquesta prova sí que permet el tractament d'una gran quantitat de mostres. Aquesta no és una metodologia nova sinó que ja Bakker i Schippers (1987) havien utilitzat una prova colorimètrica similar per identificar la producció de HCN per la soca WCS361.

Per tant, la utilització de la prova del picrat alcalí en combinació amb la prova de l'assaig al toc, quan els resultats de la primera són dubtosos, és una bona estratègia en la cerca de soques productores de HCN.

Aquesta fou la metodologia usada per investigar la producció de HCN a les soques de la col·lecció EPS. Entre aquestes hi havia les 25 soques candidates a agents de biocontrol, escollides en la selecció realitzada pel biocontrol de la estemfiliosi de la perera produïda pel fong *S. vesicarium* (Bonaterra, 1997).

Del total de les soques de la col·lecció EPS, es va observar que el 37% eren cianogèniques, el 90% de les quals eren aïllades de l'arrel. Únicament els aïllats del gènere *Pseudomonas* van produir HCN, i cap de les pertanyents a *Erwinia herbicola* va produir-ne. Aquests resultats concorden amb treballs previs (Castric, 1975; Knowles, 1976; Rodgers i Knowles, 1978), en el sentit que només s'ha detectat producció de HCN en bacteris del gènere *Pseudomonas* i *Chromobacterium*. També Bakker i Schippers (1987) havien trobat que més del 50% de *Pseudomonas* aïllades d'arrel de patatera eren productores de HCN, i que el percentatge disminuïa al 5% de productors del total d'aïllats de l'arrel.

En alguns ambients la incidència de soques cianogèniques és menor, com el cas d'aigües de riu on només 5 de 100 soques de *P. fluorescens* i un 1% de *P. aeruginosa* eren cianogèniques (Askeland i Morrison, 1983). En altres, la incidència és superior, donant-se el cas del 67% d'aïllats cianogènics de *P. aeruginosa* procedents de ferides humanes (Castric, 1975).

Entre les 25 soques seleccionades com a candidates a agents de biocontrol contra *S. vesicarium* (Bonaterra, 1997) només es va confirmar la producció de HCN a dues: la EPS288, seleccionada com a possible agent de biocontrol, i la EPS210. La majoria de les altres soques de la col·lecció productores de HCN, inhibeixen *in vitro* un o més dels fitopatògens assajats però no s'havien seleccionat com a candidates. Aquestes soques productores de HCN, havien mostrat antagonisme majoritàriament vers els bacteris *Erwinia amylovora*, causant del "foc bacterià", i *Pseudomonas syringae*, causant de la necrosi dels borrons de flor de la perera (Bonaterra, 1997).

D'altra banda i continuant amb la cerca de soques productores de metabolits secundaris, disposar de soques referenciades com a agents de biocontrol contra diverses malalties i productores de metabolits secundaris, i la utilització de tècniques moleculars va permetre realitzar la cerca de soques de la col·lecció EPS portadores del gens per la síntesi de DAPG, PCA i Prn (Badosa, 2001). En aquest treball, s'ha confirmat que les soques seleccionades per PCR (Badosa, 2001) com a portadores de diversos gens eren productores dels antibiòtics corresponents. Així, es va confirmar que la soca EPS263 era productora de PCA i de Prn, les soques EPS317 i EPS808 eren productores de DAPG, i finalment les soques EPS894, EPS895 i EPS945 eren productores de PCA.

Els metabolits DAPG, MAPG i PCA es van poder aïllar dels extractes de soques de referència i de soques del socari EPS i es van identificar en base als seus espectres de H^1 -RMN, IR i UV-VIS.

Els espectres de H^1 -RMN, UV-VIS i IR del DAPG obtingut per síntesi química o aïllat de les soques EPS317 i EPS808 eren idèntics als obtinguts per Shanahan i col. (1992b) i per Keel i col (1992), amb la qual cosa es confirma la seva producció per aquestes soques.

L'espectre de UV-VIS en $CHCl_3$ del PCA va coincidir amb els obtinguts per diversos autors (Chang i Blackwood, 1969; Gurusiddahiah i col., 1986; Brisbane i col., 1987; Pierson III i Thomashow, 1992). L'espectre de UV-VIS obtingut en la fase mòbil utilitzada per CLAR va presentar els pics de màxima absorció a 248 nm i 370 nm, i aquests coincideixen amb els obtinguts per Mavrodi i col. (1998). Podem concloure, doncs, que la substància aïllada de la soca EPS263 és PCA i que les soques EPS894, EPS895 i EPS945 també produeixen PCA.

La Prn no es va poder obtenir purificada però es va identificar la seva producció en base als espectres de H^1 -RMN i revelats colorimètrics en cromatografia de capa prima. En la separació d'extractes orgànics de la soca de referència BL915 (Hammer i col., 1997) amb CLCF no es va poder aïllar cap fracció amb aquest metabòlit purificat sinó que s'el·luïa conjuntament amb el 2-hexil-5-propilresorcinol, que sí es va aïllar i identificar per H^1 -RMN. Aquest es va revelar de color marró amb vainillina com havien observat altres autors amb un alquilresorcinol semblant (Kanda i col., 1975 i Kitahara i Kanda, 1975).

La Prn es va identificar com la banda violeta que migrava a diferents Rf en canviar els solvents. Els Rf i el color del revelat eren coincidents amb els descrits per altres autors (Burkhead i col., 1994; Rosales i col., 1995; Hammer i col., 1997). En els espectres de H^1 -RMN de la fracció corresponent a la barreja, els pics observats eren coincidents amb altres descrits per la Prn (Salcher i col., 1978; Van Pée i col., 1983; Burkhead i col., 1994; El-Banna i Winkelmann, 1998).

Es va demostrar que la soca EPS263 produïa PCA, Prn i sideròfors però no produïa HCN. Aquesta havia estat una de les soques assajades per Bonaterra (1997) com a candidates a agents de biocontrol contra l'estemfiliosi de perera. Com a soques productores de fenazines i Prn s'han descrit *P. aeurofaciens* PGS12 (Georgakopoulos i col., 1994) i *P. cepacia* 5.5B (Cartwright i col., 1995).

Es va comprovar que el DAPG, PCA i la Prn inhibien el creixement *in vitro* dels fongs escollits com a indicadors *S. vesicarium* i *P. expansum*. També es va comprovar que no hi havia correlació clara entre la producció dels metabòlits secundaris amb activitat antagonista i la inhibició dels dos fongs indicadors.

No es va determinar quina era la quantitat de cada un dels metabòlits a partir de la qual s'observava inhibició dels fongs. En el cas del DAPG, en base a la quantitat produïda en els cultius líquids i del volum dipositat en les bioautografies, s'ha calculat que la quantitat a partir de la qual s'observava una inhibició clara de *S. vesicarium* era de l'ordre de 1 µg de DAPG.

La detecció del MAPG amb el revelat amb DSA és més sensible que les proves d'antagonisme que depenen d'una dosi inhibidora mínima. Això explicaria que en l'antibiograma no es va poder detectar a partir dels extractes orgànics i sí en l'obtingut per síntesi química.

Per a la selecció de les soques productores de PCA no es va utilitzar la prova de tinció del medi PDA (Thomashow i Weller, 1988; Pierson III i Thomashow, 1992) perquè durant la seva preparació es va comprovar que l'observació sota llum UV de 365 nm d'un halo fosc al voltant de la colònia productora de PCA estava subjecte a variacions i donava lloc a interpretacions errònies.

Es pot concloure també que les proves de microextracció en fase líquida i posterior aplicació en CLAR (realitzada per DAPG i per PCA) o separació per CCP (realitzada per la Prn) són estratègies que permeten tractar d'una manera ràpida un elevat nombre de mostres i confirmar la producció del metabòlit.

2.6 Conclusions

Com a conclusions d'aquest capítol podem afirmar que:

- La inhibició *in vitro* depèn del patogen i del medi de cultiu, i no hi ha correlació clara entre la inhibició *in vitro* dels fongs indicadors i la producció de substàncies amb activitat antibiòtica per les soques antagonistes.
- Les soques productores de HCN de la col·lecció EPS són *P. fluorescens* i pertanyen majoritàriament al biovar V i estan aïllades majoritàriament de l'arrel de plantes de diferents orígens.
- Les soques EPS317 i EPS808 produeixen 2,4-diacetilfloroglucinol.
- Les soques EPS894, EPS895 i EPS945 són productores d'àcid fenazina-1-carboxílic.
- La soca EPS263 és productora d'àcid fenazina-1-carboxílic i de pirrolnitrina.
- La soca EPS375 no produeix cap dels metabòlits estudiats ni d'extraïbles amb solvents orgànics tot i que els brous on ha crescut inhibeixen la germinació de conidis de *S. vesicarium*.

Capítol 3

Producció d'àcid cianhídric en *P. fluorescens* EPS288

3.1 Introducció

L'àcid cianhídric (HCN) és una de les substàncies produïdes per *Pseudomonas* que estan implicades en processos de control biològic. És volàtil a temperatura ambient (p.ex. 25,7°C), i tòxic pels éssers vius ja que inhibeix molts enzims, bàsicament hemoproteïnes, oxidases o hidrogenases que contenen un metall al centre actiu. La inhibició es produeix a una concentració de l'ordre de 10^{-2} M, però l'enzim més sensible, la citocrom-C oxidasa, s'inhibeix a una concentració de 10^{-4} M (Knowles, 1976), pel fet que l'HCN reacciona amb el Fe(III) inhibint la respiració cel·lular (Mayes, 1995). Aquesta acció té lloc tant en microorganismes com en organismes superiors, com plantes (Laties, 1982; Shippers i col., 1987), tot i que l'HCN no inhibeix el creixement dels propis bacteris productors (Knowles, 1976) ja que utilitzen vies respiratòries insensibles a l'HCN (Castric, 1994; Laville i col., 1998).

Tot i això no és una substància estranya entre els éssers vius, ja que moltes plantes (Seigler, 1975), i fongs en produeixen (Michaels i Corpe, 1965) i també el poden assimilar (Knowles, 1976; Rodgers i Knowles, 1978) o degradar a amoni i àcid fòrmic (Watanabe i col., 1998) o a amoni i CO₂ (Harris i Knowles, 1983; Figueira i col., 1996). En el procés de detoxificació o d'eliminació de l'HCN, sembla que aquest actua com a inductor dels propis enzims que intervenen en la seva degradació (Rodgers i Knowles, 1978).

La producció d'HCN pot conferir a les plantes i microorganismes productors una protecció enfront certs patògens que hi són sensibles (Knowles, 1976; Gewitz i col., 1976; Voisard i col., 1989) però també està relacionada amb la virulència d'alguns patògens (Knowles, 1976). Hi ha però poques espècies de bacteris que en produeixen; només s'ha descrit en *Chromobacterium violaceum*, i en algunes espècies de *Pseudomonas* -*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. polycolor*- (Michaels and Corpe, 1965;

Sneath, 1956, 1966; Castric, 1975; Knowles, 1976; Rodgers i Knowles, 1978). La producció d'HCN per *Pseudomonas* ha aixecat interès pel fet que s'ha observat que és un dels mecanismes implicats en els processos de biocontrol de malalties de plantes per alguns bacteris antagonistes (Bakker i Schippers, 1987; Voisard i col., 1989; Laville i col., 1992; Flaisman i col., 1996). Tot i que en alguns casos l'HCN inhibeix el creixement de plantes dicotiledònies i monocotiledònies, i s'ha estudiat el seu efecte en blat i en patatera (Miller i Conn, 1980; Schippers i col., 1987).

La cianogènesi en un cultiu *in vitro* en *batch* no té lloc durant tot el cicle de creixement sinó que només s'ha observat al final de la fase de creixement exponencial i inici de la fase estacionària (Michaels i Corpe, 1965; Castric, 1975, Rodgers i Knowles, 1978; Castric i col., 1979; Askeland i Morrison, 1983). Aquest comportament és el característic dels metabòlits secundaris. També s'ha observat que prèviament a la cianogènesi hi ha una etapa d'inducció enzimàtica i síntesi proteica (Castric, 1975; Rodgers i Knowles, 1978). S'ha localitzat el complex enzimàtic responsable de la síntesi de l'HCN i s'evidencia que l'HCN sintetasa en *Pseudomonas* és un enzim lligat a membranes (Wissing, 1975, Laville i col., 1998).

No es coneix encara completament quin és el motiu de la posada en funcionament del metabolisme secundari i de la cianogènesi, però es postulen diverses possibilitats. Sembla que permet als bacteris productors eliminar els metabòlits primaris que s'han acumulat dins la cèl·lula i que podrien comprometre la seva futura viabilitat (Castric, 1975; Knowles, 1976; Drew i Demain, 1977; Castric i col., 1981) i, això possibilita un augment del temps de vida de les cèl·lules (Castric, 1975). Segons la hipòtesi proposada per Bu'Lock (Askeland i Morrison, 1983) amb el metabolisme secundari, els bacteris poden mantenir la viabilitat en condicions en que el creixement cel·lular ja no és possible. També se suggereix que la producció d'HCN pot conferir a les soques productores un avantatge ecològic sobre soques patògenes sensibles pel fet d'inhibir-ne el creixement (Flaishman i col., 1996).

A més, aquesta producció es veuria afavorida en condicions de baix contingut en oxigen com les que tenen lloc a la rizosfera de les plantes (Laville i col., 1998) i que n'estimulen la producció, tot i que anteriorment (Askeland i Morrison, 1983), es creia que aquesta hipòtesi era poc probable per la baixa síntesi d'HCN en condicions naturals i per la seva eliminació *in situ* per processos físico-químics i biològics.

S'ha estudiat la cianogènesi en diversos bacteris en sistemes *in vitro* i s'han identificat una sèrie de factors que influeixen, tant en *C. violaceum* com en *Pseudomonas*, que són els següents:

- Temperatura. Hi ha una temperatura o un interval òptim en el qual té lloc la màxima capacitat de síntesi d'HCN (Castric, 1975; Askeland i Morrison, 1983) però s'observa també que el rendiment final no està afectat per la temperatura de creixement en *C. violaceum* (Rodgers i Knowles, 1978).
- Ferro. El ferro estimula la cianogènesi (Rodgers i Knowles, 1978; Keel i col., 1989), i s'ha observat que hi ha una relació lineal entre el $\log[\text{Fe}^{3+}]$ i la producció d'HCN en l'interval $10^{-4} - 10^{-6}$ M (Castric, 1977) o 3-300 μM (Askeland i Morrison, 1983).
- pH. El pH també afecta la producció, ja que hi ha un pH òptim lleugerament diferent segons la soca productora (Askeland i Morrison, 1983).
- Fosfat. La concentració de fosfat també afecta positivament a la producció en l'interval 1-10 mM (Askeland i Morrison, 1983) i negativament fora d'aquest rang (Castric i col., 1979).
- Oxigen. Cal oxigen, ja que no hi ha cianogènesi en condicions anaeròbies (Sneath, 1956; Wissing, 1974 i 1975; Castric, 1975 i 1994; Knowles, 1976; Castric i col., 1981; Laville i col., 1998). La producció d'HCN *in vitro* s'ha associat a baixes concentracions d'oxigen al cultiu (Knowles, 1976; Castric i col., 1981; Laville i col., 1998), condicions que es donen en un cultiu al final de la fase de creixement exponencial que és quan s'inicia la producció de HCN en els bacteris i fongs productors (Castric, 1975).
- Glicina. La glicina és un precursor de l'HCN (Michaels i Corpe, 1965; Castric, 1975 i 1977; Laville i col., 1998; Askeland i Morrison, 1983) però no és l'inductor de la seva síntesi (Castric and col, 1979). La metionina afegida juntament amb la glicina té efecte sinèrgic, però hi ha altres aminoàcids que també estimulen o inhibeixen la cianogènesi (Michaels i Corpe, 1965; Castric, 1977; Rodgers i Knowles, 1978).

- L-glutamat. El L-glutamat és una font de carboni i afecta allargant la durada de la cianogènesi i la quantitat produïda (Michaels i Corpe, 1965; Castric i col., 1979).

Com ja s'ha comentat, l'oxigen està implicat en la cianogènesi, però es desconeixia de quina manera exercia el seu paper en la regulació (Castric i col., 1981). La incidència de l'oxigen es va estudiar amb més detall una vegada localitzats els gens que intervenen en la cianogènesi i obtinguts mutants no productors (Voisard i col., 1989; Flaishman i col., 1996).

Es va observar que el gen *anr* actua com a regulador anaeròbic (ANR). Aquest gen té una funció essencial per l'expressió del gen *hcnABC* (HCN sintetasa) a concentracions baixes d'oxigen (Laville i col., 1998), donat que s'activa en condicions de baixa concentració d'oxigen, iniciant-se llavors la síntesi de l'HCN sintetasa. Quan augmenta la concentració d'oxigen s'inactiva l'HCN sintetasa cessant la cianogènesi (Castric, 1994). Això explicaria els resultats obtinguts per Castric i col. (1981) en el sentit que els baixos nivells d'oxigen al final de la fase exponencial activarien l'HCN sintetasa i en l'augmentar la concentració d'oxigen per la disminució de l'activitat cel·lular a la fase estacionària la inactivaria.

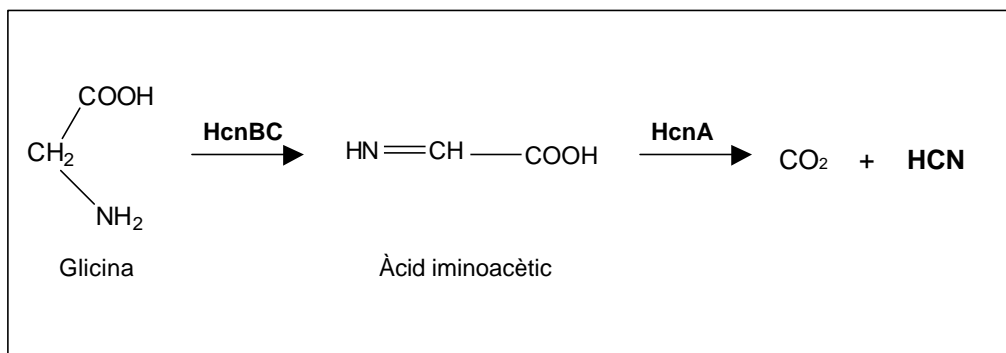


Figura 3.1. Biosíntesi d'HCN a partir de la glicina. S'indiquen els enzims que catalitzen les reaccions de biosíntesi. (De Laville i col., 1998).

Figure 3.1. HCN biosynthesis from glycine. The enzymes that catalyze the biosynthetic reactions are shown. (From Laville i col., 1998).

En la soca *P. fluorescens* CHA0 la producció d'HCN també està regulada per un altre gen el *gacA* (Global antibiotic and cyanide control) que s'expressaria en condicions de creixement restringit i/o manca de nutrients (Laville i col., 1992). El gen *gacA*, juntament amb un sensor quinasa GacS (=LemA) regula la producció de

metabòlits secundaris inclòs l'HCN (Laville i col., 1998; Aarons i col., 2000; Duffy i Défago, 2000). Es descriuen tres gens *lemA*, *gacA* i *anr* que estan implicats en la regulació de la cianogènesi en *Pseudomonas*. Els gens *lemA* i *gacA* controlen la producció global d'antibiòtics i HCN (Laville i col., 1992; Gaffney i Col., 1994; Corbell i Loper, 1995), mentre que el gen *anr* seria un regulador positiu de la cianogènesi (Laville i col., 1998).

3.1.1 HCN i control biològic de malalties de les plantes

La producció d'HCN com a mecanisme de control de patògens sembla *a priori* que queda limitada a la rizosfera on les condicions ambientals són més estables, ja que al ser una substància volàtil no perduraria a la fillosfera. Però a la rizosfera també es coneix que és ràpidament inactivat per components dels sòl o metabolitzat per microorganismes (Castric i col., 1981) i que la seva producció, que depèn de la disponibilitat de Fe (III), està inhibida per bacteris productors de sideròfors en sòls amb limitació de Fe (Schippers i col., 1987).

La producció d'HCN pot tenir efectes nocius per les plantes, doncs soques productores de HCN són les responsables de la disminució de la collita de patates (Bakker i Schippers, 1987). La causa és que l'HCN inhibeix la respiració de les arrels i per tant, el transport actiu de nutrients com N, P i K (Schippers i col., 1987). Malgrat això hi ha alguns treballs que demostren que la producció d'HCN és el mecanisme implicat en el biocontrol d'alguns patògens.

Majoritàriament, s'ha observat la supressió de malalties de plantes per HCN en la rizosfera de blat (Weller, 1988; Pierson III i Thomashow, 1992) o de tabac (Voisard i col., 1989; Laville i col., 1998), i també hi ha alguns treballs de control efectiu de malalties a la fillosfera (Flaishman i col., 1996).

La inserció dels gens *hcnABC* de *P. fluorescens* CHA0 fa augmentar en sis vegades la producció d'HCN en *P. putida* BK661 i també la supressió dels símptomes causats per dos patògens foliars augmenta també significativament. Això és indicatiu que l'HCN seria el responsable de la inhibició dels patògens en aquests patosistemes foliars (Flaisman i col., 1996). També en la soca EPS288 productora d'HCN, seleccionada com a candidata a agent de biocontrol vers el fong *S. vesicarium*, la producció d'HCN sembla la causa de l'antagonisme observat (Bonaterra, 1997).

Voisard i col. (1989) van observar que un mutant de *P. fluorescens* CHA0 no productor d'HCN aconseguia menys protecció que la soca salvatge vers la podridura negra d'arrel de tabac causada per *Thielaviopsis basicola* i, que la soca *P. fluorescens* P3 no productora no controlava la malaltia, però aconseguia controlar-la després d'incorporar-li els gens per la producció d'HCN. Laville i col. (1998), utilitzant *P. fluorescens* CHA21 (mutant *anr*) que produïa 15 vegades menys HCN que la soca CHA0 en condicions limitants d'oxigen, van observar que disminuïa la capacitat de controlar la podridura negra d'arrel de tabac amb el sòl saturat d'aigua, condicions en les quals hi ha baixa disponibilitat d'oxigen. En la rizosfera de les plantes, on es dona una concentració baixa d'oxigen, la major producció d'HCN regulada per un gen del tipus *anr* tindria probablement un efecte positiu en el biocontrol quan aquest fos el mecanisme (Laville i col., 1998). També la glicina, precursor de l'HCN, que n'estimula la síntesi, és un dels components dels exsudats de les arrels (Schippers i col., 1987).

El coneixement de les condicions ambientals i nutricionals en les que una soca expressa la producció d'HCN és necessari per avaluar la capacitat d'ésser activa en condicions reals (Weller, 1988). Aquesta etapa d'estudi *in vitro* ha de proporcionar el coneixement necessari per afrontar una etapa d'assaig en condicions reals. Per això, es creu convenient estudiar la síntesi d'HCN per la soca de *P. fluorescens* candidata a agent de biocontrol EPS288.

3.1.2 Detecció i quantificació de la producció d'HCN

Un dels mètodes que més s'han utilitzat per la detecció de l'HCN produït per soques de bacteris i de fongs són tires impregnades de picrat sòdic (Michaels i Corpe, 1965; Sneath, 1966; Castric, 1975; Askeland i Morrison, 1985; Bakker i Schippers, 1987). Aquest sistema es basa en el canvi de color de la tira de picrat sòdic que passa del color groc inicial a vermell teula, canvi produït per la reducció del picrat alcalí pel cianur (Fisher i Braun, 1952). Un altre sistema també força utilitzat i que es basa en un canvi de color és l'ús de etilacetoacetat de coure (II) (Castric i Castric, 1983; Voisard i col., 1989; Laville i col., 1998) on es produeix un complex blau en contacte amb HCN. Aquest mètode és el recomanat per la AOAC per la seva detecció (AOAC, 1984). Aquestes dues metodologies permeten analitzar quantitats elevades de soques en un temps relativament curt.

Com a prova d'identificació i confirmació de la producció d'HCN s'utilitza habitualment la formació de blau de Prússia (Castric, 1975; Askeland i Morrison, 1983) o el mètode de l'àcid isonicotínic-àcid barbitúric (Bakker i Schippers, 1987).

En el present treball, la localització de soques cianogèniques s'ha fet amb la prova de la tira de picrat alcalí, mentre que per a la identificació de l'HCN s'han utilitzat la formació del Blau de Prússia, una modificació de l'assaig al toc (APHA, 1992) i també s'ha provat l'espectroscòpia d'infraroig (IR), donat que l'HCN té bandes d'absorció característiques a la zona de l'IR (Nakamoto, 1986).

Es coneixen diversos sistemes per estudiar la producció d'HCN per microorganismes. Aquests consisteixen en la destil·lació de l'HCN dissolt en el medi de cultiu (Michaels i Corpe, 1965; Voisard i col., 1989; Laville i col., 1992 i 1998; Flaishman i col., 1996), o en fer circular aire per un cultiu concentrat i recollir-lo en un paper impregnat en NaOH (Castric, 1975 i 1977; Rodgers i Knowles, 1978) o bombollejar-lo en una solució concentrada de NaOH (Wising, 1974 i 1975).

La quantificació es realitza per mètodes colorimètrics basats en la formació de complexos acolorits. Inicialment s'empraven mètodes basat en la formació de complexos d'àcid pícric o de Blau de Prússia però eren poc sensibles (Epstein, 1947; Fisher i Braun, 1952). S'han anat utilitzant diversos mètodes entre els que podem esmentar el mètode colorimètric d'Aldridge (Aldridge, 1944), un dels primers utilitzats (Michaels i Corpe, 1965; Castric, 1975 i 1977; Askeland i Morrison, 1983), el mètode d'Epstein (1947) que es basa en la formació d'un complex amb la piridina (Wising, 1974 i 1975; Rodgers i Knowles, 1978), el mètode de l'àcid barbitúric i l'àcid isonicotínic (Asmus i Garschagen, 1953) utilitzat darrerament per Castric (Castric i col., 1979 i 1981; Castric, 1994), el mètode de Nagashima (Nagashima i Ozawa, 1981) poc utilitzat (Bakker i Schippers, 1987) i finalment el mètode de Gewitz (Gewitz i col., 1976) que és una adaptació d'un mètode anterior (Guilbauld i Kramer, 1966) i actualment és dels més utilitzats (Voisard i col., 1989; Keel i col., 1989; Laville i col., 1992 i 1998; Flaishman i col., 1996).

Trobem descrits mètodes per la determinació d'HCN en efluent industrial i urbans (Frant i col., 1972; Milosavljević i col., 1995). En aquest camp, però, els més emprats són els colorimètrics estandarditzats (Fisher i Brown, 1952; Goulden i col., 1972; Csikai i Barnard, 1983).

Existeixen altres mètodes per a la quantificació en mostres d'aigües de rius o residuals industrials o domèstiques, que solen ésser mètodes pensats pel tractament d'un nombre relativament elevat de mostres i es basen en les mateixes reaccions que les trobades pels autors que estudien la cianogènesi en bacteris. El mètode de Goulden (Goulden i col., 1972) consisteix en la formació d'un complex amb un reactiu de piridina-pirazolona (Epstein, 1947) i fou el mètode recomanat en la 13^{ena} edició del *Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater* (APHA, 1984). La preparació de reactius i el desenvolupament colorimètric són relativament senzills i es poden tractar més mostres. Aquest mètode es va modificar en les darreres edicions dels *Standard Methods* (APHA, 1989 la 17^{ena} ; 1992 la 18^{ena}) utilitzant el reactiu piridina-àcid barbitúric en lloc de piridina-pirazolona assolint una major reproductivitat i degut a l'estabilitat del color durant més de 30 minuts permet analitzar moltes mostres seguides (Asmus i Garschagan, 1953; Csikai i Barnard, 1983).

La principal interferència en la determinació d'HCN és el H₂S, tant en els mètodes de quantificació basats en formació de complexos de piridina (Epstein, 1947; Asmus i Garschagan, 1953) com en el mètode del picrat sòdic (Fisher i Brown, 1952). El mètode en el qual hi ha menys interferències d'anions inclòs el H₂S és el de Guilbauld (Guilbauld i Kramer, 1966) però requereix una preparació de reactius laboriosa i delicada, i la quantificació és una cinètica que implica que el tractament de múltiples mostres sigui un procés llarg. Donat que el H₂S es produeix bàsicament en condicions anaeròbies que no es donen en els nostres estudis, no s'esperen problemes d'interferències en la detecció o quantificació per aquest compost.

3.2 Objectius

Com a objectius d'aquest capítol es van plantejar la caracterització de la producció d'HCN per la soca de *P. fluorescens* EPS288 i l'estudi de l'efecte de variables del cultiu en diferents medis.

Aquests objectius es varen subdividir en:

- Desenvolupar i validar un sistema per a la recollida de l'HCN que es produeix en cultiu discontinu.
- Estudiar la cinètica de la producció d'HCN i la influència de la temperatura d'incubació, del medi de cultiu i de la font de carboni en la producció d'HCN.
- Comparar la soca EPS288 amb una soca de referència agent de biocontrol.
- Determinar la influència del medi de cultiu en els paràmetres cinètics de creixement.

3.3 Materials i mètodes

3.3.1 Desenvolupament i validació d'un sistema pel seguiment de la producció d'HCN per bacteris cianogènics

Per estudiar la cianogènesi en cultius de *P. fluorescens* va desenvolupar-se un sistema que permetés recollir l'HCN i seguir-ne l'evolució al llarg del temps, i estudiar les variables que afecten a la seva producció.

3.3.1.1 Desenvolupament del sistema de recollida d'HCN

Els mètodes que hi ha descrits fins al moment no són adequats per estudiar la producció d'HCN al llarg del temps en cultius en *batch* en les condicions d'incubació habituals en el laboratori. Per això, el muntatge que s'ha proposat i utilitzat en aquest treball, és una modificació de diversos dels sistemes descrits (Castric i col., 1979; Askeland i Morrison, 1983; Bakker i Schippers, 1987).

En el disseny del sistema de recollida es va prioritzar poder utilitzar el material emprat habitualment en les proves d'incubació de bacteris candidats a agents de biocontrol en l'avaluació de la producció *in vitro* de metabòlits secundaris. També es considerà adient que es poguessin controlar algunes variables que afecten al creixement i seguir l'evolució del cultiu al llarg del temps.

El sistema proposat es mostra a la Figura 3.2. En aquest, l'aire es va impulsar dins el sistema de cultiu líquid mitjançant una bomba de les utilitzades per a l'injecció d'aire en peixeres (K200 SIMCOS S.A., Barcelona) capaç de subministrar 175 L/h a 0,02 bar. El cabal subministrat es va controlar mitjançant un rotàmetre (Tecfluid) que permetia regular el cabal en l'interval de 0,25 nL (normal litre) aire/min a 2,5 nL aire/min a 1 Bar i a 20°C. Aquests rotàmetres es van calibrar mesurant l'aire que sortia de l'absorbidor de gasos amb un cabalímetre de bombolla (Flowmeter, Hewlett Packard).

Abans d'introduir-lo dins l'erlenmeyer on hi havia el cultiu l'aire es va esterilitzar fent-lo passar a través d'un filtre de membrana de 0,45 µm de diàmetre de porus (FC030/3, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). El cultiu es taparen amb un tap de goma amb dos orificis on es van introduir tubs de vidre de la longitud adequada, un per l'entrada i l'altre per la sortida de l'aire. Connectat a aquests hi havia tub de silicona fins

al filtre i fins al bombollejador de gasos, respectivament. El tap, juntament amb els tubs, es van esterilitzar durant 20 min a 121°C, abans i després de cada prova.

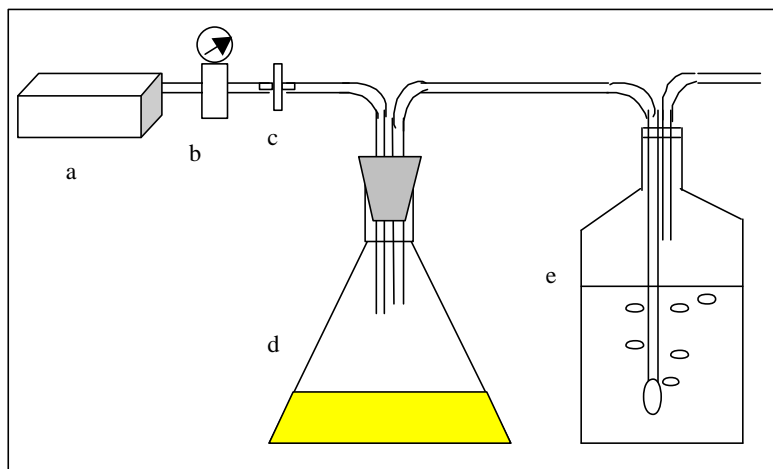


Figura 3.2. Sistema de recollida d'HCN en un cultiu de bacteris. Bomba pel suministre d'aire (a), rotàmetre pel control del cabal (b), filtre (c), erlenmeyer on hi ha el cultiu (d) i trampa absorbidora de gasos (e).

Figure 3.2. System for HCN collection from bacterial cultures. Air pump (a), flow meter (b), sterilizing filter (c), culture flask (d) and gas trap (e).

Totes les conduccions flexibles eren de tub de làtex o de silicona i les rígides eren de vidre i es van segellar amb brides per evitar pèrdues de gasos o contaminació del cultiu. Abans d'iniciar cada prova es va comprovar l'estanqueïtat del sistema.

Per recollir l'HCN produït pel cultiu s'insuflà aire dins l'erlenmeyer i es va fer incidir sobre la superfície del brou, evitant-se d'aquesta manera la formació d'escumes. L'erlenmeyer es va mantenir en agitació orbital de 125 rpm i a temperatura controlada dins un incubador (Hotcold-E, J.P. Selecta, Abrera, Barcelona, Espanya). La sortida de l'aire del cultiu es bombollejà dins de 210 mL d'una solució de NaOH 2,5 M en un absorbidor de gasos amb difusor de placa porosa (Ref^a 5224 Afora) (Prats, 1998).

3.3.1.2 Validació del sistema de recollida

Es pretenia determinar les condicions de treball que permetien que la recollida de l'HCN fos una reproducció fidel de la seva producció per cultius de bacteris a les diferents condicions que es volien assajar.

Es varen identificar les variables *pH*, *Cabal d'aire* i *Temperatura* com aquelles que afectaven a l'evaporació de l'HCN des de la solució líquida cap a la fase gasosa i que influïen en la recollida del que es despenia dels cultius.

Per estudiar l'efecte de cada una de les variables considerades i si hi havia alguna interacció entre elles, es proposà un experiment amb disseny factorial a dos nivells i tres variables o factors (2^3). Els dos nivells que es van considerar per a cada variable són els següents:

- Temperatura: 15 i 25°C
- Cabal d'aire: 0,5 i 1,0 L/min
- pH: 6 i 8

Els valors de temperatura i pH es varen escollir entre les condicions que es podien assolir en el sistema *in vivo*, mentre que els valors del cabal d'aire es varen escollir d'acord amb els cabalímetres dels quals es disposava i eren suficients per assegurar una ràpida renovació de l'aire.

El disseny experimental amb el valors de cada variable està descrita a la Taula 3.1. Cada una de les proves es va realitzar per triplicat.

Taula 3.1. Disseny experimental per a la validació del sistema de recollida d'HCN.

Table 3.1. Experimental design to validate the system for HCN collection.

Prova	Paràmetres		
	Cabal d'aire (L/min)	pH del medi	Temperatura (°C)
1	0,5	6	15
2	0,5	6	25
3	0,5	8	15
4	0,5	8	25
5	1,0	6	15
6	1,0	6	25
7	1,0	8	15
8	1,0	8	25

El muntatge utilitzat en la validació era anàleg al descrit a la Figura 3.1, però a l'interior de l'erlenmeyer, substituint el cultiu del bacteri, hi havia 100 mL de solució tamponada al pH corresponent. Per la solució de pH=6 es va preparar 1 L de solució que contenia 438,5 mL de solució 0,2 M de NaH_2PO_4 i 61,5 mL de solució 0,2 M de Na_2HPO_4 . Per la solució de pH=8 es va preparar 1 L de solució amb 26,5 mL de solució

0,2 M de NaH_2PO_4 i 473,5 mL de solució 0,2 M de Na_2HPO_4 (Dhingra i Sinclair, 1987). Aquests tampons es podien conservar a la nevera a 4°C durant una setmana.

Per iniciar la cinètica es va afegir 1 mL d'una solució concentrada de KCN al 100 mL de tampó de manera que la concentració final era de 50 ppm de CN. Es va tapar immediatament i es va fer circular aire al cabal requerit. A partir d'aquest moment, es va prendre mostra de la solució bàsica de dins de l'absorbidor a l'inici i a intervals de temps determinats, fins que tot l'HCN de l'erlenmeyer s'evaporà, cosa que es va comprovar amb el test d'assaig al toc. Els erlenmeyers es van mantenir en agitació de 125 rpm a temperatura constant dins l'incubador.

La presa de mostra es va fer interrompent la circulació d'aire, segellant amb pinces la sortida i l'entrada de l'erlenmeyer i prenent mostra de la solució tamponada (200 µL) i de l'absorbidor de gasos (1 mL).

Es van fer assaigs addicionant quantitats conegudes de solució de KCN a la solució absorbidora i es va comprovar que hi havia proporcionalitat en la resposta.

3.3.1.3 Quantificació de l'HCN

La quantificació es va fer modificant convenientment el mètode normalitzat 4500 CN D, per ús en aigües residuals i naturals (APHA, 1984). En l'adaptació realitzada es va utilitzar la solució alcalina absorbidora després de l'erlenmeyer, convenientment diluïda, com la solució absorbidora procedent de la destil·lació dels cianurs de la mostra d'aigua residual.

Sintetitzant, a un matràs de 25 mL es van afegir seqüencialment, agitant després de cada addició, 15 mL d'aigua destil·lada, 200 µL (o 100 µL en les mostres finals de la prova de seguiment) de la solució absorbidora, 2 mL de Na_2HPO_4 1 M, 1 mL de Cloramina-T i 2,5 mL de reactiu Piridina-Àcid barbitúric. L'absorbància es va mesurar a 578 nm (UV160, Shimatzu, Japan) passats 8 min des de l'addició dels reactius. La quantificació del HCN es va fer a partir de patrons de concentració coneguda.

La quantitat de l'HCN recollit en la solució absorbidora representada enfront del temps va permetre calcular la velocitat d'evaporació de l'HCN com el pendent del tram lineal inicial.

3.3.2 Producció d'H₂CN per soques de *P. fluorescens*

Una vegada demostrada la fiabilitat del sistema de recollida, es va procedir a realitzar els assaigs per l'estudi de la cianogènesi en la soca de *P. fluorescens* EPS288.

3.3.2.1 Sembra del cultiu

Per fer la sembra del brou es va partir de la soca conservada al congelador a -80°C, utilitzant un vial nou per a cada assaig. La soca sembrada per estria en plaques d'agar LB es va incubar durant 24 h a 25°C. Per la determinació de la producció d'H₂CN es van fer sembres a alta i a baixa concentració inicial.

Es van realitzar aquests dos tipus de sembra perquè es volia avaluar l'efecte de la concentració inicial de bacteris, donat que la producció de metabòlits secundaris està associada a processos dependents de la concentració cel·lular o de "quorum sensing".

- Sembra a alta concentració cel·lular: Es va resuspendre una nansa de Kolle carregada de bacteris en un tub amb 4,5 mL de tampó fosfat estèril. Aquesta suspensió es va sembrar homogèniament en superfície en diverses plaques de Petri i es van incubar durant 24 h a 25°C. El contingut cel·lular de tres de les plaques anteriors es va resuspendre en 500 mL de brou. A continuació, aquest brou es va homogeneïtzar i seguidament es va repartir en tres erlenmeyers que es van connectar al sistema de recollida d'H₂CN. En aquestes condicions la concentració cel·lular resultant era d'aproximadament 10⁸ ufc/mL. Tot aquest procés es realitzà en condicions d'esterilitat sota campana de flux laminar (Telstar, BV-30/70).
- Sembra a baixa concentració cel·lular: Es van inocular 0,5 mL del brou sembrat a alta concentració en 500 mL de medi fresc. En aquestes condicions, la concentració cel·lular inicial era de l'ordre de 10⁵ ufc/mL i de les mateixes característiques que la sembra a elevada concentració.

3.3.2.2 Seguiment de la cinètica de creixement i de producció d'H₂CN

Pel seguiment dels cultius es van fer recomptes de viables (ufc/mL) per la tècnica de les dilucions successives i es va prendre mostra de la solució alcalina de dins de l'absorbidor de gasos en intervals determinats. Per prendre mostra del cultiu s'interrompia la circulació de l'aire pel sistema, se segellaven les entrades i sortides de

l'erenmeyer amb pinces i seguidament es prenia la mostra del cultiu en condicions d'esterilitat sota la campana de flux laminar.

La quantificació de l'HCN es va fer segons la metodologia descrita anteriorment (veure l'apartat 3.3.1.3).

3.3.2.3 Efecte del cabal d'aire

Per determinar si el cabal d'aire que circulava per l'erenmeyer influïa de manera significativa en la quantitat d'HCN que es pogués produir-recollir, es van fer cultius de la soca EPS288 en els quals s'avaluà l'efecte del cabal d'aire i de la temperatura d'incubació. La sembra es va fer a alta concentració cel·lular inicial en brou LB.

Per fer aquest experiment es va preparar brou sembrat a alta concentració cel·lular i repartit en sis erlenmeyers, 100 mL a cada un. En aquestes condicions, els 6 cultius eren, en l'inici, idèntics. Aquests es van incubar en agitació 125 rpm i a temperatura constant fent circular aire a dos cabals diferents: 0,5 i 1,0 L/min, a tres cultius per cada cabal. Les temperatures d'incubació assajades foren de 10 i de 25°C.

3.3.2.4 Efecte de la temperatura

Per estudiar l'efecte de la temperatura en la producció d'HCN per la soca EPS288, el sistema descrit (veure la Figura 3.2) es va instal·lar dins d'una cambra d'incubació amb control de temperatura. El medi escollit per a la realització d'aquests assaigs fou el LB. Les cinètiques de creixement i de producció d'HCN es varen fer en el rang de temperatura de 5 a 30°C en intervals de 5°C. Per cada temperatura d'incubació es van fer cinètiques de cultius sembrats a alta i a baixa concentració inicial.

Per iniciar l'experiment es van dipositar 150 mL de brou inoculat a la concentració inicial desitjada a cada erlenmeyer, sembrant cada condició per triplicat. Els cultius van mantenir-se en agitació orbital a 125 rpm a la temperatura desitjada dins un incubador.

El cabal d'aire introduït dins el sistema era de 0,5 L/min i es va recollir fent-lo bombollear dins un absorbidor de gasos amb 210 mL de NaOH 2,5 M.

Els recomptes de bacteris viables i de la quantitat d'HCN produït es van fer a diferents intervals de temps, seleccionats d'acord amb proves preliminars realitzades a cada temperatura. Els recomptes cel·lulars de la mostra del brou es van fer

immediatament, mentre que la mostra de la solució alcalina recollida de l'absorbidor es conservava a la nevera a 4°C fins a la determinació de l'HCN.

3.3.2.5 Efecte de la composició del medi de cultiu

Una altra variable que pot tenir influència en cianogènesi, és la formulació del medi de cultiu. Per avaluar aquest efecte es van fer cultius amb medis mínims i complexos.

Els medis complexos foren LB, KB, Brou Patata Dextrosa (PDB), i Brou Nutritiu (NB). El medi mínim utilitzat fou el 21C suplementat amb diferents fonts de carboni al 1% (Glucosa, Glicerol, Manitol i Glucosa amb Glicina 10 mM) (veure l'apartat 2.3.1).

En la sembra de les soques per aquesta prova es va realitzar una adaptació del bacteri al medi a estudiar ja que la soca es conservava en medi LB i aquest, en alguns casos, difereix molt del medi a assajar. Per fer l'adaptació, la soca conservada a -80°C es va sembrar en plaques d'agar del medi corresponent incubant-les durant 36 h a 25°C.

La sembra en aquests medis es féu a alta concentració cel·lular inicial. Pels cultius, es van dipositar 150 mL de medi sembrat a cada erlenmeyer incubant-los en agitació a 125 rpm a 25°C. L'aire insuflat a un cabal de 0,5 L/min es va recollir en 210 mL de NaOH 2,5 M.

Es va prendre mostra pel recompte de viables i per la determinació d'HCN a diferents intervals de temps. Cada assaig es va realitzar per triplicat.

3.3.2.6 Comparació de la producció d'HCN entre les soques de *P. fluorescens* EPS288 i CHA0

El brou escollit pel creixement i producció d'HCN va ésser el medi de Castric (Castric P, 1977) que s'ha utilitzat en comparacions entre soques productores descrites per diversos autors (Castric P., 1979; Askeland i Morrison, 1983; Bakker i Schippers, 1987; Voisard i col., 1989).

El medi de Castric té la següent composició: Àcid L-Glutàmic (Sigma) (20 mM), glicina (Sigma) (12,5 mM), K₂HPO₄ (5 mM), NaH₂PO₄ (5 mM), MgSO₄ · H₂O (2 mM), L-metionina (Merk) (2,5 mM), citrat fèrric (Merk) (0,02 mM), i tris-(hidroximetil)aminometà (Panreac PA) (50 mM), ajustant el medi a pH=7,5.

Els cultius es van sembrar a baixa concentració cel·lular inicial en tres erlenmeyers, dipositant 150 mL a cada un, incubant-los en agitació orbital de 125 rpm a 25°C. El cabal d'aire era de 0,5 L/min i es bombollejà en 210 mL de NaOH 2,5 M.

3.3.3 Estudi dels paràmetres cinètics i de la producció d'HCN mitjançant un sistema automatitzat

En aquest experiment es va determinar la cinètica de creixement de la soca EPS288 en funció del medi de cultiu. Es volia tenir una primera aproximació dels medis d'interès en la caracterització bioquímica de la soca i conèixer els elements nutritius que permeten un creixement més ràpid i una major biomassa.

El seguiment de les corbes de creixement es va realitzar amb l'aparell Bioscreen (Model C, Labsystems Inc., Finlàndia) que utilitza plaques multipouets on es dipositen els cultius dels quals es fa el seguiment de l'absorbància del cultiu a diferents longituds d'ona. La longitud d'ona seleccionada per aquestes proves fou de 600 nm.

3.3.3.1 Sembrar i incubació dels cultius

La soca conservada a -80°C es va sembrar en 50 mL de brou LB i va incubar-se a 25°C en agitació orbital 125 rpm durant 24 h. Aquest brou es va centrifugar a 5000 rpm (RC-5CPlus Sorvall) durant 5 min descartant el sobrenedant. El sediment resultant resuspès en igual volum de tampó fosfat, es va rentar dues vegades. Es van dipositar 25 µL d'aquesta suspensió en 25 mL de cada un dels medis a assajar els quals s'homogeneïtzaren en agitació orbital a 125 rpm durant 10 min. D'aquesta manera es garantia que tots els cultius s'iniciaven a igual concentració cel·lular. Finalment, es van dipositar 100 µL de cada un dels cultius en els pouets corresponents de la microplaca.

La placa situada al receptacle corresponent de l'aparell Bioscreen es va incubar durant 60 h a 25°C amb agitació intermitent cada 10 min i lectura de l'absorbància a 600 nm cada 20 min.

Una vegada finalitzat el creixement, amb l'assaig al toc es va determinar la presència d'HCN en els brous de la microplaca (veure l'apartat 2.3.4.2).

3.3.4 Tractaments de dades

Abans de realitzar els tractaments estadístics, es comprovà que les dades complien el criteri d'homocedasticitat i, en cas contrari, es van utilitzar proves no paramètriques.

Per comprovar l'homogeneïtat de la variança, es va utilitzar el test de Levene, i per la separació de mitjanes les proves de Tukey de comparacions múltiples.

La determinació de la velocitat d'evaporació de l'HCN es va fer calculant el pendent del tram lineal inicial de la corba de recollida d'HCN ($\mu\text{g HCN}$ vs temps) ajustant les dades a un model lineal. La velocitat de producció d'HCN ($d\text{HCN}/dt$), es va expressar com $\mu\text{g HCN}\cdot\text{min}^{-1}$ en els experiments de validació del sistema de recollida o com $\mu\text{g HCN}\cdot 10^{-9} \text{ ufc}\cdot \text{h}^{-1}$ en els experiments amb bacteris. En aquest darrer cas es va considerar la població mitjana en l'interval mesurat.

La velocitat específica de creixement (μ) va expressar-se com el pendent de la zona de creixement exponencial del gràfic $\ln(\text{ufc}/\text{mL})$ vs temps (h).

Amb les corbes de creixement obtingudes en la monitorització automàtica, la *Velocitat Específica de Creixement* (μ) es va calcular com el pendent del tram lineal de creixement exponencial de la corba ($\ln\text{ABS}$ vs temps) (Baranyi i Pin, 1999; Salvensen i Vadstein, 2000) i el *Creixement Màxim* com l'absorbància màxima a 600 nm (A_{600}).

Pel tractament dels resultats s'utilitzà el full de càlcul Excel de Microsoft® i el paquet estadístic SPSS per a Windows (Versió 7.5.2S SPSS Inc. 1989-1997)

3.4 Resultats

3.4.1 Validació del sistema de recollida d'HCN

Es va estudiar l'efecte de les variables físico-químiques que influeixen en l'evaporació i posterior recollida de l'HCN generat per cultius de *P. fluorescens*.

Abans de realitzar les determinacions amb el cultiu es va procedir a l'avaluació del funcionament del sistema de recollida per conèixer quin era el seu comportament. El sistema de recollida d'HCN ha de reflectir la dinàmica de producció pel cultiu. Per fer aquesta avaluació es varen simular les condicions en les quals es realitzarien les determinacions amb la soca bacteriana, substituint el cultiu del bacteri productor d'HCN per una solució tamponada de KCN.

3.4.1.1 Efecte de la temperatura, cabal i pH en la recollida d'HCN a partir d'una solució de KCN

A la Taula 3.2 es mostren les velocitats d'evaporació a cada una de les condicions assajades amb les repeticions.

Taula 3.2. Disseny experimental i resultats de la velocitat inicial d'evaporació d'HCN ($\mu\text{g HCN}\cdot\text{min}^{-1}$) en la validació del sistema de recollida. Lletres iguals indica que no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey.

Table 3.2. Experimental design and results of HCN initial evaporation rate ($\mu\text{g HCN}\cdot\text{min}^{-1}$) in the validation of HCN collection system. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) with Tukey's test.

Prova	Variables			Repeticions			Mitjana
	Cabal	pH	Temp.	(1)	(2)	(3)	
1	0,5	6	15	20,2	19,5	19,7	19,8 ab
2	0,5	6	25	34,5	29,5	31,1	31,7 c
3	0,5	8	15	15,7	17,5	23,5	18,9 a
4	0,5	8	25	23,7	23,7	25,9	24,4 b
5	1,0	6	15	34,5	26,9	30,6	30,7 c
6	1,0	6	25	54,2	56,7	50,2	53,7 e
7	1,0	8	15	29,2	28,5	33,4	30,4 c
8	1,0	8	25	39,0	35,3	40,6	38,3 d

Es pot comprovar que les condicions en les quals s'assoleix la velocitat d'evaporació més elevada són el cabal 1,0 L/min, la temperatura de 25°C i el pH=6. L'augment de la temperatura de la solució que conté l'HCN o l'augment del cabal d'aire que es fa

circular pel sistema, provoca un marcat augment de la velocitat d'evaporació. Per contra, un augment del pH de la solució que conté l'HCN provoca una lleugera disminució de la velocitat d'evaporació.

Per estudiar la significança dels efectes de les variables en l'evaporació i recollida de l'HCN, es va fer l'anàlisi de la variança (ANOVA) que es mostra a la Taula 3.3. Com a variables independents trobem *Cabal*, *pH* i *Temperatura*, i com a variable dependent la velocitat d'evaporació.

Taula 3.3. Taula de l'ANOVA per l'efecte de *Cabal*, *pH* i *Temperatura* en la velocitat inicial d'evaporació de l'HCN.

Table 3.3. ANOVA for the effect of *Flow*, *pH* and *Temperature* on HCN initial evaporation rate.

ANOVA					
	Variable	Suma de quadrats	gl	F	P>F
Efectes principals	Cabal	1270,2	1	157,4	0,0001
	pH	213,6	1	26,5	0,0001
	Temperatura	878,5	1	108,9	0,0001
Interaccions	Cabal * pH	21,3	1	2,6	0,124
	Cabal * Temperatura	68,7	1	8,5	0,01
	pH * Temperatura	172,8	1	21,4	0,0001
Model		2625	6	46,8	0,0001
Residual		157	17		

El model amb els efectes principals pH, cabal i temperatura i les interaccions de segon ordre explica un 95% de la variança observada. El Cabal d'aire i la Temperatura tenen un efecte molt significatiu ($P > F$ 0,0001) en la velocitat d'evaporació i expliquen la major part de la variança (el 77%). El pH també té un efecte significatiu, però té poc pes en la variança (<10%) i per tant en el procés d'evaporació de l'HCN. Així, un canvi de pH en el medi no ha de provocar un canvi substancial en la velocitat d'evaporació. De les diferents interaccions, la més significativa és la interacció entre el pH i la Temperatura ($P > F$ 0,0001).

Per determinar quina és la magnitud i sentit de les variables que tenen efecte significatiu en la velocitat d'evaporació s'han calculat les estimes dels efectes principals i de les seves interaccions les quals es mostren a la Taula 3.4.

Taula 3.4. Estimes dels efectes principals i de les seves interaccions en l'avaluació de la recollida d'HCN. En els efectes principals el signe indica el sentit de l'evolució de la resposta en passar del valor (-) al (+) de la variable.

Table 3.4. Main effects and their interactions estimates in the evaluation of HCN collection. The sign shows evolution tendency when the considered main factor goes from (-) to (+) value

	Variable	Efectes
Efectes principals	Temperatura	12,1
	pH del medi	-6,0
	Cabal d'aire	14,6
Interaccions	Temperatura x pH	-5,4
	Temperatura x Cabal	3,4
	Cabal x pH	-1,9
	Cabal x pH x Temperatura	-2,2
Variança		1,3

L'augment de la temperatura o del cabal d'aire estimulen l'evaporació. Per contra, un augment del pH farà que disminueixi la velocitat d'evaporació. L'augment del pH provoca una disminució en la velocitat d'evaporació de l'HCN, però aquest efecte és menys important que els dos anteriors, sempre que el pH estigui per sota el pK_a de l'HCN ($pK_a=9,4$). Cal tenir present també que l'efecte del pH és més important a temperatures elevades.

Analitzant la interacció temperatura-pH (veure la Taula 3.2) s'observa que a baixa temperatura no hi ha diferències significatives en la velocitat d'evaporació al canviar el pH (proves 1-3, i 5-7), mentre que a temperatura elevada la velocitat d'evaporació és significativament superior a pH àcid independentment del cabal (proves 2-4, i 6-8).

3.4.1.2 Efecte del cabal d'aire en un cultiu productor d'HCN

Per realitzar aquest experiment es va utilitzar el dispositiu que està esquematitzat a la Figura 3.1. Aquest sistema va utilitzar-se per la incubació dels cultius i de la recollida d'HCN a les proves posteriors i es mostra a la Figura 3.3.

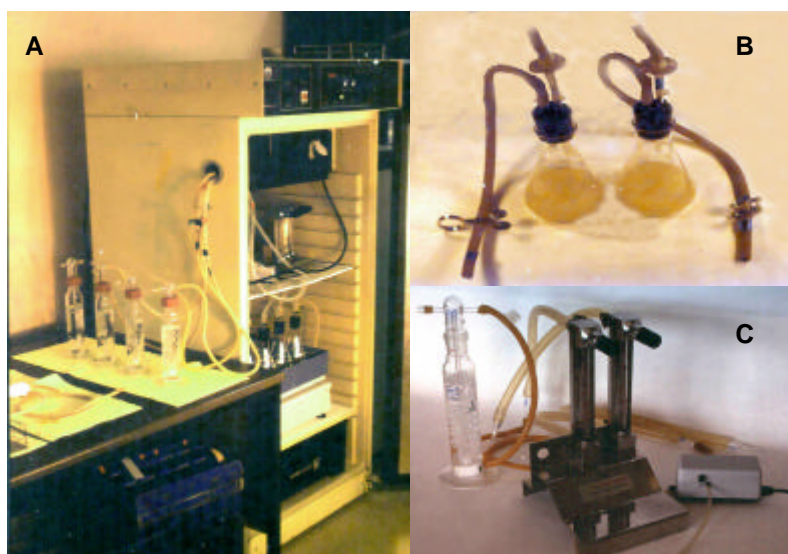


Figura 3.3. Sistema per la incubació dels cultius i recollida de l'HCN produït (A), detall dels cultius (B) i del sistema regulador del cabal i de l'absorbidor de gasos (C).

Figure 3.3. Layout of incubation and system for HCN collection (A) and detail of culture bottles (B) and flow control and gas absorber (C).

A la Taula 3.5 es mostren els resultats de la recollida d'HCN dels cultius de la soca EPS288 a dues temperatures d'incubació per avaluar l'efecte del cabal de l'aire. En aquest experiment no van observar-se diferències significatives ($P=0,05$) entre l'HCN recollit a dos cabals d'aire diferents -0,5 L/min i 1,0 L/min-, independentment de la temperatura d'incubació i del moment del mostreig (veure la Figura 3.5B).

Taula 3.5. Producció d'HCN en cultius de *P. fluorescens* EPS288 en funció del cabal d'aire i de la temperatura d'incubació. Mitjana de tres repeticions i intervals de confiança amb $P=0,05$. Prova t-Student en la comparació entre ambdós cabals.

Table 3.5. HCN production by *P. fluorescens* EPS288 culture ($\mu\text{g HCN/mL}$ broth) at different air flow and incubation temperature. Average of three replicates and confidence intervals at $P=0,05$. t-Student test for comparison between different flow rates.

Condicions de cultiu		HCN produït (mg HCN/mL brou)		Prova t-Student
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Temps (h)	0,5 L aire/min	1,0 L aire/min	
10	24	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	0,06
	96	$15,8 \pm 1,0$	$16,7 \pm 1,1$	0,39
25	24	$16,7 \pm 1,0$	$18,4 \pm 2,3$	0,30
	96	$50,9 \pm 1,6$	$53,9 \pm 2,3$	0,14

El cabal d'aire tampoc va afectar el creixement de la soca EPS288 a cap de les temperatures donat que no es van observar diferències significatives en els recomptes de viables als diferents temps de mostreig, la qual cosa es pot comprovar en la forma de les corbes de creixement als diferents cabals (veure la Figura 3.4A).

D'altra banda, la temperatura d'incubació sí que va mostrar un efecte molt significatiu en la producció d'HCN, doncs hi ha diferències molt significatives ($P > F$ 0,0001) entre la producció d'HCN a 25°C i a 10°C, essent major la producció a 25°C (veure la Taula 3.6).

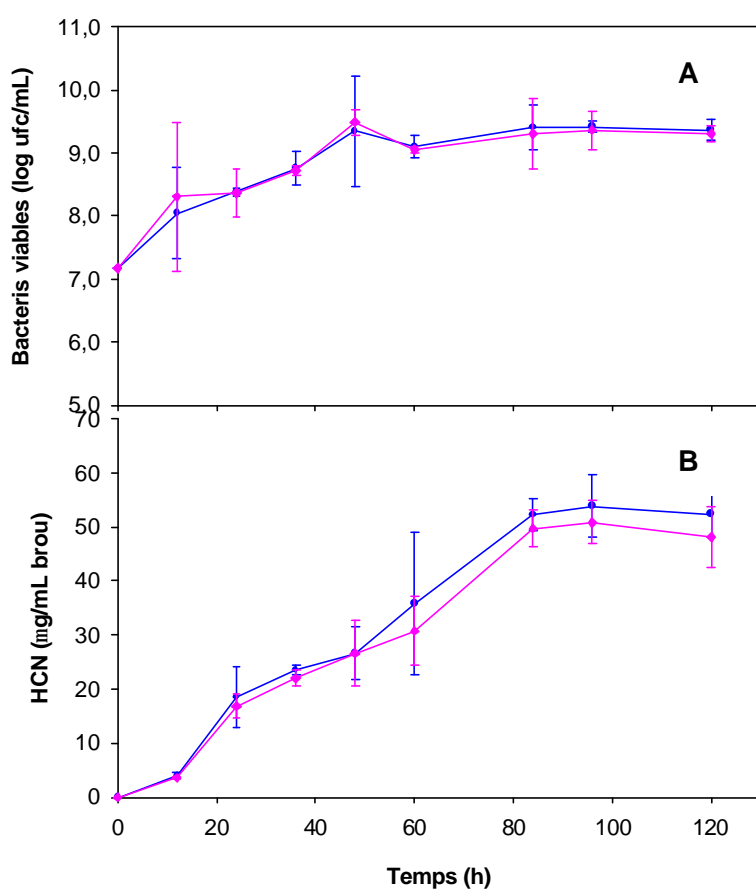


Figura 3.4. Cinètiques de creixement (A) i de recollida d'HCN produït (B) per la soca EPS288 a 25°C, amb cabal de \blacklozenge \blacklozenge 0,5 L/min i \blacklozenge \blacklozenge 1,0 L/min.

Figure 3.4. HCN collection (A) and growth (B) curves of strain EPS288 at 25°C, and air flow of \blacklozenge \blacklozenge 0,5 L/min i \blacklozenge \blacklozenge 1,0 L/min.

Quant a l'evaporació de líquid als cultius, a les 120 h d'incubació a 25°C les pèrdues de volum del cultiu per evaporació foren de 5 mL amb el cabal de 1,0 L/min i de 3 mL amb el cabal de 0,5 L/min, la qual cosa suposa una velocitat d'evaporació de 40 $\mu\text{L/h}$ i de 25 $\mu\text{L/h}$, respectivament. Es va considerar que aquestes pèrdues, del 3% del volum total de brou, en el cabal de 0,5 L/min, eren acceptables. Al llarg de l'estudi es va observar que l'evaporació de brou depenia de la humitat relativa ambiental (no es mostren dades).

Aquests resultats van permetre fixar en 0,5 L/min el cabal d'aire a circular pels erlenmeyers en fer les cinètiques de creixement i seguiment de la producció d'HCN. Amb aquest cabal no hi va haver diferències, ni en el creixement del bacteri ni en la velocitat d'evaporació de l'HCN, i es minimitzava l'evaporació del brou.

3.4.2 Producció d'HCN en *P. fluorescens* EPS288

L'efecte de la temperatura, del medi de cultiu i de la concentració cel·lular de sembra en la cianogènesi es va estudiar per la soca *P. fluorescens* EPS288, candidata a agent de biocontrol.

3.4.2.1 Repetitivitat en la producció d'HCN a 25°C

En primer lloc, es va avaluar la repetitivitat de les proves d'incubació, és a dir, si es podien observar diferències en el creixement i/o en la producció d'HCN entre cultius realitzats en dies diferents en les mateixes condicions d'inoculació i d'incubació.

A la Taula 3.6 es mostren els valors de producció d'HCN de cada una de les repeticions de les cinètiques de creixement de la soca EPS288 a 25°C. Es mostren les condicions inicials dels cultius i la seva evolució al llarg dels temps.

En els moments inicials dels cultius s'originaren diferències significatives ($P > F$ 0,0001), en la producció entre les repeticions tant en la sembra a alta concentració inicial com en la sembra a baixa concentració inicial. Aquestes diferències van disminuir en envellir els cultius. En el cas de baixa concentració inicial a les 72 h ja no s'observaven diferències entre les tres repeticions, mentre que a alta concentració encara hi va haver diferències significatives entre les repeticions.

Taula 3.6. Producció d'HCN (μg de HCN/mL de brou) per la soca *P. fluorescens* EPS288 a 25°C sembrada a alta i a baixa concentració cel·lular inicial. Mitjana de triplicats i interval de confiança 95%. Amb lletres iguals no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey entre les repeticions a cada temps.

Table 3.6. HCN production (μg de HCN/mL broth) by *P. fluorescens* EPS288 at 25°C at high and low initial cellular concentration. The values are the average of three replicates and 95% confidence interval. Repetitions at different sampling time with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) with Tukey test.

Sembra	Paràmetre	Repetició			ANOVA	
		1	2	3	F	P>F
Alta	log ufc ₀	8,3	8,1	7,9	-	
	log ufc _{72h}	8,9 ± 0,1	8,6 ± 0,2	8,5 ± 0,2	-	
	HCN 24h	14,3 ± 1,3 (c)	11,4 ± 0,6 (b)	9,1 ± 0,4 (a)	31,5	0,001
	HCN 48h	28,2 ± 1,0 (b)	23,8 ± 1,1 (a)	22,0 ± 2,1 (a)	69,1	0,003
	HCN 72h	37,4 ± 3,8 (ab)	32,0 ± 1,1 (a)	39,8 ± 1,9 (b)	18,9	0,017
	log ufc ₀	6,5	5,3	5,5		
Baixa	log ufc _{72h}	8,8 ± 0,2	8,5 ± 0,1	8,5 ± 0,1		
	HCN 24h	10,6 ± 0,8 (c)	5,1 ± 0,9 (b)	2,8 ± 1,2 (a)	5,9	0,0001
	HCN 48 h	21,3 ± 1,1 (b)	17,9 ± 2,0 (ab)	17,8 ± 1,1 (a)	8,7	0,039
	HCN 72 h	32,8 ± 3,5 (a)	31,7 ± 3,0 (a)	35,6 ± 1,5 (a)	1,9	0,224

En tots els temps de mostreig, la producció en els cultius sembrats a elevada concentració inicial va ser significativament ($P=0,01$) més elevada que en els cultius sembrats a baixa concentració inicial. Es va observar que hi havia una correlació significativa, positiva, entre la concentració cel·lular a la sembra i l'HCN produït a les 48 h (Rho Spearman 0,867 i $P=0,01$).

3.4.2.2 Cinètica de producció d'HCN i efecte de la temperatura

La soca EPS288 va créixer i produir HCN en tot l'interval de temperatura estudiat, des de 5 fins a 30°C. Per aquesta soca, van observar-se diferències tant en la producció d'HCN com en la velocitat de creixement en funció de la temperatura d'incubació i de la concentració cel·lular de sembra (veure les Figures 3.5, 3.6 i 3.7).

En totes les temperatures assajades l'inici de la producció d'HCN va estar associat amb el període comprès entre el final de la fase de creixement exponencial i l'inici de la fase estacionària, trofocel·lular i idiofase respectivament, independentment de la temperatura de creixement (veure les Figures 3.5 i 3.7).

A temperatures d'incubació baixes (veure la Figura 3.5) es va observar molta diferència en la cinètica de producció d'HCN i en funció de la concentració cel·lular de sembra. Cal destacar que en aquest cas l'inici de la producció en la sembra a baixa concentració inicial s'originà més tard que en la sembra a alta concentració.

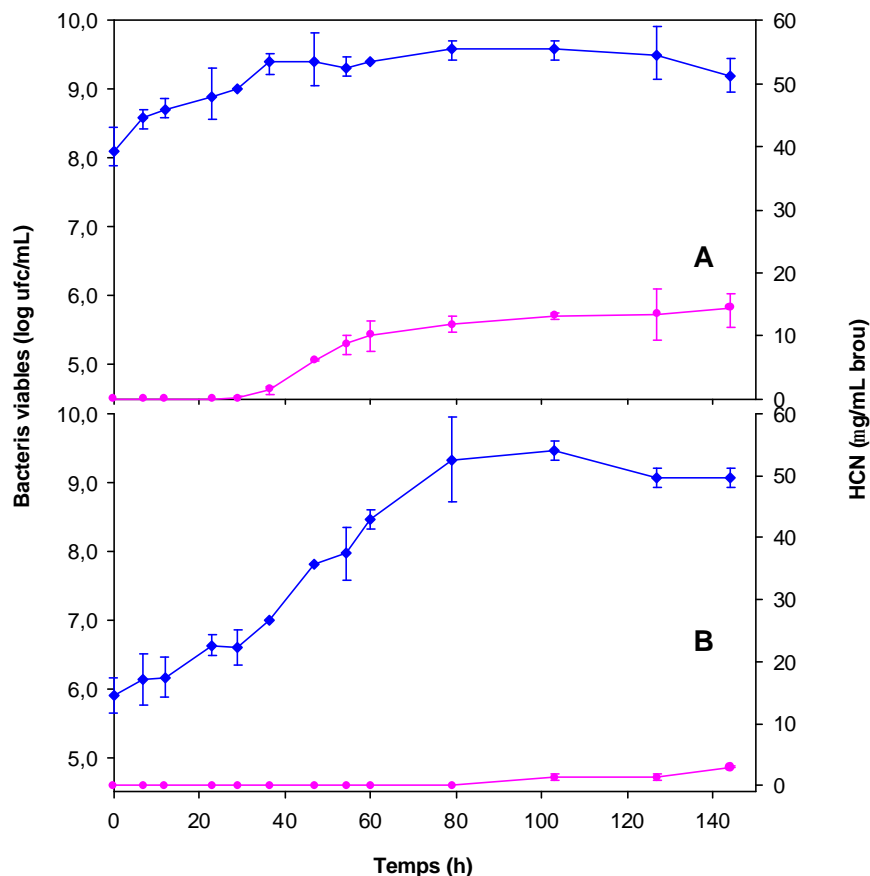


Figura 3.5. Corba de creixement \blacklozenge — \blacklozenge i de producció d'HCN \bullet — \bullet en la soca EPS288 a 5°C. Les barres mostren l'interval de confiança $P=0,05$, mitjana de tres repeticions. Inoculació a alta (A) i a baixa (B) concentració inicial.

Figure 3.5. Growth curve \blacklozenge — \blacklozenge and HCN production \bullet — \bullet by strain EPS288 at 5°C. Bars show confidence intervals at $P=0,05$ for three repetitions. Inoculation at high (A) and low (B) initial cell concentration.

En els cultius incubats a temperatures elevades (veure la Figura 3.6) aparqueren poques diferències en la cinètica de producció d'HCN entre les sèmres a alta i a baixa

concentració cel·lular inicial. Només s'observà un endarreriment en l'inici de la síntesi en els cultius sembrats a baixa concentració inicial.

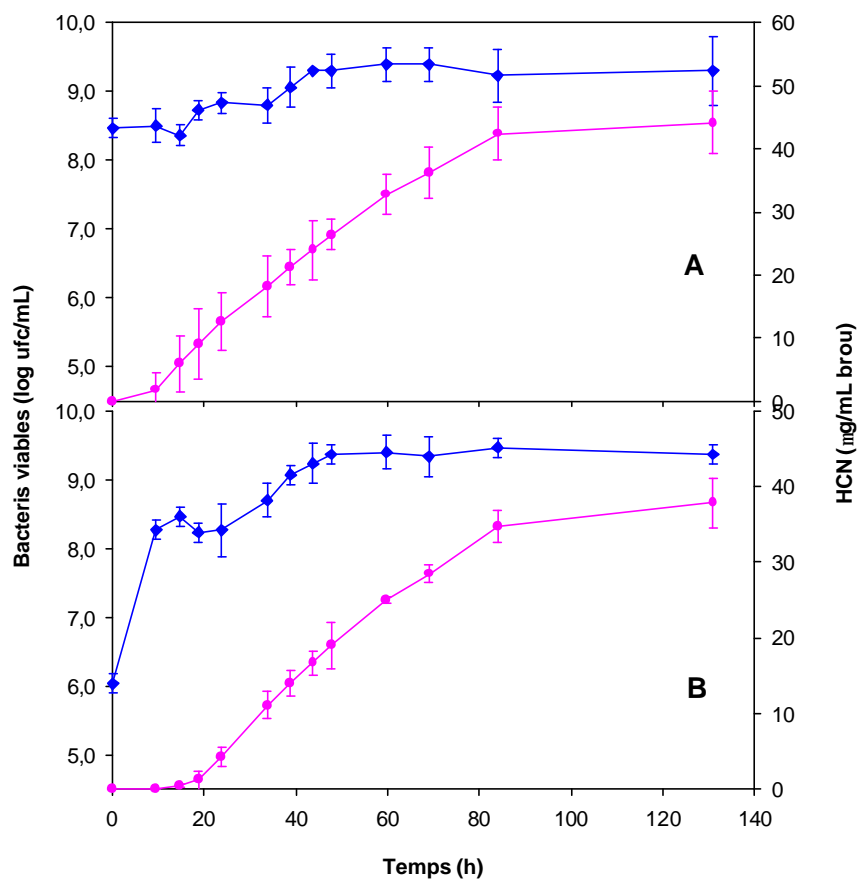


Figura 3.6. Corba de creixement \blacklozenge i de producció d'HCN \bullet de la soca EPS288 a 20°C. Les barres mostren l'interval de confiança $P=0,05$, mitjana de tres repeticions. Inoculació a alta (A) i a baixa (B) concentració inicial.

Figure 3.6. Growth curve \blacklozenge and bacterial HCN production \bullet by strain EPS288 at 20°C. Bars show confidence intervals at $P=0,05$ for three repetitions. Inoculation at high (A) and low (B) initial cell concentration.

En aquestes corbes també va comprovar-se que la màxima velocitat de producció d'HCN es concentrava en un període de temps curt coincident amb una alteració tipus diauxia en el creixement, que tenia lloc entre el final de la fase exponencial i el principi de la fase estacionària, als voltants de les 10 a 30 h (veure les Figures 3.6 i 3.7).

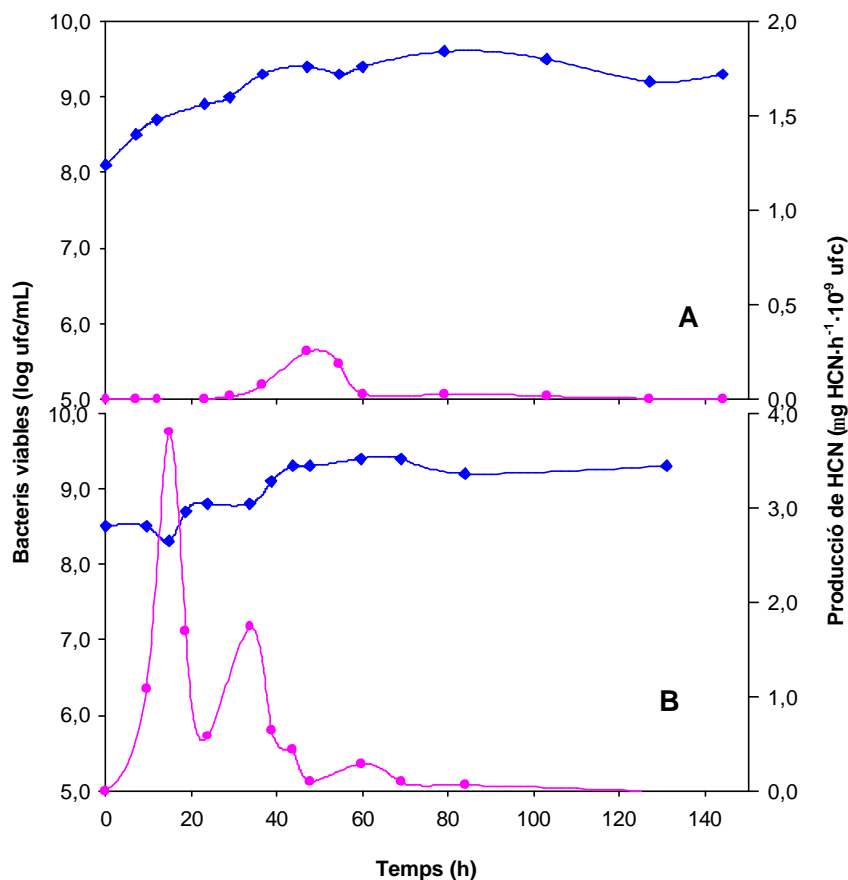


Figura 3.7. Corba de creixement \blacklozenge i velocitat específica de producció d'HCN \bullet de la soca EPS288. Incubació a 5°C (A) i a 20°C (B), en sembra a alta concentració inicial, mitjana de tres repeticions.
Figure 3.7. *P. fluorescens* EPS288 growth curve \blacklozenge and HCN production rate \bullet . Incubation at 5°C (A) and at 20°C (B) at high initial cell concentration, average of three replicates.

En l'estudi dels paràmetres de creixement que es mostra a la Taula 3.7 es va observar que, tal com era d'esperar, la μ , així com el temps de generació τ , de la soca EPS288 depenien de la temperatura.

Es va comprovar que la μ augmentà significativament amb la temperatura des de 5°C fins a 25°C, temperatura en que s'assoleix la màxima μ (0,61 h⁻¹) amb un temps de generació de 68 min.

Taula 3.7. Velocitat específica de creixement (μ) i temps de generació (τ) de la soca EPS288 a diferents temperatures. Amb lletres iguals no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey.

Table 3.7. Specific growth rate (μ) and generation time (τ) for strain EPS288 at different temperatures. Inoculation at low initial cell concentration. Values with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) with Tukey's test.

Temperatura (°C)	Paràmetres cinètics	
	μ (h ⁻¹)	τ (h)
5	0,097 a	7,2 d
10	0,24 b	2,9 c
15	0,52 c	1,3 b
20	0,54 c	1,3 b
25	0,61 d	1,1 a
30	0,53 c	1,3 b

Com es pot apreciar a la Figura 3.8 en la població cel·lular en la fase estacionària no hi va haver diferències entre els cultius sembrats a alta i a baixa concentració inicial, però sí en funció de la temperatura d'incubació. La població a la fase estacionària en els cultius sembrats a alta concentració inicial en l'interval de temperatura de 25 a 30°C va ésser significativament menor que la població assolida en l'interval de 5 a 20°C. En els cultius sembrats a baixa concentració inicial les diferències no van ser tan evidents.

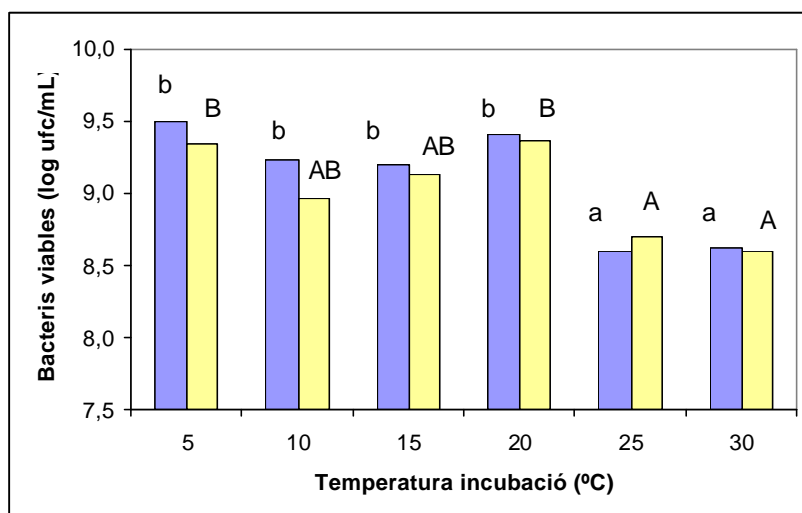


Figura 3.8. Concentració de bacteris viables a les 72 h en funció de la temperatura d'incubació. Sombres a alta ■ i a baixa ■ concentració inicial. Amb lletres iguals no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey.

Figure 3.8. Viable bacteria concentration at 72 h from starting at different incubation temperatures. High ■ and low ■ initial cell concentration. Bars with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) with Tukey's test.

A la Taula 3.8 es pot comprovar que la producció d'HCN en la soca EPS288 està clarament afectada per la temperatura d'incubació, de manera que a baixes temperatures, de 5 a 15°C, s'observa que la producció era significativament menor que a temperatures més elevades, de 20 a 30°C, independentment de la concentració cel·lular de la sembra.

Cal destacar que a elevada concentració de sembra no es van observar diferències significatives pel que fa a la producció d'HCN en l'interval de 20 a 30°C, mentre que en els cultius sembrats a baixa concentració inicial a les 72 h de la sembra la producció a 25°C era significativament més elevada que a 20 a 30°C.

Com a cas extrem, cal comentar que a baixa concentració cel·lular inicial i a temperatura d'incubació de 5°C no es va detectar producció d'HCN fins passades les 103 h des de la sembra.

Taula 3.8. HCN acumulat (μg HCN/mL de brou) a diferents temperatures d'incubació en funció de la concentració cel·lular inicial. Per cada temps, lletres iguals indica que no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey.

Table 3.8. HCN collected (μg HCN/mL broth) at diferent incubation temperatures in function of initial cell concentration. At each time there are no significant differences ($P=0,05$) with Tukey's test in temperatures with the same letter.

Sembra inicial	Temp (°C)	Temps d'incubació (h)					
		24		48		72	
Alta	5	0	a	6,2 ± 0,1	a	12,2 ± 0,6	a
	10	5,9 ± 1,5	b	12,0 ± 2,4	b	19,5 ± 1,4	b
	15	8,1 ± 0,9	b	17,2 ± 2,5	c	19,9 ± 1,8	b
	20	12,6 ± 2,0	c	26,4 ± 1,1	d	36,2 ± 1,8	c
	25	12,2 ± 2,1	c	25,0 ± 2,0	de	36,0 ± 2,1	c
	30	12,5 ± 1,0	c	29,4 ± 1,1	e	40,2 ± 2,7	c
Baixa	5	0	a	0	a	0	a
	10	0	a	0,5 ± 0,2	a	6,2 ± 0,8	b
	15	0,7 ± 0,2	ab	11,2 ± 1,6	b	14,4 ± 2,2	c
	20	4,3 ± 0,6	bc	19,1 ± 1,4	c	28,4 ± 1,1	d
	25	5,9 ± 2,0	c	19,3 ± 1,2	c	33,1 ± 1,9	e
	30	5,5 ± 1,0	c	18,3 ± 1,0	c	27,1 ± 2,2	d

També es va provar que la producció acumulada d'HCN en els cultius en els quals la sembra va ser a alta concentració cel·lular inicial era significativament ($P<0,05$) més gran que als cultius sembrats a baixa concentració independentment de la temperatura d'incubació.

Tal com es mostra a la Taula 3.9, es va constatar que la velocitat instantània de producció (dHCN/dt) i el moment en que es va assolir el valor màxim, depenien de la temperatura d'incubació i de la concentració cel·lular de sembra.

Es pot observar com a mida que augmenta la temperatura d'incubació augmenta la velocitat de producció d'HCN, tant a alta com a baixa concentració cel·lular de sembra. La velocitat de producció més elevada es va assolir als 20°C a elevada concentració de sembra i a 25°C a baixa concentració de sembra, però sense diferències significatives en l'interval 20 a 30°C.

Taula 3.9. Velocitat instantània de producció d'HCN (dHCN/dt) i temps des de la sembra en què es va assolir el valor màxim. Valors de dHCN/dt en $\mu\text{g HCN}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 10^{-9}$ ufc. Lletres iguals indica que no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey.

Table 3.9. Instantaneous HCN production rate (dHCN/dt), and time from inoculation when the maximum value was reached. Values of dHCN/dt in $\mu\text{g HCN}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 10^{-9}$ cfu. Values with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) with Tukey's test.

Temp (°C)	Concentració cel·lular inicial			
	Alta		Baixa	
	dHCN/dt	Temps (h)	dHCN/dt	Temps (h)
5	0,53 a	55	0,09 a	127
10	0,54 a	30	0,14 a	50
15	0,83 b	18	0,40 ab	40
20	1,19 c	15	0,65 bc	24
25	0,96 bc	12	0,82 c	18
30	0,95 bc	24	0,79 c	24

La velocitat de síntesi d'HCN en els cultius sembrats a elevada concentració és més elevada que en els sembrats a baixa concentració. El moment que la velocitat de síntesi va assolir el valor màxim va ésser anterior en els cultius sembrats a elevada concentració cel·lular.

Així, la temperatura d'incubació i la concentració cel·lular a la sembra són dos paràmetres que influeixen significativament en la producció d'HCN, tant en quantitat com en la velocitat de síntesi.

Adicionalment, es va avaluar si hi havia correlació entre els paràmetres cinètics i la producció total d'HCN a les 72 h, observant-se que en els cultius sembrats a baixa concentració hi havia correlacions significatives ($P=0,001$) entre μ i la producció d'HCN

a les 72 h ($r=0,925$), i entre $d\text{HCN}/dt$ i la producció a les 72 h ($r=0,925$) (veure la Figura 3.9).

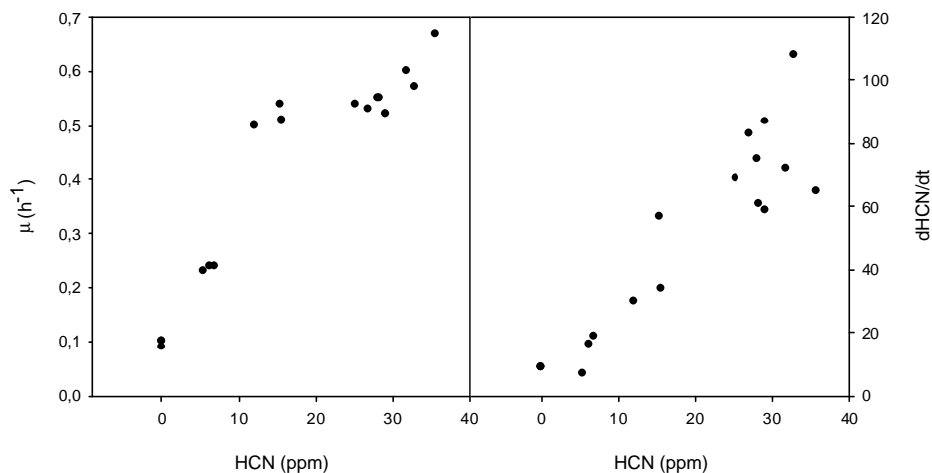


Figura 3.9. Relació entre la producció d'HCN, μ (esquerra), i $d\text{HCN}/dt$ (dreta) a baixa concentració de sembra.

Figure 3.9. Relation between HCN production, μ (left), and $d\text{HCN}/dt$ (right) in low initial cell concentration.

També a concentració de sembra elevada hi havia una correlació significativa ($P=0,001$) entre la producció d'HCN i $d\text{HCN}/dt$ a les 72 h ($r=0,794$), però en aquest cas no es va observar una correlació significativa entre μ i $d\text{HCN}/dt$.

3.4.2.3 Efecte del tipus de medi de cultiu

Utilitzant medis complexos amb diferents característiques (KB, NB, LB i PDB) i el medi mínim 21C complementat amb diferents fonts de carboni (glucosa, manitol, glicerol), es van estudiar les diferències en la producció d'HCN en funció del medi de cultiu.

A la Taula 3.10 s'aprecia que amb els medis complexos es va obtenir una producció d'HCN significativament més elevada que amb els medis mínims.

La major producció es va assolir amb el brou KB, mentre que en el medi NB va obtenir-se una elevada velocitat de producció d'HCN a les 24 h, moment en que la producció acumulada era igual al medi KB, però a partir d'aquest punt va cessar la

producció. Per altra banda, en el medi PDB tot i que la soca va créixer, no va detectar-se producció d'HCN.

La producció en els medis mínims 21C suplementats únicament amb una font de carboni va ser més baixa que amb els medis complexos. En els medis mínims no es van observar diferències significatives en funció de la font de carboni escollida durant tot el període de creixement.

Per altra banda la producció d'HCN en el medi 21C+glucosa suplementat amb glicina va ésser significativament més gran ($P > F 0,0001$) que sense glicina. Donat que la glicina és el seu precursor immediat. Segons aquests resultats es va calcular que la conversió a les 72 h era del 5%, i no va augmentar a temps més elevats.

Taula 3.10. Producció d'HCN per la soca EPS288 en diferents medis de cultiu. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre medis amb igual lletra segons la prova de Tukey. Velocitat de producció de HCN com $dHCN/dt$ ($\mu\text{g HCN}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 10^{-9}$ ufc).

Table 3.10. HCN production ($\mu\text{g HCN/mL}$ broth) by strain EPS288 in different growth media. Results are average of replicates, inside brackets the same letter have no significant differences ($P=0,05$) with Tukey's test. HCN production rate as $dHCN/dt$ ($\mu\text{g HCN}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 10^{-9}$ cfu).

Medi	Producció d'HCN (ppm)				Creixement	
	24 h	48 h	72 h	dHCN/dt	log ufc ₀	log ufc _{72h}
21C Glicerol	0,3 (a)	7,7 (a)	9,9 (a)	0,30	7,4	9,3
21C Manitol	2,4 (a)	9,2 (ab)	11,1 (a)	0,40	7,6	9,1
21C Glucosa	2,8 (a)	8,6 (ab)	11,5 (a)	0,33	7,7	6,2*
21C Gluc+Glicina	4,1 (a)	15,3 (b)	26,0 (b)	0,24	7,9	9,3
KB	20,5 (c)	51,0 (e)	99,6 (d)	1,73	8,1	9,4
LB	12,9 (b)	37,0 (d)	54,8 (c)	1,27	7,7	9,5
NB	22,9 (c)	24,4 (c)	24,5 (b)	3,68	7,8	8,7
PDB	nd	nd	nd	nd	7,7	9,0

nd: no detectat/not detected; (*) log ufc (48h): 9,2

També, la velocitat de producció d'HCN va ésser més elevada en els medis complexos que en els mínims. El valor més elevat es va assolir amb el medi NB però la producció es va concentrar en un curt espai de temps. La major producció en medi KB respecte al medi LB es pot atribuir a la major velocitat de producció ja que la durada de la cianogènesi va ésser semblant (no es mostra). La glicina, tot i que condueix a una major producció d'HCN, no va provocar un augment de la velocitat de síntesi.

La concentració cel·lular final va ésser semblant en tots els medis, llevat del medi 21C+glucosa, on es va observar una disminució de la població a partir de les 48 h, i en el medi NB que va tenir una població final més baixa.

3.4.3 Comparació de la producció d'HCN entre les soques de *P. fluorescens* EPS288 i CHA0

La capacitat de producció d'HCN de la soca EPS288 es va comparar amb la soca de referència CHA0. En aquesta darrera la producció d'HCN s'ha demostrat que està implicada en el biocontrol d'alguns patògens. Per això, conèixer la seva producció és d'interès per tal d'avaluar el potencial de la soca EPS288 com a agent de biocontrol.

A la Taula 3.11 s'observa que la soca EPS288 va produir més quantitat d'HCN en el medi de Castric que la CHA0 durant tot el període de creixement. A partir de les 78 h no es va detectar més producció en cap de les dues soques. Si s'expressa la producció com a velocitat específica de síntesi ($\mu\text{g HCN}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ufc}^{-1}\cdot 10^{-9}$), el valor màxim en la EPS288 va ésser quasi vint vegades superior al de la CHA0.

Taula 3.11. Producció d'HCN ($\mu\text{g HCN/mL}$ brou), velocitat específica de síntesi $-\text{VES}_{\text{HCN}}$ ($\mu\text{g HCN}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 10^{-9}$ ufc) i població de les soques EPS288 i CHA0 crescudes en el medi de Castric.

Table 3.11. HCN production ($\mu\text{g HCN/mL}$ broth), maximum specific HCN production rate ($\mu\text{g HCN}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 10^{-9}$ cfu) and bacterial density of strains EPS288 and CHA0 in Castric growth media.

	Producció d'HCN			VES_{HCN}	Creixement	
	24 h	48 h	78 h		log ufc ₀	log ufc ₆₀
EPS 288	1,0	22,4	22,2	38,2	6,6	7,5
CHA0	0,2	17,9	18,9	2,2	6,3	8,8
t-Student	<0,001	<0,001	0,04			

La cianogènesi per ambdues soques va tenir lloc durant un curt període de temps, abans i després del qual la producció d'HCN va ésser nul·la. La soca EPS288 va assolir la màxima producció a les 30 h i a partir de les 48 h ja no hi havia més producció, mentre que a la soca CHA0 la màxima velocitat de producció va ésser a les 24 h i a partir de les 48 h pràcticament també va cessar.

3.4.4 Estudi de l'efecte del medi amb un sistema automatitzat de cultiu

Per aquest experiment, la soca EPS288 va incubar-se en diferents medis de cultiu utilitzant el lector automàtic Bioscreen i va créixer en tots els medis assajats. A la Figura 3.10 es mostren els perfils de les corbes de creixement obtingudes amb el lector Bioscreen.

Es va comprovar que les corbes de creixement tenien diferents perfils segons si els medis eren complexos o mínims i també es diferenciaven segons la font de carboni, com es mostra a la Figura 3.10. Es van observar comportaments diferents en funció del medi de cultiu tant en la durada de la fase de latència, com en la velocitat de creixement i en el creixement màxim assolit a les 120 h de la sembra.

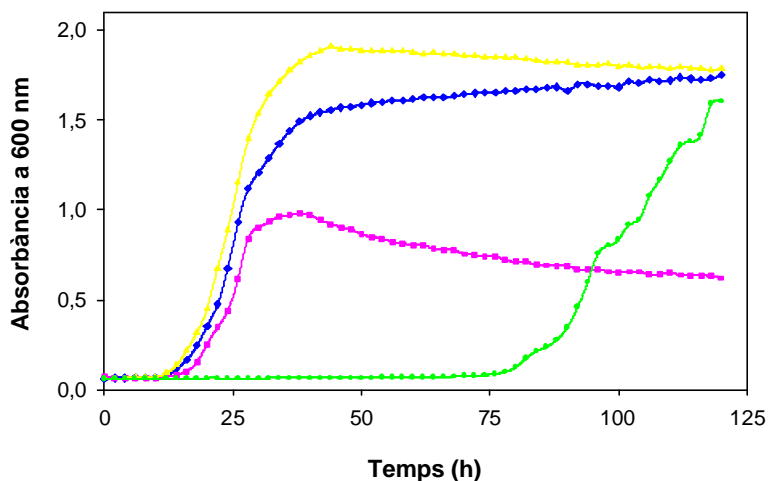


Figura 3.10. Corbes de creixement de la soca EPS288 obtingudes amb el bioscreen. Efecte de la font de carboni amb el medi 21C. Glucosa —◆—; glucosa + arginina —▲—; glucosa + lactosa —■—; fructosa —■—.

Figure 3.10. Growth curves monitored with bioscreen of strain EPS288. Effect of carbon source in 21C growth media. Glucose —◆—; glucose + arginine —▲—; glucose + lactose —■—; fructose —■—.

A la Taula 3.12 es presenten els paràmetres cinètics de les corbes de creixement obtingudes en el seguiment de cultius de la soca EPS288 en diferents medis. S'indica també si es va detectar producció d'HCN en cada un dels medis assajats. Quant a la fase de latència, es pot observar que les durades més curtes van tenir lloc en els medis complexos KB i LB. Entre els medis mínims 21C, el complementat amb àcid glutàmic és el que té la fase de latència més curta, mentre que la més llarga correspon al medi 21C suplementat amb fructosa com a font de carboni i amb fructosa+glicina.

L'addició de ferro fa disminuir la fase de latència en el medi GA. També l'addició d'aminoàcids fa disminuir la fase de latència, doncs, els medis que, a més de la font de

carboni, contenen un aminoàcid provoquen un temps de latència inferior, produint-se l'efecte més marcat amb els aminoàcids arginina i asparagina.

Taula 3.12. Paràmetres cinètics i producció d'HCN en cultius de *P. fluorescens* EPS288 monitoritzats amb el sistema Bioscreen.

Table 3.12. Kinetic parameters and HCN production of *P. fluorescens* EPS288 cultures monitorized with Bioscreen.

Medi de cultiu	Fase de latència (h)	μ (x 100 h ⁻¹)	t (h)	A _{600max}	HCN
21C +Acid Glutàmic	8,3	16,8	4,1	1,13	+
21C + Arabinosa	18,7	8,0	8,7	1,61	+
21C + Fructosa	70,3	7,7	9,0	1,52	+
21C + Fructosa + Arg.	20,7	11,4	6,0	1,49	+
21 C + Fructosa + Asn	9,0	2,4	29,0	1,66	-
21 C + Fructosa + Gly	55,0	5,7	12,3	1,52	+
21 C + Glicerol	25,3	6,0	11,5	1,44	+
21 C + Glicerol + Arg.	13,3	13,8	5,0	1,60	+
21 C + Glicerol + Asn.	8,3	29,1	2,5	1,49	-
21 C + Glicerol + Gly.	20,3	6,6	10,5	1,51	+
21 C + Glucosa	13,7	16,8	4,0	1,65	+
21 C + Glucosa + Arg.	12,0	15,8	4,5	1,85	+
21 C + Glucosa + Gly.	14,3	15,1	4,5	1,79	+
21 C + Glucosa+lactosa	15,3	14,6	4,7	0,92	-
21 C + Manitol	17,0	11,0	6,3	1,64	+
21 C + Manitol +Arg.	14,7	7,5	9,2	1,76	+
21 C + Manitol. + Asn.	8,3	30,7	2,3	1,74	+
21 C + Manitol + Gly.	17,3	9,1	7,5	1,76	+
21 C + Sacarosa	17,3	13,1	5,3	1,48	+
21 C + Xilosa	46,7	3,5	19,5	0,52	-
GA	9,3	12,8	5,5	0,56	-
GA + Fe	7,3	11,5	6,0	0,98	-
KB	4,7	13,1	5,3	1,33	+
LB	6,3	21,1	3,3	1,08	+
PDB	10,0	13,9	5,0	1,35	-

Els temps de generació menors, que corresponen a velocitats de creixement més elevades, es van assolir en els medis mínims 21C amb manitol i glicerol com a font de carboni i suplementats amb asparagina. Entre els medis complexos el temps de generació en medi LB va ésser més baix que en KB. Els temps de generació més elevats es van assolir amb el medi 21C amb fructosa, xilosa i glicerol com a fonts de carboni.

Finalment, la màxima biomassa, mesurada com a absorbància a 600 nm, va assolir-se amb els medis mínims 21C que tenien com a font de carboni glucosa o manitol i que estaven suplementats amb un aminoàcid com arginina o glicina, mentre que amb els

medis complexos la biomassa final va ser menor. Els mínims rendiments van assolir-se amb el medi 21C suplementat amb xilosa i amb el medi GA, en el qual l'addició de ferro va fer augmentar la biomassa final.

Es pot observar que suplementar el medi 21C+glucosa amb lactosa (sucre que no utilitza la soca EPS288) disminueix les aptituds de creixement de la soca i la biomassa, fa augmentar el temps de latència i el temps de generació, i fa que la producció d'HCN sigui inexistent.

La combinació de fonts de carboni com glucosa, manitol, glicerol, i l'addició d'aminoàcids com asparagina, arginina, o àcid glutàmic, haurien d'escollir-se com a punt de partida per la formulació del medi per la producció en massa de la soca EPS288.

Finalment, es mostra que la síntesi d'HCN es va confirmar en tots els medis assajats llevat dels medis en que hi va haver menys creixement, com són els medis 21C suplementats amb xilosa i glucosa+lactosa, o amb medi PDB. Tampoc es va detectar producció d'HCN en els medis formulats amb asparagina com GA i GA+Fe, o els 21C suplementats amb asparagina amb l'excepció de quan la font de carboni era manitol.

3.5 Discussió

Inicialment, per poder estudiar els paràmetres que afecten a la cianogènesi en soques de bacteris antagonistes, es va idear un sistema que diferia dels descrits fins el moment (Wissing, 1974; Castric i col., 1979 i 1981; Bakker i Shippers, 1987; Castric, 1994) i que permetia estudiar la dinàmica de creixement dels cultius i de la producció d'HCN. Els sistemes descrits es basen en utilitzar cultius en batch on s'incuben concentrats de bacteris pràcticament sense creixement de la població i la biomassa roman constant en el temps. Aquests sistemes permeten determinar fàcilment la producció d'HCN pel bacteri però no aporten informació de la dinàmica del cultiu.

En el sistema que va proposar-se per la realització del present treball es pot seguir simultàniament el creixement i la producció d'HCN utilitzant materials d'incubació habituals en el laboratori. Per tal d'atrapar tot l'HCN produït durant el temps d'incubació del cultiu es va tenir en compte que a part de l'HCN hi ha altres substàncies produïdes pel cultiu, com el biòxid de carboni, que també s'absorbeixen en la solució alcalina. Quantitativament, el CO_2 , és la substància que s'absorbeix més i prové principalment de l'aire que s'insufla dins el sistema -unes 360 ppm (mL/m^3)- i del que es produeix per la respiració del bacteri. Aquest fet condiciona la concentració mínima de NaOH que ha de tenir la solució absorbidora.

El seguiment de la concentració de HCN recollit en la trampa absorbidora ha de reflectir la dinàmica de l'evaporació de l'HCN des de la solució tamponada, o del cultiu. Calia però validar el seu funcionament i determinar quins eren els paràmetres a controlar.

Els tres paràmetres considerats en la validació del sistema van ser, el cabal d'aire que circula per l'erenmeyer, la temperatura d'incubació i el pH del medi. Aquestes són variables físiques que poden afectar en el procés d'evaporació de l'HCN i de transport cap a la trampa absorbidora, i que també afecten al creixement dels bacteris.

Aquestes variables tenen una influència significativa en la velocitat d'evaporació i en el nostre experiment de validació s'ha demostrat que tant la temperatura com el cabal d'aire tenen un efecte important en l'evaporació de l'HCN, de manera que un augment de la temperatura o del cabal estimulen la seva evaporació des de l'erenmeyer on hi ha el cultiu.

Els resultats obtinguts coincideixen amb les hipòtesis de partida en el sentit que una major pressió de vapor, que augmenta de manera exponencial en augmentar la temperatura, farà que augmenti la proporció d'HCN en fase gasosa i que un major cabal d'aire permetrà una evacuació d'una massa més gran de vapor. El pH també té un efecte significatiu però amb menor pes. Un augment del pH provoca una disminució de la velocitat d'evaporació de l'HCN. Això s'explica perquè a pH elevat augmenta la proporció d'HCN en forma ionitzada que no és volàtil. El pK_a de l'HCN és 9,4; per tant en l'interval estudiat (pH=6 a 8) està majoritàriament en forma molecular (aprox 99,9 % a pH=6 i el 90 % a pH=8). D'aquesta manera, era previsible que en els cultius de bacteris que es van fer, habitualment tamponats dins aquest rang de pH, el comportament fos molt similar al que es va observar en la validació del sistema.

La interacció observada entre pH i temperatura indica que l'efecte del pH es manifesta amb més intensitat a temperatura elevada, i això es justifica per l'augment exponencial de la pressió de vapor amb la temperatura. Demostrat l'efecte de les variables pH, temperatura i cabal d'aire, cal controlar-les per tal que la cinètica de recollida d'HCN del cultiu bacterià amb aquest sistema es correlacioni fidelment amb la seva producció.

A més, la temperatura d'incubació també té un efecte important en la velocitat de creixement dels microorganismes. Degut al seu efecte estimulador de l'evaporació del HCN, es va creure convenient avaluar si en un sistema *in vivo* els canvis en la temperatura d'incubació afectarien la recollida d'HCN i la seva correlació amb la velocitat de producció pel bacteri. Per poder avaluar aquesta hipòtesi es va estudiar si el cabal d'aire afectava a la producció/recollida d'HCN en un sistema *in vivo* a diferents temperatures d'incubació. Si hi hagués alguna variació en la velocitat de recollida de l'HCN produït per una soca bacteriana en canviar el cabal d'aire o la temperatura d'incubació s'hauria de tenir present en el disseny dels experiments a realitzar amb el bacteri. En les proves realitzades va demostrar-se que l'aireig no afectava a la recollida de HCN a la trampa absorbidora i que no feia disminuir la producció, per inhibició de la cianogènesi.

Castric i col. (1981) havien observat que la producció d'HCN augmentava en condicions de poc aireig i també Castric (1994) en afegir oxigen a un cultiu havia comprovat que cessava la producció. És per això que es va estudiar l'efecte del cabal d'aire introduït al sistema.

S'ha observat que no hi ha diferències significatives ni en la velocitat de creixement del bacteri *P. fluorescens* EPS288, ni en la d'evaporació d'HCN en canviar el cabal que es fa circular entre 0,5 i 1,0 L/min en l'interval de temperatura d'incubació entre 10 i 25°C. El que sí canvia significativament és la quantitat d'HCN produïda en funció de la temperatura d'incubació.

L'aireig a 0,5 L/min dóna lloc a un temps de residència de l'aire de dins els erlenmeyers utilitzats pels cultius de quasi vint segons, renovant-se l'aire més de tres vegades cada minut, la qual cosa fa pensar que el factor limitant en la recollida de l'HCN a la trampa absorbidora és la producció d'HCN pel cultiu. Ja que la transferència entre les fases líquida i gasosa és pràcticament instantània (Prats, 1998).

El fet que el cabal d'aire aplicat al sistema de recollida no afectés al creixement del cultiu o a la producció d'HCN independentment de la temperatura d'incubació indica que la velocitat d'evaporació de l'HCN és igual o superior a la velocitat de producció d'HCN per la soca EPS288 en aquest marge de temperatures. Per la qual cosa és d'esperar que la cinètica de recollida de l'HCN a la trampa sigui un reflex de la producció pel cultiu.

Les pèrdues per evaporació al cabal de 0,5 L/min van ser comparables a les obtingudes per Castric (1977), 20 µL/h, amb un muntatge similar. Per això es va escollir el cabal d'aire a 0,5 L/h ja que permet recollir quantitativament l'HCN produït minimitzant alhora l'evaporació de l'aigua del brou.

Finalment, podem concloure que el sistema de recollida d'HCN dissenyat per aquest treball reflecteix la seva producció pels bacteris i que el cabal d'aire de 0,5 L/min és adequat per la realització dels seguiments.

S'havia especulat que la producció d'HCN per la soca EPS288 podria estar relacionada amb l'antagonisme que desenvolupa enfront *S. vesicarium* i també enfront altres patògens (Bonaterra, 1997). Aquesta soca aplicada com a tractament en processos de frigoconservació permetia reduir substancialment la incidència de pèrdues en postcollita produïdes per podridures fúngiques (Francés, 2000). Per això, l'estudi de la producció d'HCN en el nostre treball es va realitzar amb aquesta soca.

El coneixement de les condicions de producció de metabòlits secundaris pel bacteri agent de biocontrol és necessari per tenir una aproximació de les variables a tenir en compte en l'aplicació de l'agent de biocontrol en condicions reals (Cook, 1993).

Per tal d'establir les condicions òptimes per la producció d'HCN, es varen estudiar tres variables culturals com la temperatura d'incubació, la concentració cel·lular inicial, i la composició del medi de cultiu.

Donada la variabilitat que s'observa en la producció de metabòlits secundaris, entre ells l'HCN, i la quantitat de factors que poden influir-hi, es va optar per fixar-ne el major nombre possible. Tot això tenint present que aquest pot ser un dels motius pels quals la bona reproductibilitat del funcionament de les soques en experiments de biocontrol *in vitro* no s'observi en els assaigs *in vivo* en condicions no controlades. Cal recordar que la inconsistència dels resultats en assaigs a camp és un dels principals problemes de l'aplicació dels agents de biocontrol (Weller, 1988).

La quantitat de bacteris influeix en l'efectivitat de l'agent de biocontrol. S'ha documentat que existeix una correlació entre la concentració relativa d'agent antagonista i patògen diana, amb la capacitat de biocontrol (Bull i col., 1991; Raaijmakers i col., 1995 i 1998; Larkin i Fravel, 1999), que ha estat demostrada també per la soca EPS288 (Montesinos i Bonaterra, 1996).

En la majoria dels treballs on s'estudia la producció d'HCN, la sembra es realitza a elevada concentració cel·lular (Michaels i Corpe, 1965; Castric, 1975 i 1977; Castric i col., 1979 i 1981; Askeland i Morrison, 1983; Voisard i col., 1989; Laville i col., 1992; Flaishman i col., 1996), però en pocs casos s'inicia el seguiment a baixa concentració cel·lular (Wissing, 1974). No s'ha trobat cap referència on es realitzi una comparació de la producció d'HCN en funció de la concentració cel·lular a la sembra del cultiu. Aquest aspecte és important perquè en condicions reals de biocontrol, es considera que la concentració inicial d'aplicació del bacteri tindrà importància en la supervivència de la soca i en la seva capacitat de controlar al patògen diana (Weller, 1988; Cook, 1993).

Per avaluar la variabilitat en la producció d'HCN *in vitro* es van fer tres cinètiques independents de creixement i recollida de l'HCN produït a la temperatura de 25°C, amb sembres a alta i a baixa concentració cel·lular inicial. En aquestes proves es va observar que hi havia diferències tant en el creixement com en la quantitat produïda i que eren més grans en els moments inicials del cultiu però disminuïen a mida que els cultius envellien. També es va comprovar que la producció d'HCN es correlacionava amb la concentració cel·lular a la sembra. La variabilitat en la producció de metabòlits secundaris *in vitro* ha estat descrita per altres autors (Gurusiddaiah i col., 1986), però no s'havia correlacionat amb la concentració cel·lular a la sembra.

És possible que la major producció d'HCN observada en augmentar la concentració cel·lular de sembra pugui ajudar a explicar la relació dosi-resposta que existeix entre la soca EPS288 i el biocontrol de les infeccions per *S. vesicarium* (Montesinos i Bonaterra, 1996). Així es podria disminuir la concentració d'aplicació de l'agent de biocontrol estimulant la producció del metabòlit secundari actiu en el moment de la preparació de l'inòcul.

Un dels objectius de l'estudi de la producció d'HCN per la soca EPS288 era determinar el marge de temperatures en que era capaç de créixer i produir-ne. L'ús d'agents de biocontrol en postcollita o a camp implica que han d'ésser actius en un marge de temperatures per sota de 4°C, que són les habituals en les cambres de frigoconservació, fins a 25-30°C que es poden trobar a camp. La temperatura afecta tant la velocitat de creixement dels microorganismes com a la producció de metabòlits. De fet, s'ha demostrat que la producció d'HCN per bacteris disminueix en allunyar-se de la temperatura òptima tant per defecte com per excés (Castric, 1977; Askeland i Morrison, 1983).

La correlació existent entre la concentració cel·lular a la sembra i la producció d'HCN va permetre descartar l'efecte de la temperatura d'incubació en les diferències entre repeticions, en el rang estudiat. Les repeticions es van fer en un incubador que tenia un marge de variació de 4°C en la temperatura de consigna. Es pot creure que aquesta oscil·lació era la causa però, posteriorment es va observar que no hi havia diferències significatives en creixement i producció d'HCN en el rang de 20 a 30°C per la soca EPS288.

A les corbes de creixement de la soca EPS288 va observar-se que el moment de màxima producció d'HCN coincidia amb una alteració de la dinàmica de creixement donant lloc a una corba tipus diauxia, que també havia estat observada per Askeland i Morrison (1983) en la corba de creixement d'una soca de *P. fluorescens*. Aquest comportament es va observar en major o menor mesura en tot el rang de temperatura estudiat –de 5 a 30°C–, tot i que variaven la velocitat de creixement, l'inici de la síntesi d'HCN, i la quantitat produïda.

Aquesta alteració correspon al final de la fase de creixement exponencial i inici de la fase estacionària, independentment de la temperatura, i es podria descriure com l'inici del metabolisme secundari que es desencadena quan s'acaba la fase de creixement actiu i s'inicia la fase estacionària (Castric, 1975; Castric i col., 1979; Askeland i

Morrison, 1983). Els canvis que tenen lloc en aquesta etapa són deguts a la producció de metabòlits secundaris o a les adaptacions metabòliques necessàries per créixer en presència d'HCN o per eliminar-lo, i són els responsables del canvi observat en la cinètica de creixement del cultiu (Knowles, 1976).

Es va comprovar que la temperatura d'incubació tenia un efecte significatiu en la producció d'HCN, en la velocitat de creixement i en la concentració cel·lular a la fase estacionària de la soca EPS288. Aquesta soca va produir HCN en tot l'interval estudiat però en major quantitat a temperatures elevades. La temperatura òptima de producció es va situar entre 20 i 25°C, en aquest interval també la velocitat específica de creixement era màxima. Aquest fet també va ésser observat per Castric (1975) que va trobar una temperatura òptima en *P. aeruginosa* per sobre i per sota de la qual la producció era menor.

Aquest fenomen es deu al fet que la temperatura òptima de creixement pot variar en funció de la zona on s'ha aïllat la soca. En *P. fluorescens* aïllades d'aigües de riu i residuals, la màxima producció d'HCN tenia lloc en l'interval de 25 a 30°C (Askeland i Morrison, 1983) i a 35°C en *P. aeruginosa* aïllades de cremades en humans (Castric, 1975).

La correlació observada entre la velocitat de creixement (μ) i la producció d'HCN permet explicar que quan més ràpidament creix un bacteri, abans s'assoleix la concentració necessària per iniciar la síntesi d'HCN, d'acord amb la regulació d'un sistema sensible al nivell poblacional (Laville i col., 1992; Gaffney i col., 1994).

S'ha observat que la producció d'HCN en els cultius sembrats a alta concentració inicial és més elevada que en els cultius sembrats a baixa concentració inicial per totes les temperatures d'incubació. Es confirma així que l'efecte de la concentració cel·lular en la producció d'HCN és independent de la temperatura d'incubació en el rang de temperatures estudiat. Això indica que la concentració d'aplicació de la soca antagonista pot condicionar el seu funcionament quan el mecanisme sigui la producció d'HCN, com ja s'havia observat en EPS288 que a concentracions més elevades és capaç de produir més quantitat d'HCN i de fer-ho abans.

Un altre aspecte que condiona el creixement dels agents de biocontrol és la formulació del medi de cultiu, el qual afecta al creixement, als productes finals i a l'eficiència de l'agent de biocontrol (Kisaalita i col., 1993; Slininger i col., 1995 i 1996).

En aplicar l'agent de biocontrol a una collita, cal assegurar que hi hagi una població bacteriana suficient i que aquesta a més sigui activa en la producció del metabòlit desitjat. A més, la comercialització dels agents de biocontrol requereix el desenvolupament d'una formulació que permeti la producció en massa i que sigui efectiva en aplicar-se (Slininger i col., 1996).

Mitjançant proves nutricionals s'havia establert el patró de la soca EPS288 quant a la seva capacitat d'utilitzar 96 fonts de carboni diferents (Bonaterra, 1997). Aquesta soca es capaç d'utilitzar totes les fonts de carboni assajades en aquestes proves llevat de la lactosa. És per això que en el nostre treball s'ha avaluat la influència del medi de cultiu en la producció d'HCN.

En medis complexos es va obtenir una major quantitat d'HCN que en els medis mínims suplementats amb font de carboni. La producció d'HCN va ésser superior en el medi KB que en LB. Michaels i Corpe (1965) també havien observat un comportament similar en *C. violaceum* on la producció en medi complex era més elevada que en mínim i en peptona millor que en extracte de llevat, que semblava inhibir la producció. Es pot suposar que la major producció en medis complexos és deguda a que hi ha una major disponibilitat de nutrients que afavoriran un creixement més ràpid i una major quantitat de metabòlits i precursors que es poden transformar en HCN.

No es van observar diferències en la producció d'HCN entre les fonts de carboni glucosa, glicerol i manitol. Però es va confirmar que l'addició de glicina feia augmentar-ne la producció. Es coneix que la glicina és el precursor immediat i que fa augmentar la producció d'HCN en *C. violaceum* (Michaels i Corpe, 1965), en *P. aeruginosa* (Castric, 1975 i 1977), i en *P. fluorescens* (Askeland i Morrison, 1983; Laville i col., 1998).

La conversió de la glicina a HCN ha estat en aquest cas del 5% a les 90 h, lluny de la conversió 1:1,09 descrita per Wissing (1974) o 1:1 de Castric (1977). La diferència entre aquests rendiments de transformació i l'obtingut en el nostre treball es justifica pel fet que en el nostre estudi la glicina es va afegir en un cultiu en fase de creixement exponencial i part de la glicina pot haver-se consumit en l'augment de biomassa mentre que en els estudis descrits la glicina es va afegir a un concentrat de bacteris en fase estacionària. També el fet que en el medi 21C només hi havia NH_4^+ i NO_3^- com a fonts de nitrogen i que la concentració cel·lular en el cultiu suplementat amb glicina era major que sense, indicaria que part de la glicina es va invertir en el creixement del cultiu.

En l'assaig de monitorització del creixement realitzat amb l'aparell Bioscreen no es va detectar producció d'HCN en els medis complementats amb asparagina, com GA i altres. L'asparagina està descrita com el producte final d'una de les rutes metabòliques d'eliminació de l'HCN en *Chromobacterium violaceum* (Knowles, 1976), i aquest fet suggereix que aquest aminoàcid pot inhibir la cianogènesi. En aquest sentit Castric (1977) havia observat que l'asparagina feia disminuir la producció d'HCN en un 60%.

No es va observar l'efecte estimulador del ferro en la producció d'HCN en medi GA, ja que tampoc no es va detectar producció en el medi GA+Fe, malgrat que l'efecte estimulador del ferro està ben descrit en cultius *in vitro* en medis definits (Castric, 1975, Castric i col., 1979; Askeland i Morrison, 1983) o en biocontrol per CHA0 (Keel i col., 1989). L'addició de ferro en GA sí que va estimular el creixement de la soca EPS288 ja que es va observar una disminució de la fase de latència i un augment del rendiment cel·lular final. Creiem que l'efecte inhibidor de l'asparagina en la producció d'HCN pot haver emmascarat l'estimulació pel ferro.

En medi PDB no es va detectar producció d'HCN tot i que es va assolir un creixement comparable als altres medis. Possiblement alguna substància inhibeix la producció o bé l'elevada quantitat de glucosa present al medi impedeix veure'n la producció per la seva conversió en cianhidrina (Figueira i col., 1995), ja que amb la nostra tècnica de recollida només es pot quantificar el que està lliure en forma molecular. Aquest efecte també pot explicar que no es detecti producció en el medi GA, en l'assaig al toc, ja que està descrit que la presència de glucosa pot interferir en aquesta determinació per la formació de cinhidrines (APHA, 1992).

En les proves de monitorització també es va estudiar la capacitat de creixement de la soca EPS288 en diferents medis. En aquestes condicions es poden obtenir altres paràmetres que descriuen el creixement, com són el temps de latència i la velocitat específica de creixement (μ). Les fases de latència més curtes van tenir lloc amb els medis complexos KB i LB, la qual cosa era d'esperar car són medis rics en nutrients i a més el creixement de l'inòcul inicial s'havia realitzat en medi complex LB.

Malgrat aquest fet, la velocitat de creixement i el rendiment cel·lular més elevats es van obtenir majoritàriament en medis mínims que tenen glucosa o manitol com a fonts de carboni i complementats amb aminoàcids com asparagina, arginina o glicina. En base a aquestes dades la producció en massa de la soca EPS288 hauria de realitzar-

se en un medi mínim de sals complementat amb font de carboni com glucosa o manitol i amb un aminoàcid com asparagina, arginina o glicina.

Cal notar que el temps de generació determinat a partir dels cultius en matrassos erlenmeyer no coincideix amb l'obtingut amb el sistema automatitzat bioscreen. Això es pot explicar perquè en un cas es mesura el creixement cel·lular com bacteris viables (ufc/mL de brou) i en l'altre com absorbància a 600 nm (A_{600}). Aquest paràmetre determina el nombre total de partícules i no diferencia entre cèl·lules vives i mortes. En general, hi ha una bona correlació entre la lectura de l'absorbància i la concentració de viables, però només es dóna en solucions diluïdes ($A_{600} \approx 0,15$). En els cultius monitoritzats amb l'aparell Bioscreen en el nostre experiment, l'absorbància del tram de creixement exponencial lineal podia arribar fins a valors de 0,5 o 1,0 UA, la qual cosa va provocar una distorsió en la correlació entre concentració de viables i absorbància que justifica la desviació esmentada en el càlcul de la velocitat específica de creixement.

La soca CHA0 va utilitzar-se com a referència per comparar la producció d'HCN amb la soca EPS288, donat que la producció d'HCN és d'interès per tal d'avaluar el potencial d'aquesta darrera soca com a agent de biocontrol. A la soca *P. fluorescens* CHA0 s'ha descrit que l'HCN és, en gran part, responsable de l'activitat antagonista contra la podridura negra d'arrel de tabac (Voisard i col., 1989; Keel i col., 1989; Laville i col., 1992 i 1998).

La producció de la soca CHA0 no s'ha comparat directament amb dades bibliogràfiques de producció, car en molts treballs la quantificació de l'HCN es realitza en el brou on ha crescut la soca (Voisard i col., 1989; Laville i col., 1992 i 1998; Flaishman i col., 1996) i no en la solució absorbidora, o també les condicions de creixement són diferents. Com a exemple es pot destacar que la producció de la soca CHA0 a les 48 h en el nostre experiment va ésser nou vegades superior a l'obtinguda per Voisard i col. (1989) però en aquell cas la incubació s'havia fet a 30°C i l'HCN era l'acumulat en el medi després de créixer 48 h en un cultiu tancat. També, les condicions d'agitació afecten a la producció de HCN tal com havia observat Castric (1975), on la producció d'HCN en un cultiu agitat era tres vegades superior a la del mateix cultiu sense agitar.

En el nostre estudi la soca EPS288 va produir més HCN i més ràpidament que la soca CHA0 en medi de Castric. Per altra part, si s'expressen els resultats com a activitat específica en $\mu\text{g HCN}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 10^{-9}$ ufc, la soca EPS288 va produir deu vegades més HCN que la soca CHA0, demostrant així que la capacitat de la soca EPS288 per produir HCN és molt elevada. Tot i això, no es pot concloure que la soca EPS288 sigui millor productora que la soca CHA0 en qualsevol medi i a qualsevol temperatura. Caldria avaluar l'efecte de la temperatura i del medi de cultiu en la soca CHA0 de la mateixa manera que es va avaluar per la soca EPS288.

La soca EPS288 que havia estat seleccionada com la millor candidata a agent de biocontrol vers *S. vesicarium* és capaç de produir HCN en diversos medis, i en medi de Castric de produir-ne més que l'agent de biocontrol CHA0. També, és capaç de créixer ràpidament en medis de diversa composició. Tant la temperatura com la concentració cel·lular afecten a la producció d'HCN, de manera que un ampli marge de temperatures en què se n'assegura la síntesi. Cal però tenir present que per confirmar la implicació de l'HCN en l'antagonisme observat *in vitro* per la soca EPS288 caldria disposar de mutants no productors.

3.6 Conclusions

Concloem l'estudi de la producció d'HCN i de la cinètica de creixement de la soca EPS288 amb les següents afirmacions:

- La temperatura i el cabal d'aire són dues variables que afecten a l'evaporació de l'HCN des del cultiu a la trampa absorbidora de gasos. Un cabal d'aire de 0,5 L/min permet seguir amb fidelitat la seva producció per cultius de bacteris en les condicions que s'ha realitzat el present treball.
- La concentració cel·lular a la sembra, la temperatura i la composició del medi de cultiu, són paràmetres que afecten a la producció d'HCN en la soca EPS288.
- En la soca EPS288, l'inici de la producció i la quantitat d'HCN produïda són sensibles a la concentració cel·lular inicial. A elevada concentració hi ha més producció que a baixa concentració inicial, i aquest efecte és més evident a baixa temperatura, quan el creixement és més lent, i en els moments immediatament posteriors a la sembra.
- La soca EPS288 és una candidata a agent de biocontrol en el cas que el mecanisme sigui la producció d'HCN. Aquesta soca creix i produeix una quantitat relativament elevada d'HCN en un ampli rang de temperatures i varietat de medis. Aquesta possibilitat queda subjecte a la realització d'altres proves de supervivència, assaigs sobre material vegetal i de formulació i toxicitat que s'han de superar.
- Les condicions de cultiu per la producció en massa de la soca EPS288 consisteixen en un medi definit amb una font de carboni afegida, bàsicament glucosa o manitol, i complementat amb aminoàcids. Si es vol optimitzar el rendiment cel·lular per sobre de la rapidesa, la temperatura d'incubació ha d'estar per sota de 20°C.

Capítol 4

Estudi de la producció de 2,4-diacetilfloroglucinol en soques de *P. fluorescens*

4.1 Introducció

La producció de substàncies amb activitat antibiòtica es considera un dels principals mecanismes pel biocontrol de patògens a la rizosfera de les plantes (Weller, 1988; Thomashow i Weller, 1988; Voisard i col., 1989; Thomashow i col., 1990; Vincent i col., 1991; Pierson III i Thomashow, 1992; Shanahan i col., 1992a; Corbell i Loper, 1995; Raaijmakers i col., 1997).

Entre els antibiòtics que més expectatives tenen en el biocontrol destaca el 2,4-diacetilfloroglucinol (Mathre i col., 1999), que és una substància fenòlica que s'origina probablement per la via de l'acetat amb el monoacetilfloroglucinol (MAPG) com a producte intermig (Mann, 1987; Shanahan i col., 1993; Bangera i Thomashow, 1996; Bender i col., 1999). El DAPG presenta activitat antibiòtica d'ampli espectre, actuant com antifúngic, antibacterià, antivíric, i antihelmíntic (Tada i col., 1990; Vincent i col., 1991, Keel i col., 1992; Maurhofer i col., 1992; Fenton i col., 1992; Harrison i col., 1993; Bangera i Thomashow, 1996; Cronin i col., 1997a).

Hi ha descrits diverses soques de *Pseudomonas* del grup fluorescent de diferents orígens geogràfics d'arreu del món que produeixen DAPG. Aquestes soques tenen en comú l'habilitat de suprimir una o més malalties d'arrel i de llavors de plantes, causades per patògens del sòl (Cook i col., 1995; Duffy i Défago, 1999; McSpadden i col., 2000). Utilitzant mutants no productors de DAPG i soques no productores de DAPG a les quals s'han transferit els gens de síntesi, s'ha demostrat que la producció de DAPG és el mecanisme utilitzat per determinats bacteris en el biocontrol de malalties causades per múltiples patògens (Fenton i col., 1992; Keel i col., 1992; Cronin i col., 1997b, Raaijmakers i col., 1997).

En estudis *in situ* s'ha demostrat que hi ha producció de DAPG per soques implicades en el control de malalties de les arrels de plantes (Keel i col., 1992,

Shanahan i col., 1992a) i s'ha correlacionat aquesta major producció de DAPG amb una major efectivitat en el biocontrol d'una malaltia anomenada "take all" del blat causada pel fong *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Keel i col., 1992; Raaijmakers i col., 1999).

L'ampli espectre d'activitat de l'antibiòtic, que també s'ha vist que té efecte fitotòxic, fa que, en casos d'elevada producció, l'efecte pugui ésser beneficiós o perjudicial depenent de la planta hoste a la que s'aplica (Haas i col., 1991; Maurhofer i col., 1992; Harrison i col., 1993). Malgrat això hi ha un interès creixent en l'obtenció i aïllament de soques productores de DAPG per utilitzar-les com a agents de biocontrol donat el potencial que tenen en agricultura per a la protecció dels cultius (Mathre i col., 1999).

Assumint que la producció de metabòlits secundaris amb activitat antibiòtica juga un paper important en la colonització de les arrels i en el seu funcionament com a agents de biocontrol es considera necessari entendre els factors que afecten a la seva producció *in situ* (Georgakopoulos i col., 1994; Rodríguez i Pfender, 1997).

En els estudis realitzats per diversos autors s'ha observat una variació considerable en la quantitat de DAPG que es produeix *in vitro* per les soques de *Pseudomonas* implicades en processos de biocontrol, tant dins el mateix assaig com en assaigs diferents (James i Gutterson, 1986; Shanahan i col., 1992a i 1993; Nowak-Thompson i col., 1994; Corbell i Loper, 1995; Kraus i Loper, 1995; Rosales i col., 1995; Keel i col., 1996; Bonsall i col., 1997; Rodríguez i Pfender, 1997; Yuan i col., 1998; Duffy i Défago, 1999).

Aquestes diferències trobades *in vitro*, estan relacionades amb la temperatura (Kanner i col., 1978; Shanahan i col., 1992b; Russo i col., 1996; Bonsall i col., 1997), el medi de cultiu (Keel i col., 1992; Duffy i Défago, 1997 i 1999; Rodríguez i Pfender, 1997), el pH del medi i les fonts de carboni utilitzades (James i Gutterson, 1986; Gutterson i col., 1988; Shanahan i col., 1992a; Nowak-Thomson i col., 1994; Yuan i col., 1998). També influeixen diversos cations i anions com Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} o PO_4^{3-} (Duffy i Défago, 1995, 1996b, 1997 i 1999), la font de nitrogen (Shanahan i col., 1993; Yuan i col., 1998; Duffy i Défago, 1999) i fins i tot altres antibiòtics (Shanahan i col., 1993; Schnider-Keel i col., 2000). La consistència del medi de cultiu, és a dir, si és sòlid –agar- o líquid –brou- s'ha demostrat que també afecta (James i Gutterson, 1986; Russo i col., 1996; Bonsall i col., 1997). Quan la soca està immobilitzada en gel d'alginat (Russo i col., 1996), s'aconsegueix una producció més elevada en el cultiu

immobilitzat que en suspensió. Finalment també en alguns casos no s'ha trobat quin és el motiu de la variabilitat observada en la producció de DAPG (Gurusiddaiah i col., 1986).

Aquesta variabilitat en la producció de DAPG explicaria, en part, el fet que en certs casos hi hagi poca reproductibilitat en els resultats de les proves a camp i una falta de consistència entre les proves *in vitro* i els assaigs a camp. En condicions de camp hi ha múltiples factors biòtics i abiòtics que afecten al funcionament de les soques antagonistes (Stutz i col., 1986; Weller, 1988; Haas i col., 1991) que en les proves *in vitro* estan controlats. Entre els factors abiòtics hi ha el tipus d'argila del sòl (Stutz i col., 1989), el pH (Weller i col., 1988), i un exemple de factors biòtics seria la inhibició de la síntesi de DAPG en la soca CHA0 per l'àcid fusàric produït pel fong patògen d'arrel *Fusarium* (Duffy i Défago, 1997).

Darrerament, s'ha demostrat que en algunes ocasions l'estudi dels factors que afecten al funcionament d'un agent de biocontrol *in situ*, és a dir en condicions reals, es pot realitzar també en condicions *in vitro* ja que hi ha una bona correlació entre factors identificats *in vitro*, i en condicions naturals (Duffy i Défago, 1997). En aquest sentit el cultiu líquid és una tècnica que permet, abans d'assajar condicions de camp, identificar senyals ambientals que afecten a la producció de diversos antibiòtics (Duffy i Défago, 1999).

La inhibició del patògen *in vitro* s'ha correlacionat en alguns casos amb l'efectivitat *in vivo* (Rosales i col., 1995; Cronin i col., 1997b; Rodriguez i Pfender, 1997). En assaigs *in vitro* s'ha observat que hi ha una correlació entre el diàmetre de l'halo d'inhibició i la producció d'antibiòtic (Rosales i col., 1995), però que cal una concentració mínima d'antibiòtic perquè s'observi antagonisme (Cronin i col., 1997b). És a dir hi ha una dosi llindar per sota de la qual no hi ha inhibició, i això també es compleix per l'activitat antagonista de patògens en les arrels (Raaijmakers i Weller, 1998). En general, en els assaigs d'inhibició *in vitro* es proven múltiples medis de cultiu per associar antagonisme amb paràmetres nutricionals, però tampoc hi ha una regla fixa, ja que hi ha soques de *P. fluorescens* en les quals la inhibició és dependent del medi i en altres en les quals la inhibició és independent del medi assajat (Nielsen i col., 1998).

4.1.1 Regulació de la síntesi

La regulació de la producció de DAPG a nivell genètic ha estat molt estudiada i ha d'ajudar a descobrir els mecanismes de regulació de la síntesi de DAPG en condicions naturals. Actualment es coneixen bé quins són els gens implicats en la producció de DAPG (Vincent i col., 1991; Corbell i Loper, 1995; Banger i Thomashow, 1996, Bender i col., 1999) i fins i tot que el propi DAPG és un regulador positiu de la seva síntesi (Schnider-Keel i col., 2000).

Els gens implicats en la síntesi del DAPG (locus biosintètic) han estat localitzats i caracteritzats (Banger i Thomashow, 1996; 1999; Schnider-Keel i col., 2000). En aquest locus biosintètic hi ha sis gens agrupats *phIA*, *phIB*, *phIC*, *phID*, *phIE* i *phIF* que codifiquen pels corresponents enzims, que intervenen en les diferents etapes cap a la síntesi del DAPG. Així, PhID seria responsable de la síntesi de MAPG i PhIA, PhIB i PhIC serien necessaris per la transformació a DAPG (veure la Figura 4.1). El MAPG en cultius *in vitro* es produeix conjuntament amb el DAPG, però a més de precursor també és el producte de degradació del DAPG en la soca CHA0 i en el mutant CHA631 (Schnider-Keel i col., 2000).

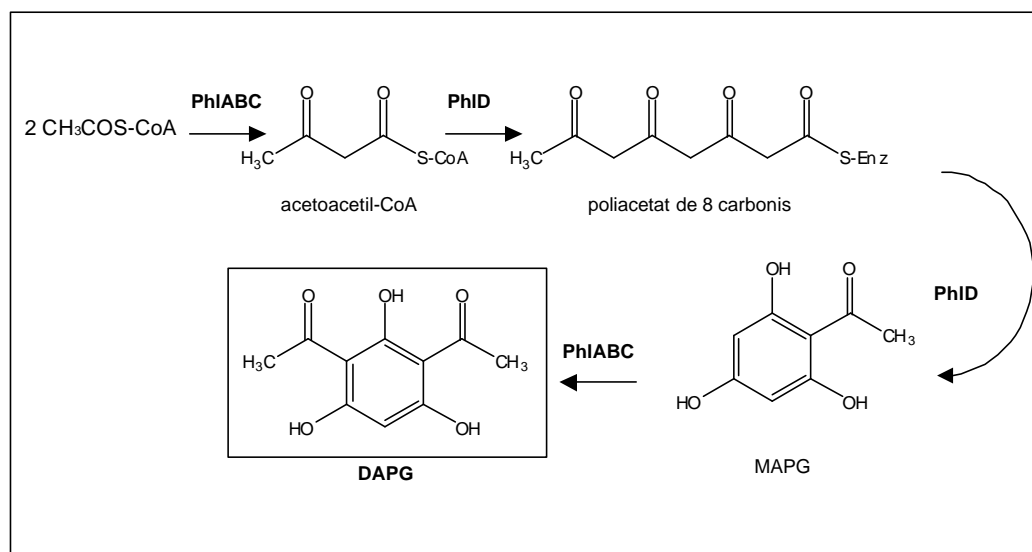


Figura 4.1. Ruta de biosíntesi del 2,4-diacetilfloroglucinol. Es mostren els enzims que catalitzen les reaccions de biosíntesi (De Banger i Thomashow, 1999).

Figure 4.1. Biosynthetic pathways for 2,4-diacetylphloroglucinol. The enzymes that catalyze the biosynthetic reactions are shown (From Banger i Thomashow, 1999).

La síntesi de DAPG en *Pseudomonas* es realitza per condensació de molècules d'acetat en una via anomenada "via del poliacetat" semblant a la síntesi d'àcids grassos però amb una ciclació posterior (Hopwood i Sherman, 1990; Bender i col., 1999). Aquestes etapes van des de la condensació de molècules d'acetat fins a la síntesi del monoacetilfloroglucinol (MAPG), precursor immediat del DAPG (Mann, 1987; Shanahan i col., 1993; Banger i Thomashow, 1999). En *Pseudomonas* s'ha comprovat que aquesta ruta biosintètica té més semblances amb la via del poliacetat que utilitzen les plantes per la síntesi de calcones i estilbens -substàncies aromàtiques colorades- (Schröder, 1997; Bender i col., 1999) que amb les vies biosintètiques del poliacetat tipus I i II, semblants a la síntesi d'àcids grassos, que són característiques d'animals, d'algunes plantes, de microorganismes i també són comuns en la síntesi d'antibiòtics pels actinomicets (Katz i Donatio, 1993).

Pel que fa referència a la regulació a nivell genètic, s'ha identificat un sistema de dos components implicat en el control de la síntesi de DAPG i d'altres antibiòtics, en *Pseudomonas*, que es va anomenar *gacA* -Global antibiotic and cyanide control- (*GacA-GacS*) en la soca CHA0 (Laville i col., 1992) o *apdA* (*ApdA-ApdS*) en la soca Pf5 (Corbell i Loper, 1995). Aquests gens codifiquen proteïnes que actuen a nivell de membrana cel·lular que són sensibles a senyals ambientals (Bender i col., 1999). La producció de DAPG en *Pseudomonas* estaria regulada per un sistema enzimàtic en cascada en el qual els sistemes *gacA* i *apdA* només serien un esglaó (Cook i col., 1995). El coneixement d'aquest sistema es creu que permetrà predir quines són les condicions ambientals favorables per la producció dels antibiòtics i també per millorar genèticament els agents de biocontrol (Corbell i Loper, 1995).

S'ha comprovat que la regió biosintètica del DAPG es conserva en les soques productores independentment del seu origen geogràfic i, això juntament amb el coneixement dels gens ha permès, amb ajuda de tècniques de seqüenciació i clonació, desenvolupar sondes genètiques que es poden usar per a la detecció de soques productores de DAPG en diversos ambients (Bonsall i col., 1997; Keel i col., 1996; Raaijmakers i col., 1997; Picard i col., 2000). El gen *phlD* està ben conservat en les soques conegudes i s'ha utilitzat pel desenvolupament de cebadors per realitzar la Reacció en Cadena de la Polimerasa, (PCR) útil en la cerca de soques portadores del gen per la síntesi del DAPG (Mc Spadden i col., 2000 i 2001). Aquestes eines han possibilitat una nova estratègia per la cerca d'agents de biocontrol, que començaria per

la localització de soques productores de DAPG, o d'altres antibiòtics, en els ambients i hostes en els quals es vulgui desenvolupar un sistema de control biològic i on s'observi que hi ha condicions naturals de supressió de la malaltia. També es creu que les soques productores de DAPG amb un patró genètic comú permetrà predir la seva capacitat com a agent de biocontrol (Mavrodi i col., 2001). Aquestes soques aïllades dels ambients on es vol aplicar l'estratègia de biocontrol estarien millor adaptades a les condicions específiques del sòl on s'aïllin i és d'esperar que siguin més efectives en sistemes hoste-patogen-antagonista (Raaijmakers i col., 1997; Raaijmakers i Weller, 1998; Mc Sapdden i col., 2000).

En una altre ordre de coses, al locus biosintètic del DAPG es va identificar el gen *red* responsable de la síntesi d'un pigment vermell (Bangera i Thomashow, 1996) del qual encara no s'ha determinat l'estructura. Aquest pigment està molt lligat a la síntesi de DAPG i es creu que és un subproducte (Bangera i Thomashow, 1996). En medi KB la producció d'aquest pigment s'observa al cap de 4 a 7 dies d'incubació i està lligada a la producció de DAPG. Aquest fet s'ha utilitzat com a prova per a la cerca ràpida de soques productores de DAPG en processos d'aïllament (Keel i col., 1996, Bangera i Thomashow, 1996). D'altra banda s'ha observat que diversos microorganismes sintetitzen pigments vermells per una via diferent dels tipus I i tipus II, i que és semblant a la via per la síntesi de calcones i estilbens (Funa i col., 1999).

S'ha argumentat que la producció de DAPG pot ésser una característica clau en un bacteri per esdevenir agent de biocontrol. Però, cal tenir present la variabilitat en la seva producció per l'efecte de múltiples factors. Per això va considerar-se oportú estudiar la producció de DAPG a les soques de la col·lecció EPS que posseïen els gens *phlD* i determinar alguns dels factors que poden afavorir la síntesi *in vitro* de DAPG en aquestes soques.

4.1.2 Quantificació del DAPG

Actualment hi ha descrits diversos mètodes per a la quantificació del DAPG produït tant en medi sòlid (Keel i col., 1992; Maurhofer i col., 1992; Shanahan i col., 1992b; Bonsall i col., 1997), com en brou (Shanahan i col., 1992a; Harrison i col., 1993; Nowak-Thompson i col., 1994), en arrels de plantes (Keel i col., 1992; Bonsall i col., 1997; Raaijmakers i col., 1999), o en el sòl (Shanahan i col., 1992b), de manera que

l'estudi de la producció de DAPG tant en condicions *in vitro* com *in vivo* no suposa cap problema.

En els assaigs tant *in vitro* com en condicions reals la quantificació del DAPG es realitza generalment mitjançant CLAR utilitzant una columna de fase reversa C₁₈ i com a fase mòbil una barreja d'acetonitril o metanol amb aigua a pH àcid (àcid fosfòric, àcid tricloroacètic, àcid trifluoroacètic) per mantenir el DAPG (pK_a 4,0) protonat (Vincent i col., 1991; Fenton i col., 1992; Shanahan i col., 1992a, 1992b, i 1993; Keel i col., 1992; Maurhofer i col., 1992; Bonsall i col., 1997). Quant a les condicions de purificació de la mostra hi ha molta diversitat de mètodes; en general, la purificació es realitza mitjançant extracció en sòlid en fase reversa (Sept Pack C₁₈), o bé fent extracció del brou amb acetat d'etil a pH=2. La detecció i la quantificació es realitza també amb diferents tipus de detectors depenent en alguns casos del nombre d'antibiòtics que es vulguin determinar de manera simultània. En general s'utilitza un detector de UV a 254 a 270 nm, tot i que i també s'han utilitzat en alguna ocasió la detecció amperomètrica (Shanahan i col., 1992b) o l'espectrometria de masses (Vincent i col., 1991).

Aquesta metodologia va ésser adaptada específicament als requeriments del present treball, tal i com es descriu al Capítol 2 d'aquesta memòria.

4.2 Objectius

L'objectiu principal que es va plantejar en aquest capítol va ésser estudiar la producció de l'antibiòtic DAPG per soques productores de la col·lecció EPS.

Aquest objectiu es va subdividir en els següents:

- Estudiar la influència de les característiques del medi de cultiu com complexitat , consistència, font de carboni i addició de ferro o de glucosa en la producció de DAPG.
- Cercar trets comuns o singularitats entre les soques de referència i les soques del socari EPS en relació a la producció de DAPG.

4.3 Materials i mètodes

4.3.1 Quantificació del DAPG

La metodologia per a la quantificació del DAPG va ésser diferent en funció de si el medi de cultiu era sòlid o líquid.

4.3.1.1 Quantificació a partir de cultius en medi sòlid

Per la sembra de les soques i obtenció de l'extracte orgànic es va seguir la metodologia descrita anteriorment (veure l'apartat 2.3.5.1).

Per fer la quantificació del DAPG es van prendre 0,1 mL de l'extracte orgànic, dipositant-los en un vial color àmbar per CLAR (Amber-203, Kimble Glass Inc., USA) i evaporant a sequetat al buit. El residu va resuspendre's en 1,0 mL de fase mòbil (30% ACN: 70% H₂O a pH 2,8 amb TCA) i va injectar-se al CLAR en les condicions ja descrites (veure l'apartat 2.3.6.3).

4.3.1.2 Quantificació a partir de cultius en medi líquid

La soca procedent d'un vial conservat a -80°C, es va sembrar en plaques de medi LB que es van incubar durant 24 h a 25°C. Amb la nansa de Kolle es tocava una colònia i s'esbandia en 25 mL del medi líquid corresponent. A continuació s'incubava en agitació orbital a 125 rpm durant 24 h a 25°C. Aquest cultiu es centrifugava a 6000 rpm (RC-5CPlus Sorvall) durant 5 min, descartant el sobrenedant i resuspenent el sediment en igual volum del medi a assajar. En aquestes condicions la concentració cel·lular inicial era de l'ordre de 10⁸ ufc/mL. Quan la sembra era a alta concentració cel·lular inicial s'utilitzava aquesta suspensió directament i en les sembres a baixa concentració inicial es diluïa convenientment.

Per la quantificació del DAPG es va desenvolupar un sistema de microextracció basat en altres descrits (Palmer i Bender, 1993; Rodriguez i Pfender, 1997; Yuan i col., 1998). El brou es va centrifugar 10 min a 6000 rpm (RC-5CPlus Sorvall) per eliminar les cèl·lules, prenent seguidament 1 mL del sobrenedant dins un microtub tipus Eppendorf on s'afegien seqüencialment 50 mg de NaCl (Panreac PA) per fer la fase aquosa més polar, 20 µL de HCl 2 M per protonar el DAPG i 0,5 mL d'acetat d'etil (Panreac PA) com a solvent extractant.

L'extracció es va fer agitant els microtubs amb vòrtex durant 30 s, i centrifugant-los a 4000 rpm (Sigma 203, B.Braün) per trencar l'emulsió. Es van dipositar 0,4 mL de la part orgànica dins un vial per CLAR i s'evaporaven fins a sequedat al buit a temperatura ambient. El residu final es resuspensava en 0,8 mL de la fase mòbil i s'injectava a l'aparell CLAR (veure l'apartat 2.3.6.3).

Mitjançant el patró sintètic va comprovar-se que la recuperació amb aquest mètode era quantitativa i es va utilitzar per la corba de calibrat.

4.3.2 Estudi de la producció de DAPG

4.3.2.1 Cinètica de creixement i de producció

Per determinar en quin moment del creixement del cultiu s'inicia la producció de DAPG i quan s'assoleix el màxim, es va seguir el creixement i la producció de DAPG al llarg del temps en diversos cultius de *P. fluorescens*. Per això es van utilitzar dues soques de referència, la JBR 1-70 i la Q2-87, i la soca pròpia EPS808. El medi de cultiu escollit per aquesta cinètica fou el brou LB.

Les soques es van sembrar a baixa concentració inicial (10^4 - 10^5 ufc/mL) en 100 mL de brou dins un erlenmeyer de 250 mL amb tap de cotó i van incubar-se a 25°C en agitació orbital a 125 rpm durant 52 h. Cada soca es va sembrar per triplicat.

Per seguir l'evolució del cultius es van prendre mostres del brou a la sembra i a diferents temps mesurant el creixement del cultiu com ufc/mL. La mostra per la quantificació del DAPG, 1 mL de brou, es va centrifugar a 5000 rpm durant 15 min (Sigma 203 B. Braün) i el sobrenedant es va congelar immediatament a -30°C fins a l'anàlisi. La quantificació del DAPG es va fer per CLAR (veure l'apartat 4.3.1). Prèviament s'havia comprovat que en mostres guardades 15 dies a -30°C no variava la quantitat de DAPG.

4.3.2.2 Efecte de l'addició de ferro i de glucosa

Efecte del Ferro

Per estudiar l'efecte de l'addició de ferro al medi de cultiu es va fer un disseny factorial amb els factors *Soca* –EPS317, EPS808, CHA0, JBR 1-70, PS15 i Q2-87-; *Ferro*, l'addició o no de 50 µM ferro al medi; *Consistència* del medi –sòlid o líquid- i

Complexitat del medi –KB com a complex i GA com a mínim-. Aquest correspon a un disseny amb sis soques i tres factors a dos nivells. Cada prova es va fer per triplicat.

Les soques es van sembrar en brou a partir de cultius crescuts en agar LB que van incubar-se en agitació orbital a 125 rpm durant 24 h a 25°C. L'inòcul es va preparar a partir d'aquests cultius, centrifugant-los durant 5 min a 5000 rpm (RC-5CPlus Sorvall), i eliminant el sobrenedant i resuspenent el sediment en igual volum de tampó fosfat. El procés de rentat es va repetir una segona vegada ajustant posteriorment la suspensió de bacteris a 10^8 ufc/mL ($A_{610}=0,2$) amb tampó fosfat. Les soques es van sembrar inoculant 100 μ L d'aquesta suspensió en 10 mL del brou corresponent, dins tubs de cultiu (Culture Tubes 25x150 mm C5916, Sigma Chemical Co. St Louis, Mo, USA) tapats amb els taps corresponents (Closure C1798, Sigma Chemical Co. St Louis, Mo, USA). Aquests permeten una bona transferència d'oxigen per tenir una relació superfície-volum elevada (Clark i col., 1995). Els tubs van incubar-se inclinats a 25°C en agitació orbital a 150 rpm durant 48 h. La quantificació del DAPG va fer-se seguint la metodologia descrita (veure l'apartat 4.3.1).

Efecte de la glucosa

En aquest experiment va proposar-se un disseny factorial anàleg al de l'apartat anterior amb els factors *Soca* –EPS317, EPS808, CHA0, JBR 1-70, PS15 i Q2-87-, *Complexitat* -medi complex LB o medi mínim 21C (veure l'apartat 2.3.1)-, *Consistència* – medi sòlid o líquid-, i *Glucosa*¹ –addició o no de 1% glucosa -.

La sembra de les soques i la quantificació del DAPG es va fer de manera anàloga a l'apartat anterior.

4.3.2.3 Efecte de la font de Carboni

Per avaluar l'efecte de la font de carboni en la producció de DAPG es va escollir com a medi base el 21C el qual es va complementar amb diverses fonts de carboni al 1%. Les fonts de carboni foren escollides entre les utilitzades per les soques de la col·lecció EPS (Bonaterra, 1997). Les fonts de carboni assajades van ser glucosa (Panreac PA), fructosa (Panreac PA), arabinosa (Merk AR), glicerol (Fluka), eritrosa (Merk AR), maltosa (Panreac PA) i etanol (Panreac PA). Aquestes es van addicionar al

¹ El medi mínim 21C sense glucosa es va formular amb glicerol com a font de carboni.

medi base com a solucions concentrades esterilitzades per filtració a 0,22 µm (F030/3 Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Es van assajar medis sòlid i líquid llevat del suplementat amb etanol que només es realitzà en medi líquid.

Les soques es van sembrar en el mateix medi sòlid en el qual havien de créixer i s'incubaren durant 36 h a 25°C. A continuació es va preparar una suspensió de bacteris ajustada amb tampó fosfat a 10⁸ ufc/mL ($A_{610}=0,2$) per a cada soca. A partir d'aquesta suspensió es van sembrar els brous i medis sòlids a assajar, i s'incubaven a 25°C durant 48 h i en agitació orbital a 125 rpm els brous. Cada condició fou realitzada per triplicat. La quantificació del DAPG va fer-se segons la metodologia ja descrita (veure l'apartat 4.3.1).

4.3.3 Estudi dels paràmetres cinètics i de la producció de DAPG mitjançant un sistema automatitzat

Les corbes de creixement de soques de *P. fluorescens* productores de DAPG es van obtenir monitoritzant l'absorbància a 600 nm dels cultius amb l'aparell Bioscreen. Es van utilitzar soques de referència descrites com a agents de biocontrol (Q2-87 i CHA0), soques aïllades de sòls supressius (JBR 1-70 i PS15) i soques pròpies candidates a agents de biocontrol (EPS317 i EPS808). També es van utilitzar mutants espontanis Rif^r d'aquestes soques que posteriorment s'havien d'utilitzar en experiments de colonització de material vegetal. En aquests mutants es volia comprovar si mantenien les mateixes característiques que les soques salvatges originals.

El creixement va realitzar-se en brou LB, LB suplementat amb 1% glucosa (LB+Gluc), KB, GA, GA suplementat amb 50 µM Fe³⁺ (GA+Fe), extracte de malta (Malta), i YM. La sembra del brou en els micropouets de la placa del Bioscreen, es va realitzar segons el procediment descrit prèviament (veure l'apartat 3.3.3).

La quantificació del DAPG produït es va fer a partir del brou contingut en els micropouets seguint la metodologia descrita a l'apartat 4.3.1.

4.3.4 Tractament de dades

Les dades de producció de DAPG s'han expressat en µg? de DAPG/mL de brou (ppm DAPG) i s'han transformat en log (ppm DAPG+0,1) per tal que compleixin el criteri d'homocedasticitat. Per confirmar la homogeneïtat de les variàncies es va utilitzar

la prova de Levene. Per fer les proves de separació de mitjanes es va utilitzar la prova de Tukey.

La velocitat específica mitjana de producció de DAPG (VEP) es va mesurar a partir del pendent de l'interval lineal de la corba de producció de DAPG front el temps dividint per la població mitjana en aquell interval ($\mu\text{g DAPG}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 10^{-9}$ ufc).

Amb les dades de les corbes de creixement obtingudes amb Bioscreen s'ha determinat la producció cel·lular com el valor màxim de l'absorbància (A_{600}) i la velocitat específica de creixement (μ) com el pendent del tram lineal de la corba de creixement (ln ABS vs temps) en la fase exponencial. Pel tractament estadístic l' A_{600} i la μ s'han utilitzat sense transformar.

En l'estudi de les correlacions s'ha utilitzat el coeficient de correlació Rho de Spearman ja que les dades no eren simètriques en molts casos. Prèviament es comprovava gràficament que existia una relació lineal entre les variables. Per fer la correlació amb la producció de DAPG van eliminar-se de la matriu de dades els valors en que no hi havia producció ($\log\text{DAPG}+0,1= -1$).

Pel tractament de les dades es van utilitzar el full de càlcul Excel de Microsoft® i el paquet estadístic SPSS per Windows (Versió 7.5.2S, SPSS Inc. 1989-1997).

4.4 Resultats

4.4.1 Cinètica de creixement dels cultius i de la producció de DAPG

La concentració cel·lular mitjana de sembra va ésser semblant per les tres soques, de 2×10^5 ufc/mL per la EPS808, de $9,5 \times 10^4$ ufc/mL per la Q2-87 i de $1,3 \times 10^5$ ufc/mL per la JBR 1-70, així com el perfil de la corba de creixement, amb les fases de creixement exponencial i estacionària ben diferenciades. Per contra es van observar diferències en la corba d'acumulació de DAPG al brou tant en la quantitat com en la velocitat i moment d'inici de la producció. La representació gràfica corresponent a cadascuna de les soques es presenta a la Figura 4.2.

A les soques EPS808 i JBR 1-70 l'inici de la producció de DAPG va coincidir amb la fi de la fase de creixement exponencial i principi de la fase estacionària (veure la Figura 4.2B i C), mentre que l'inici de la producció de DAPG per la soca Q2-87 va tenir lloc a les 44 h de la sembra, ja avançada la fase estacionària, i en una quantitat molt petita respecte les soques EPS808 i JBR 1-70 (veure la Figura 4.2A).

A la Taula 4.1 es pot observar que per la soca JBR 1-70 ja es va detectar producció a les 12 h, assolint-se el valor màxim a les 36 h, mentre que per la soca EPS808 l'inici de la producció fou a les 18 h i la màxima producció a les 44 h. La soca JBR1-70 va produir més quantitat de DAPG i més ràpidament que la soca EPS 808. A la soca JBR 1-70 a partir de les 38 h va disminuir la concentració de DAPG en el brou (veure Figura 4.2 i Taula 4.1), ja que, van observar-se diferències significatives ($P < 0,05$) entre la concentració de DAPG al brou entre les 39 i 52 h.

Taula 4.1. Producció de DAPG ($\mu\text{g/mL}$ brou) a diferents temps d'incubació i Velocitat Específica de Producció -VEP- ($\mu\text{g DAPG} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^{-9}$ ufc).

Table 4.1. DAPG production ($\mu\text{g/mL}$) at different incubation times and Specific DAPG production rate -VEP- ($\mu\text{g DAPG} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^{-9}$ cfu).

Soca	Temps d'incubació (h)					VEP
	12	24	36	44	52	
EPS808	0	37	180	262	266	45,5
JBR 1-70	7	268	349	340	320	97,6
Q2-87	0	0	0	1	6	0,25

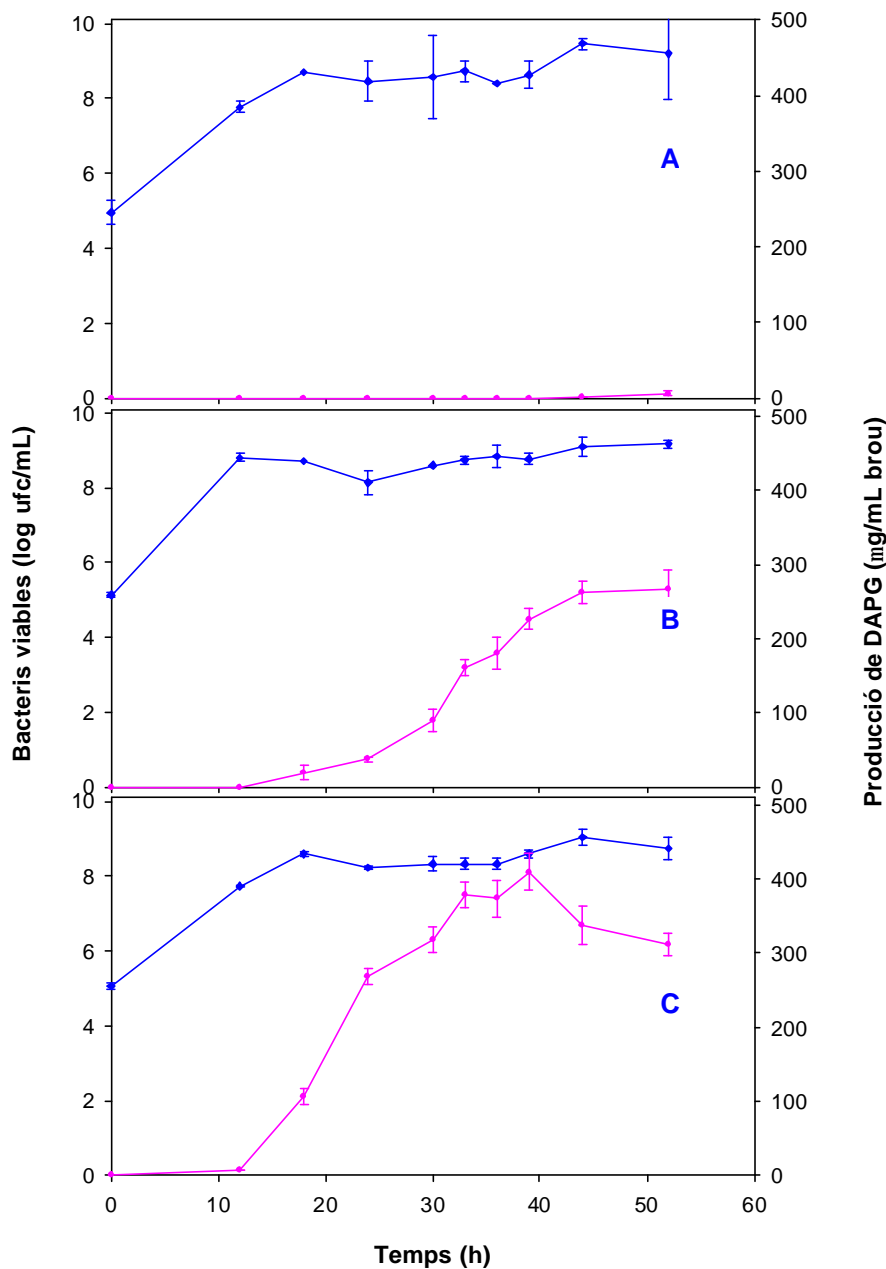


Figura 4.2. Cinètica de creixement \blacklozenge i de producció de DAPG \bullet per les soques Q2-87 (A); EPS808 (B) i JBR 1-70 (C). Mitjana de triplicats i interval de confiança a $P=0,05$.

Figure 4.2. Growth curve \blacklozenge and DAPG production \bullet by strains Q2-87(A); EPS808 (B) and JBR 1-70 (C). Average of replicates and confidence interval at $P=0,05$.

La soca JBR 1-70 a les 30 h des de la sembra ja havia assolit el 75% de la producció màxima mentre que la soca EPS808 havia arribat al 40% i finalment a la soca Q2-87 l'inici de la producció va tenir lloc entre les 40 i 44 h des de la sembra. També la velocitat específica mitjana de producció de DAPG ($\mu\text{g DAPG}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 10^{-9}\text{ufc}$) per la soca JBR 1-70 va ésser el doble que per la soca EPS808 (veure la Taula 4.1).

Tant per la soca EPS808 com per la JBR 1-70 va observar-se una caiguda de la població de viables a les 27 h que va coincidir amb el moment de màxima producció de DAPG. En aquest moment es va calcular una velocitat instantània de producció de DAPG de $4,5\cdot 10^{-5}\ \mu\text{g DAPG}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ufc}^{-1}$ per la JBR 1-70 i de $1,2\cdot 10^{-6}\ \mu\text{g DAPG}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ufc}^{-1}$ per la EPS808.

4.4.2 Efecte de l'addició de ferro en la producció de DAPG

A la Taula 4.2 es mostra l'anàlisi de la variança de l'efecte dels factors *Soca*, *Ferro*, *Complexitat* i *Consistència* del medi de cultiu (veure l'apartat 4.3.2.2), on s'indica que els efectes principals i les interaccions de 2^{on} ordre són significatives i expliquen el 82% de la variança. Per això s'ha considerat el model amb els efectes principals i les interaccions de 2^{on} ordre mentre que les interaccions de tercer i quart ordre s'engloben en el residual.

Taula 4.2. Taula de l'ANOVA que mostra l'efecte de *Soca*, *Complexitat* i *Consistència* del medi de cultiu, i de l'addició de *Ferro* en la producció de DAPG.

Table 4.2. ANOVA table showing the effect of *Strain*, growth media *Complexity* and *Consistency* and *Iron* addition on DAPG production.

Efectes	Factors	gl	Suma de quadrats	F	P>F
Efectes principals	Ferro	1	0,9	2,4	0,125
	Soca	5	179,8	88,8	0,0001
	Complexitat	1	0,02	0,05	0,84
	Consistència	1	1,1	2,6	0,11
Interaccions	Soca x Complexitat	5	9,7	4,8	0,001
	Soca x Consistència	5	9,4	4,6	0,001
	Soca x Ferro	5	0,5	0,1	0,95
	Complexitat x Consistència	1	14,1	34,8	0,0001
	Complexitat x Ferro	1	1,1	2,6	0,11
	Consistència x Ferro	1	0,7	1,7	0,2
Model		26	217,1	20,6	0,0001
Residual		117	47,4		

gl. graus de llibertat/degrees of freedom

Es pot apreciar que dels efectes principals només el factor *Soca* és molt significatiu i a més té un elevat pes en la varianza observada, explicant-ne un 83%. Els altres factors *Ferro*, *Complexitat* i *Consistència* del medi no tenen efecte significatiu, però sí que són significatives les interaccions, com es mostrarà posteriorment.

Això indica que la producció de DAPG *in vitro* és una característica que depèn en gran manera de la soca. En una primera aproximació per estudiar el factor *Soca*, s'ha realitzat la separació de mitjanes mitjançant la prova de Tukey amb $P=0,05$ (no es mostren els resultats). S'ha observat que les soques es poden separar en tres grups amb diferències significatives segons la producció de DAPG. En un primer grup hi ha la soca CHA0, la soca menys productora, en un altre les soques EPS317 i PS15 com a mitjanament productores i finalment en un tercer grup les soques més productores que són Q2-87, JBR 1-70 i EPS 808.

A la Taula 4.2 també s'observa que hi ha una interacció entre *Complexitat* i *Consistència* del medi de cultiu que és molt significativa ($P<0,0001$), i que les interaccions de *Soca* amb *Complexitat* i de soca amb *Consistència* són molt significatives ($P=0,001$), i expliquen la resta de la varianza, el 18%. Això indica que la producció de DAPG per cada soca, depèn de la complexitat i de la consistència del medi de cultiu. Cal ressaltar que ni l'efecte del ferro ni les seves interaccions amb els altres factors són significatives.

Ja que les proves van ser realitzades de manera independent per a cada soca, es va fer la separació de mitjanes segons la prova de Tukey ($P=0,05$), obtenint una gradació en la producció de DAPG des de les combinacions (soca i medi) en que no es va detectar producció fins a les que es va detectar una major producció de DAPG (veure la Taula 4.3). En aquesta taula es pot observar que les soques més productores són la Q2-87 i la JBR 1-70 i que les millors condicions per la producció de DAPG són el medi complex KB en formulació líquida. L'addició de ferro no sembla un factor determinant. Només l'addició de ferro va mostrar un efecte estimulador a la soca JBR 1-70 per assolir la màxima producció però no va afectar a la soca Q2-87.

Taula 4.3. Producció de DAPG (μg DAPG/mL de brou) per les soques de *P. fluorescens* estudiades en diversos medis de cultiu en l'estudi de l'efecte del ferro. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey entre les condicions amb lletres iguals.

Table 4.3. DAPG production (μg DAPG/mL of broth) of selected *P. fluorescens* strains in different growth media, in the evaluation of iron effect. There are no significant differences ($P=0,05$) with Tukey's test between conditions with the same letter.

Soca, medi i consistència	Producció de DAPG	
CHA0 KB Sòlid	0,0	a
CHA0 KB Fe Sòlid	0,0	a
CHA0 GA Sòlid	0,0	a
CHA0 GA Fe Sòlid	0,0	a
PS-15 GA Sòlid	0,0	a
EPS317 KB Líquid	0,0	a
EPS317 KB + Fe Líquid	0,0	a
CHA0 KB + Fe Líquid	0,0	a
PS-15 KB + Fe Líquid	0,0	a
CHA0 GA Líquid	0,0	a
CHA0 GA + Fe Líquid	0,0	a
CHA0 KB Líquid	3,0	b
PS-15 KB Líquid	4,6	bc
EPS317 GA + Fe Sòlid	6,5	cd
EPS317 GA Sòlid	6,1	cd
Q2-87 GA + Fe Sòlid	9,7	d
PS-15 GA + Fe Sòlid	9,7	d
EPS317 KB + Fe Sòlid	21,4	e
EPS317 GA + Fe Líquid	43,8	f
Q2-87 GA Sòlid	49,7	f
PS-15 KB + Fe Sòlid	55,3	f
EPS317 GA Líquid	54,8	f
EPS808 GA + Fe Sòlid	56,9	f
PS-15 KB Sòlid	58,0	f
EPS808 GA Sòlid	70,5	fg
JBR 1-70 KB + Fe Sòlid	77,7	fg
EPS808 GA + Fe Líquid	80,4	fg
EPS317 KB Sòlid	78,1	fg
Q2-87 KB + Fe Sòlid	126,9	gh
PS-15 GA + Fe Líquid	149,3	hi
JBR 1-70 KB Sòlid	158,7	hi
JBR 1-70 GA + Fe Líquid	162,3	hi
EPS808 KB Líquid	164,1	hi
EPS808 GA Líquid	167,5	hij
EPS808 KB + Fe Sòlid	172,0	hij
JBR 1-70 GA Sòlid	179,4	hij
EPS808 KB + Fe Líquid	180,2	hij
JBR 1-70 GA + Fe Sòlid	189,4	hij
Q2-87 KB Sòlid	265,4	ijk
Q2-87 GA + Fe Líquid	288,5	ijk
JBR 1-70 GA Líquid	321,9	jk
PS-15 GA Líquid	212,3	jk
EPS808 KB Sòlid	323,0	jk
Q2-87 GA Líquid	323,0	jk
JBR 1-70 KB Líquid	394,4	kl
Q2-87 KB Líquid	455,0	kl
Q2-87 KB + Fe Líquid	681,1	lm
JBR 1-70 KB + Fe Líquid	938,0	m

A la Taula 4.4 es mostra l'ANOVA separat per cada soca on s'avalua l'efecte del medi de cultiu (complexitat i consistència) en la producció de DAPG.

Taula 4.4. Taules de l'ANOVA per a cada soca per l'avaluació de l'efecte de la *Complexitat* (Cp) i *Consistència* (Ct) del medi de cultiu, i l'addició de *Ferro* (Fe) en la producció de DAPG.

Table 4.4. ANOVA tables for each strain for the evaluation of growth media *Complexity* (Cp), and *Consistence* (Ct) and *Iron* addition (Fe) on DAPG production.

Efectes	Factors	gl	Soques					
			EPS 317			EPS 808		
			Suma de quadrats	F	P>F	Suma de quadrats	F	P>F
Efectes principals	Ferro	1	0,2	6,4	0,02	0,16	12,3	0,003
	Complexitat	1	5,1	172,4	0,0001	0,8	64,5	0,0001
	Consistència	1	4,2	146,1	0,0001	0,02	1,6	0,22
Interaccions	Cp x Ct	1	18,8	647,8	0,0001	0,24	18,4	0,0001
	Cp x Fe	1	0,06	2,2	0,15	0,01	1,0	0,33
	Ct x Fe	1	0,09	3,1	0,09	0,001	0,1	0,75
Model		6	28,4	163,1	0,0001	1,27	16,3	0,0001
Residual		17	0,5			0,22		
Efectes	Factors	gl	Soques					
			CHA0			JBR 1-70		
			Suma de quadrats	F	P>F	Suma de quadrats	F	P>F
Efectes principals	Ferro	1	0,76	13,95	0,002	0,01	0,5	0,48
	Complexitat	1	0,76	13,95	0,002	0,06	2,4	0,14
	Consistència	1	0,76	13,95	0,002	1,1	38,3	0,0001
Interaccions	Cp x Ct	1	0,76	13,95	0,002	0,6	22,2	0,0001
	Cp x Fe	1	0,76	13,95	0,002	0,04	1,5	0,24
	Ct x Fe	1	0,76	13,95	0,002	0,05	1,8	0,20
Model		6	4,6	13,95	0,0001	1,87	11,1	0,0001
Residual		17	0,9			0,5		
Efectes	Factors	gl	Soques					
			PS 15			Q 2-87		
			Suma de quadrats	F	P>F	Suma de quadrats	F	P>F
Efectes principals	Ferro	1	0,001	0,06	0,81	0,3	50	0,0001
	Complexitat	1	0,9	46,6	0,0001	2,1	357	0,0001
	Consistència	1	0,3	15,1	0,001	4,1	680	0,0001
Interaccions	Cp x Ct	1	27,1	1438	0,0001	0,7	113	0,0001
	Cp x Fe	1	4,2	225	0,0001	0,1	21	0,0001
	Ct x Fe	1	5,6	307	0,0001	0,5	83	0,0001
Model		6	38,3	339	0,0001	7,8	217	0,0001
Residual		17	0,3			0,1		

gl: graus de llibertat/degrees of freedom

L'addició de ferro no és un factor significatiu per les soques JBR 1-70 i PS15, però per la resta és significatiu malgrat que explica poca variança, només a la EPS808 explica el 10% de la variança. Això està d'acord amb el model proposat (veure la Taula 4.2) en el sentit que en general el ferro no és determinant de la producció de DAPG, tot i que en algunes soques pugui tenir un efecte apreciable.

Donat que per a cada soca el disseny experimental realitzat correspon a un disseny factorial amb tres factors a dos nivells (2^3) es poden calcular els efectes principals i les interaccions per tal de conèixer la seva magnitud, valors que es mostren a la Taula 4.5. Aquesta taula és complementària a la Taula 4.4 de l'ANOVA atorgant una magnitud quantitativa i una tendència en la producció de DAPG a cada un dels efectes principals i a les seves interaccions.

Taula 4.5. Valors de les estimes dels efectes principals i de les interaccions en la producció de DAPG. En els efectes principals el signe indica el sentit en que la variable afecta a la resposta al passar del nivell (-) al nivell (+).

Table 4.5. Main effects and interactions in DAPG production. In main effects the sign shows the sense in response when evolving from low (-) level to high (+) level of the factor.

Factor	Soques					
	EPS317	EPS808	CHA0	JBR 1-70	PS 15	Q2-87
Ferro¹	-16,8	-58,9	-0,8	78,2	-42,5	2,5
Complexitat³	-2,9	116,0	0,8	178,9	-90,8	213,5
Consistència²	3,4	7,6	-0,8	-302,8	-88,2	-324,7
Ct x Cp	46,4	67,8	-0,8	-245,1	142,5	-48,8
Ct x Fe	-11,4	-23,4	0,8	-113,7	46,0	-93,4
Cp x Fe	-11,5	-8,6	-0,8	153,0	38,9	39,7
Ct x Cp x Fe	-17,0	-60,2	0,8	-198,5	-45,1	-90,6
Int. Conf. (P=0,05)	2,1	9,4	0,3	15,5	6,7	9,7

¹No (-) Si/Yes (+); ²Liquid/broth (-) Sòlid/agar (+); ³GA (-) KB (+). Int. Conf.: Interval de Confiança/ Confidence interval

L'efecte del ferro és significatiu en les soques EPS317 i EPS808 en les quals inhibeix la producció de DAPG, de manera que hi ha més producció en condicions limitants de ferro. A les altres soques l'efecte del ferro té poc pes o no és significatiu.

Finalment, a la Taula 4.6 es resumeixen els resultats obtinguts en base a les taules de significança del contrast dels factors (veure Annex B).

Taula 4.6. Resum de l'efecte de l'addició de *Ferro*, de la *Consistència* i *Complexitat* del medi de cultiu en la producció de DAPG.

Table 4.6. Summary of responses of the effect of *Iron* addition, *Complexity* and *Consistence* of growth media in DAPG production.

Soca	Variables		
	Addició de Ferro	Complexitat	Consistència
EPS317	- en KB	GA>KB en sòlid	líquid>sòlid en GA
	0 en GA	KB>GA en líquid	sòlid>líquid en KB
EPS808	- en KB sòlid	KB>GA	líquid>sòlid en GA
	- en GA líquid		sòlid>líquid en KB
	0 en KB líquid		
	0 en KB sòlid		
CHA0	només en KB líquid sense ferro		
JBR 1-70	- en GA líquid	KB>GA en líquid	líquid>sòlid
	0 en GA sòlid	GA>KB en sòlid	
	+ en KB líquid		
	- en KB sòlid		
PS15	- en GA líquid	GA>KB en líquid	líquid>sòlid en GA
	+ en GA sòlid	KB>GA en sòlid	sòlid>líquid en KB
	0 en KB sòlid		
	+ en KB líquid		
Q2-87	+ en KB líquid	KB>GA	líquid>sòlid
	- en KB sòlid		
	- en GA		

+ estimula/promotes; - inhibeix/inhibition; 0 no afecta/does not affect.

A les taules anteriors (Taulas 4.4 a 4.6) s'han desglossat els efectes de les variables estudiades en la producció de DAPG. Hi ha molts efectes creuats que provoquen l'augment de la variabilitat en la interacció de dos o més factors, de manera que els comportaments són singulars per a cada soca però es poden observar algunes similitats que es recullen a continuació.

Només es va observar efecte estimulants del ferro en la producció de DAPG en les soques PS15 en GA sòlid i JBR 1-70 i Q2-87 en KB líquid. En KB líquid l'addició de

ferro estimula significativament la producció de DAPG a les soques JBR 1-70 i Q2-87 assolint en aquests casos la màxima producció de DAPG observada.

D'altra banda en medi KB sòlid l'addició de ferro a les soques EPS317, EPS808, JBR 1-70 i Q2-87, inhibeix la producció de DAPG en alguns medis (veure la Taula 4.6) fent-la disminuir quasi a la meitat.

A les soques EPS808 i Q2-87 la producció de DAPG en el medi complex KB va ésser superior al medi GA. A la resta de les soques es van manifestar efectes creuats amb la consistència del medi. En medi GA es va obtenir major producció en líquid i en KB la producció fou superior en sòlid o líquid depenent de la soca.

A les soques JBR 1-70 i Q2-87 la producció en líquid va ésser superior a la formulació sòlida, a la resta de soques s'ha trobat un efecte creuat amb la complexitat. En general la producció més elevada en líquid es va obtenir en medi KB i en sòlid tant en KB com en GA depenent de la soca.

4.4.3 Efecte de l'addició de glucosa en la producció de DAPG

L'anàlisi de la varianza per l'estudi de l'efecte de *Soca*, *Glucosa*, i *Complexitat* i *Consistència* del medi de cultiu en la producció de DAPG, mostra que els efectes principals i les interaccions de 2^{on} ordre expliquen el 85% de la varianza (veure la Taula 4.7). Els factors amb major pes en la varianza són *Soca* amb un 33% i *Glucosa* amb el 21%, cal notar que l'efecte de la glucosa és molt més significatiu ($F=121$) que l'efecte de la soca ($F=37,4$).

Les interaccions de la *Soca* amb *Complexitat*, *Consistència* i *Glucosa* expliquen conjuntament i per igual quasi el 30% de la varianza. També la interacció *Complexitat* amb *Glucosa* explica part de la varianza (6,5%) i entre les interaccions és la que té un pes més elevat ($F=37,1$).

Que totes les interaccions entre les variables siguin significatives i en alguns casos amb un pes elevat indica que hi haurà molts comportaments diferents.

Taula 4.7. Taula de l'ANOVA que mostra l'efecte de *Soca*, *Complexitat* i *Consistència* del medi de cultiu i de l'addició de *Glucosa* en la producció de DAPG.

Table 4.7. ANOVA summary showing the effect of *Strain*, *Complexity* and *Consistency* of growth media and *Glucose* addition on DAPG production.

Efectes	Factors	gl	Suma de quadrats	F	P>F
Efectes principals	Glucosa	1	37,7	121,5	0,0001
	Complexitat	1	4,4	14,1	0,0001
	Consistència	1	8,8	28,3	0,0001
	Soca	5	58,1	37,4	0,0001
Interaccions	Soca x Complexitat	5	17,3	11,1	0,0001
	Soca x Consistència	5	16,9	10,9	0,0001
	Soca x Glucosa	5	16,6	10,7	0,0001
	Complexitat x Consistència	1	2,4	7,7	0,0001
	Complexitat x Glucosa	1	11,5	37,1	0,0001
	Consistència x Glucosa	1	2,7	8,9	0,003
Model		26	176,3	21,8	0,0001
Residual		116	36,3		

En una primera aproximació per l'estudi del factor soca s'ha comprovat que les soques es poden separar en diversos grups: un amb les més productores JBR 1-70 i EPS808, un altre la soca CHA0 com la menys productora, i un darrer amb les soques amb una producció intermitja, la PS15, la EPS317 i la Q2-87. Aquesta distribució segons la producció de DAPG és similar a l'obtinguda en l'apartat anterior amb l'efecte del ferro (veure l'apartat 4.4.2).

A la Taula 4.8 es recull la separació de mitjanes, de totes les combinacions de soca-medi, realitzada mitjançant la prova de Tukey. En aquesta taula es pot comprovar que medi complex, les soques JBR 1-70 i la EPS808, la formulació sòlida i l'addició de glucosa són les condicions en les que es va obtenir la producció de DAPG més elevada. En medi 21C líquid suplementat amb glicerol no es va detectar producció de DAPG per cap de les soques estudiades.

Taula 4.8. Producció de DAPG (μg DAPG/mL de brou) per les soques de *P. fluorescens* estudiades, en diversos medis de cultiu en l'estudi de l'efecte de l'addició de glucosa. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey entre les condicions amb les lletres iguals.

Table 4.8. DAPG production (μg DAPG/mL of broth) by selected *P. fluorescens* strains in different growth media in the avaluation of glucose addition. There are no significant differences ($P=0,05$) with Tukey's test between conditions with the same letter.

Soca, medi i consistència	Producció de DAPG	
PS-15 LB Sòlid	0,0	a
EPS317 21C + Glucosa Sòlid	0,0	a
CHA0 21C + Glicerol Sòlid	0,0	a
PS-15 21C + Glicerol Sòlid	0,0	a
CHA0 LB Líquid	0,0	a
CHA0 LB + glucosa Líquid	0,0	a
PS-15 LB Líquid	0,0	a
EPS317 21C + Glicerol Líquid	0,0	a
EPS808 21C + Glicerol Líquid	0,0	a
CHA0 21C + Glicerol Líquid	0,0	a
JBR 1-70 21C + Glicerol Líquid	0,0	a
PS-15 21C + Glicerol Líquid	0,0	a
Q2-87 21C + Glicerol Líquid	0,0	a
Q2-87 LB Líquid	0,4	ab
CHA0 LB Sòlid	17,8	bc
PS-15 LB + Glucosa Sòlid	1,4	cd
EPS317 21C + Glicerol Sòlid	1,5	cd
CHA0 21C + Glucosa Líquid	2,5	cde
EPS317 LB + Glucosa Sòlid	2,7	cde
CHA0 LB + Glucosa Sòlid	2,4	cde
EPS317 LB + Glucosa Líquid	2,5	cde
Q2-87 LB + Glucosa Líquid	7,8	def
EPS808 21C + Glicerol Sòlid	11,0	efg
Q2-87 LB Sòlid	11,6	efg
EPS317 LB Sòlid	13,0	efgh
Q2-87 21C + Glucosa Líquid	13,5	efgh
PS-15 21C + Glucosa Líquid	18,3	fgh
EPS317 21C + Glucosa Líquid	30,2	fghi
PS-15 LB + Glucosa Líquid	31,3	fghi
JBR 1-70 LB Sòlid	31,9	fghi
EPS808 LB Sòlid	33,2	fghi
JBR 1-70 21C + Glicerol Sòlid	34,6	fghi
JBR 1-70 LB + Glucosa Líquid	35,0	fghi
JBR 1-70 21C + Glucosa Líquid	38,1	fghi
EPS808 21C + Glucosa Líquid	45,7	ghij
PS-15 21C + Glucosa Sòlid	45,8	ghij
EPS808 21C + Glucosa Sòlid	46,3	ghij
EPS317 LB Líquid	47,6	ghijk
Q2-87 LB + Glucosa Sòlid	48,7	ghijk
Q2-87 21C + Glicerol Sòlid	52,7	ghijk
CHA0 21C + Glucosa Sòlid	54,2	ghijk
JBR 1-70 21C + Glucosa Sòlid	77,7	hijk
Q2-87 21C + Glucosa Sòlid	122,8	ijk
EPS808 LB Líquid	134,1	ijk
EPS808 LB + Glucosa Líquid	145,3	ijk
JBR 1-70 LB Líquid	150,2	ijk
EPS808 LB + Glucosa Sòlid	241,4	jk
JBR 1-70 LB + Glucosa Sòlid	282,4	k

Mitjançant l'anàlisi de la varianza de la Taula 4.9 s'ha determinat com afecten les condicions de cultiu a la producció de DAPG en cada soca.

Taula 4.9. Taules de l'ANOVA per a cada soca en l'avaluació de l'efecte de la *Complexitat* (Cp), *Consistència* (Ct) del medi de cultiu, i de l'addició de *Glucosa* (Glu) de la producció de DAPG.

Table 4.9. ANOVA tables for each strain for the evaluation of growth media *Complexity* (Cp), *Consistence* (Ct), and *Glucose* addition (Glu) on DAPG production.

		Soques						
Efectes	Factors	gl	EPS 317			JBR 1-70		
			Suma de quadrats	F	P>F	Suma de quadrats	F	P>F
Efectes principals	Glucosa	1	0,2	41	0,0001	3,9	585	0,0001
	Complexitat	1	5,8	1342	0,0001	5,0	739	0,0001
	Consistència	1	1,3	297	0,0001	3,6	525	0,0001
Interaccions	Cp x Ct	1	0,2	44	0,0001	2,5	372	0,0001
	Cp x Glu	1	3,9	914	0,0001	2,6	385	0,0001
	Ct x Glu	1	3,6	841	0,0001	0,2	21	0,0001
	Ct x Cp x Glu	1	6,7	1546	0,0001	5,5	804	0,0001
Model		7	21,8	718	0,0001	23,2	490	0,0001
Residual		16	0,07			0,1		
		Soques						
Efectes	Factors	gl	EPS808			PS 15		
			Suma de quadrats	F	P>F	Suma de quadrats	F	P>F
Efectes principals	Glucosa	1	6,5	34,1	0,0001	27,6	407	0,0001
	Complexitat	1	8,6	45,6	0,0001	0,6	8,8	0,009
	Consistència	1	1,1	5,7	0,03	0,3	4,7	0,044
Interaccions	Cp x Ct	1	2,2	11,5	0,04	1,1	16,5	0,001
	Cp x Gl	1	2,2	11,6	0,03	0,6	8,8	0,009
	Ct x Glu	1	0,5	2,7	0,115	0,3	4,7	0,044
Model		6	21,1	18,5	0,0001	30,6	75	0,0001
Residual		17	3,2			1,1		
		Soques						
Efectes	Factors	gl	CHA0			Q 2-87		
			Suma de quadrats	F	P>F	Suma de quadrats	F	P>F
Efectes principals	Glucosa	1	8,0	26,0	0,0001	8,0	112	0,0001
	Complexitat	1	1,2	4,0	0,062	0,4	5	0,04
	Consistència	1	5,0	16,1	0,001	14,4	202	0,0001
Interaccions	Cp x Ct	1	0,4	1,1	0,3	0,5	7	0,02
	Cp x Glu	1	4,9	16,1	0,001	0,05	1	0,41
	Ct x Glu	1	1,3	4,1	0,06	2,6	36	0,0001
Model		6	20,9	11,1	0,0001	26	61	0,0001
Residual		17	5,3			1,2		

El model considerant els efectes principals i les interaccions de segon ordre explica més del 80% de la varianza, llevat de les soques EPS317 (70%) i JBR 1-70 (75%) en les quals la interacció de tercer ordre explica part de la varianza.

En aquest disseny experimental les soques també es diferencien segons els efectes dels factors i de les seves interaccions. Com a tret característic s'observa que *Glucosa* és un factor molt significatiu per totes elles fins al punt que en la soca PS15 explica quasi la totalitat de la varianza.

Com que s'ha utilitzat un disseny factorial de tres factors a dos nivells (2^3) s'han calculat les estimes dels efectes principals i de les interaccions (veure la Taula 4.10) per a cada una de les soques.

Taula 4.10. Valors de les estimes dels efectes principals i de les seves interaccions en la producció de DAPG. El signe indica el sentit en que la variable afecta a la resposta al passar del nivell (-) al nivell (+).

Table 4.10. Main effects and their interactions in evaluation of production DAPG. In main effects the sign shows the sense in response when evolving from low (-) level to high (+) level of the factor.

Efectes principals	Soques					
	EPS317	EPS808	CHA0	JBR 1-70	PS15	Q2-87
Glucosa ¹	-6,7	75,1	10,4	54,1	24,2	32,1
Complexitat ³	8,5	112,8	-9,1	87,3	-7,9	-30,2
Consistència ²	-15,9	1,7	18,0	50,8	-0,6	53,5
Ct x Cp	-1,5	-4,1	-7,9	13,7	-14,3	-27,5
Ct X Glu	0,7	46,7	9,1	92,7	-0,6	21,6
Cp x Gu	-21,1	34,6	-18,0	13,5	-7,9	-9,8
Cp x Ct x Glu	16,6	51,9	-16,7	90,1	-14,3	-6,7
Int. Conf. (P=0,05)	0,6	10,1	4,5	6,1	1,0	1,9

¹ No (-) Si/Yes (+); ² Liquid/broth (-) Sòlid/agar (+); ³21C(-) LB (+).

Únicament a la soca EPS317 l'addició de glucosa inhibeix la producció de DAPG; a la resta de les soques l'efecte de l'addició de glucosa és augmentar la producció de DAPG.

La *Consistència* i la *Complexitat* no afecten de la mateixa manera que en l'anterior experiment on s'estudia l'efecte del ferro (veure la Taula 4.5); només a la soca PS15 coincideix l'efecte d'ambdues variables. Al ser els medis base diferents també ha canviat l'efecte de la consistència.

Per tal d'estudiar detalladament l'efecte de cada un dels factors s'han desglossat els resultats dels efectes per cada soca (veure l'Annex C) i s'ha resumit a la Taula 4.11.

Taula 4.11. Resum de l'efecte de l'addició de *Glucosa*, *Complexitat* i *Consistència* del medi de cultiu en la producció de DAPG.

Table 4.11. Summary of responses in DAPG production by *Glucose* addition, *Complexity* and *Consistence* of growth media.

Soca	Variables		
	Addició Glucosa	Complexitat	Consistència
EPS317	- en LB	LB>21C en sòlid	líquid>sòlid 21C Gluc(+)
	+ en 21C líquid	LB>21C en líquid +Gluc	sòlid>líquid 21C Gluc(-)
	- en 21C sòlid	21C>LB en líquid -Gluc	líquid>sòlid LB Gluc(+) líquid=sòlid LB Gluc(+)
EPS808	+	LB>21C	líquid=sòlid Gluc(+) sòlid>líquid 21C Gluc(-) líquid>sòlid LB Gluc(-)
	+	21C>LB amb glucosa	sòlid>líquid
	0 en LB	LB>21C sense glucosa	
JBR 1-70	- en LB líquid	LB>21C	sòlid>líquid
	+		líquid>sòlid en LB Gluc(-)
PS15	+	LB>21C en líquid	sòlid>líquid en 21C
		21C>LB en sòlid	líquid>sòlid en LB
Q2-87	+	21C>LB en sòlid	sòlid>líquid
		21C=LB en líquid	

+ estimula/promotes; - inhibeix/inhibition; 0 no afecta/does not affect.

Dels resultats mostrats a les taules anteriors (veure les Taules 4.9 a 4.11) es dedueix que el comportament en la producció de DAPG per les soques i condicions estudiades és molt divers; hi ha però, alguns trets comuns que es poden destacar.

L'efecte de la glucosa és molt significatiu per totes les soques i explica gran part de la variança observada com es pot comprovar a la Taula 4.9. Excepte per la soca EPS317 i la JBR 1-70 en LB líquid en els quals l'addició de glucosa provoca una disminució del DAPG produït, l'efecte de la glucosa és estimular la producció de DAPG. Com a cas extrem, la soca PS15 només va produir DAPG quan hi havia glucosa en el

medi de cultiu; també a la soca CHA0 l'addició de glucosa fa augmentar la producció de DAPG en tots els medis llevat de LB en líquid en el qual no hi ha efecte significatiu.

En medi 21C líquid l'efecte estimulador de la glucosa queda patent pel fet que malgrat que totes les soques van créixer en medi 21C amb glicerol en cap d'elles es va detectar producció de DAPG.

L'efecte de la complexitat és molt significatiu en les soques EPS808 i JBR 1-70 on va observar-se una major producció en medi complex LB independentment dels altres factors. A la resta de les soques es van manifestar interaccions amb consistència o glucosa que provoca una diversitat de comportaments.

L'efecte de la consistència és significatiu per totes les soques. En general, es va observar una producció més elevada en medi sòlid, com s'observa en les soques CHA0 i Q2-87, mentre que a les altres soques les interaccions amb complexitat i glucosa donen lloc a comportaments particulars.

4.4.4 Efecte del tipus de font de carboni

Els resultats de producció de DAPG en diferents fonts de carboni es resumeix a la Taula 4.12, on pot apreciar-se que en els medis amb eritrosa i maltosa com a font de carboni no hi va haver creixement en cap de les soques. En etanol no van créixer la EPS808 ni la JBR 1-70, mentre que en la resta de medis van créixer totes les soques

Amb glucosa com a font de carboni es va detectar producció de DAPG en totes les soques tant en medi líquid com en medi sòlid, llevat de la soca EPS317 que en sòlid no va produir DAPG.

Tant amb glicerol i arabinosa en medi líquid, com en fructosa en sòlid no hi va haver producció de DAPG a les 48 h per cap de les soques, malgrat que totes hi van créixer.

Les soques PS15 i CHA0 només van produir DAPG quan hi havia glucosa en el medi. Aquests resultats confirmarien la dependència de la síntesi de DAPG quant a necessitat de glucosa en aquestes dues soques tal com s'ha vist anteriorment.

Taula 4.12. Producció de DAPG de diverses soques i efecte de la font de carboni en el medi 21C. Mitjana de triplicats en µg DAPG/mL brou i interval de confiança al 95%.

Table 4.12. DAPG production by different bacterial strains. and effect of carbon source in 21C growth media. Average of triplicate samples in µg DAPG/mL broth and 95% confidence interval.

Consistència	Font de Carboni	Soca					
		CHA0	EPS317	EPS808	JBR 1-70	PS15	Q2-87
Sòlid	Glucosa	54,2 ± 7,7	nd	46,3 ± 5,1	77,7 ± 4,0	45,8 ± 1,0	123 ± 11
	Glicerol	nd	1,5 ± 0,8	11,0 ± 1,6	35 ± 12	0,0	52,7 ± 6,7
	Arabinosa	nd	nd	9,85 ± 2,2	nd	nd	nd
	Fructosa	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Eritrosa	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	Maltosa	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Líquid	Glucosa	2,5 ± 0,8	30,2 ± 4,0	45,7 ± 5,5	35,1 ± 5,0	18,3 ± 4,6	13,5 ± 3,5
	Glicerol	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Etanol	nd	nd	nd	nd	nd	64,7 ± 8,5
	Arabinosa	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Fructosa	nd	nd	nd	nd	nd	2,4 ± 1,1
	Eritrosa	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	Maltosa	nc	nc	nc	nc	nc	nc

nc: no creixement/ no growth; nd: No detectat/ below detection limit

La soca Q2-87 és la que va produir més quantitat de DAPG i en major nombre de medis de totes les estudiades. Les soques EPS808 i JBR 1-70 són les que segueixen a la Q2-87 quant a capacitat de síntesi de DAPG, tant en quantitat com en nombre de fonts de carboni utilitzades. La producció, en medis amb glucosa com a font de carboni, de les soques Q2-87 i JBR 1-70 va ésser més elevada en medi sòlid que en líquid.

4.4.5 Estudi de paràmetres cinètics de creixement i producció de DAPG en microcultius

Els paràmetres cinètics dels cultius i la producció de DAPG es van estudiar en microcultius utilitzant el sistema automatitzat Bioscreen.

En les corbes de creixement obtingudes a partir de la lectura de l'absorbància amb l'aparell Bioscreen es pot observar l'evolució de diverses soques en un mateix medi de cultiu (veure la Figura 4.3) o d'una mateixa soca en diferents medis de cultiu (veure la Figura 4.4).

Com a exemple es mostra el creixement de les soques en el medi LB amb glucosa afegida (veure la Figura 4.3). Es pot observar que la soca CHA0 és la que va créixer més ràpidament mentre que la EPS317 és la que ho va fer més lentament. Aquestes

dues soques són també les que assoleixen una absorbància més elevada en fase estacionària (veure la Taula 4.15).

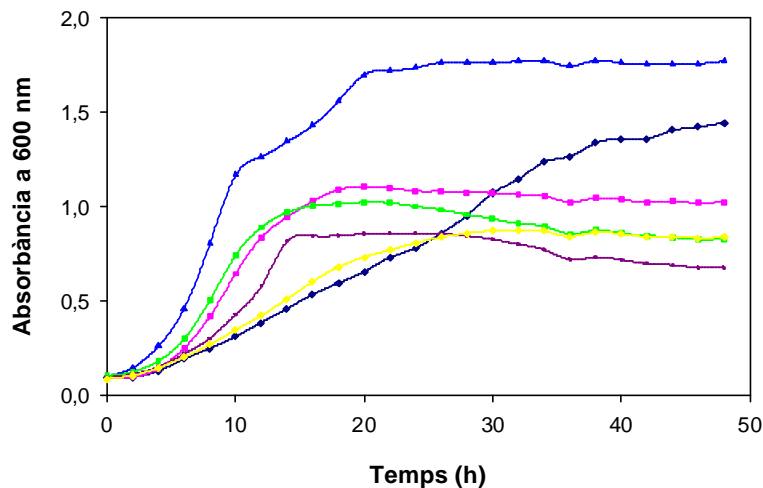


Figura 4.3. Corbes de creixement de diverses soques crescudes en medi líquid LB + Glucosa. EPS317 ◆ ; EPS808 ■ ; CHA0 ▲ ; JBR 1-70 ● ; PS15 ✕ i Q2-87 ◆ .

Figure 4.3. Growth curves of some strains grown on LB + Glucose broth. EPS317 ◆ ; EPS808 ■ ; CHA0 ▲ ; JBR 1-70 ● ; PS15 ✕ i Q2-87 ◆ .

A la Figura 4.4 es pot comprovar com una mateixa soca té perfils de la corba de creixement que difereixen segons el medi de cultiu on ha crescut. En aquesta figura es pot observar també que el ferro en medi GA no té cap efecte en el creixement de la soca EPS808. En medi LB es va observar el creixement més ràpid i també que l'addició de glucosa no va afectar a la velocitat de creixement però sí a la concentració cel·lular final.

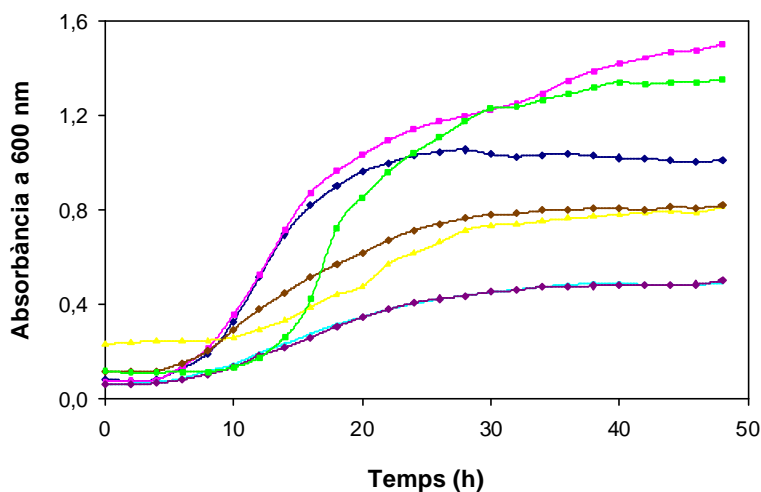


Figura 4.4. Corbes de creixement de la soca EPS808 en diversos medis de cultiu.

LB ◆ ; LB+Glu ■ ; Malta ▲ ; GA × ; GA+Fe ● ; KB ◆ i YM ■.

Figure 4.4. Growth curves of strain EPS808 on different growth media. LB ◆ ;

LB+Glu ■ ; Malta ▲ ; GA × ; GA+Fe ● ; KB ◆ and YM ■.

A la Taula 4.13 es mostra el resultat de l'anàlisi de la variança de l'efecte de *Soca*, *Medi* i *Mutant* en el creixement (A_{600}), en la velocitat específica de creixement (μ) i en la producció de DAPG. El factor *Mutant* s'ha estudiat per avaluar si els mutants espontanis resistents a la Rifampicina seleccionats pels experiments "*in vivo*" (veure el Capítol 5) mantenen les característiques cinètiques i de producció de DAPG de les soques salvatges.

En aquest model els efectes principals i les interaccions de segon ordre explicaven quasi el 90% de la variança de manera que s'ha considerat aquest model com adequat. En general s'observa que *Soca* i *Medi* i la seva interacció expliquen la major part de la variança, superior al 80%, per totes tres variables dependents. El factor *Mutant* només quan s'estudia la μ té un pes elevat ($F=177$) i explica poca variança (10%).

Taula 4.13. Taula de l'ANOVA on es mostra l'efecte de *Medi*, *Soca* i *Mutant* en el creixement màxim (A_{600}) –a dalt-, en la velocitat específica de creixement (μ) –al mig-, i en la producció de DAPG –a baix-.

Table 4.13. ANOVA table showing the effect of *Growth media*, *Strain* and *Mutant* in maximum growth (A_{600}) -above-, specific growth rate (μ) -middle-, and DAPG production -below-.

A_{600}		Suma de quadrats	g.l.	F	P>F
Efectes principals	Medi	25,9	6	317	0,0001
	Soca	4,0	5	59	0,0001
	Mutant	0,1	1	6,3	0,013
Interaccions	Medi x Soca	7,8	30	19	0,0001
	Medi x Mutant	0,3	6	4	0,002
	Soca x Mutant	0,1	5	1,4	0,234
Model		38,2	53	53	0,0001
Residual		2,7	198		
iii		Suma de quadrats¹	g.l.	F	P>F
Efectes principals	Medi	20	6	98,5	0,0001
	Soca	12	5	67	0,0001
	Mutant	6	1	177	0,0001
Interaccions	Medi x Soca	21	30	16	0,0001
	Medi x Mutant	3	6	16	0,0001
	Soca x Mutant	1	5	8,3	0,0001
Model		60	53	32,4	0,0001
Residual		7	198		
DAPG		Suma de quadrats	g.l.	F	P>F
Efectes principals	Medi	47,9	6	73,2	0,0001
	Soca	99,6	5	183	0,0001
	Mutant	6,9	1	63	0,0001
Interaccions	Medi x Soca	97,3	30	30	0,0001
	Medi x Mutant	4,4	6	7	0,0001
	Soca x Mutant	10,2	5	19	0,0001
Model		266,4	53	46	0,0001
Residual		21,6	198		

¹ Suma de quadrats/ $\times 10^6$.

El medi de cultiu és el factor més important, per damunt de la soca, en la producció cel·lular i velocitat de creixement. Mentre que la producció de DAPG depèn en primer lloc de la soca, tot i que el medi de cultiu també afecta.

L'efecte del mutant és significatiu per les tres variables però explica poca variança. S'ha fet l'ANOVA per les soques salvatges i les soques mutants separatament, considerant *Medi* i *Soca*, i a la Figura 4.5 s'ha representat la distribució de la variança explicada per a cada factor. S'observa que en les soques salvatges el creixement màxim assolit està explicat majoritàriament pel medi de cultiu i que la producció de DAPG està explicada en un 40% per la *Soca* i per la interacció *Medi-Soca*, mentre que la μ s'explica tant pel *Medi* com per la *Soca*. Aquesta distribució es repeteix en els mutants, llevat de la μ , variable en la qual el factor *Soca* té un pes superior que en les salvatges.

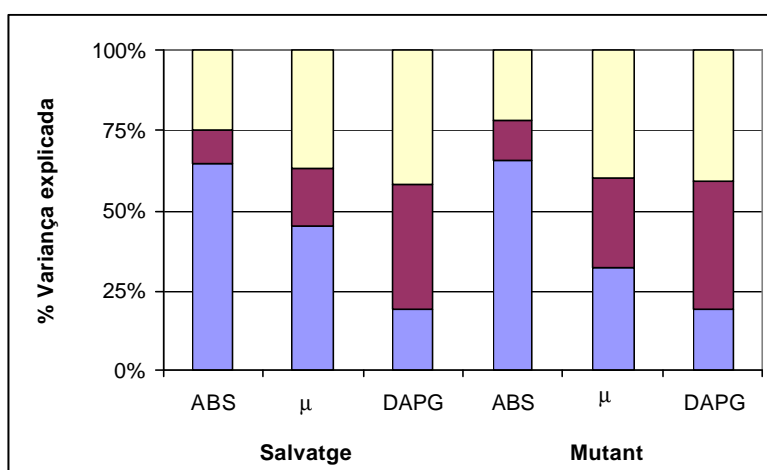


Figura 4.5. Percentatge de variança explicat per cada factor i per la seva interacció. *Medi* ■, *Soca* ■, *Medi x Soca* ■.

Figure 4.5. Part of variance explained by every factor and its interaction. *Growth media* ■, *Strain* ■, *Growth media x Strain* ■.

Això indica que hi ha algunes diferències entre soques salvatges i mutants que seran més evidents en la velocitat de creixement (μ).

Per estudiar amb detall aquest experiment es va fer la separació de mitjanes amb la prova de Tukey per a cada soca i medi de cultiu per separat amb els resultats de l' A_{600}

(veure la Taula 4.14), μ (veure la Taula 4.15) i producció de DAPG (veure la Taula 4.16) tant per les soques salvatges com per les mutants.

Taula 4.14. Creixement màxim assolit (A_{600}) per les soques salvatges i mutants resistents a rifampicina en diversos medis de cultiu. Lletres iguals indica que no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey.

Table 4.14. Maximum growth (A_{600}) of wild type and mutants rifampicine resistant in different growth media. There are no significant differences ($P=0,05$) in conditions with the same letter with Tukey's test.

Soca i medi		Salvatge		Mutant
EPS317 Malta	0,376	a	0,365	a
EPS808 GA	0,432	ab	0,447	abcd
Q2-87 GA	0,436	abc	0,441	abc
EPS808 GA+Fe	0,444	abcd	0,462	abcd
EPS317 GA+Fe	0,461	abcde	0,409	ab
EPS317 GA	0,485	abcdef	0,461	abcd
PS15 GA	0,502	abcdef	0,489	abcd
Q2-87 GA+Fe	0,505	abcdef	0,524	abcd
PS15 GA+Fe	0,509	abcdef	0,522	abcd
Q2-87 Malta	0,520	bcdef	0,520	abcd
CHA0 GA+Fe	0,556	bcdefg	0,563	abcd
CHA0 Malta	0,574	cdefgh	0,587	abcd
EPS808 Malta	0,580	defgh	0,555	abcd
JBR 1-70 GA+Fe	0,596	efgh	0,621	abcd
CHA0 GA	0,620	fghi	0,587	abcd
JBR 1-70 GA	0,622	fghi	0,614	abcd
PS15 LB	0,685	ghij	1,158	fghijkl
JBR 1-70 Malta	0,708	hijk	0,792	bcdef
PS15 Malta	0,752	ijkl	0,354	a
PS15 LB+Glu	0,754	ijkl	0,664	abcde
Q2-87 LB	0,756	ijkl	0,607	abcd
JBR 1-70 KB	0,819	klm	0,801	bcdefg
Q2-87 KB	0,823	klm	0,589	abcd
Q2-87 LB+Glu	0,840	klm	1,068	fghij
EPS808 KB	0,869	lmn	0,869	defghi
CHA0 KB	0,869	lmn	0,869	defghi
JBR 1-70 LB	0,887	lmn	1,066	fghij
EPS317 KB	0,896	mn	0,826	bcdefgh
EPS808 LB	0,975	mo	1,025	efghij
EPS317 YM	1,066	op	1,077	fghij
Q2-87 YM	1,143	pr	0,853	cdefghi
EPS317 LB	1,201	r	1,232	hijkl
JBR 1-70 LB+Glu	1,243	rs	1,252	ijkl
EPS808 YM	1,248	rs	1,224	hijkl
JBR 1-70 YM	1,340	st	1,208	ghijkl
PS15 KB	1,409	t	1,155	fghijkl
PS15 YM	1,412	t	1,104	fghijk
EPS808 LB+Glu	1,457	t	1,497	klmn
CHA0 LB	1,623	u	1,534	lmn
EPS317 LB+Glu	1,673	u	1,336	jklm
CHA0 YM	1,844	w	1,685	mn
CHA0 LB+Glu	1,850	w	1,800	n

En el creixement màxim s'observa que hi ha en general una correspondència entre l'ordenació de les soques salvatges i de les mutants, i malgrat que hi ha algunes

diferències, aquests resultats concorden amb l'ANOVA (veure la Taula 4.13) en el sentit que tot i haver-hi diferències significatives el mutant explica molt poca varianza.

Taula 4.15. Velocitat específica de creixement (h^{-1}) per les soques salvatges i pels mutants resistents a rifampicina en diversos medis de cultius. Lletres iguals indica que no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey.

Table 4.15. Specific growth rate (h^{-1}) of wild type and mutants rifampicine resistant in different growth media. There are no significant differences ($P=0,05$) in conditions with the same letter with Tukey's test.

Soca i medi	Salvatge	Mutant
Q2-87 Malta	0,050 a	0,046 a
EPS808 Malta	0,073 b	0,056 b
EPS317 LB+Glu	0,082 bc	0,068 c
EPS317 Malta	0,084 bcd	0,083 d
PS15 GA	0,085 bcd	0,073 c
PS15 Malta	0,095 cde	0,047 a
CHA0 GA+Fe	0,101 cdef	0,125 l
EPS317 GA+Fe	0,102 defg	0,112 hij
CHA0 Malta	0,103 defg	0,082 d
Q2-87 KB	0,104 defg	0,071 c
Q2-87 LB+Glu	0,106 efgh	0,090 de
EPS808 GA+Fe	0,107 efgh	0,110 hij
EPS317 LB	0,109 efghi	0,084 d
PS15 LB	0,114 efghij	0,087 de
EPS808 GA	0,115 efghij	0,116 ijkl
EPS808 KB	0,118 fghijk	0,100 fg
JBR 1-70 Malta	0,119 fghijk	0,115 ijkl
Q2-87 GA+Fe	0,119 fghijk	0,111 hij
EPS317 GA	0,123 ghijkl	0,117 jkl
PS15 LB+Glu	0,127 hijkl	0,094 ef
JBR 1-70 GA+Fe	0,129 ijklm	0,138 m
Q2-87 LB	0,132 jklmn	0,084 d
Q2-87 GA	0,135 klmno	0,123 kl
PS15 GA+Fe	0,140 lmno	0,107 ghi
EPS317 YM	0,140 lmno	0,151 no
CHA0 GA	0,148 mnop	0,104 gh
EPS317 KB	0,149 mnop	0,122 kl
CHA0 KB	0,151 nop	0,139 m
JBR 1-70 KB	0,155 opr	0,109 ghij
JBR 1-70 GA	0,167 prs	0,159 op
CHA0 YM	0,174 rst	0,188 s
CHA0 LB+Glu	0,174 rst	0,193 s
PS15 KB	0,182 stu	0,043 a
EPS808 LB+Glu	0,187 tu	0,153 no
PS15 YM	0,195 u	0,177 r
JBR 1-70 YM	0,213 w	0,115 ijk
EPS808 LB	0,216 w	0,164 p
Q2-87 YM	0,241 x	0,105 gh
JBR 1-70 LB	0,250 x	0,105 gh
JBR 1-70 LB+Glu	0,255 x	0,191 s
EPS808 YM	0,255 x	0,149 n
CHA0 LB	0,299 y	0,203 t

En la μ tot i que en les condicions extremes coincideixen les soques salvatges i mutants s'observen diferències sobretot en les condicions intermitges. Es pot

observar també que la μ assolida per les soques mutants és en general menor que per les soques salvatges.

Taula 4.16. Producció de DAPG ($\mu\text{g/mL}$ de brou) per les soques salvatges i pels mutants resistents a rifampicina en diversos medis de cultiu. Lletres iguals indica que no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey.

Table 4.16. DAPG production ($\mu\text{g/mL}$ of broth) of wild type and mutants rifampicine resistant in different growth media. There are no significant differences ($P=0,05$) in conditions with the same letter with Tukey's test.

Soca	Salvatge	Mutant
CHA0-KB	0,0 a	0,0 a
CHA0-LB	0,0 a	0,0 a
CHA0-Malta	0,0 a	0,0 a
CHA0-GA	0,0 a	0,0 a
CHA0-GA+Fe	0,0 a	0,0 a
PS15-YM	0,0 a	0,3 b
Q2-87-LB	0,0 a	0,0 a
Q2-87-LB+Glu	0,0 a	0,0 a
Q2-87-YM	0,7 b	2,1 de
JBR 1-70-Malta	1,2 bc	7,8 g
JBR 1-70-YM	1,5 bcd	1,0 c
EPS317-LB	1,5 bcd	0,0 a
EPS317-YM	1,8 bcd	1,1 cd
PS15-LB	2,4 bcde	0,0 a
CHA0-LB+Glu	3,3 cdef	4,7 fg
EPS808-LB	3,3 cdef	1,3 cde
EPS808-YM	4,7 cdef	0,9 c
Q2-87-Malta	4,1 cdef	0,0 a
CHA0-YM	4,2 cdef	3,0 ef
EPS317-KB	4,6 def	1,4 cde
EPS317-GA+Fe	6,9 efgh	9,7 gh
EPS317-Malta	9,6 fgh	9,2 g
EPS317-GA	9,7 fghi	9,3 gh
EPS317-LB+Glu	10,5 fghi	5,0 fg
JBR 1-70-LB+Glu	43,7 ghij	34,5 ijk
PS15-KB	26,6 ghijk	0,0 a
JBR 1-70-GA+Fe	24,3 hijkl	30,0 ijk
PS15-GA+Fe	27,0 hijklm	5,5 fg
JBR 1-70-LB	28,7 hijklm	24,6 hi
EPS808-LB+Glu	30,5 ijklm	25,8 ij
PS15-GA	36,4 jklmn	6,5 g
PS15-LB+Glu	41,3 jklmn	1,4 cde
Q2-87-KB	44,9 jklmn	0,0 a
EPS808-Malta	44,8 jklmno	54,0 jklm
JBR 1-70-GA	51,2 jklmno	52,0 jklm
EPS808-KB	61,4 jklmno	108,0 mn
EPS808-GA+Fe	73,0 klmno	42,9 jkl
PS15-Malta	82,5 lmno	3,1 ef
EPS808-GA	85,9 lmno	76,8 lm
Q2-87-GA+Fe	97,8 mno	61,6 klm
Q2-87-GA	120,6 no	78,2 lm
JBR 1-70-KB	171,7 o	197,3 n

A la Taula 4.16 s'observa que hi ha diferències en la producció de DAPG entre les soques salvatges i les mutants, i en general, la producció dels mutants és inferior a la de la soca salvatge corresponent.

En general hi ha consistència en les diferències entre salvatge i mutant per a cada soca. Per una banda, quan no hi ha diferències en una soca entre salvatge i mutant això es manté de manera més o menys consistent en tots els medis, essent el cas de les soques CHA0, EPS317, EPS808 i JBR 1-70. Per l'altra, quan hi ha diferències entre salvatge i mutant aquestes es mantenen en tots els medis, com és el cas de les soques Q2-87 i PS15 en les quals la soca mutant mostra uns valors inferiors a la soca salvatge en totes les variables estudiades.

Les diferències són més evidents en la μ i en la producció de DAPG que no en la A_{600} . Això indicaria que la mutació de resistència a la rifampicina pot ser tant neutre com perjudicial i que depèn del mutant seleccionat.

En les Taules 4.17 i 4.18 es mostra un resum de les soques i dels medis en els quals es van assolir els valors màxims de rendiment cel·lular i de producció de DAPG respectivament.

Taula 4.17. Soques que van assolir el valor màxim de cada un dels paràmetres determinats, en funció del medi de cultiu. En les condicions amb més d'una soca no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) les soques segons la prova de Tukey.

Table 4.17. Strains which reached the maximum value of the recorded parameter in function of growth media. When more than one strain is present there are no significant differences ($P=0,05$) between strains with Tukey's test.

Medi	Paràmetres cinètics		DAPG (mg/mL brou)
	A_{600}	m (h^{-1})	
KB	PS15	PS15	JBR 1-70 (i Rif ⁺)
LB	CHA0 (i Rif ⁺)	CHA0	JBR 1-70 (i Rif ⁺)
LB + Glucosa	CHA0 (i Rif ⁺)	JBR 1-70	PS15/EPS808 (i Rif ⁺)
Malta	PS15	JBR 1-70 (i Rif ⁺)	PS15
GA	JBR 1-70 (i Rif ⁺)/CHA0 (i Rif ⁺)	JBR1-70 (i Rif ⁺)	Q2-87
GA+ Fe	JBR 1-70	PS15/JBR 1-70	Q2-87
YM	CHA0 (i Rif ⁺)	EPS808	CHA0 (i Rif ⁺)/EPS808

Les soques CHA0, JBR 1-70 i PS15 són les que van assolir les concentracions cel·lulars més elevades en els medis estudiats. La soca CHA0 va assolir el màxim creixement en els medis LB, LB+Glucosa, YM, medis força semblants quant a composició -complexos i suplementats amb glucosa-, i en GA. La soca JBR 1-70 és la

que va assolir les concentracions cel·lulars més elevades en els medis GA i GA+Fe, rics en glucosa.

Quant a la μ la soca JBR 1-70 va ésser la de creixement més ràpid en quatre dels medis assajats, GA, GA+Fe, LB+glucosa i Malta tots ells rics en sucres, la soca PS15 va ésser la més ràpida en KB i GA+Fe i la CHA0 i EPS808 en LB i YM respectivament.

En la producció de DAPG cal destacar que les soques EPS317, EPS808 i JBR 1-70 van produir-ne en tots els medis de cultiu assajats. De totes les soques, només la EPS317 no apareix mai entre les més productores; la resta de soques van assolir la màxima producció en un o més medis.

S'ha constatat (veure les Taules 4.14 a 4.17) que les soques EPS808, JBR 1-70 i Q2-87 apareixen sempre entre les més productores de DAPG i que creixen més ràpidament (μ), però no en les que assoleixen una biomassa final més elevada (A_{600}).

Els mutants de les soques Q2-87 i PS15 no apareixen juntament amb la corresponent soca salvatge en els valors màxims, mentre que en les altres soques en alguna ocasió coincideixen mutant i salvatge en els valors màxims d'algun dels paràmetres. Això sembla indicar que per aquestes soques els mutants seleccionats són menys competents que les soques salvatges.

Els medis en els quals cada soca va assolir el valor màxim dels diferents paràmetres mesurats es resumeixen a la Taula 4.18. Com a tret general, s'observa que el màxim rendiment cel·lular va tenir lloc en medis enriquits amb glucosa -LB+Glucosa, GA o YM-, cosa que també s'ha observat en les corbes de creixement (veure la Figura 4.4).

L'efecte de la glucosa en la velocitat de creixement no és tant generalitzat de manera que en les soques CHA0 i JBR 1-70 la màxima μ s'assoleix també en el medi LB sense glucosa afegida. La presència de glucosa en la formulació del medi de cultiu afavoreix la síntesi de DAPG, excepte a la soca JBR 1-70 en la qual la màxima producció té lloc en medi KB, mentre que en la velocitat de creixement la glucosa no té un efecte tant marcat.

Taula 4.18. Medis de cultiu en els quals es van assolir els valors màxims per a cada un dels paràmetres determinats. Amb dos o més medis no hi ha diferències significatives ($P=0,05$) segons la prova de Tukey.

Table 4.18. Growth media were every strain reached the maximum value for each measured recorded. When different media are listed there are no significant differences ($P=0,05$) with Tukey's test.

Soca	Paràmetres cinètics		DAPG (mg/mL brou)
	A_{600}	μ (h^{-1})	
EPS317	LB+Glu	KB/YM	LB+Glu/GA/GA+Fe
EPS317Rif	LB+Glu	YM	LB+Glu/GA/GA+Fe
EPS808	LB+Glu	YM	GA/GA+Fe/KB
EPS808Rif	LB+Glu	LB	GA/KB
CHA0	LB+Glu/YM	LB	LB+Glu/YM
CHA0Rif	LB+Glu	LB	LB+Glu
JBR 1-70	LB+Glu/YM	LB/LB+Glu	GA/KB
JBR 1-70Rif	LB+Glu/YM	LB+Glu	KB
PS15	KB/YM	KB/YM	Malta
PS15Rif	GA/GA+Fe	YM	GA/GA+Fe
Q2-87	YM	YM	GA/GA+Fe
Q2-87Rif	LB+Glu	GA	GA

En expressar la productivitat específica de DAPG com ppm DAPG/ A_{600} , es va observar que el valor més elevat s'obtenia per la soca JBR 1-70 en medi KB seguida per les soques Q2-87 i EPS808 en medi GA (no es mostren les dades). Per les altres soques la productivitat específica màxima era significativament més baixa que en els casos anteriors, assolint-se els valors més elevats en medi Malta per les soques PS15 i EPS317 i en medi YM per la soca CHA0.

4.5 Discussió

L'estudi de l'efecte del medi de cultiu en la producció de DAPG es planteja per estudiar l'efecte d'un micronutrient, el ferro, d'una font de carboni, la glucosa, i altres característiques del medi de cultiu com són la consistència (brou o agar), i la complexitat (complex o definit). També, prenent com a base un medi definit (21C) es va estudiar l'efecte de diferents fonts de carboni que s'ha descrit que afecten a la quantitat de metabòlits que es produeixen (Keel i col., 1992; Russo i col., 1996; Bonsall i col., 1997; Yuan i col., 1998). Es van utilitzar soques de diversos orígens, algunes d'elles agents de biocontrol contra diferents patògens en les quals el DAPG estava implicat en la inhibició dels patògens.

La quantificació de la producció de DAPG en aquest treball s'ha fet a partir d'una mesura puntual a un temps determinat. Aquesta és la metodologia usual per comparar la producció *in vitro* de DAPG i altres metabòlits secundaris entre diferents soques de bacteris o entre diferents medis (Slininger i Jackson, 1992; Keel i col., 1996; Yuan i col., 1998).

La producció de metabòlits en un cultiu en discontinu segueix una cinètica que és funció del temps i, en general, els bacteris tenen diferents velocitats i temps de durada de la síntesi dels metabòlits. Per poder determinar aquestes característiques en un cultiu, cal prendre mostres a intervals de temps més curts. En el present treball, s'ha contemplat aquest fet estudiant la cinètica de producció de DAPG en algunes de les soques més representatives.

En les cinètiques de creixement i de producció de DAPG, les soques EPS808, JBR 1-70 i Q2-87 van diferir tant en la velocitat específica de producció ($\mu\text{g DAPG}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ufc}^{-1}$), com en el moment d'inici de la síntesi i en el temps de durada de l'etapa de síntesi, mentre que les diferències en el creixement no van ésser tan evidents.

La velocitat de producció de DAPG més elevada va assolir-la la soca JBR 1-70, seguida de EPS808. La JBR 1-70 va iniciar la síntesi de DAPG abans que la soca EPS808, però l'etapa de síntesi de DAPG va durar més en la soca EPS808. La soca JBR 1-70 va aïllar-se de sòl supressiu amb una llarga història de monocultiu de blat (Raaijmakers, comunicació personal), en el qual la producció de DAPG s'ha descrit com el mecanisme responsable de la inhibició de patògens (Mc Spadden i col., 2000).

La ràpida producció de DAPG és una característica favorable per una soca antagonista perquè li permet respondre ràpidament a la competició amb altres microorganismes sensibles al DAPG tant a les arrels com a les llavors (Schnider-Keel i col., 2000).

Les soques *P. fluorescens* EPS808, JBR 1-70 i Q2-87 van mostrar la cinètica típica de creixement amb les fases exponencial i estacionària, i amb un canvi o enlentiment en el creixement que va coincidir amb l'inici de la producció de DAPG en la EPS808 i la JBR 1-70. L'inici de la producció de DAPG va tenir lloc al final de la fase de creixement exponencial i inici de la fase estacionària, tal com era d'esperar per un producte del metabolisme secundari. En la mateixa prova, per la soca Q2-87 l'inici de la síntesi va tenir lloc ja molt avançada la fase estacionària. Aquest comportament indicaria que no sempre l'inici de la síntesi del metabòlit secundari està lligada al creixement i coincideix amb la transició entre les fases estacionària i exponencial. La soca Q2-87 està descrita com a agent de biocontrol i com a productora de DAPG (Vincent i col., 1991; Bonsall i col., 1997), i en el nostre treball, malgrat que pràcticament no va produir-ne en medi LB o LB + glucosa, hem observat que en altres medis de cultiu, com KB o GA, produeix DAPG en elevada quantitat.

Per altra banda, la disminució de la concentració de DAPG acumulat al brou, a partir de les 39 h en els cultius de la soca JBR 1-70, pot atribuir-se a l'assimilació pel propi bacteri com està descrit per la soca CHA0 (Schnider-Keel i col., 2000) ja que no hi ha descrites evidències d'oxidació o degradació per altres components del brou. A la soca EPS808 no va observar-se aquesta disminució però això no es pot descartar en cas d'haver augmentat la durada de l'experiment. En general, en la majoria de bacteris productors s'ha observat que el DAPG roman constant a partir del moment en què s'acaba l'etapa de síntesi (Shanahan i col., 1992b), però la soca CHA0 metabolitza el DAPG acumulat cap a MAPG que també s'acaba degradant (Schnider-Keel i col., 2000). Aquesta pot ser una segona etapa del metabolisme secundari per l'eliminació d'una substància tòxica acumulada convertint-la en una altra menys tòxica permetent-li mantenir l'activitat cel·lular. No s'ha trobat descrita la repercussió de la capacitat de degradar el DAPG en l'eficàcia en el biocontrol per aquestes soques.

Amb aquest experiment, s'ha demostrat que depenent del moment que es faci una determinació puntual de la concentració de DAPG es perd informació del comportament de les soques durant el cultiu. Si només es disposa d'una mesura puntual, les

diferències de producció entre les soques es poden atribuir de manera errònia. La soca JBR 1-70 a les 24 h havia produït set vegades més DAPG que la EPS808, però a partir de les 44 h el DAPG acumulat en el brou de la JBR 1-70, que havia començat a disminuir, només era un 30% superior a la EPS808. Això confirma el fet que les cinètiques de producció són més precises que les determinacions puntuals en el seguiment de la producció de DAPG i altres antibiòtics (Schnider-Keel i col., 2000).

En tot cas cal fer les mesures de producció de DAPG en la fase estacionària. En aquestes mesures puntuals, llevat que la soca productora degradi el DAPG aquest roman en el medi. Per això, en el present treball, l'estudi de l'efecte de les característiques del medi de cultiu (ferro, glucosa, consistència, complexitat) en la producció de DAPG es va realitzar a partir d'una mesura puntual a les 48 h des de la sembra.

En l'experiment per l'estudi de l'efecte del ferro, s'ha observat que la soca explica la major part de la variança en la producció de DAPG, i que l'addició de ferro no és un factor determinant en la producció de DAPG, malgrat que en algunes soques com EPS317, EPS808 o Q2-87 té un efecte significatiu. Aquest fet també ha estat observat en altres estudis on es compara la producció de DAPG en soques aïllades de sòls supressius (Keel i col., 1996). En general, es va obtenir més producció de DAPG en condicions limitants de ferro i l'efecte és més marcat en el medi KB, en el qual la disponibilitat de ferro és mínima per estar formulat amb una elevada concentració de fosfats i de glicerol que actuen com a complexants del ferro. En general, l'efecte del ferro ha estat inhibir la producció de DAPG, excepte per la soca JBR 1-70 que en KB suplementat amb ferro va assolir la màxima producció de DAPG observada en aquest treball (938 µg/mL de brou), quasi tres vegades superior que en KB.

Shanahan i col. (1992a) havien observat que en *P. fluorescens* F113 el ferro no tenia cap efecte significatiu en la producció de DAPG però Duffy i Défago (1999) van observar que en CHA0 l'addició de ferro feia augmentar la producció de DAPG i de pioluteorina. Nosaltres, en aquest treball, no hem pogut avaluar aquest efecte perquè en medi GA no es va detectar producció de DAPG per la soca CHA0.

En l'estudi de l'efecte de la glucosa no es van utilitzar els medis, KB (complex) i GA (mínim) per estar ja formulats amb fonts de carboni, glicerol el KB i glucosa el GA. Així es van utilitzar el medis complex LB i el mínim 21C.

L'efecte de la glucosa és molt significatiu per totes les soques provocant un augment de la producció de DAPG, llevat de la soca EPS317 en la qual en medi LB, l'addició de glucosa fa disminuir la producció. Aquest darrer resultat coincideix amb l'obtingut en *P. fluorescens* F113, aïllada d'arrel de remolatxa (Shanahan i col., 1992a) que pràcticament no produïa DAPG amb glucosa com a font de carboni. Per contra la soca PS15, tot i que creix en els medis utilitzats, no va produir DAPG en absència de glucosa. Aquest comportament s'ha observat també en la soca CHA0 (Duffy i Défago, 1999). A més, l'efecte estimulador de la glucosa en la producció per la soca Q2-87 en aquest treball coincideix amb el descrit (Duffy i Défago, 1999).

La soca PS15 va ésser l'única de les estudiades amb una dependència tan gran de la glucosa per la síntesi de DAPG. Aquesta soca va ser aïllada d'arrel de remolatxa i pertany al biovar II/IV, i procedeix d'un estudi en el qual les soques mostraven una dependència molt gran de la glucosa per a la síntesi de DAPG *in vitro* (Nielsen i col., 1998).

La complexitat i la consistència del medi de cultiu influeixen de manera considerable en la quantitat de DAPG produïda. Això indicaria que tot i la influència de la soca en la producció, en comparar soques en un assaig *in vitro* caldrà tenir present quin tipus de medi s'utilitza i si la formulació serà sòlida o líquida, la qual cosa influirà d'una manera significativa en els resultats que es puguin obtenir.

Els resultats del nostre estudi amb la soca Q2-87 no coincideixen amb els resultats d'altres estudis (Keel i col., 1996; Bonsall i col., 1997) on la producció en medi sòlid era cinquanta o seixanta vegades superior a la producció en medi líquid. Hi ha però força diferència entre estudis en relació amb els medis utilitzats, KB en el nostre cas, i llevat extracte de malta (YM) en aquell. Però sí que hi ha coincidència quant al fet que en el medi LB suplementat amb glucosa -que és semblant al medi YM- s'observa una major producció (cinc vegades superior) en medi sòlid que en medi líquid. També per aquesta soca, en agar KB s'ha obtingut una producció de DAPG superior a l'obtinguda per Keel i col. (1996), però aquests autors realitzen la determinació del DAPG produït a les 64 h de la sembra i en els nostres estudis s'ha fet a les 48 h.

Aquest efecte estimulador del medi sòlid en la producció de DAPG s'hauria de tenir en compte en la formulació d'agents de biocontrol productors ja que alguns autors han constatat que la preparació de l'inòcul afecta a la supervivència i capacitat d'exercir biocontrol (Slininger i col, 1996; Moënne-Loccoz i col., 1999). La producció de DAPG en

un cultiu sòlid permet emular les condicions del bacteri en un sistema immobilitzat, com seria la utilització de boles d'alginat per la conservació i aplicació d'agents de biocontrol (Smidsrod i Skjak-Baek, 1990). Així, Russo i col. (1996) havien comprovat que la producció de DAPG en *P. fluorescens* F115 era deu vegades més elevada en medi sòlid o immobilitzada en alginat que en suspensió en medi líquid.

Com a tret general de totes les soques, s'ha observat que hi ha unes condicions que condueixen cap a una major producció de DAPG com són medi KB i líquid i que el ferro té un efecte que depèn de la soca i del medi. L'addició de ferro no s'ha observat que millorés la producció de DAPG de manera que en els casos que aquest sigui el mecanisme implicat en l'antagonisme possiblement la limitació de ferro ajudarà a assolir el biocontrol. La producció relativa entre diferents soques en un medi podria canviar en funció bàsicament de la complexitat i també de la consistència del medi de cultiu utilitzat.

Es considera que la diferent producció de DAPG en funció de la font de carboni en soques de *Pseudomonas* pot reflectir diferents graus d'adaptació a l'espectre de nutrients d'un ambient determinat (Schnider-Keel i col., 2000). En aquest sentit es creu que si es disposés d'informació de la producció de DAPG o d'altres antibiòtics en relació amb la composició dels exsudats de les plantes es podran buscar combinacions bacteri-planta més efectives pel biocontrol (Shanahan i col., 1992a).

S'ha observat que les soques Q2-87 (aïllada de sòl supressiu de "take all" del blat i antagonista vers diversos fongs), JBR 1-70 (aïllada de sòl supressiu però no caracteritzat el seu antagonisme) i EPS808, (aïllada d'arrels de portaempelt), són les que van produir més DAPG en quasi tots els medis assajats. En la situació oposada trobem la soca CHA0 que només va produir DAPG en KB líquid. Les soques EPS317 i PS15 s'han classificat com a moderadament productores en la majoria de medis. Aquesta distribució és molt similar a l'obtinguda en el l'avaluació de l'efecte de la glucosa que es comentarà a continuació, la qual cosa indica que la producció de DAPG tot i que depèn del medi tipus i consistència- és una característica molt lligada a la soca.

En un altre ordre de coses, els nostres resultats estan d'acord en que la soca CHA0 produeix DAPG en medi extracte de malta i que en KB sòlid no produeix DAPG (Maurhofer i col., 1992; Keel i col., 1992; 1996). A més, segons els nostres resultats en KB líquid, la soca CHA0 va sintetitzar DAPG, la qual cosa sembla indicar que en

aquesta soca la síntesi de DAPG no només depèn de la glucosa sinó també de si el creixement del bacteri té lloc en suspensió o en superfície.

Les soques més productores de DAPG en aquestes condicions -la JBR 1-70 i EPS808- tenen un patró de producció molt semblant. Aquesta s'incrementa en medi sòlid, en medi complex i en presència de glucosa. Les soques JBR 1-70 i Q2-87 tenen en comú haver estat aïllades de sòls supressius amb blat com a hoste i són, juntament amb la EPS808, les que han produït més DAPG de totes les soques assajades.

En l'estudi de l'efecte de la font de carboni es va comprovar que les soques Q2-87, EPS808 i JBR 1-70 són les que van produir DAPG en un major nombre de fonts de carboni. D'aquestes, la que més va afavorir la síntesi de DAPG va ésser la glucosa tant en sòlid com en líquid. Per contra, el glicerol, bàsicament en medi líquid, va inhibir la producció de DAPG. Això concorda amb el fet que s'ha observat que el glicerol inhibeix la síntesi de DAPG en les soques de *P. fluorescens* Pf5 (Nowak-Thompson i col., 1994; Corbell i Loper, 1995; Rodríguez i Pfender, 1997) i CHA0 (Keel i col., 1992; Duffy i Défago, 1999). La inhibició de la producció de DAPG pel glicerol observada a la soques CHA0 i Pf5 no sembla mostrar-se en la soca EPS808 que en KB és quan produeix més DAPG.

La glucosa no va ser per totes les soques la font de carboni que més estimulà la síntesi de DAPG, així amb glicerol per la soca EPS317 en medi sòlid i amb etanol per la Q2-87 es va detectar més producció de DAPG que amb glucosa. És conegut que la font de carboni afecta significativament a la producció d'antibiòtics com el DAPG (Nowak-Thompson i col., 1994; Rosales i col., 1995; Duffy i Défago, 1999), la pioluteorina (Kraus i Loper, 1995; Yuan i col., 1998; Duffy i Défago, 1999), el PCA (Kanner i col., 1978), la Prn (Nowak-Thompson i col., 1994) i d'altres (James i Gutterson, 1986).

En síntesi, si es considera la producció per a cada un dels medis i s'ordenen les soques segons la producció de DAPG s'obté que hi ha tres soques que són les que més DAPG produeixen en tots els medis assajats: la soca JBR 1-70 és la més productora en nou medis; la Q2-87 és la més productora en sis medis i la EPS808 és la més productora en sis medis. Es dona també una coincidència en els medis en els quals aquestes soques aconseguen la màxima producció: la EPS808 bàsicament ho fa en medis complexos; la Q2-87 bàsicament en medis mínims i la JBR 1-70 en medis complexos i medis mínims per igual. Aquestes tres soques són també les segones

millors productores en el 70% dels medis. Les soques EPS317 i PS15 són mitjanament productores i, finalment, la soca CHA0 no està mai entre les més productores de DAPG. Potser el fet de produir Plt, Prn, HCN i DAPG pot provocar que les millors condicions on s'expressen els diferents gens siguin molt concretes i no corresponguin a les que s'han assajat en aquest treball.

La producció de DAPG està condicionada en primer lloc per la soca i en menor mesura pel medi de cultiu que s'utilitza per l'avaluació. Les soques més productores assolixen la màxima producció de DAPG en el medi KB: KB líquid + Ferro (JBR 1-70 i Q2-87) i KB sòlid (EPS808) i que només en els medis 21C+Glucosa líquid i LB+Glucosa sòlid totes les soques produeixen DAPG. En els altres medis sempre hi ha alguna soca que no és capaç de produir, com seria el cas de la CHA0 en medi GA. Això es podria explicar pel fet que la utilització de peptones i altres hidrolitzats proteics com a font de nitrogen i de carboni afecta significativament a la síntesi d'alguns antibiòtics en diverses soques (Yuan i col., 1998; Duffy i Défago, 1999). Ja en altres estudis la producció de DAPG en Q2-87 està descrita com a més elevada en medis complexos (Bangerer i Thomashow, 1996).

Darrerament la determinació de la producció de DAPG en proves de comparació entre soques es fa en medi KB (Keel i col., 1996; Mavrodi i col., 2001) en el qual s'observa que hi ha més producció que en medi malta. En el nostre estudi s'ha observat que això no es compleix per totes les soques. La producció va ser més gran en medi KB per les soques CHA0, JBR 1-70 i Q2-87, no hi havia diferències significatives en les EPS317 i EPS808 i, la producció en medi malta va ser més elevada que en KB per la PS15. Així, seria interessant que per comparar la producció de DAPG entre diferents soques, o generalitzant, per qualsevol metabòlit secundari, es realitzés en diferents medis i d'aquesta manera avaluar un ventall més ampli de condicions i poder incloure l'efecte del medi en les conclusions.

D'altra banda, la soca EPS317 ha estat objecte d'una caracterització de l'espectre d'inhibició *in vitro* en diferents medis i contra diversos fitopatògens. Presenta inhibició vers *P. syringae*, *S. vesicarium* i *E. amylovora* en medi GA i en medi LB, més intensa en GA+Fe (50 µM) i escassa en agar KB (Bonaterra, 1997). Aquests resultats d'antagonisme correlacionen, parcialment, amb la producció de DAPG en aquests medis, tal com seria d'esperar si aquest fos el mecanisme responsable de l'antagonisme observat (Keel i col., 1996). Malgrat que, en agar KB que és quan la soca

EPS317 produeix més DAPG és quan s'havia observat que la soca tenia menys inhibició vers *P. syringae* mentre que en GA, amb una producció menor que en KB, inhibia tant a *P. syringae* com a *S. vesicarium* (Bonaterra, 1997).

A més, presenta una particularitat respecte a les altres soques productores de DAPG referenciades, i és que produeix DAPG però no HCN. Totes les soques productores de DAPG s'han distribuït en dos grups un amb soques que produeixen DAPG i HCN on hi hauria la Q2-87, i un altre amb les soques que produeixen DAPG, pioluteorina i HCN on hi hauria la CHA0 (Keel i col., 1996; Mc Spadden i col., 2000). Llavors la soca EPS317 no es podria incloure en cap d'aquests dos grups. No s'ha avaluat si aquesta manca de producció d'HCN en la EPS317 és deguda a una mutació. Tampoc s'ha investigat la producció de pioluteorina en aquestes soques de la col·lecció EPS. També, la soca EPS808 que produeix DAPG i HCN, es podria incloure en el primer grup.

Quant als paràmetres cinètics de creixement, l'experiment de monitorització del creixement amb l'aparell Bioscreen ha permès comprovar que el medi de cultiu és el factor que té una major influència per obtenir un alt rendiment cel·lular. El medi conductor cap a un elevat creixement és un medi complex que està suplementat amb una font de carboni. Així els medis en els quals es van assolir els valors màxims de creixement per pràcticament totes les soques van ser medis complexes amb composició molt semblant, l'LB suplementat amb glucosa i l'YM.

La velocitat específica de creixement és un paràmetre característic de la soca, però el medi de cultiu té una influència significativa en la seva magnitud. El medi en el qual es va aconseguir la màxima velocitat de creixement va ser bàsicament un medi complex (LB, YM o KB), i les soques amb la velocitat de creixement més elevada van ser CHA0, JBR 1-70, Q2-87 i EPS808.

La velocitat de creixement és un paràmetre que pot tenir interès per conèixer el potencial d'una soca per esdevenir agent de biocontrol o per colonitzar les arrels. Així la soca EPS808 mostra una elevada capacitat de producció de DAPG i també una elevada velocitat de creixement, característiques que l'agrupen amb altres soques de referència agents de biocontrol. Aquestes característiques combinades amb una elevada capacitat per colonitzar les arrels de les plantes farien de la soca EPS808 una ferma candidata a agent de biocontrol quan el mecanisme pel control dels patògens sigui la producció de DAPG.

Cal destacar que la producció de DAPG en l'experiment de microcultius amb el Bioscreen ha estat fins a 10 vegades inferior a l'obtinguda amb els tubs de cultiu. Una possible explicació seria que amb el Bioscreen s'assoleix un menor aireig que en l'assaig en tubs de cultiu. Aquest menor aireig pot ser conseqüència de l'agitació intermitent en el Bioscreen respecte a l'agitació contínua en els tubs, ja que la relació àrea de contacte amb volum de brou és quatre vegades més elevada en els pouets del Bioscreen que en els tubs, la qual cosa afavoriria l'oxigenació.

S'ha demostrat que les condicions limitants d'aireig estimulen la producció de PCA en la soca *P. fluorescens* 2-79 i en mutants *phz*⁺ de la soca *P. fluorescens* SBW25 respecte a les condicions d'aireig normals (Timms-Wilson i col., 2000). Atribuïnt-se això com un fet positiu perquè en condicions reals a la rizosfera, amb poc oxigen, es postula que la producció de PCA estarà afavorida. D'altra banda també condicions limitants d'oxigen fan que se sintetitzi majoritàriament un antibiòtic en una soca que en produeix diversos (Clark i col., 1995). En aquest sentit totes les soques estudiades en el present treball, llevat de la EPS317, produeixen HCN la biosíntesi del qual s'estimula en condicions microaeròfiles (Laville i col., 1998). Això permetria explicar la disminució de la síntesi de DAPG per l'activació de la síntesi d'HCN. I per altra banda potser també s'explicaria l'estimulació de la síntesi de PCA en la soca Pf 2-79, abans descrita, ja que aquesta que no produeix HCN.

La mutació de resistència a la rifampicina va tenir una influència important en la velocitat específica de creixement i en menor mesura en la producció de DAPG de les soques mutants. Globalment, aquestes van créixer més lentament i van produir menys DAPG que les corresponents soques salvatges. Aquestes diferències entre les soques salvatges i les mutants es poden explicar per un efecte de la mutació que comporta resistència a la rifampicina. Aquesta mutació pot ser deguda a canvis en la ARN polimerasa o en la permeabilitat de la membrana cel·lular, que poden comportar efectes negatius en el funcionament de les cèl·lules. Entre aquests cal considerar un possible efecte negatiu en la RNA polimerasa que afecti l'eficiència en la transcripció i provoqui canvis en la síntesi de proteïnes, limitant així la velocitat de creixement i de producció de DAPG. Si es provoquen canvis en la permeabilitat de la membrana també el creixement i la producció de DAPG poden ser afectats tant pel que fa a l'entrada de nutrients com a la sortida dels metabòlits.

En canvi, en base a altres característiques es pot afirmar que els mutants seleccionats amb resistència a la rifampicina no difereixen de les soques salvatges. Per exemple, l'empremta genètica amb PFGE amb digestió amb l'enzim *EcoRI* no es van observar diferències per cap de les soques mutants respecte a les salvatges (Badosa, 2001).

4.6 Conclusions

Les conclusions d'aquest capítol es resumeixen en els següents apartats:

- La glucosa estimula la producció de DAPG a pràcticament totes les soques, i augmenta el rendiment cel·lular.
- El ferro té un efecte poc definit en la producció de DAPG que depèn del medi de cultiu i de la soca.
- La consistència (sòlid, líquid) i la complexitat (mínim, complex) del medi afecten significativament a la producció de DAPG. No es pot establir un patró comú però en general la producció augmenta en medi sòlid i complex.
- Les soques descrites com a actives en el biocontrol d'alguna malaltia van ser les més productores de DAPG exceptuant la *P. fluorescens* CHA0, en les condicions assajades en aquest treball.
- La soca EPS808 produeix DAPG en quantitats similars a les soques de referència *P. fluorescens* Q2-87, JBR 1-70, en quasi totes les condicions provades en aquest treball.
- La soca EPS808 té una elevada velocitat de creixement, similar a les soques de referència que són agents de biocontrol CHA0, Q2-87 i JBR1-70.
- La soca EPS808 és una ferma candidata a agent de biocontrol per la seva capacitat de produir DAPG i de créixer a velocitat elevada, de manera anàloga a les soques de referència agents de biocontrol utilitzats en el nostre treball.

Capítol 5

Producció de DAPG i colonització de fruits i arrels per soques seleccionades de *P. fluorescens*

5.1 Introducció

La capacitat per colonitzar les arrels de les plantes hoste es considera una característica necessària perquè una soca bacteriana pugui arribar a ésser un agent de biocontrol de malalties del sistema radical (Weller i Cook, 1983; Weller, 1984 i 1988; Cook, 1993). Aquesta capacitat s'ha relacionat també amb la producció d'antibiòtics en les arrels (Raaijmakers i col., 1999), amb l'eficàcia en el biocontrol (Bull i col., 1991). S'ha demostrat que mutacions en caràcters relacionats amb la capacitat de colonitzar les arrels com la mobilitat o la síntesi d'aminoàcids provoquen que una soca deixi d'exercir biocontrol (Chin-A-Woeng i col., 2000). Per això, en el procés de selecció de bacteris com a candidats a agents de biocontrol, l'estudi de la seva capacitat de colonitzar la planta és una etapa necessària (Cook, 1993).

La colonització de les arrels ha estat molt estudiada i és un procés en el qual hi intervenen múltiples factors que actuen de manera específica per cada soca i hoste. Tota aquesta informació serà necessària per determinar la concentració cel·lular mínima en l'aplicació del tractament biològic per poder assolir la concentració llindar i assegurar així l'establiment efectiu de l'agent de biocontrol a les arrels.

L'establiment d'una soca en un ambient és un procés complex que no només depèn de les condicions ambientals -temperatura, humitat, nutrients, pH, etc...- (Suslow i Schrotch, 1982; Weller, 1984; Burr i Caesar, 1984; Stutz i col., 1986; Thompson, 1997; Kinkel i col., 2000) o de la concentració d'aplicació (Weller i Cook, 1983; Weller i col., 1988; Bull i col., 1991), sinó també de la capacitat de la soca introduïda per competir amb la microbiota autòctona (Rodríguez i Pfender, 1997; Raaijmakers i col., 1999), de les característiques del sòl on s'aplica (Stutz i col., 1989; Latour i col., 1996; Bevivino i col., 1998) o de la planta a la que ha de colonitzar (Latour i col., 1996; Troxler i col., 1997a; Kinkel i col., 2000). De manera que en escollir un agent de biocontrol cal

estudiar amb deteniment l'ambient i l'hoste al qual es vol aplicar per tal d'augmentar les possibilitats d'èxit.

La relació entre el nivell poblacional de l'agent de biocontrol i del patògen és també un aspecte important per assolir un biocontrol efectiu (Raaijmakers i col., 1995, Montesinos i Bonaterra, 1996; Raaijmakers i Weller, 1998). Així, s'ha definit la concentració cel·lular llindar com la mínima concentració de l'agent de biocontrol que permet assolir un control significatiu del patògen (Raaijmakers i Weller, 1998).

Una concentració llindar efectiva baixa permetria disminuir el cost dels tractaments amb agents de biocontrol (Bonsall i col., 1997). Però, s'ha pogut comprovar que aquesta concentració llindar canvia en ordres de magnitud segons la soca antagonista (Raaijmakers i Weller, 1998; Raaijmakers i col., 1999). En altres estudis, s'ha demostrat que la quantitat de bacteris que colonitza les arrels està directament relacionada amb la concentració aplicada com a inoculant a les llavors (Bull i col., 1991; Thompson, 1997).

En el procés de colonització de les arrels per microorganismes introduïts artificialment també cal tenir present el sistema d'aplicació, el qual influeix en la població que s'hi estableix. En aquest sentit, Russo i col. (1996) van observar que *P. fluorescens* immobilitzades en alginat colonitzaven millor les arrels de remolatxa sucrera que quan s'aplicaven com a suspensió.

Una dificultat que s'ha advertit en el desenvolupament dels agents de biocontrol és que les soques aplicades com a inoculant a les plantes o com a recobriment de llavors es troben, en general, amb condicions de baixa disponibilitat de carboni i de ferro que afecten substancialment a la seva activitat en el sòl i que són molt diferents a les assajades en el laboratori (Van Overbeek i col., 1997). Així, la capacitat de produir sideròfors, d'utilitzar un ampli ventall de fonts de carboni diferents i tenir una velocitat de creixement elevada, són característiques desitjables en les soques aplicades (Schippers i col., 1987; Mirleau i col., 2000). Aquesta capacitat de colonització no es pot avaluar correctament en assaigs *in vitro* i s'ha de avaluar en assaigs sobre material vegetal o a camp en condicions reals.

Una vegada els bacteris han colonitzat l'arrel han de mantenir-se actius per protegir la planta durant un període suficientment llarg. Però això pot presentar dificultats perquè la dinàmica de la població bacteriana introduïda a les arrels està condicionada per factors biòtics, com l'estat vegetatiu i edat de la planta, de manera que en envellir hi

ha una disminució de la població tant inoculada com total (Troxler i col., 1997b; Bevivino i col., 1998).

Els exsudats també tenen un paper important en la colonització de les arrels (Schippers i col., 1987; Picard i col., 2000), i s'ha postulat que el coneixement de la composició dels exsudats de les arrels i la capacitat de diferents fonts de carboni per estimular la producció d'un antibiòtic és essencial per trobar una combinació bacteri-planta efectiva (Shanahan i col., 1992a). També, en algun cas, s'ha observat un augment de la quantitat de bacteris presents a les arrels que es relaciona amb la supervivència de la soca introduïda en les arrels en descomposició presents al sòl (Troxler i col., 1997a).

La distribució dels bacteris al llarg de les arrels depèn de diversos factors (Weller, 1984; Dandurand i col., 1997) com són: la topografia de les arrels -hi ha més bacteris a la base de l'arrel que a l'extrem- (Russo i col., 1996), i la disponibilitat de nutrients ja que la distribució sembla reflectir el patró d'exsudació de l'arrel (Jaeger III i col., 1999). Els bacteris es localitzen predominantment als llocs on es troben els nutrients procedents dels exsudats, tant siguin ferides com zones de creixement (Dandurand i col., 1997; Jaeger III i col., 1999). La població de bacteris a les arrels no es distribueix de manera lineal, sinó que ho fan de manera discontinua i en forma de distribució lognormal (Loper i col., 1984; Weller, 1984; Pierson i Weller, 1994; Chin-A-Woeng i col., 1997). S'ha comprovat l'existència de diferències tant a nivell de localització al llarg de l'arrel com en les diferents poblacions que s'estableixen durant el creixement de la planta (Picard i col., 2000). Aquest aspecte és especialment important a l'hora de plantejar el mostraig en els estudis de colinització.

Entre les característiques desitjables que haurien de posseir les soques introduïdes com a agents de biocontrol destaca el que no causin alteracions en la microbiota beneficiosa autòctona (Weller, 1988). Aquesta ajuda a mantenir un estat sanitari bo a les arrels. S'ha remarcat també que algunes de les soques introduïdes causen alteracions en la microbiota que depenen de la concentració de sembra però que disminueixen a mida que passa els temps (Thompson i col., 1995).

S'ha constatat una gran diversitat de variables que intervenen en el biocontrol i que llevat d'algunes excepcions sembla que cal un agent antagonista diferent per a cada malaltia o plaga i per a cada hoste (Mathre i col., 1999).

Per tal de solventar aquest fet i millorar l'eficàcia dels antagonistes s'ha assajat la utilització de barreges amb més d'una soca de manera que es pugui assegurar un ampli ventall d'aptituds per a colonitzar les arrels (Schroth i Hancock, 1981, Pierson i Weller, 1994; Fukui i col., 1994 i 1999; Duffy i col., 1996a; De Boer i col., 1999). En aquestes proves s'ha observat que en general s'obtenien millors resultats amb les barreges, però no sempre la mateixa barreja proporciona la mateixa eficàcia (Pierson i Weller, 1994). Tampoc en aquest cas es pot assegurar l'èxit ja que Chiarini i col. (1998) van observar que no hi havia diferències entre la promoció del creixement amb una o més soques.

Darrerament s'estan investigant estratègies alternatives per a la selecció de soques de manera que s'incrementin les possibilitats de trobar soques antagonistes. Es tractaria de definir quines són les característiques que ha de tenir un agent de biocontrol per cercar-los mitjançant aïllaments dirigits. Un dels arguments utilitzats és que les soques es poden diferenciar fenotípicament per la utilització de diferents fonts de carboni (McSpaden i col., 2000) de manera que el coneixement d'aquest patró i de la composició dels exsudats de la planta pot ajudar a trobar una combinació bacteri-planta més efectiva (Shanahan i col., 1992b).

En el present treball, fins ara, s'han demostrat les potencialitats de la soca EPS288 per produir HCN *in vitro* en quantitats similars a l'agent de biocontrol CHA0 i de la soca EPS808 per produir DAPG en quantitats elevades i similars a les soques de referència agents de biocontrol Q2-87, JBR 1-70 i CHA0, en els quals la producció de DAPG està implicada en el biocontrol. S'ha demostrat també que ambdues soques tenen capacitat per créixer a una velocitat específica elevada, anàloga o superior a les soques de referència.

Però, com s'ha argumentat, cal confirmar les potencialitats de les soques EPS288 i EPS808 en assaigs *in vivo* sobre material vegetal -fruits, arrels- abans de seleccionar-les com a candidates a agents de biocontrol. Per això, en aquest capítol es realitzen diversos assaigs sobre material vegetal, tant de producció de DAPG en ferides de fruits com de colonització d'arrels de plantes a partir de llavors inoculades.

5.2 Objectius

En aquest capítol, l'objectiu principal que es va plantejar fou l'estudi de diverses soques en relació a la capacitat de colonitzar efectivament l'hoste i que puguin expressar els components que intervenen en el mecanisme pel qual exerceix el biocontrol.

Aquest objectiu es va dividir en dos:

- Determinació de la capacitat d'algunes soques de *P. fluorescens* per produir DAPG i d'inhibir infeccions causades per patògens sobre material vegetal.
- Estudi de la colonització i supervivència, de la capacitat de promoció de creixement vegetal, i de l'efecte en la microbiota total a les arrels, per soques seleccionades de *P. fluorescens*.

5.3 Materials i mètodes

5.3.1 Bioassaigs sobre material vegetal

5.3.1.1 Selecció de mutants de les soques de *P. fluorescens*

Per seguir l'evolució dels nivells poblacionals de soques de *P. fluorescens* introduïdes tant a les arrels com a les ferides de la fruita, fou necessari seleccionar mutants espontanis resistents a rifampicina. Per això, es van preparar plaques d'agar LB amb gradient de concentració de rifampicina, dipositant agar LB amb 50 mg de rifampicina/L en plaques de Petri inclinades i deixant-les solidificar de manera que l'agar quedava dipositat formant pendent. A continuació, les plaques es van dipositar horitzontalment, addicionant a continuació agar LB i es deixaren solidificar. Aquestes plaques es conservaren a 4°C fins a la seva utilització, com a màxim durant deu dies.

Les soques de les quals es volien seleccionar mutants, foren sembrades en plaques d'agar LB i incubades durant 24 h a 25°C. A partir d'aquests cultius es preparà una suspensió cel·lular concentrada en tampó fosfat. D'aquesta suspensió es van sembrar homogeniament 250 µL en les plaques amb gradient de rifampicina i es van incubar a 25°C de 24 a 36 h. De cada soca es van seleccionar aquelles colònies crescudes a la zona de major concentració de rifampicina, i per tal de comprovar la seva puresa es van sembrar en plaques de LB+50 mg de rifampicina/L i s'incubaren a 25°C unes 24 h. Els mutants espontanis resistents a rifampicina (Rif^r) es congelaren en diferents vials Eppendorf amb brou LB amb 20% de glicerol de manera que per a cada assaig s'utilitzà un vial nou (veure l'apartat 2.3.2).

5.3.1.2 Producció de DAPG en fruits

Per determinar si les soques productores de DAPG eren capaces de produir-ne en ferides de fruita es van utilitzar dues varietats de pera (Conference i Passe Crassanne) i una varietat de poma (Golden). Aquesta fruita procedia d'una central frutícola on es conservava en les condicions habituals.

Les soques escollides per aquest experiment van ser *P. fluorescens* JBR 1-70, Q2-87 i la pròpia EPS808, perquè es coneixia la seva capacitat de sintetitzar DAPG .

Els fruits es van desinfectar rentant-los per immersió en una solució al 5% de lleixiu comercial (DAC, solució d'hipoclorit de sodi amb 40 g clor lliure per litre) durant 2 min, esbandint-les tot seguit i successivament en aigua corrent, en aigua desmineralitzada i finalment en aigua desmineralitzada estèril.

Cada fruit es va partir longitudinalment en dues meitats, dipositant-les a continuació sobre paper de filtre humidificat amb aigua dins una safata, tot en condicions d'esterilitat. A la superfície de cada meitat es van fer 9 ferides distribuïdes en grups de tres, dipositant a cada ferida 20 µL d'una suspensió de bacteris de 10^8 ufc/mL ($A_{610}=0,2$) del mutant Rif^r de la soca candidata. La suspensió es va preparar en tampó fosfat a partir d'un cultiu en medi LB + Rif sòlid crescut durant 24 h, inoculant cada soca en tres ferides. Com a control no tractat es va dipositar aigua estèril en lloc de la suspensió. La safata, amb els fruits inoculats, es va cobrir amb una bossa de plàstic que es va segellar i incubar a 25°C a les fosques.

Pel recompte de viables i extracció del DAPG a les ferides dels fruits, a les 48 h, es van obtenir discs de 1,0 cm de diàmetre i 1,5 cm de fondària, que contenien la ferida amb ajuda d'un trepant, i es van extreure amb 10 mL d'aigua peptonada utilitzant l'homogeneïtzador de pales (Masticator, IUL Instruments). Els recomptes de viables a les ferides es van fer a partir de la suspensió anterior sembrada en agar LB suplementat amb 50 µg de rifampicina/L.

Per a la quantificació del DAPG produït els discs de fruita, utilitzats pel recompte de viables, van ser reextrets amb 10 mL d'acetona durant 10 min per dues vegades. L'extracte amb tampó fosfat i els d'acetona es van combinar i centrifugar a 6000 g (RC-5CPlus, Sorvall) durant 5 min i es va seguir procedint l'extracció i quantificació del DAPG de manera anàloga a un cultiu sòlid (veure l'apartat 4.2.1).

5.3.1.3 Producció de DAPG en arrels

La planta model escollida per avaluar la capacitat de colonització i de producció de DAPG en arrels fou el portaempelt GF677, híbrid presseguer-ametller, (Agromillora Catalana S.A.). Les plantes tenien 45 dies i foren obtingudes de l'hivernacle de producció de l'empresa, i estaven crescudes en testos individuals de 200 mL amb substrat.

Per inocular les plantes es van aplicar 5 mL d'una suspensió de 10^8 ufc/mL de la soca Rif^r ($A_{610}=0,2$) al substrat dins el test i seguidament 15 mL d'aigua corrent.

Es van inocular 9 plantes amb cada soca, utilitzant els mutants Rif^r de les soques EPS808 i Q2-87, i deixant un control no tractat amb 9 plantes. Aquestes es van mantenir en les condicions del laboratori regant-les amb aigua corrent quan era necessari.

Els dies 8 i 21 es van prendre aleatòriament tres plantes de cada tractament i dels controls, i es van determinar els bacteris viables i el contingut de DAPG que hi havia associat a les arrels. El substrat enganxat a les arrels es va eliminar deixant només el que estava fortament associat. Les arrels es van tallar, pesar i afegint 10 mL d'aigua peptonada es van extreure amb l'homogeneïtzador de pales durant 1 min. A partir d'aquesta suspensió es va realitzar el recompte de viables en medi LB amb rifampicina (veure l'apartat 5.3.1.1) i l'extracció del DAPG va realitzar-se seguint la metodologia descrita prèviament (Shanahan i col. 1992a i 1992b, Bonsall i col. 1997).

Les suspensions pertanyents a les repeticions del mateix tractament es van ajuntar, centrifugar, i després d'ajustar el sobrenedant a pH=2 amb HCl, l'extracte es va concentrar utilitzant cartutxos d'extracció Sep-Pak C₁₈ (Waters, Mildford, USA). La solució de rentat del cartutx es va evaporar a sequedat, i el residu obtingut, una vegada dissolt amb fase mòbil (veure l'apartat 2.3.5), quedava ja preparat per la quantificació del DAPG mitjançant CLAR.

5.3.1.4 Bioassaigs d'inhibició d'infeccions causades per bacteris i fongs fitopatògens

La capacitat d'inhibició del desenvolupament de les infeccions causades per bacteris i fongs fitopatògens es va assajar sobre fruits immadurs de perera per *Erwinia amylovora*, en fulles de perera per *S. vesicarium*, i en pomes per *P. expansum*.

El material vegetal es va desinfectar prèviament submergint-lo en una solució d'hipoclorit de sodi del 1% de clor actiu durant 5 min i esbandint-lo amb abundant aigua corrent, aigua desionitzada i finalment en aigua desionitzada estèril.

Inhibició de la infecció causada per *E. amylovora*

Es van utilitzar fruits immadurs de perera (Passe Crassane) de 10 setmanes recollits d'una explotació comercial de la província de Girona que es van conservar a 4°C i al 100% d'humitat fins a la seva utilització.

Una vegada desinfectats es van fer 4 ferides a cada un dels fruits. Cada tractament consistia en 3 repeticions de 3 fruits amb 4 ferides. El treball amb *E. amylovora* (bacteri de quarantena a Europa) es va realitzar extremant les precaucions en la manipulació, sota campana de seguretat biològica (Nuair Class II UN-426-400E-USA) i destruint mitjançant autoclau tot el material després de la finalització de l'experiment. El procediment seguit va ésser el descrit per Cabrefiga (2000).

A partir de cultius en brou LB dels bacteris dels que es volia determinar la capacitat antagonista es va preparar una suspensió, de 10^8 ufc/mL ($A_{610}=0,2$). Els fruits a tractar es van submergir en aquestes suspensions durant 2 min i es van dipositar dins alvèols en safates que contenien un paper humitejat amb aigua destil·lada estèril. Les safates introduïdes dins bosses, es van segellar i incubar durant 24 h a 22°C. Posteriorment, a cada ferida dels fruits es van dipositar 10 µL de la suspensió de la soca *E. amylovora* 273 i les safates, segellades, es van incubar a 22°C amb fotoperíode de 16 h de llum. Com a controls es van utilitzar fruits sense inocular amb el patogen (Cn), i fruits submergits en aigua i inoculats amb el patogen (Ca).

La lectura dels resultats (aparició d'exsudats característics a les ferides) es va realitzar als 5, 6, 7 i 10 dies de la inoculació.

El percentatge d'eficàcia -E(%)- en la reducció de la infecció per a cada aïllat es va calcular com:

$$E(\%) = \frac{F_c - F_a}{F_c} * 100$$

On

F_c és el nombre de ferides infectades en el control sense tractar (Ca)

F_a nombre de ferides infectades en cada tractament per cada aïllat (Cn)

Inhibició de la infecció causada per *S. vesicarium*

Es van utilitzar fulles de perera que es van obtenir de plantes de la varietat Conference i s'arrencaren ben formades de la zona més apical (extrem superior). La metodologia seguida va ésser la descrita per Bonaterra (1997).

Les fulles van desinfectar-se submergint-les durant 2 min en una solució a l'1% de clor actiu de lleixiu comercial (DAC, solució d'hipoclorit de sodi de 40 g clor lliure per litre) i ja eixutes, es van submergir durant 2 min en una suspensió de 10^8 ufc/mL

($A_{610}=0,2$) de les soques antagonistes. Seguidament, es van dipositar sobre paper de filtre humitejat amb aigua destil·lada estèril dins un safata, i segellades dins una bossa es van incubar 24 h a 22°C i amb un fotoperíode de 16 h de llum. El control negatiu eren fulles submergides en aigua estèril.

Per inocular les fulles es van dipositar en el seu revers 6 gotes de 10 µL d'una suspensió de *S. vesicarium* a una concentració $5 \cdot 10^4$ conidis/mL (preparada segons l'apartat 2.3.3.1). Seguidament, les safates es van introduir en bosses que van segellar-se i incubar a 22°C amb un fotoperíode de 16 h de llum. La lectura dels resultats es va fer a les 48, 64 i 144 h des de la inoculació.

Per determinar la severitat de la infecció a les fulles es va considerar el següent índex: 0: sense necrosi, 1: un sol punt de necrosi, 2: necrosi desenvolupada (diversos punts de necrosi), i 3: necrosi molt desenvolupada (ocupa quasi la totalitat de la superfície inoculada).

Així el percentatge d'eficàcia d'inhibició -E(%)- es va calcular per cada repetició amb la fórmula:

$$E(\%) = \frac{\sum_1^n I_c - \sum_1^n I_a}{\sum_1^n I_c} * 100$$

On

I_c és l'índex de cada punt d'inoculació del control sense tractar

I_a és l'índex de cada punt d'inoculació de les fulles tractades amb antagonista

Inhibició de la infecció causada per *P. expansum*

Es van utilitzar pomes (Golden) procedents de la Finca experimental de la Fundació Mas Badia a La Tallada d'Empordà (Girona), que estaven emmagatzemades a 1°C. L'assaig es va fer seguint el procediment descrit prèviament per Dorca (1998).

Les pomes, una vegada desinfectades, es van partir per la meitat de manera longitudinal i en cada meitat es van realitzar 12 ferides alineades en grups de 3 ferides. Aquestes meitats es van dipositar dins una safata sobre paper de filtre humitejat amb aigua destil·lada estèril.

Es van inocular 50 µL d'una suspensió de 10^8 ufc/mL ($A_{610}=0,2$) de les soques antagonistes en 3 ferides de 3 mitges pomes diferents. Es van inocular 3 soques a cada mitja poma deixant 3 ferides sense inocular, com a control positiu. Les safates es van introduir dins una bossa de plàstic, i segellades, es van incubar a 15°C durant 24 h. A continuació, les ferides es van inocular amb una suspensió de *P. expansum* a una concentració de $5 \cdot 10^4$ conidis/mL (veure l'apartat 2.3.3.1), dipositant-ne 10 µL a cada ferida.

La safata introduïda dins una bossa segellada es va incubar a 15°C amb fotoperíode de 16 h de llum. La lectura dels resultats es va fer als 5 i als 6 dies des de la inoculació del patogen. L'eficàcia de la soca antagonista es va avaluar independentment per cada fruita mesurant els diàmetres de la podridura.

El percentatge de l'eficàcia -E(%)- per a cada repetició es va calcular segons la fórmula següent:

$$E(\%) = \frac{\sum_1^3 Dc - \sum_1^3 Da}{\sum_1^3 Dc} * 100$$

On

Dc, diàmetre de la lesió en el control (patogen sense antagonista)

Da, diàmetre de la lesió en presència de l'antagonista

El valor d'eficàcia era la mitjana de les eficàcies de les tres repeticions.

5.3.1.5 Bioassaig de promoció del creixement en plantes

L'assaig de promoció del creixement es va realitzar amb portaempelts de les varietats Marianna 2624 (pruner) i GF677 que es troben en fase d'aclimatació dins alvèols a l'hivernacle de les instal·lacions dels vivers comercials d'Agromillora Catalana a El Rebató (Barcelona). Aquest assaig es va realitzar segons el protocol desenvolupat per Ruz (1999).

En síntesi, es va aplicar 1 mL d'una suspensió de 10^8 ufc/mL ($A_{610}=0,2$) de les soques al substrat de cada un dels alvèols de les plantes a tractar. Es van realitzar 6 repeticions de cada combinació soca-portaempelt i per cada 9 soques es disposava un control aplicant-li només aigua. Les plantes es van mantenir a les condicions habituals

de l'hivernacle del viver comercial. La lectura es va fer als 21 dies de l'aplicació mesurant la longitud de la part aèria.

Per determinar si una soca tenia efecte en el creixement del portaempelt es va relacionar la mitjana de longituds de les repeticions per cada soca amb la mitjana de longituds pel control no tractat a la mateixa safata (I).

$$I = \frac{L_s}{L_c}$$

On $I > 1$ indica efecte estimulador de la soca en el creixement del portaempelt

L_s és la mitjana de la longitud de la part aèria de la soca inoculada i

L_c és la mitjana de la part aèria del control.

5.3.2 Estudi de la colonització d'arrels

La capacitat de colonització d'arrels per soques de *P. fluorescens* es va assajar mitjançant la inoculació en llavors i la sembra en substrat estèril. La germinació de les llavors i el creixement de les plantes es va fer en condicions d'ambient controlat.

Les soques escollides per realitzar aquest experiment foren els mutants espontanis resistents a rifampicina de *P. fluorescens* de les soques pròpies EPS282, EPS263, EPS288, EPS317, EPS375, EPS808, -totes candidates a agents de biocontrol- i de les soques CHA0, Q2-87, Pf 2-79, BL915, -agents de biocontrol que produeixen antibiòtics diferents-, les quals van utilitzar-se com a referència.

5.3.2.1 Selecció i condicionament de les llavors

Les llavors escollides foren de dues espècies ben diferenciades d'interès en agricultura: tomatera varietat d'hivern TRES CANTOS (Ref. 15908 Semillas Batlle S.A.) i pomera varietat Golden (Golden Delicious). Aquestes darreres llavors foren obtingudes directament a partir de fruita i, prèviament a la sembra, es van sotmetre a un procés de vernalització consistent en aplicar hores de fred a les llavors per preparar-les per la germinació.

Les llavors de pomera es van obtenir a partir de fruita madurada a l'arbre (finals del mes de setembre) recollida a la Finca experimental de la Fundació Mas Badia. Les pomes es van partir transversalment amb cura i es van extreure les llavors del seu receptacle conservant les que no havien estat ferides en aquest procés.

Per tal de preparar-les per la vernalització, es van rentar acuradament per eliminar les restes de polpa i van ser desinfectades per immersió en una solució al 3% de lleixiu comercial (DAC, solució d'hipoclorit de sodi de 40 g clor lliure per litre) durant 2 min. Posteriorment, es van rentar successivament en aigua corrent, en aigua desionitzada i finalment en aigua desionitzada estèril.

El procés de vernalització es va iniciar dipositant les llavors entre capes de paper de filtre humitejat amb aigua estèril en un recipient que es va guardar tapat a la nevera a una temperatura entre 4 i 10°C durant 80 dies. Periòdicament, es comprovà que la humitat es mantenia, i s'afegí aigua i es canviaren els papers quan era necessari.

Les llavors de tomatera es van considerar aptes i preparades per a la sembra tal com es presentaven comercialment.

5.3.2.2 Inoculació i sembra de les llavors

Les llavors tant de tomatera com de pomera es van desinfectar i rentar abans de la inoculació submergint-les durant 1 min en una solució al 3% de lleixiu comercial i esbandint-les bé amb aigua, aigua desionitzada i finalment desionitzada estèril.

Les suspensions de les soques a aplicar es van preparar amb tampó fosfat a una concentració de 10^8 ufc/mL ($A_{610}=0,2$) a partir de cultius crescuts 24 h en agar LB. La inoculació es va fer dipositant unes 40 llavors en 10 mL de la suspensió i deixant-les durant 15 min en agitació orbital a 100 rpm. Pel control no tractat les llavors es van dipositar en 10 mL de tampó fosfat estèril.

L'excés de suspensió es va eliminar per decantació i les llavors es van sembrar dipositant-les en alvèols de 25 mL en els quals s'havia afegit una capa de substrat (Potgrond P, Klasmann Deimann GmbH, Geeste, Germany) prèviament esterilitzat a 121°C durant 20 min, i es van cobrir amb el mateix substrat.

El disseny experimental va ésser el següent: es van sembrar dotze llavors de cada soca i del control no tractat i, per evitar efectes de veïnatge, les soques es van repartir aleatòriament en files. Es va atorgar un número a cada soca, ordenant-les en els alvèols segons una seqüència aleatòria generada per ordinador (Microsoft Excel). Cada bloc es va fer per triplicat. L'experiment va repetir-se en les mateixes condicions (experiment B).

5.3.2.3 Germinació de les llavors, creixement de les plantes i determinació de la població bacteriana en les arrels

Les plaques contenint els alvèols es van incubar a la cambra d'expressió durant tot el període de germinació i de creixement sota condicions controlades de temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$), d'humitat ($85\pm 5\%$) i amb un fotoperíode de 12 h.

Els alvèols es van regar periòdicament amb aigua corrent, quan les llavors encara no havien germinat i, una vegada germinades, es van regar alternativament amb aigua corrent i amb aigua a la qual s'afegia 1 g/L d'Hakaphos verde (Compo, BASF Española, Barcelona), fórmula per l'inici del cultiu que conté: 15% N (4% NO_3 i 11% NH_4), 10% P_2O_5 , 15% K_2O , 30% SO_4 , 2% MgO i també s'afegia 0,5 mL/L de solució de micronutrients (LUQSA, Leridana Unión Química S.A., Sudanel, Lleida) que conté 0,35% B, 0,15% Cu, 1,5% Fe, 1% Mn, 0,25% Zn i 0,02% Mo.

Per fer els recomptes de viables a les arrels i les pesades de les plantes i arrels es varen prendre aleatòriament tres plantes de cada una de les tres repeticions per cada soca i pel control a cada temps de mostreig.

El recompte de bacteris viables a les arrels va fer-se seguint el mètode descrit per Carrol i col., (1995). Les plantes es van treure dels alvèols procurant no trencar l'arrel i amb cura, però enèrgicament. El substrat es va eliminar deixant només el que estava fortament associat a les arrels. Aquestes, una vegada pesades, es van dipositar individualment dins una bossa asèptica (Model 6041 Seward Ltd., London) que contenia 10 mL de tampó fosfat i es van extreure durant 1 min. Els recomptes de viables es van fer a partir d'aquesta suspensió en agar LB suplementat amb rifampicina (veure l'apartat 5.1.1), per determinar les soques inoculades que eren Rif^r, i en agar LB pel recompte de la població total, tant de les llavors com de les arrels. Les plaques es van incubar a 20°C durant 24 a 36 h.

Les determinacions moleculars pel seguiment de les soques inoculades a les arrels van ser realitzades per Badosa segons la metodologia pròpia (Badosa, 2001). Es va seguir la presència del gen *phlD* que codifica per la síntesi de DAPG utilitzant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) a les soques EPS317, EPS808, CHA0 i Q2-87, d'un gen de síntesi del PCA a les soques EPS263 i Pf 2-79. Per fer el seguiment de les soques EPS282, EPS288, EPS375 i BL915 es va utilitzar el patró de

bandes de macrofragments de restricció del DNA (MRFLP) obtingut per electroforesi de camp pulsant en gel d'agarosa (PFGE).

5.3.3 Tractament de dades

En l'estudi de la colonització de les arrels els factors estudiats mitjançant l'ANOVA han estat *Soca* (veure les soques escollides a l'apartat 5.3.2.1), *Experiment* (dos experiments independents), *Repetició* experimental (tres repeticions per a cada prova) i *Hoste* (pomera i tomatera). El temps de mostreig es va considerar com a covariable.

Per fer el tractament estadístic de les dades dels recomptes de viables els valors es van dividir pel pes d'arrel fresca i es van transformar en logaritmes [$\log(\text{ufc/g arrel})$]. Els resultats de pesos de les arrels i de les plantes no es van transformar.

La separació de mitjanes es va fer amb la prova de comparacions múltiples de Duncan i també amb la prova de Dunnet per comparacions dels diferents tractaments amb un control.

Quan en l'ANOVA no s'observà efecte significatiu de la repetició experimental, s'agruparen els triplicats fent la mitjana de les tres plantes per a cada repetició i aquesta mitjana es va considerar com una mostra.

Les correlacions entre variables es van realitzar amb la correlació de Pearson, si les dades seguien una distribució normal o amb el coeficient Rho de Spearman quan les dades no es van distribuir normalment.

Pel tractament estadístic es va utilitzar el paquet informàtic SPSS per Windows. (Versió 7.5.2S. SPSS Inc. 1989-1997).

5.4 Resultats

5.4.1 Bioassaigs d'activitat sobre material vegetal

5.4.1.1 Producció de DAPG *in vivo*

Producció en arrels

La població resistent a rifampicina detectada a les arrels de les plantes inoculades va ésser aproximadament entre el 2 i el 20% de la població total, mentre que a les arrels del control no tractat la població Rif⁺ va ésser del 0,03 al 0,05% en tots els temps de mostreig tal com es mostra a la Taula 5.1. Això indica que les soques inoculades varen colonitzar efectivament les arrels del portaempelt GF677, malgrat que es va observar una petita caiguda de la població entre els dies 8 i 21, però sense diferències significatives.

Taula 5.1. Població de bacteris Rif⁺ i totals a les arrels de GF677 a diferents temps de mostreig (log ufc/g arrel fresca). Mitjana de tres plantes.

Table 5.1. Bacterial Rif⁺ and whole population at roots of GF677 at different time (log cfu/g fresh root). Average of three plants.

Temps	Control		EPS808		Q2-87	
	Total	Rif ⁺	Total	Rif ⁺	Total	Rif ⁺
8 dies	5,9 ± 0,1	2,4 ± 0,1	6,1 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,7 ± 0,1	4,6 ± 0,3
21 dies	5,8 ± 0,1	2,4 ± 0,2	5,9 ± 0,2	4,7 ± 0,5	5,6 ± 0,2	4,5 ± 0,2

Malgrat la presència dels bacteris inoculats, no es va detectar DAPG en cap de les arrels ni als diferents temps de mostreig.

La població de bacteris totals era independent de la inoculació de la soca, doncs era similar a la població del control. A més, s'observà que al control hi havia una població de bacteris Rif⁺ d'aproximadament 10² ufc/g arrel, que pot considerar-se com a soroll de fons. Mentre que la població Rif⁺ de les arrels tractades amb les soques EPS808 i Q2-87, era significativament més elevada, de 100 a 1000 vegades superior que la del control no tractat.

Producció en fruits

A les 48 h de la inoculació es va observar en les peres Conference que les ferides inoculades amb les soques EPS808 i JBR 1-70 apareixien envoltades d'halos marrons,

mentre que al control no tractat no hi havia senyals visibles (veure la Figura 5.1). Aquestes senyals de necrosi corresponen a fitotoxicitat, perquè aquestes soques de *P. fluorescens* no son HR⁺ i per tant, no són patògenes. No es van observar aquests halos en les pomes Golden ni en les peres Passe Crassanne per cap de les soques aplicades.

En els recomptes de viables es va observar que totes les soques mantenien una població superior a 10⁸ ufc/ferida en tots els fruits.



Figura 5.1. Ferides de les peres Conference (part superior) i de les pomes Golden (part inferior) tractades amb les soques Q2-87, JBR1-70 i, EPS808 (d'esquerra de dreta).

Figure 5.1. Wounds in Conference pears (above) and Golden apples (below) treated with strains Q2-87, JBR1-70 and, EPS808 (from left to right).

La producció de DAPG va ésser diferent en funció de la fruita i de la soca inoculada i els resultats es mostren a la Taula 5.2.

Taula 5.2. Producció de DAPG (μg DAPG /ferida) en ferides de fruits inoculades amb soques de *P. fluorescens*.

Table 5.2. DAPG production (μg DAPG /wound) in fruit wounds inoculated with *P. fluorescens* strains.

Soca	Fruita		
	Poma Golden	Pera Conference	Pera Passe Crassanne
EPS808	0,6 \pm 0,3	148,3 \pm 10,3	93,0 \pm 12,4
JBR 1-70	8,3 \pm 2,1	254,0 \pm 19,1	135,0 \pm 7,4
Q2-87	ND	0,3 \pm 0,1	1,5 \pm 0,3

ND. No detectat/ Not Detected.

Totes tres soques van produir DAPG en les ferides de les peres, detectant-se més quantitat de DAPG en Conference que en Passe Crassanne, llevat de la soca Q2-87

que va produir més en Passe Crassanne. Quant a l'hoste, la producció de DAPG en poma va ésser significativament més baixa que en pera per totes les soques. La soca JBR 1-70 és la que va produir més DAPG en totes les fruites i la Q2-87 la que en va produir menys, de manera que en poma no va produir-ne quantitats detectables.

Els senyals de fitotoxicitat van aparèixer només en pera Conference i per les soques EPS808 i JBR1-70, que són les que havien produït més DAPG. En poma i pera Passe Crassanne no van produir necrosi.

5.4.1.2 Inhibició d'infeccions causades per bacteris i fongs fitopatògens

Els resultats de la capacitat d'inhibició de les infeccions causades per tres patògens: *E. amylovora*, *S. vesicarium*, i *P. expansum*, per les soques assajades es mostra a la Taula 5.3.

En relació a l'eficàcia d'inhibició dels patògens assajats hem de remarcar les soques PS15 i EPS808 com a les que van mostrar la menor capacitat d'inhibició i Pf 2-79 que fou l'única que va assolir una eficàcia d'inhibició superior al 85% davant tots tres patògens.

Taula 5.3. Eficàcia de les soques seleccionades de *P. fluorescens* en la inhibició de les infeccions causades per diversos fitopatògens.

Table 5.3. Efficacy of selected *P. fluorescens* strains against infection caused by different phytopathogens.

	Biocontrol (% d'eficàcia)		
	<i>E. amylovora</i> en fruits immadurs	<i>S. vesicarium</i> en fulles de perera	<i>P. expansum</i> en fruits madurs
<i>P. fluorescens</i> EPS263	64	18	26
<i>P. fluorescens</i> EPS288	33	62	34
<i>P. fluorescens</i> EPS317	17	9	70
<i>P. fluorescens</i> EPS375	81	60	22
<i>P. fluorescens</i> EPS808	25	0	8
<i>P. fluorescens</i> 2-79	88	94	100
<i>P. fluorescens</i> BL915	75	35	100
<i>P. fluorescens</i> CHA0	100	75	20
<i>P. fluorescens</i> Q2-87	6	31	31
<i>P. fluorescens</i> PS15	19	0	0
<i>P. fluorescens</i> JBR 1-70	56	19	7
<i>P. fluorescens</i> SBW25	50	56	80

La inhibició de la infecció va dependre del patògen i de la soca i, en general aquestes soques van mostrar una major capacitat d'inhibir el bacteri *E. amylovora* que

als fongs *S. vesicarium* i *P. expansum*. Si s'agrupen les soques en relació al seu espectre d'inhibició (considerant com a acceptable una eficàcia igual o superior al 60%), s'entreveuen tres grups: un primer grup amb la soca Pf2-79 que va mostrar-se eficaç enfront els tres patògens; un segon, amb les soques BL915, CHA0, i EPS375 que es mostraren eficaces vers el bacteri i un dels fongs i finalment en un tercer amb les soques EPS263, EPS288, EPS317, i SBW25 que es mostraren eficaces només vers un del tres patògens.

Si es considera el metabòlit que produeixen, les soques productores de PCA i/o Prn van mostrar una capacitat d'inhibició més elevada que les soques productores de DAPG. De les soques amb elevada eficàcia només BL915, CHA0 i EPS288 produeixen HCN i finalment, les soques EPS375 i SBW25 no produeixen cap dels metabòlits abans esmentats. De les soques JBR 1-70, EPS808 i Q2-87 -les més productores de DAPG tant en condicions *in vitro* com sobre material vegetal- les dues primeres, no van mostrar en cap cas una eficàcia d'inhibició superior al 60%. Per aquestes tres soques no es va trobar correlació entre la producció de DAPG i la inhibició de les infeccions sobre material vegetal.

5.4.1.3 Efecte sobre el creixement de portaempelts de fruiters

Els resultats d'eficàcia en la promoció o inhibició del creixement dels portaempelts GF677 i Marianna crescuts durant 21 dies en hivernacle en condicions comercials es mostren a la Taula 5.4.

Es pot apreciar que l'efecte depèn de la soca i de la planta, així l'efecte de promoció del creixement en Marianna fou més elevat que en GF677. Semblaria que el portaempelt GF677, híbrid presseguer-ametller, és menys sensible a la promoció del creixement per aquestes soques. Les soques EPS288 i EPS808 són juntament amb les de referència Q2-87, PS15 i SBW25 les que van millorar el creixement d'ambdós portaempelts de manera substancial.

Algunes soques van inhibir el creixement dels portaempelts, com la EPS317 que va inhibir en un 30% el creixement de Marianna i les soques EPS263 i BL915 que van inhibir el creixement de GF677 en un 10% i la CHA0 en un 40% (veure la Taula 5.4). Aquestes tres darreres soques produeixen Prn (veure la Taula 5.5).

Taula 5.4. Promoció del creixement en els portaempels GF677 i Marianna per soques de *P. fluorescens*.

Table 5.4. Growth promotion of rootstocks GF677 and Marianna by *P. fluorescens* strains

	Índex de promoció del creixement	
	GF677	Marianna
<i>P. fluorescens</i> EPS263	0,9	1,3
<i>P. fluorescens</i> EPS288	1,5	1,8
<i>P. fluorescens</i> EPS317	1,3	0,7
<i>P. fluorescens</i> EPS375	1,0	2,5
<i>P. fluorescens</i> EPS808	1,3	1,6
<i>P. fluorescens</i> 2-79	1,1	1,6
<i>P. fluorescens</i> BL915	0,9	1,4
<i>P. fluorescens</i> CHA0	0,6	2,2
<i>P. fluorescens</i> Q2-87	1,5	2,8
<i>P. fluorescens</i> PS15	1,3	2,1
<i>P. fluorescens</i> JBR 1-70	1,2	2,1
<i>P. fluorescens</i> SBW25	1,6	2,4

Taula 5.5. Metabòlits produïts, inhibició de la infecció sobre material vegetal i de la promoció del creixement per soques de *P. fluorescens*.

Table 5.5. Metabolites produced, inhibition of infection and growth promotion by *P. fluorescens* strains.

	Metabòlits				Inhibició de la infecció ¹			Promoció del creixement	
	HCN	DAPG	PCA	Prn	Ea	Sv	Pe	GF677 ²	Marianna ³
EPS263	-	-	+	+	+	-	-	-	*
EPS288	+	-	-	-	-	+	-	+	+
EPS317	-	+	-	-	-	-	+	+	-
EPS375	-	-	-	-	+	+	-	*	+
EPS808	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Pf2-79	-	-	+	-	+	+	+	*	+
BL915	+	-	-	+	+	-	+	-	*
CHA0	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Q2-87	+	+	-	-	-	-	-	+	+
PS15	+	+	-	-	-	-	-	+	+
JBR 1-70	+	+	-	-	-	-	-	*	+
SBW25	-	-	-	-	-	-	+	+	+

¹ Ea: *E. amylovora*; Sv: *S. vesicarium*; Pe: *P. expansum*; + si eficàcia/eficiència $\geq 60\%$

² En GF677 + si $I \geq 1,3$ (veure/see l'apartat 5.3.1.5); * $1 < I < 1,3$, i/and - si $I < 1$

³ En Marianna + si $I \geq 1,6$ (veure/see l'apartat 5.3.1.5); * $1 < I < 1,6$; i/and - si $I < 1$

La promoció del creixement, en aquestes soques, no sembla associada a la producció d'un determinat metabòlit secundari. Tot i això en GF677, la promoció del creixement per les soques Q2-87, JBR 1-70 i EPS808 sembla reflectir la diferent producció de DAPG, en el sentit que la menys productora de les tres, la Q2-87, és la

que mostra una major promoció del creixement. També caldria estudiar el possible efecte inhibitor del Prn en GF677, bé afegint Prn al sòl o bé utilitzant mutants no productors. Les dues soques que no produeixen cap dels metabòlits estudiats, EPS375 i SBW25, van mostrar una bona capacitat tant d'inhibició de les infeccions com de promoció del creixement (veure les Taules 5.3 i 5.4). Entre les soques productores d'antibiòtics, cal destacar que Pf2-79 va mostrar una elevada capacitat d'inhibició de les infeccions amb els tres patògens però només va ser activa en la promoció del creixement de Marianna, i que la soca EPS317 va inhibir el creixement de Marianna mentre que la resta de soques productores de DAPG van mostrar-se estimulants del creixement en Marianna i en GF677.

5.4.2 Tractament de llavors i colonització d'arrels per soques de *P. fluorescens*

Tan les llavors tractades amb les soques com els controls van germinar entre els 7 i 12 dies des de la sembra. Posteriorment es van deixar créixer fins al primer recompte que es va realitzar als 37 dies de la sembra. A la Figura 5.2 es pot comprovar l'aspecte de les plantes als 45 dies de la sembra on les pomeres tenien una alçada d'uns 5 cm i les tomateres de 20 cm.



Figura 5.2. Aspecte dels plançons de pomera (esquerra) i de tomatera (dreta) als 45 dies de la sembra.

Figure 5.2. Apple seedlings (left) and Tomato seedlings (right) 45 days after sowing.

5.4.2.1 Creixement de les plantes

Per determinar l'efecte de la *Soca*, l'*Experiment*, i la *Repetició* en el creixement de les plantes es va fer l'ANOVA del pes de la planta als 72 dies de la sembra (no es mostra). Per pomera, ni el factor *Soca* ($P=0,155$) ni el factor *Experiment* ($P=0,976$) eren significatius, mentre que per tomatera el factor *Soca* no era significatiu ($P=0,253$) però sí que ho era l'*Experiment* ($P=0,07$). Això va indicar que en tomatera hi havia diferències significatives en els pesos de les plantes entre els dos experiments independents. El factor *Repetició* no va tenir efecte significatiu ni per tomatera ni per pomera.

Comparant el pes global de les pomeres i de les tomateres entre els dos experiments independents que es mostra a la Taula 5.6, es va comprovar que no hi havia diferències significatives entre els pesos de les pomeres, però que les tomateres en l'experiment A van assolir un pes més elevat que en l'experiment B.

Taula 5.6. Pes fresc mitjà de les tomateres i de les pomeres als 72 dies de la sembra.

Table 5.6. Average fresh weight of tomato plants and apple seedlings at 72 days after sowing.

Planta	Experiment		Sig. t-Student
	A	B	
Pomera	0,620	0,619	0,98
Tomatera	3,354	3,012	0,005

Amb la prova t-Student va determinar-se si hi havia diferències en el pes de les tomateres entre els dos experiments per alguna de les soques (no es mostren els resultats). Va observar-se que a l'experiment A les plantes tenien un pes superior per totes les soques i també pel control, però que només hi havia diferències significatives a la soca CHA0, que tenia un pes significativament superior a la prova A ($P=0,005$). De manera que pot considerar-se que el major pes de les tomateres a l'experiment A va ésser un efecte generalitzat independentment de la soca aplicada.

Per estudiar l'efecte de les soques en el creixement de les plantes s'ha fet l'ANOVA per cada experiment i hoste per separat (no es mostren els resultats). En tomatera la soca no té efecte significatiu ($P=0,1$) en l'augment de pes de la planta en cap dels experiments, mentre que en pomera només en l'experiment A hi ha un efecte significatiu ($P= 0,04$) de la soca.

Fent la separació de mitjanes segons la prova de Duncan (veure la Taula 5.7), s'observà que en pomera en l'experiment A, es produïen diferències de pes entre algunes de les soques, però només les plantes tractades amb EPS317 tenien un pes inferior que el control. Llevat d'aquest cas, no es van observar diferències significatives en el pes de les plantes ni en pomeres ni en tomateres respecte al control no tractat en cap dels dos experiments. Amb la qual cosa pot afirmar-se que en les condicions assajades en aquest experiment les soques no afectaren significativament el tamany de les plantes.

Taula 5.7. Pes fresc mitjà de les pomeres i tomateres inoculades amb soques de *P. fluorescens* als 72 dies de la sembra en funció de la soca aplicada. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre tractaments amb lletres iguals segons la prova de Duncan.

Table 5.7. Average of whole fresh plant weigh in apple tree and tomato plant inoculated with *P. fluorescens* strains at 72 days after sowing in function of applied strain. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) by Duncan's test.

Soca	Pomera		Tomatera	
	Experiment A	Experiment B	Experiment A	Experiment B
EPS 263	0,603 abc	0,693 a	3,133 ab	2,817 a
ESP 282	0,634 abc	0,596 a	3,470 ab	3,205 a
EPS 288	0,680 bc	0,579 a	2,664 a	2,697 a
EPS 317	0,494 a	0,572 a	3,419 ab	3,157 a
EPS 375	0,631 abc	0,688 a	3,404 ab	2,959 a
EPS 808	0,676 bc	0,554 a	3,506 ab	2,674 a
CHA0	0,705 c	0,617 a	3,983 b	3,113 a
BL 915	0,545 abc	0,614 a	3,450 ab	3,287 a
Q 2-87	0,525 ab	0,562 a	3,286 ab	2,902 a
Pf 2-79	0,642 abc	0,751 a	3,228 ab	2,961 a
Control	0,686 bc	0,586 a	3,348 ab	3,363 a

5.4.2.2 Creixement de les arrels

Per estudiar si alguna de les soques aplicades tenia efecte estimulant o inhibidor en el creixement de les arrels es va realitzar l'anàlisi de la covariància (ANCOVA) del pes de les arrels amb els factors: *Soca*, *Experiment* i *Repetició*, prenent el temps de mostreig com a covariable.

En aquest model, cap de les interaccions va ser significativa, de manera que només es van considerar els efectes principals. El model que es mostra a la Taula 5.8, explica poca variança -el 15% per la pomera i el 25% per la tomatera- amb la qual cosa és poc representatiu de la variació del pes de les arrels, indicant que altres factors no

controlats independents dels tractaments amb les soques de *P. fluorescens* van contribuir a la variabilitat en el pes de les plantes durant l'experiment.

Taula 5.8. Taula de l'ANOVA de l'efecte de *Repetició*, *Experiment* i *Soca* en el pes de les arrels de pomera i de tomatera.

Table 5.8. ANOVA table of the effect of *Repetition*, *Trial* and *Strain* on root weight of apple tree and tomato plant.

Hoste	Factor	gl	Suma de quadrats	F	P>F
Pomera	Temps (Cov)	1	0,16	81,7	0,0001
	Experiment	1	0,0001	0,05	0,82
	Repetició	2	0,0015	0,39	0,68
	Soca	10	0,03	1,54	0,123
	Model	14	0,19	7,1	0,0001
	Residual	579	1,1		
		gl	Suma de quadrats	F	P>F
Tomatera	Temps (Cov)	1	3,1	159	0,0001
	Experiment	1	0,124	6,2	0,013
	Repetició	2	0,01	2,4	0,09
	Soca	10	0,61	3,1	0,001
	Model	14	4,0	14,1	0,0001
	Residual	579	11,6		

Lògicament, el temps és una variable molt significativa ($P < 0,0001$) en ambdós casos i explica pràcticament la totalitat de la variances del model -84% en tomatera i 77% en pomera- tal com era d'esperar pel creixement de les arrels al llarg del temps. Per pomera, cap dels factors que es van estudiar va tenir efectes significatius mentre que per tomatera sí que van ser-ho *Experiment* i *Soca*.

Per estudiar si la soca va tenir algun efecte en el creixement de les arrels de tomatera es va fer l'ANOVA per cada temps i cada experiment per separat (no es mostren els resultats). Es va observar que només a l'experiment B a les 72 h des de la sembra les soques tenien efecte significatiu ($P < 0,05$) en les diferències de pes observades.

A les Figures 5.3 i 5.4 es mostra l'evolució del pes de les arrels de pomeres i tomateres al llarg del temps. Els resultats de la separació de mitjanes del pes al llarg del temps corresponent a aquestes figures es poden consultar a l'annex D.

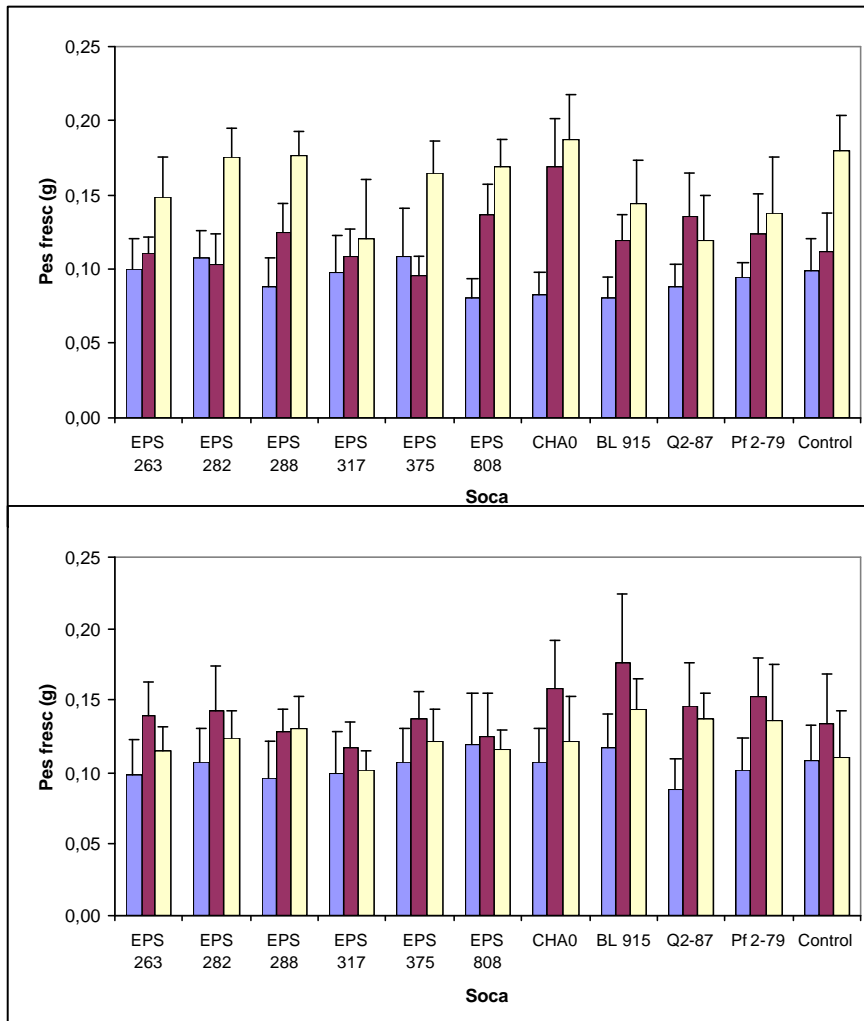


Figura 5.3. Pes de les arrels de les pomeres als 37 dies, 52 dies, i 72 dies, en els experiments A (dalt) i B (baix). Les barres indiquen interval de confiança de tres repeticions ($P=0,05$).

Figure 5.3. Root weight of apple tree seedlings at 37 days, 52 days, i 72 days, after sowing for trials A (above) and B (below). Bars are for confidence interval of three repetitions ($P=0,05$).

Cal notar que el pes de l'arrel en les pomeres als 72 dies des de la sembra a l'experiment B va ésser més baix que als 52 dies però sense diferències significatives ($P>0,05$). Es pot atribuir aquesta disminució a un retard en el mostreig, ja que a l'estar expressada com a pes fresc aquesta mesura és molt sensible al reg.

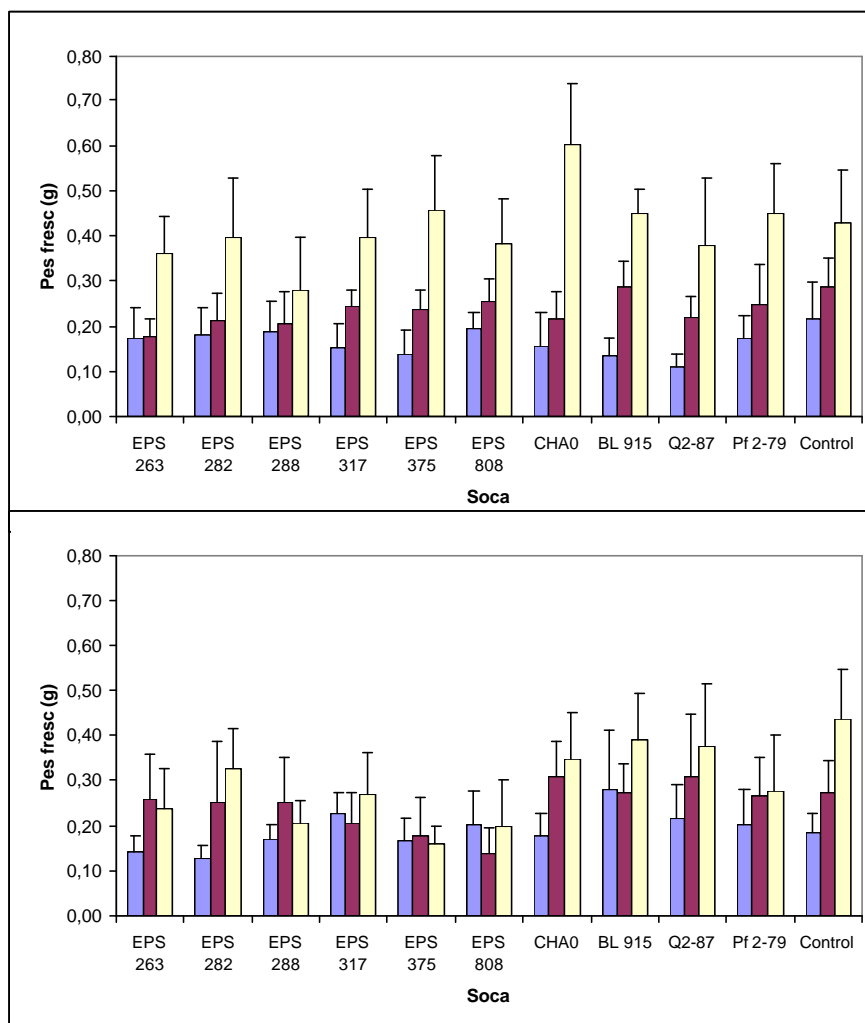


Figura 5.4. Pes de les arrels de les tomateres als 37 dies, 52 dies, i 72 dies, en els experiments A (dalt) i B (baix). Les barres indiquen interval de confiança de tres repeticions ($P=0,05$).

Figure 5.4. Root weight of tomato seedlings at 37 days, 52 days, i 72 days, after sowing for trial A (above) and trial B (below). Bars are for confidence interval of three repetitions ($P=0,05$).

Donat l'efecte del temps en l'ANCOVA, es va fer la separació de mitjanes dels pesos de les arrels de pomeres i de tomateres, segons la prova de Duncan als 37, 52 i 72 dies (Annex D i Taula 5.9) es pot observar que, en pomera, cap de les soques va diferenciar-se del control en els dos experiments, mentre que en tomatera a l'experiment B als 72 dies, les plantes tractades amb les soques EPS263, EPS288, EPS375 i EPS808 tenen un pes d'arrel significativament menor que el control.

També a l'experiment A, les arrels de les plantes tractades amb les soques EPS263, EPS288 i EPS808 tenien un pes menor que el control però en aquest cas les diferències no són significatives. Així, les soques EPS263, EPS288 i EPS808 semblaria que tenen un lleuger efecte inhibidor del creixement de les arrels de tomatera, donat que provoquen la disminució del seu pes de manera consistent als dos experiments.

Taula 5.9. Pes mitjà de les arrels de pomeres i de tomateres als 72 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre tractaments amb lletres iguals segons la prova de Duncan.

Table 5.9. Average weigh of roots of apple and tomato seedlings 72 days after sowing in function of applied strain. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) by Duncan's test.

Soca	Pomera		Tomatera	
	Experiment A	Experiment B	Experiment A	Experiment B
EPS263	0,148 ab	0,115 ab	0,362 a	0,238 abcd
EPS282	0,175 b	0,124 ab	0,397 ab	0,326 abcde
EPS288	0,177 b	0,131 ab	0,278 a	0,209 abc
EPS317	0,121 a	0,102 a	0,397 ab	0,268 abcde
EPS375	0,164 ab	0,122 ab	0,459 ab	0,160 a
EPS808	0,169 ab	0,117 ab	0,384 ab	0,198 ab
CHA0	0,188 b	0,121 ab	0,602 b	0,349 bcde
BL 915	0,144 ab	0,143 b	0,449 ab	0,390 de
Q2-87	0,119 a	0,138 ab	0,378 ab	0,379 cde
Pf 2-79	0,138 ab	0,136 ab	0,451 ab	0,280 abcde
Control	0,181 b	0,110 ab	0,432 ab	0,437 e

Com a tret general, cal comentar que globalment no s'observa un efecte consistent de la soca en el pes de les arrels entre les dues proves ni en les pomeres ni en les tomateres.

Relació part aèria-part radical

La relació de pesos entre part aèria -fulles + tija- i part radical -arrels- (PA/PR) es va determinar per si alguna de les soques inoculades provocava un efecte mesurable. L'ANOVA va indicar que en tomatera el tipus de soca tenia efecte significatiu (no es mostra). Per estudiar-lo es va fer la separació de mitjanes amb la prova de Duncan que es mostra a la Taula 5.10, on es confirma en pomera la inexistència de diferències en la relació PA/PR de les plantes tractades respecte al control, mentre que en tomatera tot i que es van observar diferències aparentment considerables, no són significatives i, per tant no s'ha pogut demostrar cap efecte estimulador o inhibidor d'alguna de les soques en el creixement de les plantes.

Taula 5.10. Relació entre la part aèria i la radical en pomera i tomatera als 72 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre tractaments amb lletres iguals segons la prova de Duncan.

Table 5.10. Shoot-root rate of apple and tomato seedlings 72 days after sowing, in function of applied strain. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) by Duncan's test.

Soca	Pomera		Tomatera	
	Experiment A	Experiment B	Experiment A	Experiment B
EPS 263	3,23 ab	5,03 c	8,69 a	12,78 abc
EPS 282	2,66 a	3,92 abc	9,14 a	9,43 ab
EPS 288	2,84 a	3,57 ab	9,97 a	11,70 ab
EPS 317	3,36 ab	4,70 bc	8,47 a	13,48 bc
EPS 375	2,96 a	4,76 bc	7,18 a	17,16 c
EPS 808	3,03 a	3,84 abc	9,22 a	17,12 c
CHA0	2,91 a	4,24 abc	6,50 a	8,69 ab
BL 915	2,94 a	3,32 a	6,81 a	8,27 ab
Q2-87	3,43 ab	3,12 a	9,88 a	8,90 ab
Pf 2-79	3,82 b	4,92 c	6,92 a	11,90 ab
Control	2,93 a	3,92 abc	7,90 a	7,87 a

La disminució de pes de l'arrel en tomatera observat per les soques EPS263, EPS288 i EPS808 (veure la Taula 5.9) no s'ha traduït en un efecte en la relació PA/PR, de manera que també la part aèria hauria disminuït proporcionalment.

5.4.2.3 Colonització de llavors i arrels

En el moment de la sembra les llavors tractades tenien una població associada entre 6,2 i 7,9 \log_{10} (ufc/llavor) de les soques mutants Rif⁺, mentre que els recomptes de bacteris viables tant totals com Rif⁺ de les llavors del control estaven per sota del límit de detecció, 100 ufc/llavor (2 \log_{10}).

A la Taula 5.11 es mostra l'ANOVA de la població Rif⁺ a les llavors en el moment de la sembra i es pot observar que tant l'*Hoste* com la *Soca* tenien efecte significatiu. Aquest model explica un 84% de la variança, corresponent a la soca el 60% de la variança del model.

En referència a l'efecte de la soca, en la separació de mitjanes segons la prova de Duncan que es mostra a la Taula 5.12, es constata que en pomera, tot i haver-hi algunes diferències entre soques, no són consistents entre els dos experiments independents, mentre que es pot comprovar com en tomatera les soques EPS317, BL915 i Q2-87 van colonitzar les llavors amb poblacions significativament inferiors a la resta de soques.

Taula 5.11. Taula de l'ANOVA de l'efecte de l'Hoste, Experiment i Soca en la població establerta a les llavors en el moment de la sembra.

Table 5.11. ANOVA summary of the effect of Host, Trial and Strain on bacterial seed population at sowing.

Efectes	Factors	gl	Suma de quadrats	F	P>F
Principals	Hoste	1	4,38	77,7	0,0001
	Experiment	1	0,22	4,0	0,05
	Soca	9	15,08	29,8	0,0001
Interaccions	Hoste x Experiment	1	0,004	0,1	0,8
	Hoste x Soca	9	5,94	11,7	0,0001
	Experiment x Soca	9	0,38	0,8	0,65
Model		30	26,2		0,0001
Residual		89	5,01		

Quant a l'efecte de l'hoste, les soques EPS317, EPS808, CHA0, BL915, i Q2-87 van establir-se amb poblacions més elevades en pomera que en tomatera a tots dos experiments, mentre que a la resta de soques no van observar-se diferències significatives.

Taula 5.12. Població de bacteris viables Rif^r a les llavors (log ufc/llavor) de pomera i de tomatera en el moment de la sembra, en funció de la soca aplicada. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre tractaments amb lletres iguals segons la prova de Duncan.

Table 5.12. Rif^r bacteria on apple and tomato seeds (log cfu/seed) at sowing time, in function of applied strain. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) by Duncan's test.

Soca	Pomera		Tomatera	
	Experiment A	Experiment B	Experiment A	Experiment B
EPS 263	7,59 bc	7,71 c	7,85 d	7,80 d
EPS 282	7,58 bc	7,39 bc	7,53 bc	7,38 c
EPS 288	7,44 b	7,52 bc	7,45 cd	7,51 c
EPS 317	6,95 a	7,07 ab	6,30 a	6,10 a
EPS 375	7,86 c	7,45 bc	7,66 cd	7,40 cd
EPS 808	7,32 b	6,88 a	6,21 c	6,61 a
CHA0	7,65 bc	7,67 c	7,45 c	7,28 c
BL 915	7,54 bc	7,55 bc	7,07 b	6,75 b
Q2-87	7,85 c	7,63 c	6,42 ab	6,43 a
Pf 2-79	7,57 bc	7,50 bc	7,46 cd	7,36 c
Control	nd	nd	nd	nd

nd: no detectades/ not detected

Colonització de les arrels

Per avaluar la influència de l'*Hoste*, la *Soca*, l'*Experiment* i la *Repetició* en la colonització de les arrels, es va fer l'ANCOVA dels nivells poblacionals a les arrels (Rif⁺ i total), prenent el *Temps* com a covariable. Aquest model només explicava el 52% de la variança en la població Rif⁺ i el 28% en la població total, amb el *Temps* amb un pes considerable en la variança del model, mentre que *Experiment* i *Repetició* no mostraren efecte significatiu (no es mostren els resultats).

Per això per avaluar l'efecte de *Soca* i *Hoste* en la colonització de les arrels s'ha realitzat l'ANOVA per a cada temps de mostreig, els resultats del qual es mostren a la Taula 5.13. S'ha de diferenciar entre els efectes en la població Rif⁺ i en la total. En ambdós casos, tant soca com hoste tenen efecte significatiu en la població present a les arrels, però en la població Rif⁺ la soca té un efecte més important mentre que en la població total és l'hoste el factor amb major pes. Aquests resultats s'interpreten com que les soques aplicades colonitzen de manera diferent les arrels de les plantes, però que és l'hoste qui afecta a la població total present a les arrels.

Taula 5.13. Taula de l'ANOVA per l'efecte de *Soca* i *Hoste* en la població a les arrels a diferents temps de mostreig.

Table 5.13. ANOVA table of the effect of *Strain* and *Host* on bacterial root population at different sampling periods.

Temps de mostreig (dies)	Factors	Població Rif ⁺				Població Total		
		gl	Suma de quadrats	F	P>F	Suma de quadrats	F	P>F
37	Soca	10	61,1	45	0,001	1,9	4,1	0,001
	Hoste	1	3,3	25	0,001	0,7	16	0,001
	Soca x Hoste	10	5,8	4,3	0,001	0,7	1,4	0,18
	Model	21	70,3	25	0,001	3,3	3,4	0,001
	Residual	110	15			8,4		
52	Soca	10	53,7	26,6	0,001	1,9	2,5	0,01
	Hoste	1	2,4	12	0,001	6,0	79	0,001
	Soca x Hoste	10	2,3	1,1	0,34	1,3	1,7	0,08
	Model	21	58,4	14	0,01	9,1	5,8	0,001
	Residual	110	22,1			8,2		
72	Soca	10	39	12	0,001	2,8	4,1	0,001
	Hoste	1	0,03	0,1	0,75	0,4	5,2	0,03
	Soca x Hoste	10	5,2	1,6	0,11	1,9	2,7	0,005
	Model	21	44,3	6,5	0,001	5,1	3,5	0,001
	Residual	110	35,4			7,6		

Als 37 dies des de la sembra, la població Rif⁺ a les arrels de les plantes tractades era significativament més elevada que al control (veure la Taula 5.14), efecte que es va donar tant en pomeres com tomateres i a ambdós experiments. Cal afegir que es van observar algunes diferències entre les soques aplicades. En pomera la soca EPS282 mostrà una població Rif⁺ menor que les altres soques de manera coherent entre els dos experiments.

En tomatera també algunes soques van assolir poblacions Rif⁺ més baixes que d'altres però les diferències no eren coherents entre els dos experiments.

Taula 5.14. Població de bacteris viables Rif⁺ [log (ufc/g d'arrel)] a les arrels de pomera i de tomatera als 37 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre tractaments amb lletres iguals segons la prova de Duncan.

Table 5.14. Bacterial Rif⁺ root population [log (cfu/g root)] on apple and tomato seedlings 37 days after sowing, in function of applied strain. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) by Duncan's test.

Soca	Pomera		Tomatera	
	Experiment A	Experiment B	Experiment A	Experiment B
EPS 263	6,45 c	6,13 c	5,68 bc	5,48 b
EPS 282	4,87 b	4,92 b	5,63 bc	6,00 c
EPS 288	6,21 c	6,38 c	5,73 bc	5,96 c
EPS 317	6,49 c	6,14 c	5,93 c	5,66 bc
EPS 375	6,61 c	5,92 c	6,04 c	5,86 bc
EPS 808	6,34 c	6,26 c	5,64 bc	5,72 bc
CHA0	6,26 c	6,12 c	5,81 bc	5,80 bc
BL 915	6,21 c	6,32 c	5,63 bc	5,77 bc
Q2-87	6,42 c	6,34 c	6,09 c	5,70 bc
Pf 2-79	5,67 bc	5,95 c	5,41 b	5,78 bc
Control	3,72 a	3,57 a	3,52 a	3,72 a

Quant a l'efecte de l'hoste en la població establerta a les arrels, va observar-se que les soques EPS263, EPS317, EPS808, CHA0, BL915 i Q2-87 van assolir una població significativament ($P<0,05$) superior als 37 dies de la sembra en arrels de pomera que en les de tomatera. Cal destacar que, llevat de la soca EPS263, les altres soques eren les que s'havien establert a una població superior a les llavors de pomera (veure la Taula 5.12), de manera que aquesta major població a les arrels podria indicar un efecte de la concentració de sembra o de l'afinitat per les llavors en la colonització inicial.

Tal com es mostra a les Figures 5.3 i 5.4 i a les Taules 5.12, 5.14 i 5.15, a les plantes inoculades s'observà, una disminució en la població Rif⁺ de $2 \log_{10}$ (ufc/g arrel) entre la sembra i el dia 37 i una altra disminució de 0,5 a $2 \log_{10}$ (ufc/g arrel), entre els

dies 37 i 72 des de la sembra. Mentre que als 37 dies la població de bacteris Rif⁺ a les arrels era de 4,9 a 6,6 log₁₀ (ufc/g arrel) en pomeres, i de 5,4 a 6,1 log₁₀ (ufc/g arrel) en tomateres, als 72 dies aquesta població havia disminuït fins 3 a 5,5 1 log₁₀ (ufc/g arrel) en pomera i de 3,7 a 5,3 1 log₁₀ (ufc/g arrel) en tomatera.

En els mostreigs posteriors, la població Rif⁺ de les arrels de les plantes tractades va disminuir substancialment. Aquesta disminució de la població Rif⁺ al llarg del temps va provocar que disminuís la diferència amb el control no inoculat. Així, als 52 dies (veure l'Annex E) i als 72 dies (veure la Taula 5.15) hi havia soques en les quals la població Rif⁺ de les plantes tractades ja no es diferenciava del control.

Taula 5.15. Població de bacteris viables Rif⁺ [log(ufc/g d'arrel)] a les arrels de pomera i de tomatera als 72 dies de la sembra en funció de la soca aplicada. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre tractaments amb lletres iguals segons la prova de Duncan.

Table 5.15. Rif⁺ bacteria [log(cfu/g root)] in apple and tomato seedlings root at 72 days after sowing in function of applied strain. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) by Duncan's test.

Soca	Pomera		Tomatera	
	Experiment A	Experiment B	Experiment A	Experiment B
EPS 263	3,97 ab	3,92 bc	4,21 abc	4,66 bcd
EPS 282	4,62 b	4,68 cd	4,53 bc	4,67 bcd
EPS 288	3,94 ab	3,68 ab	4,20 abc	3,88 bc
EPS 317	4,05 ab	3,01 a	4,46 bc	4,26 bcd
EPS 375	4,83 b	4,96 d	4,32 abc	4,24 bcd
EPS 808	4,80 b	5,27 d	5,11 c	4,74 cd
CHA0	4,62 b	4,80 cd	4,71 bc	3,79 b
BL 915	4,58 b	4,03 bc	4,58 bc	4,46 bcd
Q2-87	4,63 b	5,49 d	5,28 c	5,17 d
Pf2-79	4,65 a	3,76 ab	3,87 ab	4,02 bc
Control	2,88 a	3,33 ab	3,24 a	2,82 a

Entre les soques que als 72 dies de la sembra van trobar-se a una població superior a la població Rif⁺ del control cal destacar les soques EPS282, EPS808, CHA0 i Q2-87 que van recuperar-se tant en pomera com en tomatera (veure la Taula 5.15). Aquestes serien les soques que en aquest experiment van mostrar la capacitat de supervivència més elevada a les arrels, independentment de l'hoste.

També la soca EPS375, en pomera, i les EPS317 i BL915, en tomatera, van mantenir una població superior al control, mentre que la resta de soques no mostraren resultats coherents entre els dos experiments. Per contra, la soca EPS317 a l'experiment B va ésser desplaçada per la població autòctona ja que no es va trobar en

les proves de PCR amb les soques Rif^r recuperades. De manera que als 72 dies de la sembra, llevat dels casos esmentats, les soques aplicades a les llavors van sobreviure a les arrels de les plantes amb diferències significatives amb el control no tractat.

D'altra banda, la població total establerta a les arrels a partir dels 37 dies anava de 6,3 a 7,2 log₁₀ (ufc/g arrel) en pomeres i de 6,3 a 7,8 log₁₀ (ufc/g arrel) en tomateres i es va mantenir més o menys constant fins als 72 dies (veure la Taula 5.16).

La població total a les arrels de les plantes tractades era inferior a la del control (veure la Taula 5.16), tot i que majoritàriament les diferències no eren significatives. No va haver-hi, llevat de la soca EPS288 en tomatera, coherència entre els dos experiments.

Paral·lelament, a les arrels de les plantes del control, tant per pomera com per tomatera, es va establir una població de soques resistents a la rifampicina de 2,8 a 4,0 log₁₀ ufc/g arrel. Aquesta població va mantenir-se més o menys constant durant els experiments. Per les tècniques de PFGE i de PCR es va comprovar que cap d'aquestes soques corresponia a les inoculades en el nostre estudi.

Taula 5.16. Població total de bacteris viables [log[(ufc/g d'arrel)]] a les arrels de pomera i de tomatera 72 dies després de la sembra, en funció de la soca aplicada. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre tractaments amb lletres iguals segons la prova de Duncan.

Table 5.16. Bacterial viable population [log(cfu/g root)] on apple and tomato seedlings roots 72 days after sowing, in function of applied strain. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) by Duncan's test.

Soca	Pomera		Tomatera	
	Experiment A	Experiment B	Experiment A	Experiment B
EPS 263	6,13 a	6,32 ab	6,94 c	6,72 ab
EPS 282	6,09 a	6,64 abc	6,46 ab	6,47 a
EPS 288	6,37 ab	6,42 abc	6,35 a	6,55 a
EPS 317	6,73 cd	7,01 c	6,61 abc	6,73 ab
EPS 375	6,34 ab	6,54 abc	6,88 c	7,07 b
EPS 808	6,39 ab	6,87 abc	6,65 abc	6,39 a
CHA0	6,90 de	6,27 a	6,75 bc	6,37 a
BL 915	6,59 bc	6,53 abc	6,61 abc	6,68 ab
Q2-87	6,58 bc	6,79 abc	6,79 c	6,74 ab
Pf2-79	6,79 cde	6,42 abc	6,85 c	6,53 a
Control	7,03 e	6,92 bc	6,69 bc	7,11 c

Finalment, cal remarcar que les soques introduïdes no van afectar de manera significativa l'establiment de la població autòctona.

Aquesta possiblement provenia de l'ambient de la cambra d'expressió o havien estat aportades amb l'aigua de reg. Això explicaria la homogeneïtat en la població total, i la Rif⁺ en el control, entre els dos experiments i els diferents tractaments.

A la Figura 5.5 es mostra el percentatge de població Rif⁺ que colonitzava les arrels. En tomatera les soques Q2-87 i EPS808 van mantenir pràcticament en tots dos experiments el nivell poblacional assolit als 37 dies, quan representaven la EPS808 el 2,7% i la Q2-87 el 5,4%, de la població total fins als 72 dies que estaven el 2,2% i el 3,1%, respectivament (veure la Figura 5.5A i B). En aquestes figures s'observa que, en general, les soques inoculades van establir-se millor en pomera que en tomatera tot i que cap de les soques inoculades va aconseguir conservar un nivell superior al 30% de la població total en les plantes passats els 52 dies. S'observen diferències entre les soques però no són coherents entre els dos experiments.

Llevats dels casos anteriors, tant en pomera com en tomatera, la població Rif⁺ va experimentar una caiguda substancial a partir del dia 37, de manera que a partir d'aquest moment cap de les soques introduïdes arriba a representar més del 2% de la població total a les arrels de tomatera o el 5% a les arrels de pomera.

A les plantes control la població de soques Rif⁺ presents a les arrels només representaven un percentatge testimonial per sota el 0,05% tant per tomatera com per pomera.

(Pàgina següent/Next page)







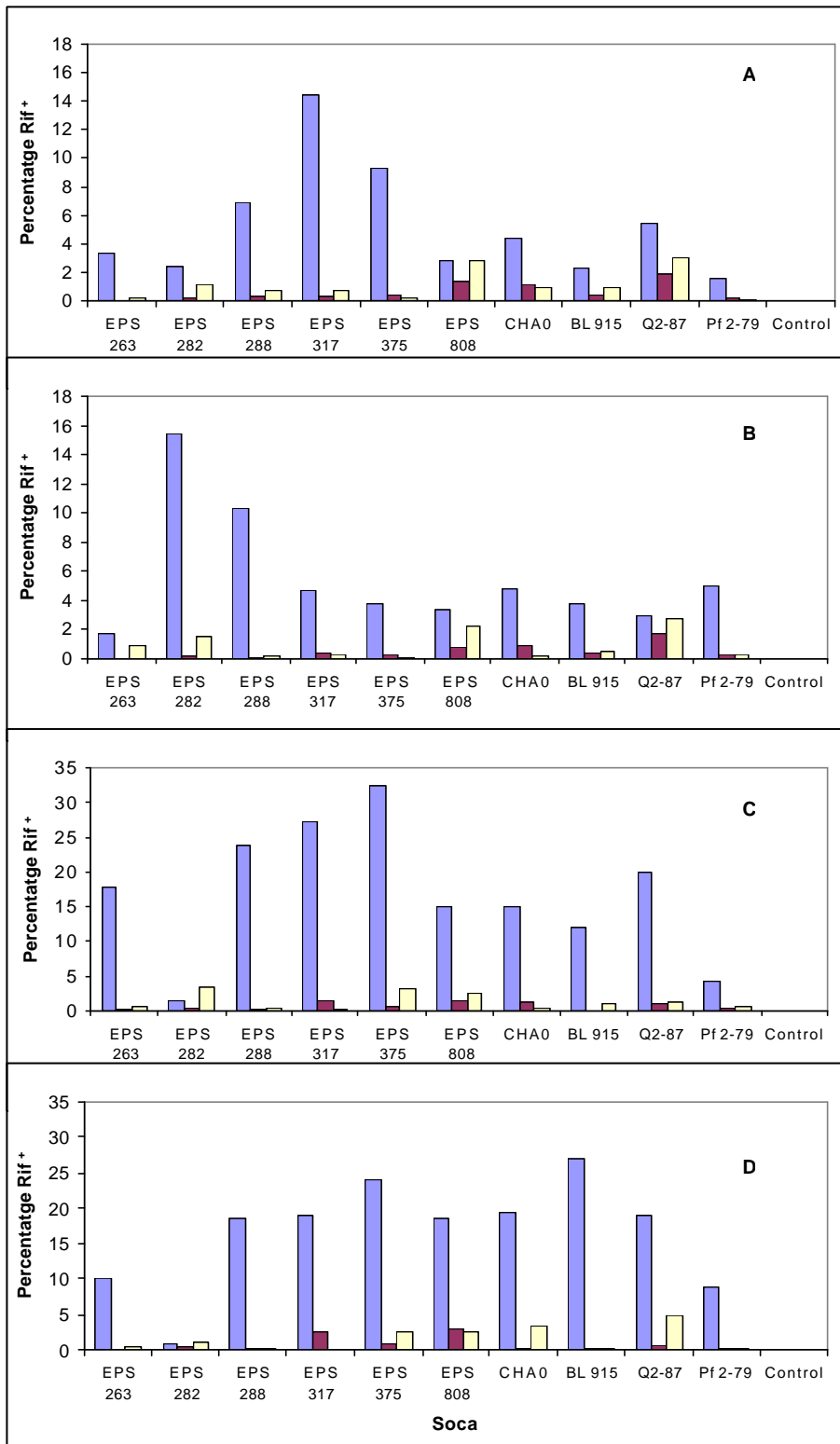
Figura 5.5. Percentatge de bacteris viables Rif⁺ de cadascuna les soques aplicades respecte a la població total en arrels de tomatera experiment A (A) i B (B) i en arrels de pomera a l'experiment A (C) i B (D) als 37 , 52  i 72  dies de la sembra.

Figure 5.5. Percentage of viable Rif⁺ for each of the applied strains in tomato plant roots in trial A (A) and trial B (B) and apple tree roots at trial A (C) and trial B (D) at 37 , 52  i 72  days after sowing.



5.5 Discussió

En l'estudi de la producció de DAPG en fruits de dues varietats de perera (Conference i Passe Crassanne) i una varietat de poma (Golden), es van escollir les soques que, *in vitro*, n'havien produït en un major nombre de medis de cultiu. Les tres soques van produir DAPG en les ferides dels fruits, però JBR 1-70 i EPS808 ho van fer en una quantitat més elevada que Q2-87. D'aquesta darrera soca s'havia comprovat que era capaç de produir DAPG en un major nombre de fonts de carboni que les altres soques i que la producció tenia lloc majoritàriament en medis mínims. D'altra banda, la soca més productora sobre fruita, la JBR 1-70, era també la que més DAPG havia produït en la majoria dels medis i la que havia mostrat la velocitat de síntesi de DAPG més elevada.

En les peres i pomes, els sucres majoritaris són sacarosa, glucosa i fructosa en una proporció aproximada de 2:1:1 respectivament. Tenint en compte aquests sucres, en les proves *in vitro* amb diverses fonts de carboni, s'havia observat que amb glucosa en medi sòlid totes tres soques havien produït DAPG, i que la soca Q2-87 n'havia produït en més quantitat que EPS808 i JBR 1-70.

En base als resultats de l'estudi de la producció en diferents medis s'ha comprovat que la producció relativa d'aquestes soques sobre pera es correlaciona parcialment amb la producció en el brou LB amb glucosa, en el qual les soques més productores havien estat JBR 1-70 i EPS808 amb una producció superior a Q2-87. A la cinètica de creixement en medi LB aquestes tres soques havien crescut de manera semblant, però la síntesi de DAPG en la Q2-87 va iniciar-se molt més tard i va produir-ne molt menys que les EPS808 i JBR 1-70. Aquest comportament semblaria haver-se repetit en l'estudi de la producció de DAPG sobre fruita, ja que la població a les ferides va ésser semblant però amb grans diferències en la producció de DAPG essent també la soca Q2-87 la menys productora en aquestes circumstàncies.

S'ha comprovat que soques productores de DAPG *in vitro* també poden produir-ne sobre material vegetal, i també sembla complir-se allò postulat per Duffy i Défago (1997 i 1999) en el sentit que els assaigs *in vitro* poden orientar en el comportament de la soca *in vivo*, tenint en compte que la producció de les soques en pera i en el medi LB suplementat amb glucosa tenen un patró similar. Caldria estudiar si la coincidència és

circumstancial o si es pot afirmar que el patró de producció sobre pera és similar al que es pugui obtenir *in vitro* en el brou LB suplementat amb una (o més fonts de carboni).

La producció més elevada en pera que en poma podria atribuir-se al fet que les peres estaven més madures que les pomes, amb la qual cosa els contingut en sucres seria més elevat. A més s'ha observat concretament que la glucosa estimula la producció de DAPG en les tres soques, però per confirmar aquesta hipòtesi s'hauria d'haver determinat el contingut en sucres de la fruita utilitzada i estudiar la producció de DAPG en diferents estadis de maduració. Aquesta hipòtesi té interès car s'argumenta que el coneixement de la composició dels exsudats de fruits, llavors, fulles flors i arrels de les plantes, i de la capacitat d'utilització de les fonts de carboni per l'antagonista permetrà trobar una combinació bacteri-planta efectiva pel biocontrol (Schippers i col., 1987; Shanahan i col., 1992a; Jaeger III i col., 1999).

En el nostre experiment amb fruits s'ha observat que una elevada producció de DAPG en les ferides de les peres origina efectes no desitjats com la fitotoxicitat. Això demostra que l'efecte del DAPG pot ser positiu o negatiu en funció de l'hoste, com s'havia demostrat també en la disminució de pes en les plantes o del percentatge de germinació de llavors causada per mutants de la soca CHA0 hiperproductors de DAPG (Haas i col., 1991; Maurhofer i col., 1992).

Caldria remarcar que aquests resultats no invaliden la utilització d'aquestes soques productores de DAPG en la protecció en postcollita de les peres sinó que posa de manifest la possibilitat de resposta hipersensible en casos d'elevada producció. Possiblement a temperatures més baixes, usuals en la conservació en postcollita la producció de DAPG seria inferior, com ja s'havia comprovat pel HCN, i les possibilitats de toxicitat per la fruita disminuirien.

En la producció de DAPG a les arrels dels portaempelts, cal comentar que una possible causa de què no se'n detectés podria ser el pes insuficient de mostra processat, per haver utilitzat només 3 arrels amb un pes total de 4-5 g respecte als 15 g que havien utilitzat Bonsall i col. (1997) o els 30 g d'arrels de blat utilitzats per Raaijmakers i col. (1999).

En els experiments d'antagonisme sobre material vegetal es va constatar que la inhibició d'infeccions es correlacionava parcialment amb la producció d'antibiòtics per les soques antagonistes. Les soques productores de PCA o de Prn mostraven una

major eficàcia que les productores de DAPG. Però aquest fet no permet associar l'antagonisme a la producció dels esmentats antibiòtics. No s'ha pogut relacionar la producció de DAPG observada sobre material vegetal per les soques EPS808, JBR 1-70 i Q2-87 i inhibició d'infeccions en poma, ni amb els fruits immadurs de pera. Possiblement no sigui aquest el mecanisme d'inhibició d'aquests patògens.

Tenint presents els resultats d'antagonisme *in vitro*, es constata que en pocs casos existeix bona correlació entre l'antagonisme en placa i la inhibició d'infeccions sobre material vegetal. L'augment de factors implicats en passar d'un cultiu *in vitro* a un sobre material vegetal, i les possibilitats d'inhibició per competència, que no es manifestà sobre placa, permetrien explicar en part aquesta manca de correlació. El canvi en les condicions nutricionals pot afectar a l'espectre d'antibiòtics produït i per tant a la capacitat d'inhibir al patogen. En aquest sentit els resultats constaten que les inoculacions sobre material vegetal proporcionen informació tant de la capacitat de l'antagonista d'establir-se i de produir el metabòlit actiu en l'hoste com per avaluar el seu efecte sobre l'antagonista, i són una etapa a considerar en la selecció d'agents de biocontrol (Schroth i Hancock, 1981; Burr i Caesar, 1984; Handelsman i Stabb, 1996).

En l'efecte de les soques aplicades com a inòcul a les llavors, va observar-se que el pes de les tomateres a l'experiment A era més elevat que al B, efecte que no es repetia en les pomeres. Aquestes diferències es podrien explicar per l'existència de petites variacions, en les condicions ambientals d'incubació entre els dos experiments com són llum, temperatura o reg. Creiem que el creixement més ràpid de les tomateres pot explicar que, petites diferències en les condicions ambientals entre els dos experiments, pogueren provocar un augment generalitzat del pes de les tomateres.

Tot i les diferències que presenten algunes soques amb el control i entre elles, no va observar-se d'una manera clara que hi hagi un efecte estimulador o inhibidor del creixement de les arrels de tomateres o de pomeres per a cap de les soques estudiades. Això permet afirmar que cap de les soques, en aquestes condicions, presenta efectes fitotòxics pel planter de pomera o de tomatera a les concentracions assajades. Algunes de les soques assajades són productores de DAPG i s'havia observat que *P. fluorescens* productores de DAPG inoculades en blat a una concentració de l'ordre de 10^9 ufc/llavor, més elevada que les aplicades en el present estudi, poden presentar efectes fitotòxics (Bull i col., 1991).

Tampoc cap de les soques va provocar un augment significatiu del pes de la planta en pomeres i tomateres, per la qual cosa no es poden classificar com a Bacteris Promotors del Creixement d'aquestes plantes. Malgrat això no es pot dir que no tindran efecte com a agents de biocontrol o PGPR en altres condicions experimentals, ni tampoc exclou la possibilitat d'efecte si s'haguessin aplicat les soques diverses vegades una vegada germinades les plantes, com va ésser el cas de la promoció del creixement en prunus descrit també en aquest treball.

Hi ha descrits nombrosos exemples de que quan s'apliquen determinades soques a plantes i no hi ha present un patogen no s'observa millora en el seu creixement, o estat sanitari (Suslow i Schrotch, 1982; Weller i Cook, 1983; Bakker i Schippers, 1987; Haas i col., 1991; Maurhofer i col., 1991; Natsch i col., 1994; Grondona i col., 2000). Però hi ha casos en que la inoculació amb l'agent de biocontrol fa augmentar significativament el pes de la planta malgrat no hi hagi patogen present (Chiriani i col., 1998). Com que en el nostre cas no es van inocular les plantes amb cap patogen, no podem concloure en aquest sentit.

Continuant amb l'efecte sobre la planta, les soques aplicades no van provocar canvis en el creixement de les arrels de les pomeres en cap de les dues proves tot i que a la l'experiment A les plantes crescudes a partir de llavors inoculades amb les soques EPS317 i Q2-87 van assolir un pes en l'arrel inferior al control, però aquests resultats no es van repetir a l'experiment B on no es van observar diferències amb el control per aquestes soques.

La relació entre part aèria i radical és un paràmetre que s'ha utilitzat per mesurar l'efecte que causa la inoculació de bacteris a la planta. Així una relació baixa entre fullam i arrel indica que la planta serà més efectiva en absorbir aigua i nutrients per l'augment de tamany de l'arrel (Schippers i col., 1987; Naseby i col., 1999). També es creu que el creixement de les arrels ajuda a les plantes a compensar el mal causat per un patogen del sistema radical (Sivasithamparam, 1998). En el nostre treball no es van observar diferències significatives en la relació entre fullam i arrel pels diferents experiments i hostes. Això seria indicatiu que cap de les soques va tenir efecte negatiu o estimulador en el creixement de les plantes o bé que la relació es mantenia pel creixement simultani d'arrels i de la part aèria.

Un factor que s'ha comprovat que augmenta la pressió ambiental a la que està sotmesa la planta és la producció de DAPG per microorganismes presents a les arrels

(Naseby i col., 1999). En el nostre experiment s'han utilitzat diverses soques productores de DAPG, com són la EPS317, EPS808, CHA0 i Q2-87, però no s'ha observat cap efecte significatiu en aquest sentit, ja que tot i tenir una relació fullam-arrel més baixa que el control les diferències no són significatives. D'aquestes, únicament les soques EPS808, CHA0 i Q2-87 estan entre les que més van sobreviure en les arrels tant de pomeres com de tomateres. Però no es pot confirmar que la producció de DAPG sigui la causa de la major supervivència d'aquestes soques. D'altra banda, cap de les soques productores de DAPG va mostrar fitotoxicitat, malgrat que el DAPG és fitotòxic per plantes dicotiledònies, com seria el cas de la pomera (Keel i col., 1992).

Quant a la colonització de les arrels, en el recompte realitzat en el moment de la inoculació van observar-se diferències en la població que va colonitzar a les llavors que van atribuir-se a l'hoste i a la soca. També soca i hoste són els factors que expliquen les diferències observades en la població, tant Rif^r com total, que colonitzà les arrels.

L'efecte de la soca en la colonització de les llavors no es pot descartar que sigui degut a les diferències de concentració de les suspensions utilitzades en la inoculació. Aquestes suspensions es preparaven a partir d'una mesura d'absorbància ($A_{610}=0,2$), i podrien haver-hi diferències en el nombre de viables a una mateixa absorbància entre soques diferents.

Quant a l'efecte de l'hoste en el nivell poblacional, la població a les llavors de pomera va ésser en general de l'ordre de $0,4 \log_{10}$ superior que en les de tomatera. Aquesta diferència és menor que l'observada per Kraus i Loper (1995) on la soca Pf5 s'establí amb una població $1,5 \log_{10}$ superior en llavors de cotó que en llavors de cogombre, però confirmaria que l'hoste -planta o llavor- és un factor a tenir en compte en aplicar un bacteri perquè afectarà al nivell poblacional que pot colonitzar les arrels (Latour i col., 1996).

La major concentració cel·lular en les llavors de pomera que en les de tomata per les soques EPS317, EPS808, CHA0, BL915 i Q2-87 podria explicar que als 37 dies de la sembra la població a les arrels de pomera sigués més elevada que a les arrels de tomatera. Això estaria d'acord en que la concentració de la suspensió utilitzada per inocular les llavors està directament relacionada amb la població que colonitza les arrels (Bull i col., 1991; Duijff i col., 1999), de manera que com més elevada sigui la seva concentració, més elevada serà la població que colonitzi les arrels (Suslow i Schrotch, 1982).

La major colonització de les arrels de pomera per aquestes soques podria indicar una selecció de l'hoste en la línia descrita per altres autors. En aquest sentit, Kinkel i col. (2000) van observar que la planta tenia una influència significativa en la població epífita. També Ornat i col. (2000) en una prova de colonització en diferents espècies hortícoles havien observat diferències en la colonització de l'arrel segons l'hoste i l'aïllat (fongs de l'espècie *Vericillium chlamydosporium*), i *P. putida* van sobreviure millor a la rizosfera de mongeta (10^6 - 10^7 ufc/g sòl), que en la de blat de moro (10^4 - 10^5 ufc/g sòl), però en aquest cas la concentració d'inoculació de les llavors va ser superior en la mongeta i no es va poder atribuir a l'efecte de l'hoste (Molina i col., 2000). S'ha comprovat que la composició dels exsudats de les arrels és un dels factors que condiciona la microbiota que s'hi estableix (Casey i col., 1998; Benizri i col., 1998), i en conseqüència, la diferent composició dels exsudats de cadascuna de les llavors pot explicar les diferències de població trobades.

En el seguiment de l'evolució de la població a les arrels dels plançons es va observar una disminució de viables Rif⁺ des de la primera mesura, als 37 dies de la sembra, fins a la darrera mesura als 72 dies. Es desconeix quina població de bacteris Rif⁺ va colonitzar les arrels en els moments inicials de creixement perquè malauradament, no es van efectuar mesures en els estadis de germinació precoços. Per això la major caiguda de població observada, va tenir lloc entre els dies 37 i 52 des de la sembra. El comportament de la població Rif⁺ que s'havia observat a les arrels dels portaempelts GF677, va ésser molt similar al de les plantes germinades a partir de llavors tot i que l'aplicació en aquell cas era per reg i les plantes ja estaven desenvolupades.

Als 37 dies de la sembra la població Rif⁺ a les arrels tant de tomatera com de pomera era significativament superior a la població Rif⁺ del control i, excepte per la soca EPS282 en pomera, la població Rif⁺ era superior a la concentració lliandar de $5 \log_{10}$ de bacteris que es considera necessària per la protecció efectiva de les arrels segons alguns autors (Raaijmakers i col., 1995). Per això és de suposar que fins als 37 dies després de la sembra les soques inoculades en el nostre experiment mantenen una població capaç d'exercir antagonisme vers patògens de l'arrel, ja que la colonització de l'arrel i l'antagonisme en els estadis inicials de la sembra i germinació de la planta es considera una aptitud necessària de l'agent de biocontrol per assegurar l'èxit en el seu funcionament (Weller, 1988; Cook, 1993; Chin-A-Woeng i col., 2000).

En general s'observa en altres estudis que la població inoculada disminueix amb el temps com per exemple la disminució des de $6,5 \log_{10}$ de viables fins a només el 15% de la població total als 21 dies (Moënne-Loccoz i col., 1996). O la disminució de la població de *P. fluorescens* F113 i del mutant no productor de DAPG F113G22, de $2 \log_{10}$ en 15 dies, de manera que la producció de DAPG no semblava ajudar a la capacitat de colonitzar les arrels (Fenton i col., 1992).

En una de les poques proves documentades del seguiment de la població de les arrels a llarg termini, va observar-se que la població disminuïa des de la sembra a la maduresa en blat però que augmentava en blat de moro (Troxler i col., 1997a). L'augment i variació de la població de bacteris de *P. fluorescens* productors de DAPG en blat de moro també ha estat descrit per Picard i col. (2000).

L'elevada variança observada en el nostre treball, en els recomptes de les arrels pot haver estat la causa que s'hagin trobat poques diferències significatives entre les soques aplicades en la colonització de les arrels. De fet en poques soques s'ha pogut demostrar de manera coherent una major capacitat de colonitzar les arrels. En tot cas cal destacar les soques EPS808 i Q2-87, les quals van assolir una població relativa més elevada en les arrels de les tomateres després de 72 dies d'inocular-les a les llavors de manera coherent entre els dos experiments independents. A les arrels de pomeres aquestes soques són també les que assoliren una major població, clarament a l'experiment B, però que va ser consistent a l'experiment A.

L'elevada variança es podria explicar per la distribució logarítmica dels bacteris, que s'aprecia a les arrels quan s'estudien arrel per arrel o en trams (Loper i col., 1984; Pierson i Weller, 1994; Raaijmakers i col., 1995; Kinkel i col., 2000). En el nostre treball s'ha tingut en compte l'arrel com un tot i s'ha determinat el nombre total de bacteris la qual cosa fa pensar que la variabilitat no seria deguda a aquest fet.

Per estudiar el paper de les nostres soques com a agents de biocontrol o com a bacteris promotors del creixement de les plantes (BPCP) els experiments s'haurien de realitzar amb la presència d'un patògen. Aquest no ha estat el cas en el nostre experiment de colonització a partir de soques inoculades, on tant el substrat com les llavors s'havien sotmès a un procés de desinfecció eliminant possibles patògens abans de la inoculació amb les soques a assajar. Una altra possibilitat seria realitzar l'experiment en condicions reals no controlades com seria el cas de l'assaig de promoció del creixement realitzat a l'explotació comercial d'Agromillora Catalana. En

aquest darrer experiment es va comprovar que la promoció del creixement també depenia de l'hoste i de la soca. Hi havia soques que no afectaven, d'altres que estimulaven creixement dels portempelts i d'altres que inhibien el creixement d'un o altre dels portaempelts. No s'ha pogut associar promoció del creixement amb la producció d'algun antibiòtic, només es pot especular amb la possibilitat que la producció de Prn tingui efecte inhibidor del creixement de GF677.

Tanmateix, la població total de bacteris a les arrels no va canviar significativament en el període estudiat. En tot moment la població total a les plantes del control va estar lleugerament per sobre la població de les plantes inoculades amb les soques a assajar. Això indica que les soques inoculades en les llavors i que posteriorment van colonitzar les arrels de les plantes germinades, afecten poc a la població que s'hi va establir. En aquest sentit aquest resultat constata la recomanació de que en la cerca i desenvolupament dels agents de biocontrol s'avalui l'efecte de les soques introduïdes sobre la microbiota beneficiosa autòctona associada a les arrels (Barea i col., 1998; Edwards i col., 1998). Aquesta microbiota actua millorant el seu estat sanitari i creixement, per això és desitjable que les soques introduïdes no la perjudiquin.

La capacitat d'establir-se i de colonitzar les arrels es considera com a necessari perquè una soca pugui tenir èxit com a bacteris promotors del creixement de les plantes (Weller, 1988; Bull i col., 1991; Raaijmakers i col., 1995; Thompson i col., 1995). Una soca que pugui mantenir una elevada població a les arrels de l'hoste podrà competir amb els patògens amb majors garanties d'èxit. En alguns casos s'han modificat genèticament per aconseguir-ho, encara que sense èxit (Moënne-Loccoz i col., 1996).

Cal ressaltar com a resultat significatiu d'aquest treball, que la soca EPS808, independentment de l'hoste, pot assolir una elevada població a les arrels i mantenir-la durant un període de temps força elevat en condicions controlades.

Tenint present l'elevada capacitat de colonització de les arrels que està descrita per la soca Q2-87, que és un bon agent de biocontrol (Raaijmakers i col., 1999), i en base als resultats de colonització de les arrels obtinguts per la soca EPS808, es preveu que aquesta pugui ser un bon agent de biocontrol ja que compleix alguns dels postulats que es consideren necessaris: produeix un factor nociu pels patògens, és capaç de colonitzar efectivament material vegetal (arrels i fruits). No s'ha estudiat la seva supervivència ni l'eficàcia en el biocontrol en condicions de camp o reals en hivernacle,

per motius que ultrapassen l'abast d'aquesta tesi doctoral, però aquestes proves serien necessàries per poder assegurar el seu futur com a agent de biocontrol de malalties, especialment de les arrels.

Preveient una aplicació comercials dels agents de biocontrol, cal recordar que l'aplicació de concentracions elevades d'antagonista representa un cost econòmic en el preparat i en la formulació. En el nostre estudi es va optar per utilitzar una suspensió de concentració cel·lular de l'ordre de 10^8 ufc/mL per fer la inoculació, que en experiments preliminars s'havia comprovat que permetia una colonització efectiva de les arrels. S'ha comprovat que aquesta concentració, aplicada a les llavors, és suficient per aconseguir una colonització efectiva de les arrels de les plantes durant al menys 37 dies per totes les soques assajades.

Però la supervivència d'un agent de biocontrol ha de ser limitada, si una soca aplicada sobreviu i és activa en l'arrel durant molt temps, però una vegada acabada la collita també sobreviu en el sòl, llavors serà poc interessant des del punt de vista econòmic com a producte fitosanitari tant a nivell industrial com pel productor, i possiblement també a nivell ecològic. L'industrial no podrà comercialitzar regularment el seu producte, el productor pot obtenir efectes no desitjats sobre altres collites per les quals l'agent de biocontrol no sigui efectiu o pugui ésser perjudicial, i des del punt de vista ecològic l'agent de biocontrol pot afectar la microbiota autòctona beneficiosa. Per això una supervivència efectiva però controlada de l'agent de biocontrol pot ser més interessant tant econòmicament com ecològica.

Finalment, s'ha descrit que en funció de l'estadi de desenvolupament canvia la microbiota associada (Troxler i col., 1997a; Picard i col., 2000), de manera que es podrien seleccionar els antagonistes òptims per a cada estadi de desenvolupament.

5.6 Conclusions

En base als resultats anteriors es poden extreure les següents conclusions:

- Les soques productores de DAPG *in vitro*, EPS808, Q2-87 i JBR 1-70, també van produir-ne en fruits. Algunes d'aquestes soques provocaren fitotoxicitat a les ferides de pera però no a les de poma ni pera Passe Crassane. Aquest efecte pot s'atribueix a una major producció de DAPG sobre pera que sobre poma i demostra l'existència de diferències entre hostes quant a suportar producció de DAPG per bacteris.
- No es va observar correlació entre antagonisme *in vitro*, inhibició de la infecció sobre material vegetal i producció de metabòlits secundaris amb activitat antibiòtica en les soques estudiades.
- Les soques EPS288, EPS808, Q2-87, PS15 SBW25 van exercir un efecte de promoció del creixement, quan va ésser inoculades per reg, en plantes de *Prunus*, Marianna i GF677.
- Totes les soques estudiades, EPS263, EPS282, EPS288, EPS317, EPS375, EPS808, CHA0, BL915, Q2-87 i Pf 2-79, inoculades en llavors, van colonitzar les arrels tant de les tomateres com de les pomeres de manera efectiva durant 37 dies mantenint els nivells poblacionals per sobre de 5 log₁₀ ufc/g arrel. Però aquesta colonització va dependre de l'hoste i de la soca.
- No es va observar cap disminució ni augment significatiu del pes de les plantes o de les arrels de pomera i tomatera respecte a les plantes control no inoculades, i per tant, no hi ha indicis de fitotoxicitat o de promoció del creixement degut al tractament amb les soques a la concentració d'aplicació emprada (10⁷-10⁸ ufc/llavor).
- La població de les soques aplicades a les llavors de tomatera i pomera va disminuir significativament amb el temps, i totes, llevat de la EPS317, van recuperar-se de les arrels de les plantes inoculades als 72 dies de la sembra.
- Les soques inoculades en pomera i tomatera no van afectar de manera significativa a la població total que s'establia a les arrels de les plantes tractades respecte al control. En tot cas l'efecte va ser lleuger.

Bibliografia

- A**arons S., Abbas A., Adams C., Fenton A. and O'Gara F. 2000. A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolites in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.*, 182: 3913-3919.
- Aldridge W.N. 1944. A new method for the estimation of microquantities of cyanide and thiocyanate. *Analyst*, 69: 262-265.
- AOAC (Asociation of Official American Chemists). *Official methods of analysis*. Ed. by Sidney Williams. Arlington Virginia. 1984.
- APHA, AWWA, WEF. 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18th Edition. Ed by Greenberg A.E., Clesceri L.S. and Eaton A.D. Washington.
- Askeland R.A. and Morrison S.M. 1983. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Appl. Environ. Microb.*, 45: 1802-1807.
- Asmus E. and Garschagen H. 1953. The use of barbituric acid for the photometric determination of cyanide and thiocyanate. *Z. Anal. Chem.*, 138: 414-422.
- B**adosa, E. 2001. Anàlisi polifàsica de soques de *Pseudomonas fluorescens* potencials agents de biocontrol en malalties de fruiters. Tesi Doctoral. Universitat de Girona.
- Bagnasco P., de la Fuente L., Gualtieri G., Noya F. and Arias A. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1317-1322.
- Baker K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 25: 67-85.
- Bakker A.W. and Schippers B. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potatoe yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.*, 19: 451-457.
- Baldwin B.C. and Rathmell W.G. 1988. Evolution of concepts for chemical control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26: 265-283.
- Balinova A. 1995. Extension of the bioautograph technique for multiresidue determination of fungicide in plants and water. *Anal. Chim. Acta*, 311: 423-427.
- Bangera M.G. and Thomashow L.S. 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol. Plant Microbe Int.*, 9: 83-90.
- Bangera M.G. and Thomashow L.S. 1999. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *J. Bacteriol.*, 181: 3155-3163.

- Bantley R. 1999. Secondary metabolite biosynthesis: the first century. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 19: 1-40.
- Baranyi J and Pin C. 1999. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Appl. Environ. Microb.*, 65: 732-736.
- Barea J.M., Andrade G., Bianciotto V., Dowling D., Lohrke S., Bonfante P., O'Gara F. and Azcon-Aguilar C. 1998. Impact of arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microb.*, 64: 2304-2307.
- Bashan Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth *Appl. Environ. Microb.*, 51: 1089-1098.
- Bashan Y. and Holguin G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1225-1228.
- Bashan Y. and Gonzalez L.E. 1999. Long term survival of the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Appl. Microbiol. Biot.*, 51: 262-266.
- Bélanger R.R., Dik A.J. and Menzies J.G. 1998. Powdery mildews. Recent advances towards integrated control. A *Plant-microbe interactions and biological control*. Ed. by G.J. Boland and L.O. Kuykendall. Marcell Dekker Inc. New York. pp. 89-109.
- Bender C.L., Rangaswamy V. and Loper J. 1999. Polyketide production by plant-associated *Pseudomonads*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 175-196.
- Benizri E., Courtane A., Picard C. and Guckert A. 1998. Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1481-1484.
- Bevivino A., Sarrocco S., Dalmastrì C., Tabacchioni S., Cantale C. and Chirini L. 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia capacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 27: 225-237.
- Bockus W.W. and Shroyer J.P. 1998. The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36: 485-500.
- Bonaterra A., 1997. Aïllament i caracterització de fitobacteris epífits antagonistes i control biològic de *Stemphylium vesicarium*. Tesi Doctoral. Universitat de Girona.
- Bonsall R. F., Weller D.M. and Thomashow L.S. 1997. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microb.*, 63: 951-955
- Brannen P.M. and Kenney D.S. 1997. Kodiak-a successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 19: 169-171.
- Brisbane P.G., Janik L.J., Tate M.X. and Warren R.F.O. 1987. Revised Structure for the Phenazine Antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132). *Antimicrob. Agents Chem.*, 31: 1967-1971.
- Budzikiewicz H. 1993. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Rev.*, 104: 209-228.

- Bull C.T., Hill J. and Thomashow L.S. 1991. Relationship between root colonization and suppression of *G. graminis* var. *Tritici* by *P. fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*, 81, 9: 954-959.
- Burkhead K.D., Schisler D.A and Slininger P.J. 1994. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Appl. Environ. Microb.*, 60: 2031-2039.
- Burkhead K.D., Schisler D.A and Slininger P.J. 1995. Bioautography shows antibiotic production by soil bacterial isolates antagonistic to fungal dry rot of potatoes. *Soil Biol. Biochem.*, 77: 1611-1616.
- Burr T.J. and Caesar A. 1984. Beneficial plant bacteria. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 2: 1-20.
- Burriel F., Lucena F., Arribas S. y Hernandez J. 1983. *Química Analítica Cualitativa*. 11ava Ed. Editorial Paraninfo Madrid.
- Butt T.M., Harris J.G. and Powell K.A. 1999. Microbial pesticides. A *Biopesticides: use and delivery*. Ed. F.R.Hall and J.J.Menn. Humana Press Inc. Totowa N.J. pp 23-31.
- Buysens S., Heungens K., Poppe J. and Höfte M. 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl. Environ. Microb.*, 62: 865-871.

- C**abrefiga, J. 2000. Aplicació de tècniques moleculars per la prospecció selectiva, caracterització i millora de bacteris antagonistes pel control biològic d' *Erwinia amylovora* causant del foc bacterià de la pomera i perera. Treball de recerca del programa de doctorat de biotecnologia. Universitat de Girona
- Carlson G.A. and Wetzstein. 1993. Pesticides and pest management. A *Agricultural and environmental resource economics*. Eds. G. A. Carlson, D. Zilberman and J.A. Miranowski. Oxford Univ. Press. New York. pp. 269-318.
- Carmi R., Carmeli S., Levy E. and Gough F.J. 1994. (+)-(s)-dihydroaeruginic acid, an inhibitor of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria, produced by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Nat. Prod.*, 57: 1200-1205.
- Cartwright D.K. , Chilton W.S. and Benson D.M. 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 43: 211-216.
- Casey C.E., O'Sullivan O.B., O'Gara F. and Glennon J.D. 1998. Ion chromatographic analysis of nutrients in seed exudate for microbial colonization. *J. Chromatogr. A* 804: 311-318.
- Castric P.A. 1975. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 21: 613-618.
- Castric P.A. 1977. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen Cyanide biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 130: 826-831.
- Castric P.A., Ebert R.F. and Castric K.F. 1979. The relationship between growth phase and cyanogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.*, 2: 287-292.
- Castric K.F., Devitt D.A. and Castric P. 1981. Influence of aeration on cyanide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.*, 5: 223-226.

- Castric K.F. and Castric P.A. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, 45: 701-702.
- Castric P. 1994. Influence of oxygen on the *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide synthase. *Curr. Microbiol.*, 29: 19-21.
- Chalutz E. and Droby S. 1998. Biological control of postharvest disease. A *Plant-microbe interactions and biological control*. Ed. by G.J. Boland and L.O. Kuykendall. Marcell Dekker Inc. New York. pp.157-170.
- Chang P.C. and Blackwood. 1969. Simultaneous production of three phenazine pigments by *Pseudomonas aeruginosa* Mac 436. *Can. J. Microbiol.*, 15: 439-444.
- Chiarini L., Bevivino A., Tabacchioni S. and Dalmastrì C. 1998. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on sorghum bicolor: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 81-87.
- Chiarini L., Tabacchioni S. and Bevivino A. 1993. Interactions between rhizosphere microorganisms under iron limitation. *Arch. Microbiol.*, 160: 68-73.
- Chin-A-Woeng T.F.C., Priester W., Van Der Bij A.J. and Lugtenberg B.J.J. 1997. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol. Plant Microbe Int.*, 10: 76-86.
- Chin-A-Woeng F.F.C., bloemberg G.V., mulders I.H.M., Dekkers L.C. and Lugtenberg J.J. 2000. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol. Plant Microbe Int.*, 13: 1340-1345.
- Clark G.J., Langley D, and Bushell M.E. 1995. Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology UK*, 141: 663-669.
- Cody Y.S. and Gross D.C. 1987. Characterization of Pyoverdinin_{ps} the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microb.*, 53: 928-934.
- Connick Jr W.J., Daigle D.J., Pepperman A.B., Hebbar K.P., Lumsden R.D., Anderson T.W. and Sands D.C. 1998. Preparation of stable, granular formulations containing *Fusarium oxysporum* pathogenic to narcotic plants. *Biol. Control*, 13: 79-84.
- Connick Jr. W. J. 1988. Formulation of living biological control agents with alginate. A *Pesticide formulations*. Ed Cross B. and Scher H. B. ACS Symposium Series Vol. 317. pp. 241- 250.
- Cook R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31: 53-80.
- Cook R.J., Thomashow L.S., Weller D.M., Fujimoto D, Mazzola M., Bangerà G. and Dal-Soo Kim. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4197-4201.

- Cook R.J., Bruckart W.L., Coulson J.R., Goettel M.S., Humber R.A., Lumsden R.D., Maddox J.V., McManus M.L., Moore L., Meyer S.F., Quimby P.C., Stack J.P. and Vaughn J.L. 1996. Safety of microorganismes intended for pest and plant disease control: A framework for scientific evaluation. *Biol. Control*, 7: 333-351.
- Corbell N. and Loper J.E. 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.*, 177: 6230-6236.
- Costa J.M. and Loper J.E. 1994. Characterization of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*. *Mol. Plant Microbe Int.*, 7: 440-448.
- Coulter J. 1999. The north american scenario. A *Methods in biotechnology. Biopesticides. Use and delivery*. Ed. Hall F.R. and Menn J.J. Humana Press, Totowa NY. pp.13-21.
- Cronin D., Moënne-Loccoz Y., Fenton A., Dunne C., Dowling and O'Gara F. 1997a. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol *Pseudomonas* strain F113 with the potato Cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Appl. Environ. Microb.*, 63: 1357-1361.
- Cronin D., Moënne-Loccoz Y., Fenton A., Dunne C., Dowling D.N. and O'Gara F. 1997b. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-DAPG with the soft rot potato pathogen *Erwinia catovora* subsp. *Atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23: 95-106.
- Csikai N.J. and Barnard Jr. J. 1983. Determination of total cyanide in thiocyanate-containing wastewaters. *Anal. Chem.*, 55: 1677-1682.
- D**andurand L.M., Schotzko D.J. and Knudsen G.R. 1997. Spatial patterns of rhizoplane populations of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microb.*, 63: 3211-3217.
- De Boer M., Van der Sluis I., Van Loom L.C. and Bakker P.A.H.M. 1999. Combining fluorescent spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105: 210-210.
- De Waard M.A., Georgopoulos S.G., Hollomon D.W., Ishii H., Leroux P., Ragsdale N.N. and Schwinn F.J. 1993. Chemical control of plant diseases: problems and prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31: 403-421.
- Dean F.M. and Robertson A. 1953. C-diacetyl derivatives of phloroglucinol and C-methylphloroglucinol. *J. Chem. Soc. Perk T1*, 1241-1249.
- Dent D.R. 1993. The use of *Bacillus thuringiensis* as an insecticide. A *Exploitation of microorganisms*. Ed. by Jones D.G., Chapman Hall, London. pp 45-79.
- Dhingra O.D. and Sinclair J.B. 1987. *Basic plant pathology methods*. CRC Press Inc. Boca Raton.
- Dorca, M. 1998. Eficàcia d'aïllats epífits en el biocontrol de la podridura causada per *Penicillium expansum* en postcollita de fruits de llavor. Treball final de carrera. ETAIAA. Escola Politècnica de Girona. Universitat de Girona.
- Dowling D.N. and O'Gara F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant diseases. *Trends Biotechnol.*, 12: 133-141.

- Drew S.W. and Demain A.L. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31: 343-356.
- Duffy B.K. and Défago G. 1995. Influence of cultural conditions on spontaneous mutation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Phytopathology*, 85: 1146.
- Duffy B., Simon A. and Weller D.M. 1996a. Combination of *Trichoderma koningii* with Fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology*, 86: 188-194.
- Duffy B.K. and Défago G. 1996b. Influence of minerals, C-source, and pH on antibiotic and salicylate production by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Phytopathology*, 86: S79.
- Duffy B.K. and Défago G. 1997. Zinc improves biocontrol of Fusarium crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology*, 87: 1250-1257.
- Duffy B.K. and Défago G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microb.*, 65: 2429-2438.
- Duffy B.K. and Défago G. 2000. controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microb.*, 66: 3142-3150.
- Duijff B.J., Recorbet G., Bakker P.A.H.M., Loper J.E. and Lemanceau P. 1999. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of Fusarium wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology*, 89: 1073-1079.
- Durner J., Shah J. and Klessig D.F. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.*, 7: 266-274.
- Edwards S.J., Young J.P. and Fitter A.H. 1998. Interactions between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agents and *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus, within the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.*, 166: 287-303.
- El-Banna N. and Winkelmann G. 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 69-78.
- El-Ghaouth A. 1997. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 19: 160-162.
- Ellis R.J., Timms-Wilson T.M., Beringer J.E., Rhodes D., Renwick A., Stevenson L. and Bailey M.J. 1999. Ecological basis for biocontrol of damping-off disease by *Pseudomonas fluorescens* 54/96. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 454-463.
- Ellis R.J., Timms-Wilson T.M. and Bailey M.J. 2000. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environ. Microbiol.*, 2: 274-284.
- Emmet A.B.E. and Handelsman J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.*, 171: 1-9.

Epstein J. 1947. Estimation of microquantities of cyanide. *Anal. Chem.* 19: 272-274.

- F**enton A.M., Stephens P.M., Crowley J., O'Callaghan M. and O'Gara F. 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphoroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microb.*, 58: 3873-3878.
- Figueira M.M., Ciminelli V.S.t., de Andrade M.C. and Linardi V.R. 1996. Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain. *Can. J. Microbiol.*, 42, 519-523.
- Fisher F.B. and Brown J.S. 1952. Colorimetric determination of cyanide in starck gas and waste water. *Anal. Chem.*, 24: 1440-44.
- Flaishman M.A., Eyal Z., Zilberstein A., Voisard C. and Haas D. 1996. Suppression of *Septoria tritici* blotch of leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. *Mol. Plant Microbe Int.*, 9: 642-645.
- Francés, J. 2000. Bases experimentales para la implementación de un control racional de podredumbres fúngicas y fisiopatías en posrecolección de pera en la zona de frutícola de Girona. Tesis doctoral. Universidad Pública de Navarra. Pamplona.
- Frant M.S., Ross J.W. and Riseman J.H. 1972. Electrode indicator technique for measuring low levels of cyanide. *Anal. Chem.*, 44: 2227-2230
- Fravel D.R.; Marois J.J.; Lumsden R.D. and Connick W.J. 1985. Encapsulation of potential agents in alginate-clay matrix. *Phytopathology*, 75: 774-777.
- Fravel D.R. 1988. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26: 75-91.
- Froyd J.D. 1997. Can synthetic pesticides be replaced with biologically-based alternatives?- an industry perspective. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 19: 192-195.
- Fujimoto D. K., Weller D.M. and Thomashow L.S. 1995. Role of secondary metabolites in root disease suppression. A *Allelopathy* ACS Vol. 582. Inderjit, Dakshini and Einhelling (Eds.). Washington D.C. pp. 330-347.
- Fukui R., Schrotch M.N., Henderson M and Hancock J. 1994. Interaction between strains of pseudomonas in sugar beet spermospheres and their relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil. *Phytopathology*, 84: 1322-1330.
- Fukui R., Fukui H. and Alvarez A.M. 1999. Comparisons of single versus multiple bacterial species on biological control of Anthurium blight. *Phytopathology*, 89: 366-373.
- Funa N., Ohnishi Y., Fuji I., Shibuya M., Ebizuka Y. and Horinouchi S. 1999. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, 400: 897-899.
- Fuqua C., Winans S.C. and Greenberg E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50: 727-751.

- G**affney T.D., Lam S.T., Ligon J., Gates K., Frazelle J., Di Maio J., Hill S., Goodwin S., Torkewitz N., Allshouse A.M., Kempf H.J. and Becker J.O. 1994. Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. *Mol. Plant Microbe Int.*, 7: 455-463.
- Georgakopoulos D.G., Henderson M., Panopoulos N.J. and Schroth M.N. 1994. Cloning of a Phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aereofaciens* PGS12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microb.*, 60: 2931-2938.
- Gerhardt P., Murray R.G.E., Costillow R.N., Nester E.W., Wood W.A., Krieg N.R. and Phillips G.B. Eds. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington, 1981.
- Gewitz H-S, Pistorius E.K., Voss H. and Vennesland B. 1976. Cyanide formation in preparations from *Chlorella vulgaris* Beijerinck: Effect of sonication and amygdalin addition. *Planta*, 131: 145-148.
- Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 41:109-117.
- Goulden P. D., Afghan B.K. and Brooksbank P. 1972. Determination of nanogram quantities of simple and complex cyanides in water. *Anal. Chem.*, 44: 1845-1849.
- Greenberg P. 1997. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News*, 63: 371-377.
- Grondona I., Morales R., Llobell A., Fernández de Castro G., Rodríguez A. y Monte E. 2000. Control biológico en viveros de fresa. En Programa y resúmenes del X Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Valencia.
- Guilbault G. G. and Kramer D. N. 1966. Ultra sensitive, specific method for cyanide using p-nitrobenzaldehyde and o-dinitrobenzene. *Anal. Chem.*, 38: 834-836.
- Gurusiddaiah S., Weller D.M., Sarkar A. and Cook J. 1986. Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrob. Agents Ch.*, 29: 488-495.
- Gutterson N.I., Layton T.J., Ziegler J.S. and Warren G.J. 1986. Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent pseudomonad. *J. Bacteriol.*, 165: 696-703
- Gutterson N.I., Ziegler J.S., Warren G.J. and Layton T.J. 1988. Genetic determinants for catabolite induction of an antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* HV37a. *J. Bacteriol.*, 170: 380-385.
- Gutterson N. 1990. Microbial fungicides: recent approaches to elucidating mechanisms. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 10: 69-91.

- H**aaas D., Keel C., Laville J., Maurhofer M., Oberhänsli T., Schnider U., Voisard C., Wüthrich B. and Défago G. 1991. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 involved in the suppression of root diseases. A *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. H. Hennecke and D.P.S. Verma Eds. pp. 450-456.
- Hamdan H., Weller D.M. and Thomashow L.S. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl. Environ. Microb.*, 57: 3270-3277.
- Hammer P.E., Hill S., Lam S.T., Van Pée K-H. and Ligon J.M.. 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microb.*, 63: 2147-2154.
- Handelsman J. and Staab EV. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*, 8: 1855-1869.
- Harris R and Knowles C.J. 1983. Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilizes cyanide as source of nitrogen. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 1005-1011.
- Harrison L.A., Letendre L., Kovacevich P. Pierson E. and Weller D. 1993. Purification of an antibiotic effective against *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* produced by a biocontrol agent *Pseudomonas aureofaciens*. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 215-221.
- Hasegawa S., Kondo N. and Kodama F. 1991a. Suppression of Fusarium Wilt of Adzukibean by rhizosphere microorganisms. A *Naturally occurring pest bioregulators*. ACS Symposium Series, Washington D.C. pp 407-415.
- Hasegawa S., Kodama F. and Kondo N. 1991b. Soil borne Diseases in Japan. A *Naturally occurring pest bioregulators*. ACS Symposium Series, Washington D.C. pp 417-425
- Hasnad H., Weller D.M. and Thomashow L.S. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl. Environ. Microb.*, 57: 3270-3277.
- Herrera E. A. and Chet I. 1998. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. A *Agricultural and Biotechnology*. Ed by Eric Altman, Marcel Dekker Inc. New York. pp 263-282.
- Hill D. S., Stein J.I., Torkewitz N.R., Morse A.M., Howeel C.R., Pachlatko J.P., Becker J.O. and Ligon J.M.. 1994. Cloning genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease. *Appl. Environ. Microb.*, 60: 78-85.
- Hoftein R. and Chapple A. 1999. Comercial developement of biofungicides. A *Biopesticides: use and delivery*. Ed. F.R. Hall i J.J. Menn. Humana Press Tnc. Totowa N.J. pp. 77-102.
- Hoitink H. and Boehm M.J. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 427-446.

- Hollstein U. and Marshall L.G. 1972. Biosynthesis of Phenazines. *J. Org. Chem.*, 37: 3510-3514.
- Homans A.L. and Fuchs A. 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr. A*, 51: 327-329.
- Hopwood D.A. and Merrick M.J. 1977. Genetics of antibiotic production. *Bacteriol. Rev.*, 41: 595-635.
- Hopwood D.A. and Sherman D.H. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acids biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.*, 24: 37-66.
- Hornby D. 1983. Suppressive soils. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 21: 65-85.
- Howell C. R. and Stipanovic R. D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, 69: 480-482.
- Howell C. R. and Stipanovic R. D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced Damping-Off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. *Phytopathology*, 70: 712-715.
- Howie W.J. and Suslow T.V. 1991. Role of antibiotic biosynthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Int.*, 4: 393-399.

Ishimaru C.A.; Klos E.J. and Brubaker R.R. 1988. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology*, 78: 746-750.

Jackson M.A. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biocontrol agents. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 19: 180-187.

Jackson A.O. and Taylor C.B. 1996. Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. *Plant Cell*, 8: 1651-1668.

Jaeger III C.H., Lindow S.E., Miller W., Clark E. and Firestone M.K. 1999. Mapping of sugar and aminoacid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl. Environ. Microb.*, 65: 2685-2690.

James D. W. and Gutterson N. I. 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microb.*, 52: 1183-1189.

Janisiewicz W. J. and Roitman J. 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*, 78: 1697-1700.

Janisiewicz W.J. 1998. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits. Challenges and opportunities. A *Plant-microbe interactions and biological control*. Ed. G.J. Boland and L.O. Kuykendall. Marcell Dekker Inc. New York. pp. 171-198.

Jones K.A., Westby A., Reilly P.J.A. and Jeger M.J. 1993. The exploitation of microorganisms in the developing countries of the tropic. A *Exploitation of microorganisms*. Ed. by Jones D.G., Chapman Hall, London. pp 343-370.

- K**anda N., Ishizaki N., Inque N., Oshima M., Handa A. and Kitahara T. 1975. DB-2073, a new alkylresorcinol antibiotic I. Taxonomy, isolation and characterization. *J. Antibiot.*, 28: 935-942.
- Kanner D., Gerber N.N. and Bartha R. 1978. Pattern of phenazine pigment production by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 134: 690-692.
- Katz L. and Donatio S. 1993. Polyketide synthesis: Prospects for hybrid antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47: 875-912.
- Keel C., Voisard C., Berling C.H., Kaha G. and Défago G. 1989. Iron sufficiency, a prerequisite for the suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 79: 584-589.
- Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger U., Wirthner P., Haas D and Défago G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant Microbe Int.*, 5: 4-13.
- Keel C., Weller D.M., Natsh A., Défago G., Cook R.J. and Thomashow L.S. 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl. Environ. Microb.*, 62: 552-563.
- Kinkel L.L., Wilson M. and Lindow S.E. 2000. Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. *Microbial Ecol.*, 39: 1-11.
- King E.O., Ward M.K. and Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of the pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44: 301-307.
- Kirner S., Hammer P.E., Hill D.S., Altmann A., Fisher I., Weislo L.J., Lanahan M., Van Pée K-H and Ligon J.M. 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.*, 180: 1939-1943.
- Kisaalita W.S., Slininger P.J. and Bothast R.J. 1993. Defined media for optimal pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biot.*, 39: 750-755.
- Kitahara T. and Kanda N. 1975. DB-2073, a new alkylresorcinol antibiotic II. The chemical structure of DB-273. *J. Antibiot.*, 28: 943-946.
- Kloepper J.W., Leong J., Teintze M. and Schroth M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885-886.
- Kloepper J.W. and Schroth M.N. 1981. Development of a powder formulation of Rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology*, 71: 590-592.
- Kloepper J. W. 1992. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as biological control agents. *A Soil Microbial Ecology*. Ed F. Blaine Hetting Jr. Marcel Dekker Inc. 1992. pp 255-274.

- Knight S.C., Anthony V.M., Brady A.M., Greenland A.J., Heaney S.P., Murray D.C., Powell K.A., Schulz M.A., Spinks C.A., Worthington P.A. and Youle D. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35: 349-372.
- Knowles C.J. 1976. Microorganisms and Cyanide. *Bacteriol. Rev.*, 40:652-680.
- Köhl J. and Fokkema N.J. 1998. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. A *Plant-microbe interactions and biological control* Ed. by G.J. Boland and L.O. Kuykendall. Marcell Dekker Inc. New York. pp. 49-88.
- Kolter R., Siegele D.A. and Tormo A. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47: 855-874.
- Kraus J. and Loper J.E. 1992. Lack of evidence for the role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pytium* Damping-Off of cucumber. *Phytopathology*, 82: 264-271.
- Kraus J. and Loper J.E. 1995. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microb.*, 61:849-854.
- Larkin R.P. and Fravel D.R. 1999. Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of fusarium wilt of tomato by non pathogenics *Fusarium* spp. *Phytopathology*, 89: 1152-1161.
- Laties G.G. 1982. The cyanide-resistant alternative path in higher plant respiration. *Annu. Rev. Plant Phys.*, 33: 519-555.
- Latour X., Corberand T., Laguerre G., Allard F. and Lemanceau P. 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microb.*, 62: 2449-2456.
- Laville J. Voisard C., Keel C., Maurhofer M., Défago G and Haas D. 1992. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1562-1566.
- Laville j., Blumer C., Von Schroetter C., Gaia V., Défago G., Keel C. and Haas D. 1998. Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.*, 180: 3187-3196.
- Lazarovits G., Brammall R.A. and Ward W.B. 1982. Bioassay of fungitoxic compounds on thin-layer chromatograms with *Pytium* and *Phytophthora* species. *Phytopathology*, 72: 61-63.
- Leisinger T. and Margraff R. 1979. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.*, 43: 422-442.
- Leong J. 1986. Siderophores: Their biochemistry and possible role in biocontrol of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24: 187-209.
- Levy E. and Carmeli S. 1995. Biological control of plant pathogens by antibiotic-producing bacteria. A *Allelopathy* ACS Symposium Series Vol. 582. Inderjit, Dakshini and Einhelling (Eds.). Washington D.C. pp. 300-309.

- Levy S.B. 1998. La resistencia contra los antibióticos. *Investigación y Ciencia*, Mayo: 14-21.
- Lindberg G.D., Larkin J.M. and Whaley H.A. 1980. Production of tropolone by a *Pseudomonas*. *J. Nat. Prod.*, 43: 592-594.
- Lindberg G.D. 1981. An antibiotic lethal to fungi. *Plant Dis.*, 65: 680-683.
- Liyanage H., Palmer D.A., Ullrich M. and Bender C.L. 1995. Characterization and transcriptional analysis of the gene cluster for coronafacic acid, the polyketide component of the phytotoxin coronatine. *Appl. Environ. Microb.*, 61: 3843-3848.
- Loper J.E., Suslow T.V. and Schrotch M.N. 1984. Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. *Phytopathology*, 74: 1454-460.
- Loper J.E. and Buyer J.S. 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol. Plant Microbe Int.*, 4: 5-13.
- Loper J.E. and Henkels M.D. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microb.*, 65: 5357-5363.
- Lorito M., Harman G.E., Hayes C.K., Broadway R.M., Tromsø A., Woo S.L. and Di Pietro A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83: 302-307.
- Lumsden R. D., Lewis J.A. and Fravel D.R. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. *A Biorational pest control agents. Formulation and delivery*. Ed. Hall F.R. and Barry J.W. ACS Symposium Series Vol 595. pp. 166-182.
- M**ahoney N.E. and Roitman J.N. 1990. High-performance liquid chromatographic analysis of phenylpyrroles produced by *Pseudomonas cepacia*. *J. Chromatogr. A* 508: 247-251.
- Maniatis T., Fritsch E.F. i Sambrook J. 1982. *Clonig: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor.
- Mann J. *Secondary metabolism*. Clarendon Press, Oxford, 1987.
- Martin L.L., Chang C.-J., Floss H.G., Mabe J.A., Hanagan E.W. and Wenkert E. 1972. A ¹³C nuclear magnetic resonance study on the biosynthesis of pyrrolnitrin from tryptophan by *Pseudomonas*. *J. Am. Chem. Soc.*, 94: 8942-8944.
- Mathre D.E., Cook R.J. and Callan N.W. 1999. From discovery to use. Traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Dis.*, 83: 972-983.
- Maurhofer M., Keel C., Schnider U., Voisard C. Haas D. and Défago G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, 82: 190-195.

- Maurhofer M., Hase C., Meuwly P., Métraux J-P. and Défago G. 1994. Induction of systematic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, 84: 139-146.
- Maurhofer M., Reimann C., Schmidli-Sacherer P., Heeb S., Haas D. and Défago G. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, 88: 678-684.
- Mavrodi D. V., Ksenzenko V. N., Bonsall R., Cook R.J., Boronin A.M. and Thomashow L.S. 1998. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J. Bacteriol.*, 180: 2541-2548.
- Mavrodi O.V., Mc Spadden Gardener B.B., Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Weller D.M. and Thomashow L.S. 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 91:35-43.
- Mayes R.W. 1995. Carbon monoxide and cyanide from fire and accident. A Encyclopaedia of Analytical Science. Vol. 9. Ed. Alan Townshend. Academic Press.
- Mazzola M., Cook R.J., Thomashow L.S., Weller D.M. and Pierson L.S. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in Soil Habitats. *Appl. Environ. Microb.*, 58: 2616-2624.
- Mazzola M., Fujimoto D.K., Thomashow L.S. and Cook R.J. 1995. Variation in sensibility of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all of wheat. *Appl. Environ. Microb.*, 61: 2554-2559.
- Mc Spadden Gardener B.B., Schreoder K.L., Kaloger S.E., Raaijmakers J.M., Thomashow L.S. and Weller D.M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microb.*, 66: 1939-1946.
- Mc Spadden Gardener B.B., Mavrodi D., Thomashow L.S. and Weller D.M. 2001. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. *Phytopathology*, 91: 44-54.
- Menn J.J. and Hall R. 1999. Biopesticides. Present status and future prospects. A *Biopesticides. Use and Delivery*. Ed. by F.R.Hall and J.J.Menn. Humana Press. Totowa N.J. pp. 1-10.
- Mew T.W. and Rosales A.M. 1986. Bacterization of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solari*. *Phytopathology*, 76: 1260-1264.
- Meyer J.M. and Abdallah M.A. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.*, 107: 319-328.
- Michaels R. and Corpe W.A. 1965. Cyanide formation by *Chromobacterium violaceum*. *J. Bacteriol.*, 89: 106-112.
- Miller J.M. and Conn E.E. 1980. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant Physiol.*, 65:1199-1209.

- Milosavljevic E.B., Solujic L. and Hendrix J. 1995. Rapid distillationless "free cyanide" determination by a flow injection ligand exchange method. *Environ. Sci. Technol.*, 29: 426-430.
- Mirleau P., Delorme S., Philipot L., Meyer J.M., Mazurier S. and Lemanceau P. 2000. Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 34: 35-44.
- Moënne-Loccoz Y., McHugh B., Stephens P.M., McConnel F.I., Glennon J.D., Dowling D.N. and O'Gara F. 1996. Rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* sp B24 genetically modified to utilize additional ferric siderophores. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 19: 215-225.
- Moënne-Loccoz Y., Naughton M., Higgins P., Powell J., O'Connor B. and O'Gara F. 1999. Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 108-116.
- Molina L., Ramos C., Duque E., Ronchel M.C., Garcia J.M., Wyde L. and Ramos J.L. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 315-321.
- Montesinos E. and Vilardell P. 1992. Evaluation of FAST as a Forecasting System for Scheduling Fungicide Sprays for control of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Plant Dis.*, 76: 1221-1226.
- Montesinos E. and Bonaterra A. 1996. Dose-response models in biological control of plant pathogens: An empirical verification. *Phytopathology*, 86: 464-472.
- Montesinos E., Bonaterra A., Ohir Y. and Beer S.V. 1996. Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot on pear under controled environment conditions. *Phytopathology*, 86: 856-863.
- Montesinos E., López M.M. y Murillo J. 1999. Importancia y situación actual del fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) en España. Epidemiología daños y prevención. *Phytoma*, 114:128-135.
- Murphy J.F., Zehnder G.W., Schuster D.J., Sikora E.J., Polston J.E. anf Kloepper J.W. 2000. Plant growth-promoting rhizobacterial protection in tomato against Tomato mottle virus. *Plant Dis*, 84: 779-784.
- N**agashima S. and Ozawa T. 1981. Spectrophotometric determination of cyanides with isonicotinic acid and barbituric acid. *Int. J. Environ. An. Ch.*, 10: 99-106.
- Nakamoto K. 1986. Spectra of Inorganic and coordination compounds. A *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. Ed Wiley-Interscience. New York. pp. 116.
- Naseby D.C., Pascual J.A. and Lynch J.M. 1999. Carbon fractions in the rhizosphere of pea inoculated with 2,4-diacetilphloroglucinol producing and non-producing *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 173-181.

- Natsch A. Keel C., Pflirter H.A., Haas D and Défago G. 1994. Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO introduced into soil microcosms. *Appl. Environ. Microb.*, 60: 2553-2560.
- Nelson E.B. and Kraft C.M. 2000. Microbial strategies for the biological control of turfgrass diseases. A *Fate and management of turfgrass chemicals*. Ed. JM Clark and MP Kenna. ACS Symposium Series. vol 743. Washington D.C. pp. 342-352.
- Nielsen M.N., Sorensen J., Fels J. and Pedersen H.C. 1998. Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microb.*, 64: 3563-3569.
- Nielsen T.H., Christophersen C., Anthoni U. and Sorensen J. 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 80-90.
- Novartis Crop protection AG. Crop protection an introduction. Basel 1998 a <http://www.cp.novartis.com>.
- Nowak-Thomson B. and Gould S.J. 1994. Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Can. J. Microbiol.*, 40: 1064-1066.

Omat C., Sorribas F.J., Verdejo Lucas S., Lorenza M.L., López-Llorca L.V. y Salinas J. 2000. Colonización de la rizosfera de cultivos hortícolas por aislados de *Verticillium chlamydosporium*. A Programa y resúmenes del X Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Valencia 2000.

O'Sullivan D.J. and O'Gara F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.*, 56: 662-676.

Palleroni N.J. 1984. Gram-negative aerobic rods and cocci: family I. Pseudomonadaceae. Genus I *Pseudomonas*. A *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. I. Krieg N.R. and Hold J.G. (eds) William and Wilkins Co. Baltimore Md. p. 141-199.

Palmer D.A. and Bender C.L. 1993. Effects of environmental and nutritional factors on production of the polyketide phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*. *Appl. Environ. Microb.*, 49:1619-1626.

Picard C., Di Cello F., Ventura M., Fani R. and Guckert A. 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microb.*, 66: 948-955.

Pierson E.A. and Weller D.M. 1994. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology*, 84: 940-947.

Pierson III L.S. and Pierson E.A. 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aerofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiol. Lett.* 136: 101-108.

- Pierson III L.S. and Thomashow L.S. 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol. Plant Microbe Int.*, 5: 330-339.
- Pierson III, L.S., Keppenne V.D. and Wood D.W. 1994. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J. Bacteriol.*, 176: 3966-3974.
- Pierson III L.S., Gaffney T., Lam S. and Gong F. 1995. Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *FEMS Microbiol. Lett.*, 134: 299-307.
- Pierson III L.S., Wood D.W., Pierson E.A. and Chancey S.T. 1998. N-Acyl-homoserine lactone-mediated gene regulation in biological control by fluorescent pseudomonads: current knowledge and future work. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 1-9.
- Powell K.A. 1993. The commercial exploitation of microorganisms in agriculture. A *Exploitation of microorganisms*. Ed. by Jones D.G., Chapman Hall, London. pp 441-459.
- Prats M. 1998. Estudi per a la millora del procés de recollida de l'àcid cinahídric produït per part una soca bacteriana. Treball de Final de carrera. ETIQU. Escola Politècnica Superior. Universitat de Girona.

- R**aaismakers J.M., Leeman M and Van Oorschod M.M.P. 1995. Dose-response relationship in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85: 1075-1081.
- Raaismakers J.M. , Weller D.M. and Thomashow L.S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microb.*, 63: 881-887.
- Raaismakers J.M. and Weller D.M. 1998. Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol. Plant Microbe Int.*, 11: 144-152.
- Raaismakers J.M., Bonsall R.F. and Weller D.M. 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 89: 470-475.
- Ragsdale N.N. and Sisler H.D. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32: 545-557.
- Rhodes D.J. 1993. Formulation of biological control agents. A *Exploitation of microorganisms*. Ed. by Jones D.G., Chapman Hall, London. pp 411-439.
- Rodgers P.B. and Knowles. 1978. Cyanide production and degradation during growth of *Chromobacterium violaceum*. *J. Gen. Microbiol.*, 108: 261-267.
- Rodríguez F. and Pfender W.F. 1997. Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in vitro and in planta. *Phytopathology*, 87: 614-621.

- Rosales A.M., Thomashow L, Cook R.J. and Mew T.W. 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85: 1028-1032.
- Russo A., Moëne-Loccoz Y., Fedi S., Higgins P., Fenton A., Dowling D.N., O'Regan M., and O'Gara F. 1996. Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. *Appl. Microbiol. Biot.*, 44: 740-745.
- Ruz, L. 1999. Caracterització *in vitro* i *in vivo* de soques de *Pseudomonas fluorescens* i *Erwinia herbicola*, promotores de creixement en espècies de portaempelts de fruiters. Treball pràctic del master de Biotecnologia. Universitat Autònoma de Barcelona.
- S**alcher O., Lingens F. and Fisher P. 1978. Biosynthese von Pyrrolnitrin. *Tetrahedron Lett.*, 34: 3097-3100.
- Salvensen I. and Vadstein O. 2000. Evaluation of plate count methods for determination of maximum specific growth rate in mixed microbial communities, and its possible application for diversity assessment. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 442-448.
- Schippers B., Bakker A.W. and Bakker P.A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 25: 339-358.
- Schisler D.A. and Slininger P.J. 1997. Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 19: 172-179.
- Schisler D.A., Burkhead K.D., Slininger P.J. and Bothast R.J. 1998. Selection, characterization, and use of microbial antagonists for the control of Fusarium dry rot of potatoes. A *Plant-microbe interactions and biological control*. Ed. by G.J. Boland and L.O. Kuykendall. Marcell Dekker Inc. New York. pp. 199-222.
- Schnider U., Keel C., Blumer C., Troxler J., Défago G. and Haas D. 1995. Amplification of the house keeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.*, 177: 5387-5392.
- Schnider-Keel U., Sematter A., Maurhofer M., Blumer C., Duffy B., Gigot-Bonnefoy C., Reimann C., Notz R., Défago G., Haas D. and Keel C. 2000. Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J. Bacteriol.*, 182: 1215-1225.
- Schröder J. 1997. A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions. *Trends in Plant Sciences.*, 2: 373-378.
- Schroth M.N. and Hancock J.G. 1981. Selected topics in biological control. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35: 453-476.
- Schroth M.N. and Hancock J.G. 1982. Disease-suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science*, 216: 1376-1381.

- Shanahan P., Borro A., O'Gara F. and Glennon J.D. 1992a. Isolation, trace enrichment and liquid chromatographic analysis of diacetylphloroglucinol in culture and soil samples using UV and amperometric detection. *J. Chromatog. A*, 606: 171-177.
- Shanahan P., O'Sullivan D.J., Simpson P., Glennon J.D. and O'Gara F. 1992b. Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microb.*, 58: 353-358.
- Shanahan P., Glennon J.D., Crowley J.J., Donnelly D.F. and O'Gara F. 1993. Liquid chromatographic assay of microbially derived phloroglucinol antibiotics for establishing the biosynthetic route to production, and the factors affecting their regulation. *Anal. Chim. Acta*, 272: 271-277.
- Singh P.P., Shin Y.C., Park C.S. and Chung Y.R. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, 89: 92-99.
- Sivan A. and Chet I. 1992. Microbial Control of Plant Diseases. A *Environmental Microbiology*. Mitchell R Ed. Wiley-Liss Inc. New York. pp 335-354.
- Sivasithamparam K. 1998. Root cortex-The final frontier for the biocontrol of root-rot with fungal antagonists: A case study on a sterile red fungus. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36: 439-452.
- Slininger P.J. and Jackson M.A. 1992. Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biot.*, 37:388-392.
- Slininger P.J. and Shea-Wilbur M.A. 1995. Liquid-culture pH, temperature and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biot.*, 43:794-800.
- Slininger P.J., Van Cauwenberge J.E., Bothast R.J., Weller, Thomashow L.S. and Cook R.J. 1996. Effect of growth culture physiological state, metabolites and formulation on the viability, phytotoxicity, and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. *Appl. Microbiol. Biot.*, 45: 391-398.
- Smidsrod O. and Skjak-Baek G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.*, 8: 71-78.
- Smilanck J.L. and Denis-Arrue R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Dis.*, 76: 481-485.
- Smith J.W., Wiedenmann R.N. and Gilstrap F.E. 1997. Challenges and opportunities for biological control in ephemeral crop habitats: an overview. *Biol. Control*, 10: 2-3.
- Smith K.P. and Goodman R.M. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 473-491.
- Sneath P.H. 1956. Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *J. Gen. Microbiol.*, 15: 70-98.
- Sneath P.H. 1966. Identification methods applied to *Chromobacterium*. A *Identification methods for microbiologists*. B.M. Gibbs and F.A. Skinner (ed). Vol. 1A. Academic Press Inc., London. pp. 15-20.

- Stanghellini M. and Miller R.M. 1997. Biosurfactants, their identity and potential efficacy in the biocontrol of zoosporic plant pathogens. *Plant Dis.*, 81: 4-12.
- Stead P., Rudd B.A., Bradshaw H., Noble D. and Dawson M.J. 1996. Induction of phenazine biosynthesis in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* by L-N-(3-oxohexanoil)homoserine lactone. *FEMS Microbiol. Lett.*, 140: 15-22.
- Sticher L., Mauch-Mani B. and Métraux J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35: 235-270.
- Stutz E.W., Défago G and Kern H. 1986. Naturally occurring fluorescent pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology*, 76: 181-185.
- Stutz E.W., Kahr G. and Défago G. 1989. Clays involved in suppression of tobacco black root by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.*, 21: 361-366.
- Sujji E.R., Fontes E.G., Pires C.S.S. and Texeira C.A. 1996. Application of multivariate analysis for the selection of candidates for biological control agents. *Biol. Control*, 7: 288-292.
- Suslow T.V. and Schroth M.N. 1982. Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology*, 72: 199-206.
- T**ada M., Takamura T., Nagai M. and Yoshii T. 1990. Antiviral and antimicrobial activity of 2,4-diacetylphloroglucinols, 2-acylcyclohexane-1,3-diones and 2-carboxamidocyclo-hexane-1,3-diones. *Agric. Biol. Chem.*, 54: 3061-3063.
- TeBeest D.O. 1993. Biological control of weeds with fungal plant pathogens. A *Exploitation of microorganisms*. Ed. by Jones D.G., Chapman Hall, London. pp 1-17.
- Thomas M. B. 1999. Ecological approaches and the development of "truly integrated" pest management. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 5944-5951.
- Thomashow L.S. and Weller D.M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *G. graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.*, 170: 3499-3508
- Thomashow L.S.; Weller D.M.; Bonsall R.F. and Pierson III L.S. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microb.*, 56: 908-912.
- Thomashow L.S. and Pierson III L.S. 1991. Genetic aspects of phenazine antibiotic production by fluorescent pseudomonads that suppress take-all disease of wheat. *A Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. H. Hennecke and D.P.S. Verma Eds. pp 443-449.
- Thomashow L.S. and Weller D. M. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites. *A Plant Microbe Interactions*. Vol. 1. Eds Gary Stacey and Noel T. Keen. Chapman Hall, New York. pp. 187-235.
- Thompson I.P., Ellis R.J. and Bayley M.J. 1995. Autecology of a genetically modified fluorescent pseudomonad on sugar beet. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17: 1-14.

- Thompson J.A. 1997. The role of biotechnology in plant disease and pest control. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 19: 157.
- Timms-Wilson T.M., Ellis R.J., Renwick A., Rhodes D.J., Mavrodi D.V., Weller D.M., Thomashow L.S. and Bailey M.J. 2000. Chromosomal insertion of phenazine-1-carboxylic acid biosynthetic pathway enhances efficacy of damping-off disease control by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Int.*, 13: 1293-1300.
- Tronsmo A. and Hjeljord L.G. 1998. Biological control with *Trichoderma* species. A *Plant-microbe interactions and biological control*. Ed. by G.J. Boland and L.O. Kuykendall. Marcell Dekker Inc. New York. pp. 111-126.
- Troxler J., Zala M., Natsch A., Moënne-Loccoz and Défago G. 1997a. Autecology of the biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHAO in the rhizosphere and inside roots at later stages of plant development. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23: 119-130.
- Troxler J., Zala M., Moënne-Loccoz Y., Keel C. and Défago G. 1997b. Predominance of nonculturable cells of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO in the surface horizon of large outdoor lysimeters. *Appl. Environ. Microb.*, 63: 3776-3782.
- V**an Loom L.C., Beakker P.A.H.M. and Pieterse C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36: 453-483.
- Van Overbeek L.S., Van Elsas J.D., Van Veen J.A. 1997. *Pseudomonas fluorescens* Tn5-B20 mutant RA92 responds to carbon limitation in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 24: 57-71.
- Van Pée K-H, Salcher O., Fisher P., Bokel M. and Lingens F. 1983. The biosynthesis of brominated pyrrolnitrin derivatives by *Pseudomonas aureofaciens*. *J. Antibiot.*, 36: 1735-1742.
- Van Pée K-H. 1996. Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50: 375-399.
- Van Peer R. and Schippers B. 1989. Plant growth responses to bacterization with a selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hidroponic cultures. *Can. J. Microbiol.*, 35: 456-463.
- Vanneste J.L., Yu J. and Beer S.V. 1992. Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*. *J. Bacteriol.*, 174: 2785-2796.
- Vidaver A.K. 1967. Syntetic and complex media for the rapid detection of fluorescence of phytopathologic pseudomonads: Effect of the carbon source. *Appl. Microbiol.*, 15: 1523-1524.
- Vidaver A.K. 1999. Plant microbiology: century of discovery with golden years ahead. *ASM News*, 65: 358-363.
- Vidhyasekaran P., Sethuraman K., Rajappan K. and Vasumathi K. 1997. Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control Pigeonpes wilt. *Biol. Control*, 8: 166-171.

- Vilich V. and Sikora R.A. 1998. Diversity in soil microbial communities. A tool for biological system management and root health. A *Plant-microbe interactions and biological control*. Ed. by G.J. Boland and L.O. Kuykendall. Marcell Dekker Inc. New York. pp. 1-14
- Vincent M.N., Harrison L.A., Brackin J.M., Kovacevich P.A., Mukerji P., Weller D.M. and Pierson E.A. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microb.*, 57: 2928-2934.
- Viñas I. 1997. Control biológico de las principales enfermedades fúngicas post-cosecha. *Phytoma*, 90: 78-81,
- Voisard C., Keel C., Haas D. and Défago G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.*, 8: 351-358.
- W**atanabe A., Yano K., Ikebukuro K and Karube I. 1998. Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. *Microbiology UK*, 144: 1677-1682.
- Weller D.M. and Cook R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73: 463-469.
- Weller D.M. 1984. Distribution of a take-all suppressive strain of *Pseudomonas fluorescens* on seminal roots of winter wheat. *Appl. Environ. Microb.*, 48: 897-899.
- Weller D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26:379-407.
- Weller D.M., Howie W.J. and Cook R.J. 1988. Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici and suppression of take-all of wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 78: 1094-1100.
- Whipps J.M. and McQuilken M.P. 1993. Aspects of biocontrol of fungal plant pathogens. A *Exploitation of microorganisms*. Ed. by Jones D.G., Chapman Hall, London. pp 45-79.
- Wilson C.L. 1997. Biological control and plant diseases-a new paradigm. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 19: 159-159.
- Wilson C.L. and Jackson M.A. 1997. Commercializing of biologically-based technology for the control of plant pests. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 19: 156.
- Wising F. 1974. Cyanide formation from oxidation of glycine by a *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.*, 117: 1289-1294.
- Wising F. 1975. Cyanide production from glycine by a homogenate from a *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.*, 121: 695-699.
- Wood D. W., Gong F., Daykin M.M., Williams P. and Pierson II L.S. 1997. N-Acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.*, 179, 24: 7663-7670.

Wood D.K. and Pierson III L. S. 1996. The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for the phenazine antibiotic production. *Gene*, 168: 49-53.

Yoshida S., Hiradarte S., Tsukamoto T., Hatakeda K. and Shirata A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 91: 181-187.

Yuan Z., Cang S., Matsufuji M., Nakata K., Nagamutsu Y. and Yoshimoto A. 1998. High production of pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas fluorescens* S272 grown on ethanol as a sole carbon source. *J. Ferment. Bioeng.*, 86: 559-563.

Zhou T. and Boland G.J. 1998. Biological control strategies for *Sclerotinia* diseases. A *Plant-microbe interactions and biological control*. Ed. by G.J. Boland and L.O. Kuykendall. Marcell Dekker Inc. New York. pp. 127-156.

ANNEX A

Producció d'HCN per les soques de la col·lecció EPS

Taula A.1. Soques de *P. fluorescens* de la col·lecció EPS que produeixen HCN fent referència a la planta i òrgan d'origen (de Bonaterra, 1997).

Table A.1. *P. fluorescens* strains of EPS collection that produce HCN. Plant and organ of isolation origin are shown (de Bonaterra, 1997).

Codi Soca	Origen		
	Biovar	Hoste	Òrgan
EPS200	V	cua d'escorpí	arrel
EPS201	V	cua d'escorpí	arrel
EPS202	V	cua d'escorpí	arrel
EPS203	V	cua d'escorpí	arrel
EPS204	V	cua d'escorpí	arrel
EPS205	V	cua d'escorpí	arrel
EPS206	V	cua d'escorpí	arrel
EPS208	V	cua d'escorpí	arrel
EPS209	V	cua d'escorpí	arrel
EPS210	V	cua d'escorpí	arrel
EPS212	V	cua d'escorpí	arrel
EPS213	V	antil-lis	arrel
EPS214	V	antil-lis	arrel
EPS215	V	antil-lis	arrel
EPS216	V	antil-lis	arrel
EPS218	V	antil-lis	arrel
EPS219	V	antil-lis	arrel
EPS220	V	antil-lis	arrel
EPS221	V	antil-lis	arrel
EPS222	III	antil-lis	arrel
EPS223	III	antil-lis	arrel
EPS224	V	antil-lis	arrel
EPS225	V	antil-lis	arrel
EPS228	I	perera	arrel
EPS231	V	perera	arrel
EPS232	V	perera	arrel
EPS233	V	perera	arrel
EPS234	V	perera	arrel
EPS236	V	perera	arrel
EPS237	V	perera	arrel
EPS238	V	perera	arrel
EPS239	V	perera	arrel
EPS254	V	pomera	arrel
EPS257	V	pomera	arrel
EPS258	V	pomera	arrel
EPS259	V	pomera	arrel
EPS260	V	pomera	arrel
EPS261	V	pomera	arrel
EPS262	V	pomera	arrel
EPS265	V	trèbol	arrel
EPS266	V	faig	arrel
EPS267	V	trèbol	arrel
EPS268	V	trèbol	arrel

(Continua/Continue)

Taula A.1/Table A.1 (Continuació/Continuation)

Codi Soca	Origen		
	Biovar	Hoste	Organ
EPS278	V	papil-lonàcia	arrel
EPS270	V	càrex	arrel
EPS271	V	càrex	arrel
EPS272	V	càrex	arrel
EPS277	V	lúzula	arrel
EPS279	V	papil-lonàcia	arrel
EPS280	V	userda	arrel
EPS281	V	userda	arrel
EPS282	V	userda	arrel
EPS283	V	userda	arrel
EPS284	V	civada	arrel
EPS286	V	civada	arrel
EPS287	V	civada	arrel
EPS288	V	blat de moro	arrel
EPS290	V	blat de moro	arrel
EPS291	V	blat de moro	arrel
EPS293	V	alzina	arrel
EPS294	V	alzina	arrel
EPS297	V	gramínia	arrel
EPS300	V	gramínia	arrel
EPS302	V	gramínia	arrel
EPS303	V	gòdua	arrel
EPS308	V	trigonel·la	arrel
EPS323	V	girasol	arrel
EPS324	II-IV	girasol	arrel
EPS326	V	enciam	arrel
EPS328	I	enciam	arrel
EPS329	V	userda	arrel
EPS333	V	userda	arrel
EPS335	V	blat de moro	arrel
EPS349	V	perera	borró
EPS352	V	perera	borró
EPS353	V	perera	borró
EPS370	V	perera	borró
EPS385	V	verònica	flor
EPS404	V	gramínia	fulla
EPS423	V	presseguer	borró

ANNEX B

Efecte de l'addició de ferro en la producció de DAPG

Taula B.1a. Taula de la significança de la Complexitat en funció de la Consistència quan s'ha addicionat Ferro al medi. Es mostren els valors de la producció de DAPG mitjana de tres repeticions.

Table B.1a. Significance table for the effect of growth media Complexity in function of Consistency when Iron is added in the media. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Amb Ferro					
	Líquid			Sòlid		
	GA	KB	P>F	GA	KB	P>F
EPS317	43,8	-	0,0001	6,5	21,4	0,04
EPS808	80,4	180,2	0,023	56,9	172,0	0,0001
CHA0	-	-	-	-	-	-
JBR 1-70	162,3	937,8	0,0001	189,4	77,7	0,002
PS-15	149,3	-	0,0001	9,7	55,3	0,004
Q2-87	288,5	681,1	0,0001	9,7	123,6	0,0001

Taula B.1b. Taula de la significança de l'efecte de la Complexitat en funció de la Consistència sense addició de Ferro al medi. Es mostren els valors de la producció de DAPG mitjana de tres repeticions..

Table B.1b. Significance table for the effect of growth media Complexity in function of Consistency without Iron addition. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Sense Ferro					
	Líquid			Sòlid		
	GA	KB	P>F	GA	KB	P>F
EPS317	54,8	-	0,0001	6,1	78,1	0,0001
EPS808	167,5	164,1	0,780	70,5	323,0	0,001
CHA0	-	3,0	0,001	-	-	-
JBR 1-70	321,9	394,4	0,172	179,4	158,7	0,628
PS-15	212,3	4,6	0,0001	-	58,0	0,0001
Q2-87	322,8	454,8	0,001	49,7	265,4	0,002

Taula B.2a. Taula de la significança de l'efecte de la Consistència en funció de l'addició de Ferro en el medi GA. Es mostren els valors de la producció de DAPG mitjana de tres repeticions.

Table B.2a. Significance table for the effect of growth media Consistency in function of Iron addition in GA growth media. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Medi GA					
	Amb Ferro			Sense Ferro		
	Sòlid	Líquid	P>F	Sòlid	Líquid	P>F
EPS317	6,5	43,8	0,014	6,1	54,8	0,001
EPS808	56,9	80,4	0,209	70,5	167,5	0,004
CHA0	-	-	-	-	-	-
JBR 1-70	189,4	162,3	0,138	179,4	321,9	0,03
PS-15	9,7	149,3	0,0001	-	212,3	0,0001
Q2-87	9,7	288,5	0,0001	49,7	322,8	0,001

Taula B.2b. Taula de la significança de l'efecte de la Consistència en funció de l'addició de Ferro en el medi KB. Es mostren els valors de la producció de DAPG mitjana de tres repeticions.

Table B.2b. Significance table for the effect of growth media Consistency in function of Iron addition in KB growth media. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Medi KB					
	Amb Ferro			Sense Ferro		
	Sòlid	Líquid	P>F	Sòlid	Líquid	P>F
EPS317	21,4	-	0,0001	78,1	-	0,0001
EPS808	172,0	180,2	0,781	323,0	164,1	0,004
CHA0	-	-	-	-	3,0	0,001
JBR 1-70	77,7	937,8	0,0001	158,7	394,4	0,001
PS-15	55,3	-	0,0001	58,0	4,6	0,0001
Q2-87	123,6	681,1	0,0001	265,4	454,8	0,0001

Taula B.3a. Taula de la significança de l'efecte de l'addició de Ferro en funció de la Consistència en el medi GA. Es mostren els valors de la producció de DAPG mitjana de tres repeticions.

Table B.3a. Significance table for the effect of Iron addition into growth media in function of Consistency in GA growth media. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Medi GA					
	Líquid			Sòlid		
	No ferro	Ferro	P>F	No ferro	Ferro	P>F
EPS317	54,8	43,8	0,226	6,1	6,5	0,87
EPS808	167,5	80,4	0,02	70,5	56,9	0,267
CHA0	-	-	-	-	-	-
JBR 1-70	321,9	162,3	0,001	179,4	189,4	0,689
PS-15	212,3	149,3	0,01	-	9,7	0,0001
Q2-87	322,8	288,5	0,031	49,7	9,7	0,005

Taula B.3b. Taula de la significança de l'efecte de l'addició de Ferro en funció de la Consistència en el medi KB. Es mostren els valors de la producció de DAPG mitjana de tres repeticions.

Table B.3b. Significance table for the effect of Iron addition into growth media in function of Consistency in KB growth media. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Medi KB					
	Líquid			Sòlid		
	No ferro	Ferro	P>F	No ferro	Ferro	P>F
EPS317	-	-	-	78,1	21,4	0,0001
EPS808	164,1	180,2	0,579	323,0	172,0	0,001
CHA0	3,0	-	0,001	-	-	-
JBR 1-70	394,4	937,8	0,001	158,7	77,7	0,003
PS-15	4,6	-	0,0001	58	55,3	0,7
Q2-87	454,8	681,1	0,002	265,4	123,6	0,0001

ANNEX C

Efecte de l'addició de glucosa en la producció de DAPG

Taula C.1a. Taula de la significança de l'efecte de la Complexitat en funció de la Consistència quan hi ha addició de Glucosa. Es mostren els valors de la producció de DAPG, mitjana de tres repeticions.

Table C.1a. Significance table of the effect of growth media Complexity in function of Consistency when Glucose is added. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Amb glucosa						
	Líquid			P>F	Sòlid		
	LB	21C	LB		21C	P>F	
EPS317	2,5	30,2	0,0001	2,7	-	0,0001	
EPS808	145,3	45,7	0,014	241,4	46,3	0,0001	
CHA0	-	2,5	0,0001	2,4	54,2	0,0001	
JBR 1-70	35,0	38,1	0,59	282,4	77,7	0,0001	
PS-15	31,3	18,3	0,027	1,4	45,8	0,0001	
Q2-87	7,8	13,5	0,142	48,7	122,8	0,0001	

Taula C.1b. Taula de la significança de l'efecte de la Complexitat, en funció de la Consistència quan no s'addiciona Glucosa al medi. Es mostren els valors de la producció de DAPG, mitjana de tres repeticions.

Table C.1b. Significance table of the effect of growth media Complexity in function of Consistency when no Glucose is added. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Sense glucosa						
	Líquid			P>F	Sòlid		
	LB	21C	LB		21C	P>F	
EPS317	47,6	-	0,0001	13,0	1,5	0,002	
EPS808	134,1	-	0,0001	33,2	11,0	0,0001	
CHA0	-	-	-	17,8	-	0,374	
JBR 1-70	150,2	-	0,0001	31,9	34,6	0,777	
PS-15	-	-	-	-	-	-	
Q2-87	0,4	-	0,374	11,6	52,7	0,0001	

Taula C.2a. Taula de la significança de l'efecte de la Consistència en funció de l'addició de Glucosa en el medi 21C. Es mostren els valors de la producció de DAPG, mitjana de tres repeticions.

Table C.2a. Significance table of the effect of growth media Consistency in function of Glucose addition in 21C growth media. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Medi 21C					
	Amb glucosa			Sense glucosa		
	Sòlid	Líquid	P>F	Sòlid	Líquid	P>F
EPS317	-	30,2	0,0001	1,5	-	0,001
EPS808	46,3	45,7	0,862	11,0	-	0,0001
CHA0	54,2	2,5	0,0001	-	-	-
JBR 1-70	77,7	38,1	0,001	34,6	-	0,0001
PS-15	45,8	18,3	0,002	-	-	-
Q2-87	122,8	13,5	0,0001	52,7	-	0,0001

Taula C.2b. Taula de la significança de l'efecte de la Consistència en funció de l'addició de Glucosa en el medi LB. Es mostren els valors de la producció de DAPG mitjana de tres repeticions.

Table C.2b. Significance table of the effect of growth media Consistency in function of Glucose addition in LB growth media. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Medi LB					
	Amb glucosa			Sense glucosa		
	Sòlid	Líquid	P>F	Sòlid	Líquid	P>F
EPS317	2,7	2,5	0,905	13,0	47,6	0,0001
EPS808	241,4	145,3	0,088	33,2	134,1	0,0001
CHA0	2,4	-	0,0001	17,8	-	0,374
JBR 1-70	282,4	35,0	0,0001	31,9	150,2	0,0001
PS-15	1,4	31,3	0,0001	-	-	-
Q2-87	48,7	7,8	0,003	11,6	0,4	0,009

Taula C.3a. Taula de la significança de l'efecte de l'addició de Glucosa en funció de la Consistència del medi en medi 21C. Es mostren els valors de la producció de DAPG mitjana de tres repeticions.

Table C.3a. Significance table of the effect of Glucose addition in function of the Consistency in 21C the growth media. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Medi 21C					
	Líquid			Sòlid		
	No glucosa	Glucosa	P>F	No glucosa	Glucosa	P>F
EPS317	-	30,2	0,0001	1,5	-	0,001
EPS808	-	45,7	0,0001	11,0	46,3	0,0001
CHA0	-	2,5	0,0001	-	54,2	0,0001
JBR 1-70	-	38,1	0,0001	34,6	77,7	0,009
PS-15	-	18,3	0,0001	-	45,8	0,0001
Q2-87	-	13,5	0,0001	52,7	122,8	0,0001

Taula C.3b. Taula de la significança de l'efecte de l'addició de Glucosa, en funció de la Consistència en medi LB. Es mostren els valors de la producció de DAPG mitjana de tres repeticions.

Table C.3b. Significance table of the effect of Glucose addition in function of the Consistency in LB the growth media. The values of DAPG production are the average of three repetitions.

Soca	Medi LB					
	Líquid			Sòlid		
	No glucosa	Glucosa	P>F	No glucosa	Glucosa	P>F
EPS317	47,6	2,5	0,0001	13,0	2,7	0,0001
EPS808	134,1	145,3	0,96	33,2	241,4	0,0001
CHA0	-	-	-	17,8	2,4	0,61
JBR 1-70	150,2	35,0	0,002	31,9	282,4	0,0001
PS-15	-	31,3	0,0001	-	1,4	0,0001
Q2-87	0,4	7,8	0,017	11,6	48,7	0,0001

ANNEX D

Taula D1. Pes fresc mitjà (g) de les arrels de pomera i de tomatera als dies 37, 52 i 72 després de la sembra a l'experiment A en funció de la soca aplicada. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre tractaments amb lletres iguals segons la prova de Duncan.

Table D1. Average fresh weigh (g) of roots of apple and tomato seedlings at days 37, 52 and 72 after sowing at trial A in function of applied strain. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) by Duncan's test.

Soca	Pomera			Tomatera		
	37 d	52 d	72 d	37 d	52 d	72 d
EPS 263	0,100 a	0,110 ab	0,148 ab	0,175 a	0,177 a	0,362 a
EPS 282	0,108 a	0,103 ab	0,175 b	0,184 a	0,215 ab	0,397 ab
EPS 288	0,088 a	0,124 ab	0,177 b	0,190 a	0,207 ab	0,278 a
EPS 317	0,098 a	0,109 ab	0,121 a	0,152 a	0,244 ab	0,397 ab
EPS 375	0,108 a	0,095 a	0,164 ab	0,139 a	0,240 ab	0,459 ab
EPS 808	0,080 a	0,136 b	0,169 ab	0,197 a	0,253 ab	0,384 ab
CHA0	0,083 a	0,169 c	0,188 b	0,155 a	0,218 ab	0,602 b
BL 915	0,080 a	0,119 ab	0,144 ab	0,136 a	0,288 b	0,449 ab
Q2-87	0,088 a	0,136 b	0,119 a	0,111 a	0,220 ab	0,378 ab
Pf 2-79	0,094 a	0,124 ab	0,138 ab	0,174 a	0,248 ab	0,451 ab
Control	0,100 a	0,113 ab	0,181 b	0,217 a	0,289 b	0,432 ab

Taula D2. Pes mitjà fresc (g) de les arrels de pomera i de tomatera als dies 37, 52 i 72 després de la sembra a l'experiment B en funció de la soca aplicada. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre tractaments amb lletres iguals segons la prova de Duncan.

Table D1. Average fresh weigh (g) of roots of apple and tomato seedlings at days 37, 52 and 72 after sowing at trial B in function of applied strain. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) by Duncan's test.

Soca	Pomera			Tomatera		
	37 d	52 d	72 d	37 d	52 d	72 d
EPS 263	0,098 a	0,139 ab	0,115 ab	0,143 ab	0,261 ab	0,238 abcd
EPS 282	0,107 a	0,142 ab	0,124 ab	0,128 a	0,250 ab	0,326 abcde
EPS 288	0,096 a	0,127 ab	0,131 ab	0,172 ab	0,255 ab	0,209 abc
EPS 317	0,100 a	0,118 a	0,102 a	0,227 ab	0,208 ab	0,268 abcde
EPS 375	0,107 a	0,136 ab	0,122 ab	0,167 ab	0,179 ab	0,160 a
EPS 808	0,119 a	0,125 ab	0,117 ab	0,201 ab	0,140 a	0,198 ab
CHA0	0,107 a	0,158 ab	0,121 ab	0,176 ab	0,311 b	0,349 bcde
BL 915	0,117 a	0,176 b	0,143 b	0,282 b	0,273 ab	0,390 de
Q2-87	0,088 a	0,146 ab	0,138 ab	0,218 ab	0,312 b	0,379 cde
Pf 2-79	0,101 a	0,152 ab	0,136 ab	0,205 ab	0,265 ab	0,280 abcde
Control	0,108 a	0,134 ab	0,110 ab	0,185 ab	0,274 ab	0,437 e

ANNEX E

Taula E.1. Població de bacteris viables Rif⁺ log[(ufc/g d'arrel)] a les arrels de pomera i tomatera als 52 dies de la sembra, en funció de la soca aplicada. No hi ha diferències significatives ($P=0,05$) entre tractaments amb lletres iguals segons la prova de Duncan.

Table E.1. Bacterial Rif⁺ root population log[(cfu/g root)] on apple and tomato seedlings 52 days after sowing, in function of applied strain. Treatments with the same letter have no significant differences ($P=0,05$) by Duncan's test.

Soca	Pomera		Tomatera	
	Experiment A	Experiment B	Experiment A	Experiment B
EPS 263	3,97 ab	3,92 bc	4,21 abc	4,66 bcd
EPS 282	4,62 b	4,68 cd	4,53 bc	4,67 bcd
EPS 288	3,94 ab	3,68 ab	4,20 abc	3,88 bc
EPS 317	4,05 ab	3,01 a	4,46 bc	4,26 bcd
EPS 375	4,83 b	4,96 d	4,32 abc	4,24 bcd
EPS 808	4,80 b	5,27 d	5,11 c	4,74 cd
CHA0	4,62 b	4,80 cd	4,71 bc	3,79 b
BL 915	4,58 b	4,03 bc	4,58 bc	4,46 bcd
Q2-87	4,63 b	5,49 d	5,28 c	5,17 d
Pf 2-79	4,65 b	3,76 ab	3,87 ab	4,02 bc
Control	2,88 a	3,33 ab	3,24 a	2,82 a