



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



Universitat de Lleida
Registre General

31 OCT. 2000

5720

S:

Bases per a la formulació de l'agent de biocontrol *Candida sake* CPA-1



Memòria presentada per:

M. Isabel Abadías i Seró

per optar al grau de Doctora

Directora: Dra. Inmaculada Viñas i Almenar

Co-Director: Dr. Josep Usall i Rodié

Lleida, Desembre del 2000

Capítol 6

Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation

M. Abadias, N. Teixidó, J. Usall, I. Viñas and N. Magan

Canadian Journal of Microbiology, en premsa

ABSTRACT

The biocontrol agent *Candida sake* was cultured on either a unmodified molasses-based medium (water activity, a_w 0.996) or on water stressed media stress produced by the addition of glycerol, glucose, NaCl, sorbitol or proline to 0.98 and 0.96 a_w for 24, 48 and 72 h in order to study their impact on subsequent cell viability, and on concentrations of endogenous sugars (trehalose and glucose) and polyols (glycerol, erythritol, arabitol and mannitol). The viability of cells of different ages cultured on these media was evaluated on NYDA medium with freely available water (a_w 0.995), and on medium modified with polyethylene glycol to a_w 0.95.

Regardless of solute used, cells grown on molasses-based medium at a_w 0.98 were equal to or more viable than those obtained from media with water freely available. The amino acid proline stimulated growth at 10% concentration. In contrast, water stress induced by the addition of NaCl, glucose or sorbitol at 0.96 a_w caused a significant reduction in viable counts. Older cultures were more resistant to water stress.

Glycerol and arabitol were the main solutes accumulated by *C. sake* cells in response to lowered a_w . Intracellular concentration of these polyols depended more on the solute used to adjust the a_w than on the a_w itself. *C. sake* was more resistant to water stress with higher intracellular concentration of glycerol and erythritol.

Key words: compatible solutes, polyols, sugars, improved viability, formulation

INTRODUCTION

At present, there is a need to find alternative non-chemical means of controlling post-harvest diseases of perishable crops. Microbial biocontrol agents have emerged as the most effective alternatives with several products on the market for post-harvest use (Janisiewicz 1988, 1990; Smilanick and Denis-Arrue 1992; Wilson and Pusey 1985; Wilson and Wisniewski 1989). However, for fungal biocontrol agents to be applied in the field just prior to harvest it is essential that the inoculum has the necessary ecological fitness to withstand the natural fluctuations in humidity and temperature. It has been suggested that preharvest application for postharvest control of pome fruit diseases would be advantageous, as less fruit manipulation would be involved, time periods between harvest and cold storage would be reduced and also avoid additional contamination by pathogenic fungi from drenching solutions (Teixidó et al. 1999). Recent reports indicated that a strain of *Candida sake* (CPA-1) is an effective

biocontrol agent of the major fungal pathogens of apples and pears (Usall 1995; Viñas et al. 1996, 1998). However, for commercial use of this yeast it is essential that production is economical and that the formulation enhance viability and biocontrol efficacy. Thus, attempts should be made to formulate microbial inocula with improved water stress tolerance.

Water activity (a_w) is a thermodynamic parameter which describes the water availability for microbial activity (Scott 1957). The water activity of the medium is equivalent to osmotic pressure in the case of liquid cultivations (Gervais et al. 1992). They could be related by the equation:

$$\Psi = \frac{R T \ln(a_w)}{\bar{V}_w}$$

where Ψ is the water potential (Pa), R is the gas constant ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$), T is the temperature (K) and \bar{V}_w is the partial molar volume of water ($\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$).

Low molecular mass compounds are accumulated intracellularly in most organisms when exposed to osmotic stress to equilibrate the cytoplasmic a_w with the a_w of the surrounding environment (Csonka 1989; Van Eck et al. 1993; Yancey et al. 1982). The main solutes accumulated in yeasts exposed to osmotic stress are polyols (or sugar alcohols) such as glycerol, D-arabitol, D-mannitol and *meso*-erythritol (Spencer and Spencer 1978) and are compatible with metabolic activity (known as compatible solutes, Brown 1978). These solutes enable the organism to grow under water stress (Brown 1978). Intracellular accumulation of trehalose can enhance the resistance of cellular components against adverse conditions such as extreme temperatures, dehydration or osmotic stress (Van Laere 1989). Previous studies with filamentous biocontrol agents of insects and plant pathogens have demonstrated that growth on different C-sources, which also modified the medium water availability (water activity, a_w), resulted in a significant accumulation of glycerol and erythritol into mycelium and fungal propagules, improving germination and/or germ tube extension (Frey and Magan 1998; Hallsworth and Magan 1995, 1996; Pascual et al. 1996). Ecophysiological studies with *C. sake* showed that when cells grew on a rich nutrient yeast-based medium with reduced a_w , their viability over a range of relative humidities improved (Teixidó et al. 1998b), and they retained biocontrol efficacy against *Penicillium expansum* (Teixidó et al. 1998a). However, for commercial production of the biocontrol a cheap by-product from industry must be used with maintaining its quality. Recently, we found (Abadias et al. 2000) that growth on cheap molasses-based media modified with different C-sources, changed growth rate, endogenous water

potential and polyol and sugar content. However, the effects of culture age and endogenous reserves on viability under different environmental regimes, particularly water stress, have not been examined.

The objective of this study was to investigate the effect of modifying the water activity of a commercial molasses medium with different solutes and culture ages on: the number of viable *C. sake* cells obtained in those media and on its water stress resistance and the intracellular accumulation of sugars (glucose and trehalose) and polyols (glycerol, erythritol, arabitol and mannitol) in cells of *C. sake*. Moreover, the relationship between culture age, endogenous compounds and tolerance to water stress were determined.

MATERIALS AND METHODS

Yeast isolate

The isolate used in this study was *Candida sake* (strain CPA-1) from UdL-IRTA (Lleida, Spain). It is deposited in Colección Española de Cultivos Tipo, CECT-10817 (Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, Burjasot, Valencia, Spain). Stock cultures were stored at 5°C on NYDA slants (NYDA: nutrient broth, 8 g/L; yeast extract, 5 g/L; dextrose, 10 g/L; agar, 15 g/L) and had been subcultured on NYDA plates.

Evaluation of viability of *C. sake* in unstressed and stressed media

C. sake was initially grown in unmodified (cane molasses 40 g/L and urea 1.2 g/L; pH=6.3-6.6; a_w =0.996), and modified liquid molasses media. The a_w of this and all media was determined with a Novasina Humidat IC II (Novasina AG, Zurich, Switzerland). The modified molasses media were prepared at 0.98 and 0.96 a_w by the addition of glycerol (Gly98, Gly96), glucose (Glu98, Glu96), NaCl (Na98, Na96), sorbitol (Sor98, Sor96) and proline (Pro98, Pro96) as described in Table 1. For each treatment, 50 mL of medium in a 250 mL conical flask was inoculated with 10^4 CFU/mL of *C. sake* cells and cultured on a rotatory shaker (150 rpm) at 25°C. Samples were taken after 24, 48 and 72 h incubation to determine viability of *C. sake* cells and to quantify polyol and sugar concentrations in the cells. There were four replicates of each treatment.

Viability of *C. sake* cell treatments after 24, 48 and 72 h was assessed by spread-plating on unstressed (0.995 a_w) and water stressed NYDA (0.95 a_w) modified with polyethylene glycol (PEG 200/300; 1.25 M and 0.5 M respectively, Teixidó et al.

1998b). Serial dilutions were done in a solution of 0.05 M potassium phosphate buffer (PB, pH 6.5) and PEG200 of the same a_w as the growth medium. Plates of the same a_w were sealed in polyethylene bags to prevent water loss and incubated at 25°C. Colonies were counted after 48 h incubation for unstressed, and 96 h for stressed media. The experiment was repeated twice.

Table 1. Composition of modified media (g of solute to be added to 100 mL of water). Final volume was measured and then corresponding cane molasses and urea was added to obtain a final concentration of 40 g molasses per liter and 1.2 g urea per liter.

Solute	Water activity	
	0.98	0.96
Glycerol	9.20	18.40
Glucose	18.73	39.85
NaCl	3.55	7.01
Sorbitol	19.82	30.75
Proline	10.00	20.00

Extraction and detection of polyols and sugars

Another 25 mL subsample of each treatment was placed in a 30 mL sterile Universal bottle and centrifuged immediately for 15 min at 250 g (MSE Centaur 2). The yeast pellet was resuspended in HPLC grade water and centrifuged again to remove any residual liquid medium.

A known fresh weight of *C. sake* cells (10-25 mg) was mixed with 1 mL HPLC grade water in a 2 mL Eppendorf tube and sonicated with a 4 mm sonicator probe for 2 min at an amplitude of 26 μ m (Soniprep 150, Fisons). After immersion in a boiling water bath for 5 min, the samples were left to cool and 0.67 mL of acetonitrile was added to each sample to obtain the same ratio of acetonitrile:water as the mobile phase (40:60). The Eppendorf tubes were centrifuged for 10 min at 1150 g and the supernatant was filtered through a 0.2 μ m filter into an HPLC vial sealed with plastic septa.

Solutes were analyzed and quantified by HPLC using a Hamilton HC-75 Ca²⁺ column (ANACHEM Ltd, Luton, UK) and a Gilson RI Detector, specifically for sugar/polyol separation. The mobile phase used was a mixture of 40:60 degassed acetonitrile:water. The peak areas were integrated and compared with calibration curves constructed with standards of 100-800 ppm of each solute analyzed. Polyols, trehalose and glucose content were calculated as mg/g fresh weight (f.w) of *C. sake* cells (Hallsworth and

Magan 1995; Pascual et al. 2000; Teixidó et al. 1998b, 1998c). In all cases four replicates of each treatment were analyzed.

Statistical analysis

Viable counts in unstressed and water stress media and polyol/sugar concentration were analyzed by a General Linear Model (GLM) with SAS software (SAS Institute, version 6.12, Cary, NC, USA). Statistical significance was judged at the level $P < 0.05$. Significant one, two and three-way interactions were studied. When the analysis was statistically significant, Duncan's Multiple Range Test for separation of means was used. In order to compare viable counts of cells grown in unstressed NYDA medium with those obtained in water stressed NYDA, a_w 0.95, a T-test was conducted. Pearson correlation coefficients between each endogenous reserve analysed and viability on water-stressed media were calculated using PROC CORR procedure with SAS software. Pearson coefficients were also calculated for culture age and viability on water-stressed media.

RESULTS

Both statistical analyses of viable counts in unstressed and water stressed NYDA showed that there were significant differences ($P < 0.05$) due to all single factors studied (a_w , solute and culture age) and two and three-way interactions (data not shown).

Effect of a_w and solutes on viability and water stress resistance of *C. sake* cells

a) Viability under unstressed conditions. Viable count of *C. sake* cells obtained in the unmodified molasses medium was high ($> 2.0 \times 10^8$ CFU/mL) even after 24 h. Generally, viable counts of *C. sake* cells obtained from the 0.96 a_w molasses medium treatments were significantly lower than those from the 0.98 a_w treatments regardless of solute used. The cells from the Gly98, Glu96 and Na96 treatments had a longer lag phase than the others examined.

Of the 24 h age treatments (Fig. 1A), cells of *C. sake* from the unmodified molasses had the highest number of viable cells (0.996 a_w , 2.5×10^8 CFU/mL). For each solute tested, viable counts of the cells obtained from the 0.96 a_w treatments were significantly lower than from 0.98, except for glycerol. After 48 h incubation (Fig. 1B), cells from the Pro98 and Sor98 treatments gave the highest viable cell counts (6.5×10^8 and 5.8×10^8 CFU/mL, respectively), when plated on medium with freely available water, which were significantly higher than that of the unmodified molasses

control. Viable counts of cells from the Glu98 and Na98 treatments were similar to cells from the unmodified molasses medium. Cells obtained from Na96 were the least viable of all treatments tested (1.8×10^8 CFU/mL). The viability of 72 h age cells was $>4.0 \times 10^8$ CFU/mL for cells from the 0.98 a_w , and $>3.0 \times 10^8$ CFU/mL from the 0.96 a_w treatments (Fig. 1C).

b) Viability of *C. sake* cells under stress conditions. In order to examine tolerance of the yeast cells to low a_w , cells of different ages from each treatment were plated onto 0.95 a_w NYDA medium modified with PEG200/300. Viable counts of cells aged 24 h (Fig. 1A), on 0.95 a_w NYDA regardless of solute treatment were always $<1.0 \times 10^8$ CFU/mL, and there were significant differences in viable counts of cells grown on non-stressed NYDA and those on the water-stressed medium. Viable counts in the water-stressed NYDA (0.95 a_w) of all cell treatments aged 48 h (Fig. 1B) were $>1.0 \times 10^8$ CFU/mL except for the Sor98, Gly96 and Na96 treatments.

Cells grown in unmodified molasses medium, Gly98 and Na98 had the ability to grow equally well in the water stress medium as in that with freely available water. With the exception of the Sor96 and Pro96 treatments, viable counts of 72 h old cells were $>2.0 \times 10^8$ CFU/mL. There were no statistical differences between viable cell counts in NYDA, and NYDA 0.95 a_w , except for Sor98, Sor96 and Pro96 treatments.

Effect of water activity and solutes in sugar and sugar alcohol accumulation

The highest concentration of total sugars (trehalose + glucose) were present in the yeast cells obtained from the molasses medium modified with glucose (Glu98 and Glu96) after 72 h incubation, and with Na96 cells after 48 h (Table 2). After 48 h incubation, there were no differences between the total polyols (glycerol + erythritol + arabitol + mannitol) and the total sugar-polyols accumulated in *C. sake* cells. The highest concentrations of polyols were found in cells grown in medium modified with glycerol after 72 h.

Glucose accumulated in all treatments in cells of all three ages and varied from 1.71 to 5.71 mg/g f.w (Fig. 2). Twenty-four hour old cells from the Gly98 treatment accumulated more glucose than the control. However, for 48 h old cells there were no differences. The highest amount of trehalose (4.23 mg/g f.w) accumulated in 48 h old cells in the Na96 treatment. In the Pro98 treatment, trehalose accumulated in cells of all ages but at a low concentration (<1.0 mg/g f.w). However, in the unmodified molasses medium, and in the glucose-modified treatments, it was only detected in 72 h old cells.



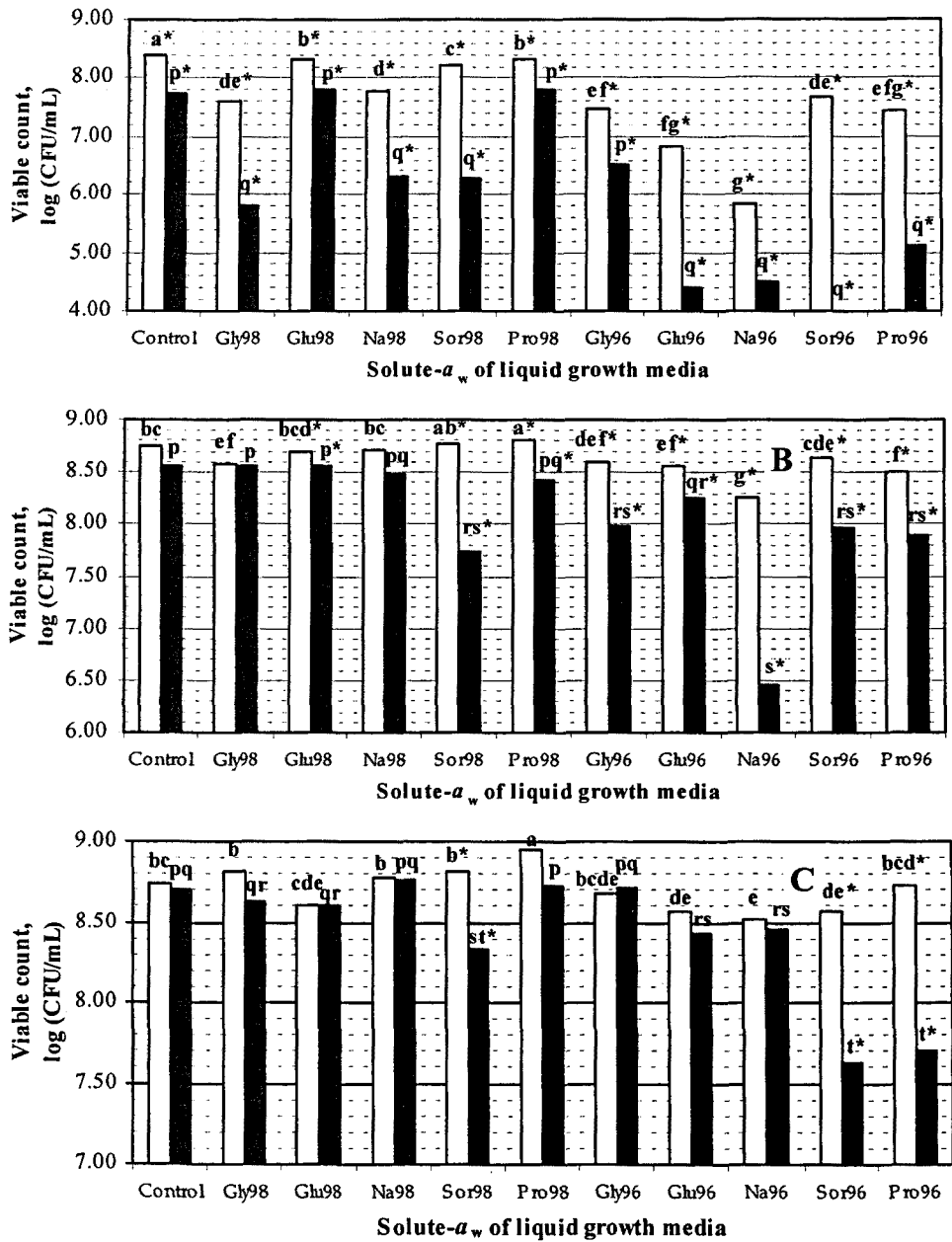


Fig. 1. Viability of *C. sake* cells of each treatment on unstressed (0.995 a_w , □) and stressed (0.95 a_w , ■) NYDA media after incubation at 25°C for: (A) 24 h, (B) 48 h and (C) 72 h. The means for each medium are separated according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$). An * indicates that for each single treatment, viability in stressed and unstressed media was significantly different ($P < 0.05$) according to a T-Test.

Table 2. Mean total intracellular quantities of the sugars (trehalose and glucose) and polyols (glycerol, erythritol, arabitol and mannitol) present in *C. sake* cells grown on a molasses unmodified media (Control, 0.996 a_w) and modified with glycerol, glucose, NaCl, proline and sorbitol to 0.98 and 0.96 a_w incubated for 24, 48 and 72 h at 25°C. Within columns, different letters indicate significant differences between means according to Duncan's Multiple Range Test ($P<0.05$).

Growth medium	mg intracellular solute/g f.w <i>C. sake</i>											
	Sugars			Polyols			Total					
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Control	2.95 ^{bc}	2.40 ^c	3.80 ^{bc}	6.64 ^b	10.64 ^a	7.18 ^c	9.59 ^b	13.04 ^a	10.98 ^d			
Gly98	5.71 ^a	3.97 ^b	2.90 ^{bc}	11.89 ^a	14.83 ^a	20.73 ^b	17.60 ^a	18.80 ^a	23.63 ^{ab}			
Gly96	*	1.71 ^c	2.41 ^{bc}	*	12.99 ^a	25.83 ^a	*	14.71 ^a	28.24 ^a			
Glu98	1.82 ^c	2.38 ^c	6.01 ^a	6.31 ^b	17.11 ^a	15.62 ^c	8.13 ^b	19.49 ^a	21.63 ^{bc}			
Glu96	*	1.94 ^c	6.30 ^a	*	17.00 ^a	15.05 ^c	*	18.94 ^a	21.35 ^{bc}			
Na98	3.35 ^{bc}	2.38 ^c	3.32 ^{bc}	12.10 ^a	16.24 ^a	13.63 ^c	15.45 ^a	18.62 ^a	16.95 ^c			
Na96	*	6.17 ^a	2.79 ^{bc}	*	12.19 ^a	7.85 ^c	*	18.36 ^a	10.64 ^d			
Pro98	2.68 ^{bc}	2.76 ^{bc}	4.66 ^{ab}	6.87 ^b	13.18 ^a	17.00 ^{bc}	9.55 ^b	15.94 ^a	21.66 ^{bc}			
Pro96	4.36 ^{ab}	3.12 ^{bc}	3.54 ^{bc}	12.80 ^a	15.68 ^a	13.05 ^{cd}	17.16 ^a	18.80 ^a	16.59 ^c			
Sor98	3.36 ^{bc}	2.29 ^c	3.04 ^{bc}	8.51 ^{ab}	6.69 ^a	7.90 ^c	11.87 ^b	8.98 ^a	10.94 ^d			
Sor96	2.21 ^c	1.86 ^c	1.85 ^c	5.35 ^b	14.50 ^a	8.83 ^{de}	7.56 ^b	16.36 ^a	10.68 ^d			

* : There were not enough cells for intracellular solutes measurement due to poor growth.

The accumulation of individual polyols (glycerol, erythritol, arabitol and mannitol) in *C. sake* cell treatments aged 24, 48 and 72 h is shown in Fig. 3. Mannitol was the predominant polyol present (>2.8 mg/g f.w) in 24 h old cells. However, in 48 h old cells the glycerol and arabitol content increased markedly and were the most abundant polyols. There were no differences in mannitol concentration among different treatments. Erythritol was only detected in the control and Glu96 treatments in 48 h old cells and in the control, Gly98, Na98 and Sor96 treatments in 72 h cells. Erythritol intracellular concentration was always <2.07 mg/g f.w.

The major compounds accumulated in 24 h old cells from the unmodified molasses medium, were mannitol (5.07 mg/g f.w) and glucose (2.95 mg/g f.w). In 48 h old cells erythritol and arabitol at 2.07 and 2.30 mg/g f.w, respectively, were also detected. Modifying the a_w with different solutes significantly changed the accumulation patterns of some polyols and sugars. For example, glycerol increased significantly specially in cells from the glycerol modified media (>10.9 mg/g f.w in 48 h and >16.8 mg/g f.w in 72 h old cells). In these cells, small quantities of arabitol were detected. The arabitol content of both glucose amended media was significantly higher than that of the unmodified molasses medium. NaCl treatments differed from control in trehalose, and erythritol accumulation in the 48 h old treatment at 0.96 a_w . Cells 48 and 72 h old, grown on proline-amended media had higher concentration of arabitol than the unmodified molasses medium, except the Pro98 at 48 h. Cells grown in Sor98 treatment accumulated higher amount of glycerol than the unmodified molasses medium.

Cells viability in water-stressed media increased with the increase of intracellular concentrations of glycerol (Pearson coefficient 0.38, $P=0.0001$), erythritol (Pearson coefficient=0.36, $P=0.0001$), total polyols (Pearson coefficient 0.44, $P=0.0001$), and total sugars and polyols (Pearson coefficient 0.43, $P=0.0001$). Moreover, viability in water-stressed media increased with culture age (Pearson coefficient= 0.64, $P<0.0001$).

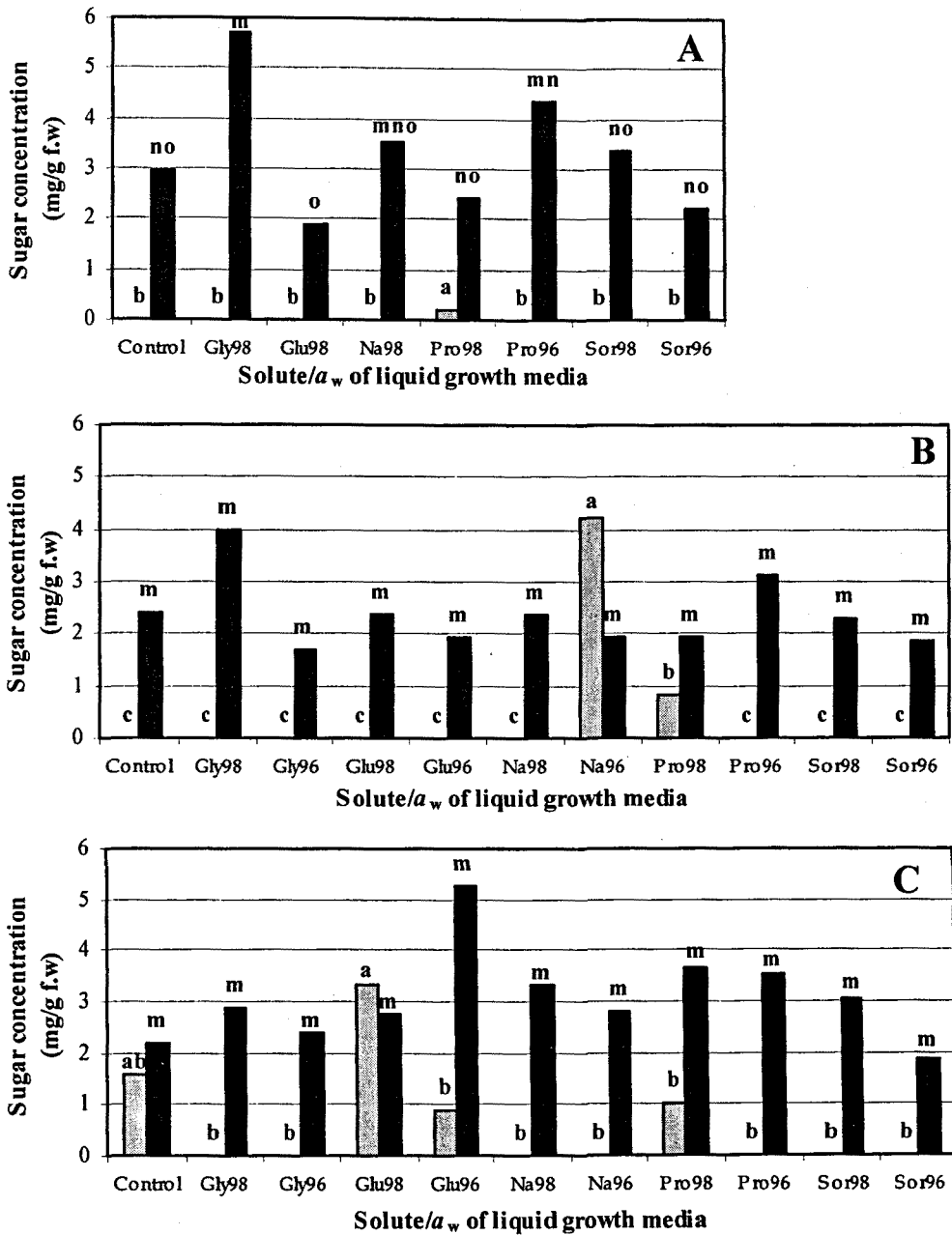


Fig. 2. Accumulation of intracellular sugars: trehalose (■) and glucose (■) in *C. sake* cells grown in liquid molasses-based media unmodified (0.996 a_w) and modified with glycerol (Gly), glucose (Glu), NaCl (Na), sorbitol (Sor) and proline (Pro) to achieve 0.98 and 0.96 a_w , after: (A) 24 h, (B) 48 h and (C) 72 h incubation at 25°C. Results are means of four replicates per treatment. The separation of means are based on Duncan's Multiple Range Test for each endogenous reserve. Columns with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). Note: At 24 h incubation there were not enough cells for intracellular solutes measurement due to poor growth.

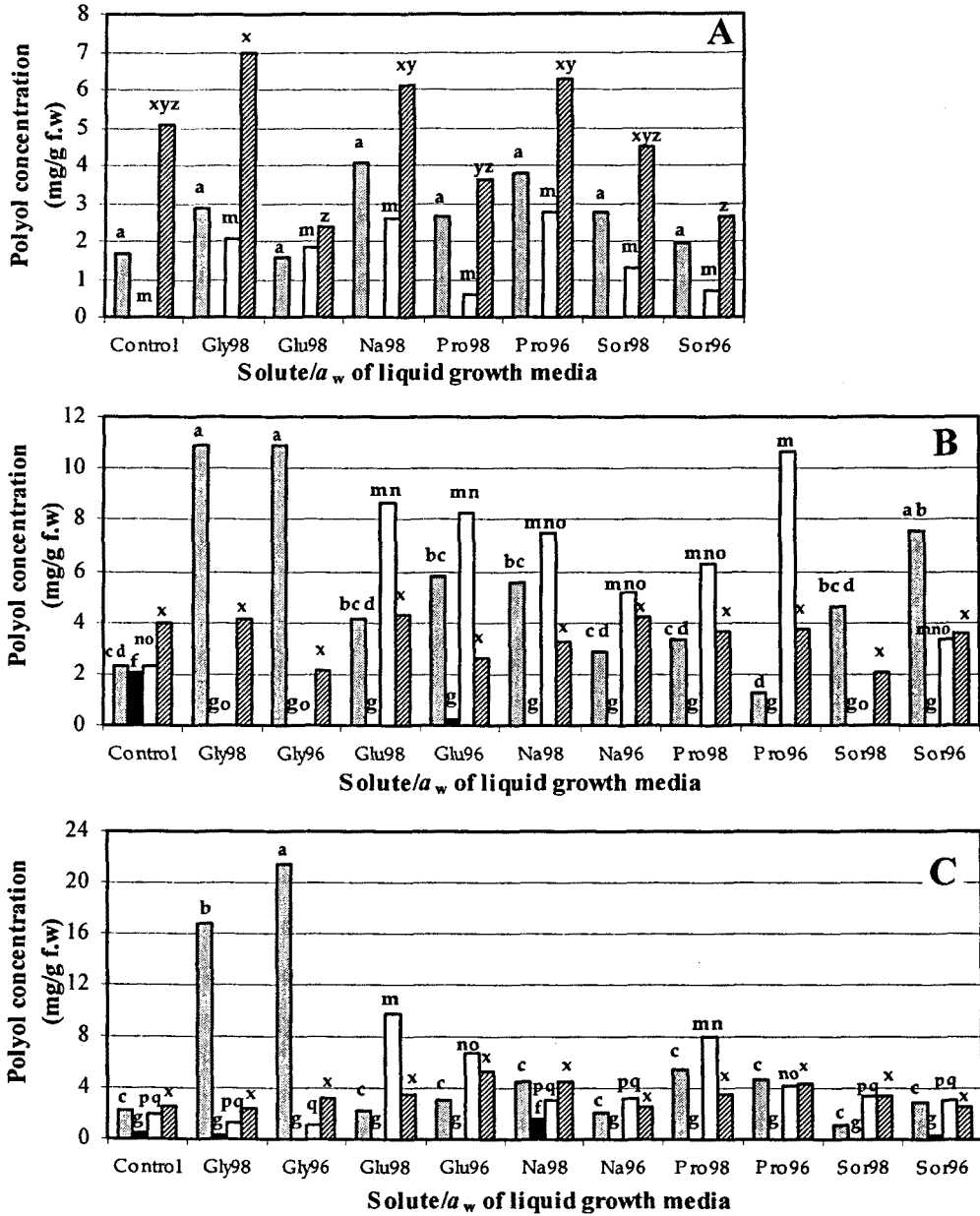


Fig. 3. Accumulation of intracellular polyols: glycerol (▣), erythritol (■), arbutol (□) and mannitol (▤) in *C. sake* cells grown in liquid molasses-based media unmodified (0.996 a_w) and modified with glycerol (Gly), glucose (Glu), NaCl (Na), sorbitol (Sor) and proline (Pro) to achieve 0.98 and 0.96 a_w , after: (A) 24 h, (B) 48 h, and (C) 72 h incubation at 25°C. Results are means of four replicates per treatment. The separations of means are based on Duncan's Multiple Range Test for each endogenous reserve. Columns with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). Note: At 24 h incubations there were not enough cells for intracellular solutes measurement in some treatments, due to poor growth.

DISCUSSION

This study has shown that manipulation of the *C. sake* growth by changing the a_w of a molasses medium with different solutes, and the time of cell harvest, significantly affected intracellular accumulation of solutes without significantly changing cells viability.

The viable count of *C. sake* cells obtained from the unmodified molasses medium (0.996 a_w) was high ($>2.0 \times 10^8$ CFU/mL) comparing to previous studies where the viable count of 48 h old cells grown in NYDB medium was $5.0-6.0 \times 10^7$ CFU/mL (Teixidó et al. 1998b). Our studies have shown that viable counts of cells grown at reduced water activity (0.98 a_w) media were equal to or higher than cells grown on unmodified media, with freely available water (0.996 a_w). Endogenous contents of glycerol and erythritol increased resistance. Viability of *C. sake* cells plated on the water stress medium (NYDA a_w 0.95) increased with age of the culture. Mackenzie et al. (1988) have pointed out that the generation of resistant cells develops in the second half of the exponential phase. However, they found a close relationship between resistance and accumulation of trehalose inside the cells, with no relationship with either glycerol or erythritol content. Less information is available on *C. sake* cells. Teixidó et al. (1998b) found that *C. sake* cells which accumulated more mannitol showed higher resistance to water stress. Previous studies found that *C. sake* grown on NYDB either diluted (50%) or modified with glucose or glycerol to 0.96 a_w , was more resistant to water stress (0.95 a_w) than cells which were grown on unmodified NYDB (Teixidó et al. 1998b). Modified conidia of three filamentous entomopathogenic fungi, containing increased quantities of glycerol and erythritol, germinated faster and over a wider range of humidities than unmodified control conidia. Conidia with elevated trehalose concentrations remained viable during a 17-week storage period for longer than those from control treatments (Hallsworth and Magan 1994).

The concentration of sugars and polyols present in different ages of *C. sake* cells grown from unmodified and modified molasses media were higher than those obtained previously by Teixidó et al. (1998b) in NYDB. Glycerol and arabitol were the main solutes accumulated by *C. sake* cells grown in the molasses medium in response to lowered a_w . Intracellular concentration of these polyols varied more depending on the solute used to adjust the a_w , than due to the a_w itself. The intracellular concentrations of glucose and mannitol in 48 h old cells did not change when the a_w of the growth medium was reduced, suggesting that these solutes may not be osmotically responsive in this yeast. Previous ecophysiological studies of *C. sake* had demonstrated that glycerol and arabitol were also the main solutes accumulated when *C. sake* cells were

grown in glycerol, glucose and NaCl amended NYDB (Teixidó et al. 1998b, 1998c). In yeasts, polyols are the main compatible solutes found, glycerol being the predominant, and arabitol the minor one (Edgley and Brown 1978). Glycerol was the main polyol accumulated intracellularly in *Zygosaccharomyces rouxii* when the a_w was adjusted with NaCl to 0.96 whereas glycerol and arabitol were accumulated when polyethylene glycol (PEG) 400 was used (Van Zyl and Prior 1990). In yeasts such as *Pichia sorbitophila*, *Candida cacoï*, *Candida magnoliae* and *Zygosaccharomyces bisporus* glycerol, arabitol and mannitol were the solutes whose concentrations were significantly increased during osmotic stress (Van Eck et al. 1993). Generally, levels of arabitol and glycerol were higher in 48 h old cells, when they had reached the stationary phase, and then were maintained or decreased slightly. However, in glycerol treatments, glycerol content increased markedly with culture age. Mannitol, which was the main solute during the exponential phase of growth, became less important in more advanced stages of growth. In saline media, the glycerol content of *Debaryomyces hansenii* was found to increase during the lag and early exponential phases and decreased again during the late exponential phase of growth. The level of arabitol increased slightly but progressively during exponential growth and reached its highest value in early stationary phase (Adler and Gustafsson 1980).

When the a_w of the molasses media was modified with glucose, arabitol was the main polyol found and, surprisingly, the glucose intracellular concentration did not increase. Glycerol was the main solute accumulated when cells grew in both glycerol-amended molasses media. Interestingly, in 48 h old cells no arabitol accumulation was observed in glycerol treatments, and only in small amounts in 72 h cells. This suggests that glycerol was directly taken up from the media. Uptake and accumulation of external stress solutes represent an alternative option to osmoregulation, in particular when the external osmoticum has the characteristics of a compatible solute (Blomberg and Adler 1992). Teixidó et al. (1998b) found that *C. sake* cells accumulated more trehalose when the a_w of the growth medium was modified with trehalose, and glycerol when cells which were grown in media containing glycerol.

There was no significant change in the pattern of polyols when the a_w of molasses medium was modified with the ionic solute NaCl. Previous studies on *C. sake* growth showed that glycerol intracellular concentration in *C. sake* cells grown on NaCl modified NYDB was significantly higher (Teixidó et al. 1998c). Glycerol was also the major osmoresponsive organic solute in exponentially growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Z. rouxii* and *D. hansenii* grown in media containing NaCl (Reed et al. 1987). The highest amount of trehalose was found after 48 h incubation in the Na96 treatment. However, *C. sake* cells grown in this medium showed the most sensitivity to water stress. Miyazaki et al. (1996) studied trehalose accumulation several strains and

found that a strain of *C. sake* did not to accumulate any trehalose when grew in YMPG medium (Yeast Extract Malt Extract Peptone Glucose medium). Trehalose concentrations greater than 10% have been found to be critical for stress resistance to freezing and freeze-drying of the yeast strain *S. cerevisiae* (Van Dijck et al. 1995).

The findings reported in the present study demonstrate that it is possible to manipulate physiologically growth of *C. sake* using cheap growth media based on molasses to produce a high concentration of water stress tolerant cells. This is particularly relevant to the development of formulations of this biocontrol agent with good viability, shelf life and improved or conserved biocontrol efficacy.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Government (MEC, Ministerio de Educación y Cultura and CICYT, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología grant AL199-0652-C02-01) for their financial support.

REFERENCES

- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., and Magan, N. 2000. Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugar and sugar alcohols in cells of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1. *J. Appl. Microbiol.*, in press.
- Adler, L., and Gustafsson, L. 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* **124**: 123-130.
- Blomberg, A., and Adler, L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *In Advances in microbial physiology*. Vol. 33. *Edited by* A.H. Rose. Academic Press Ltd., New York. pp. 145-212.
- Brown, A.D. 1978. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **17**:181-242.
- Csonka, L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147.
- Edgley, M., and Brown, A.D. 1978. Response of xerotolerant and non-tolerant yeasts to water stress, *J. Gen. Microbiol.* **104**: 343-345.
- Frey, S., and Magan, N. 1998. Improving quality and quantity of *Ulocladium atrum* for enhanced biological control of *Botrytis cinerea*. *Proc. British Crop Protection Conferences-Pests and diseases* **4D**: 305-306.

- Gervais, P., Marechal, P.A., and Molin, P. 1992. Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1435-1439.
- Hallsworth, J.E., and Magan, N. 1994. Improved biological control by changing polyols/trehalose in conidia of entomopathogens. *Proc. British Crop Protection Conferences-Pests and Diseases* **8D**: 1091-1096.
- Hallsworth, J.E., and Magan, N. 1995. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology-UK* **141**: 1109-1115.
- Hallsworth, J.E., and Magan, N. 1996. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2435-2442.
- Janisiewicz, W.J. 1988. Biological control of disease fruits. *In Biocontrol of plant diseases. Vol. 2. Edited by K.G. Mukerji and K.L. Garg, CRC Press, Boca Raton, FL.* pp.153-165.
- Janisiewicz, W. J. 1990. Biological control of postharvest fruit diseases. *In Handbook of Applied Mycology. Vol 1. Soils and Plants. Edited by D.K. Arora, Marcel Dekker, New York.* pp. 301-326.
- Mackenzie, K.F., Singh, K.K., and Brown, A.D. 1988. Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1661-1666.
- Miyazaki, J., Miyagawa, K., and Sugiyama, Y. 1996. Trehalose accumulation by a basidiomycotinous yeast, *Filobasidium floriforme*. *J. Ferment. Bioeng.* **81**: 315-319.
- Pascual, S., Magan, N., and Melgarejo, P. 1996. Improved biocontrol of peach twig blight by physiological manipulation of *Epicoccum nigrum*. *Proc. British Crop Protection Conference-Pests and Diseases* **4D**, 411-412.
- Pascual, S., Melgarejo, P., and Magan, N. 2000. Accumulation of compatible solutes in *Penicillium frequentans* grown at reduced water activity and biocontrol *Monilinia laxa*. *Biocontrol Sci. Techn.* **10**: 71-80.
- Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R., and Gadd, G.M. 1987. Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2119-2123.
- Scott, W.J. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv. Food Res.* **7**: 83-127.
- Smilanick, J.L., and Denis-Arrue, R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Dis.* **70**: 106-108.
- Spencer, J.F.T., and Spencer, D.M. 1978. Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts. *In Economic Microbiology. Vol. 2. Edited by A.H. Rose, Academic Press, London.* pp. 393-425.

- Teixidó, N., Usall, J., and Viñas, I. 1999. Efficacy of preharvest and *postharvest Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mould on apples during cold storage. *Int. J. Food Microbiol.* **40**: 9-16.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., and Magan, N. 1998a. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology* **88**: 960-964.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., and Magan, N. 1998b. Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content. *Mycol. Res.* **102**: 1409-1417.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Sanchis, V., and Magan, N. 1998c. Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 to water temperature and pH stress. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 192-200.
- Usall, J. 1995. Control biològic de *Penicillium expansum* en postcollita de fruita de llavor. Ph.D. thesis, Universitat de Lleida, Lleida, Spain.
- Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P., and Thevelein, J.M. 1995. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and non-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 109-115.
- Van Eck, J.H., Prior, B.A., and Brandt, E.V. 1993. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1047-1054.
- Van Laere, A. 1989. Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiol. Rev.* **63**: 201-210.
- Van Zyl, P.J., and Prior, B.A. 1990. Water relations of polyol accumulation by *Zygosaccharomyces rouxii* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 12-17.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., and Ochoa de Eribe, J. 1996. Successful biological control of the major postharvest diseases of apples and pears with a new strain of *Candida sake*. *Proc. British Crop Protection Conferences-Pests and Diseases* **6C**: 603-608.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., and Sanchis, V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* **40**: 9-16.
- Wilson, C.L., and Pusey, P.L. 1985. Potential for biological control of postharvest diseases. *Plant Dis.* **69**: 375-378.
- Wilson, C.L., and Wisniewski, M.E. 1989. Biological control of postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **27**: 425-441.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.d., and Somero, G.N. 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.

Capítol 7

Liquid formulation of the postharvest biological control agent *Candida sake* in isotonic solutions

M. Abadias, J. Usall, N. Teixidó and I. Viñas

Enviat a: *Applied and Environmental Microbiology*

ABSTRACT

The viability of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 stored as a liquid formulation was evaluated by studying the effect of growth, preservation medium and temperature. *C. sake* was grown in an unmodified water activity (a_w) molasses medium and in the same with a_w modified to 0.98 with the addition of glucose, glycerol, proline, NaCl or sorbitol. The cells were preserved with isotonic solutions of several substances such as arabitol, erythritol, glycerol, glycine, mannitol, proline, sorbitol and trehalose. Also, the efficacy of liquid formulations stored for different periods was tested against *Penicillium expansum* on Golden Delicious apples.

Both culture and preservation media had a great influence on *C. sake* viability. The best growth media were the unmodified one and the one modified to 0.98 a_w with the addition of glycerol or sorbitol. Temperature influenced the viability of *C. sake* cells in the liquid preservation media. At 25°C, the viable cells decreased rapidly and after 10 days of storage the viability of all treatments was <21%. For all growth media, the best preservation medium was the isotonic solution prepared with trehalose. After 7 months of storage at 4°C, the cells which grew in the sorbitol modified medium preserved with the isotonic solution of trehalose maintained their viability and efficacy against *P. expansum* on Golden Delicious apples.

INTRODUCTION

Biological control of postharvest diseases of fruits has advanced greatly during the past decade. Concerns regarding human health and environmental risks associated with chemical residues in foods have been the main driving force of the search for new and safer control methods (Droby et al., 1998). Several promising biological and physical control strategies that include the use of antagonistic microorganisms, natural fungicides, and induced resistance have been evaluated for the control of postharvest diseases (Droby et al., 1993; Janisiewicz and Roitman, 1988; Smilanick and Denis-Arrue, 1992). Among the proposed alternatives, the use of naturally occurring, antagonistic microorganisms has been the most extensively studied. Substantial progress has been achieved in taking this technology from the laboratory to practical application (Hofstein and Fridlender, 1994; Whitesides et al., 1994). Some of this technology has been patented and commercial products such as Aspire (Ecogen Corp., Langhorne, PA), Bio-Save 100, 110 and 1000 (Ecoscience Inc., Worcester, MA) and YieldPlus (Anchor Bio-Technologies, Cape Town, South Africa) have been registered for commercial use against postharvest decay of citrus and pome fruits.

Recent reports have indicated that a strain of *Candida sake* CPA-1 is an effective biocontrol agent of the major fungal pathogens of pome fruits at a small, semi-commercial (Teixidó et al., 1998a; Usall et al., 2000a; Viñas et al., 1998) and commercial (Usall et al., 2000b) scale. The major obstacle to the commercialization of biocontrol products is the development of a shelf-stable formulated product that retains biocontrol activity similar to that of the fresh cells (Janisiewicz and Jeffers, 1997). Drying of the product and maintenance in a dry environment or suspension in oil are approaches to formulating microbial agents so that they can be handled using the normal channels of distribution and storage (Rhodes, 1993). Some formulated products for biocontrol of postharvest diseases are available. Aspire (recently renamed Decco I-182), which is a wettable powder formulation of the yeast *Candida oleophila* I-182, can be stored for at least 400 days under refrigeration and/or for 20 days at room temperature. Bio-Save 100, 110 and 1000 are frozen cell concentrated pellets of the bacterium *Pseudomonas syringae*, which should be stored under freezer conditions. Previous studies demonstrated that although the viability of *C. sake* cells after dehydration using a freeze-drier was 85%, the efficacy of the dried product against *Penicillium expansum* on apples was lower than that obtained with fresh cells and its viability decreased greatly even during storage at 4°C (M. Abadias, N. Teixidó, J. Usall, A. Benabarre, and I. Viñas, submitted for publication). Consequently, other methods of *C. sake* formulation should be studied. Liquid formulation of the product could be an alternative to freeze-drying.

There is little published research concerning the impact of growth culture on the viability of a formulated biocontrol agent. Previous studies have demonstrated that growth of *C. sake* in a commercial molasses-based medium or in the same medium with lowered a_w (0.98) showed high viable counts, and increased the intracellular concentration of arabitol and glycerol and the water stress resistance of the cells (Abadias et al., 2000a). Moreover, the intracellular water potential of cells decreased with lowered a_w of the culture medium (Abadias et al., 2000b). When cells are subjected to a hydric shift, the first response is an instantaneous output (hyperosmotic shock) or input (hypoosmotic shock) of water across the cell membrane, which is accompanied by a concomitant decrease or increase in the cytoplasmic volume respectively (Koch, 1984; Stock et al., 1977). If cells are subjected to very severe hyperosmotic stresses, the passive exit of water could lead to their death (Gervais and Maréchal, 1994), following alterations of cell membranes. Also, in some hypotonic habitats, water molecules attempt to move into microbial cells, which could expand and rupture the cells (Atlas and Bartha, 1998). The effect of formulating a biocontrol agent by preserving the cells in liquid solutions that have the same water potential as the cells (isotonic solutions) has not previously been studied.

The objectives of this work were to study: (a) the viability of *C. sake* cells grown in different a_w -modified molasses media and preserved in isotonic solutions of several solutes in order to maintain the osmotic equilibrium between the cells and the external medium; (b) the effect of storage temperature on the viability of isotonic solutions of *C. sake*; and (c) the efficacy of these stored liquid formulations against *P. expansum* on Golden Delicious apples.

MATERIAL AND METHODS

Cultures

The strain CPA-1 of the yeast *Candida sake* (Colección Española de Cultivos Tipo, Spain, CECT-10817) obtained from UdL-IRTA, Catalonia, Spain, was used in this study. *C. sake* was isolated from the apple surface and has previously been demonstrated to have antagonistic activity against *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* and *Rhizopus nigricans* in pome fruits (Viñas et al., 1998). Stock cultures were stored at 4°C on nutrient yeast dextrose agar slants (NYDA: nutrient broth, 8 g l⁻¹; yeast extract, 5 g l⁻¹; dextrose, 10 g l⁻¹; agar, 15 g l⁻¹) and were subcultured on NYDA plates at 25°C.

Composition of the growth media and isotonic preservation solutions

In order to evaluate the effect of growth and preservation media in *C. sake* storage stability, cells were grown in unmodified and a_w -modified liquid molasses based media. Unmodified a_w media was used as a control (cane molasses 40 g l⁻¹, urea 1.2 g l⁻¹; 0.996 a_w).

Liquid a_w -modified molasses media were prepared at 0.98 a_w with the addition of glycerol (Gly, 92.0 g l⁻¹), glucose (Glu, 187.3 g l⁻¹), NaCl (Na, 35.5 g l⁻¹), proline (Pro, 100 g l⁻¹) or sorbitol (Sor, 198.2 g l⁻¹) (Abadias et al., 2000b).

Low water potential solutions used as preservation media were prepared with arabitol, erythritol, glycerol, glycine, mannitol, proline, sorbitol, and trehalose. These solutes are accumulated by some microorganisms during stress periods (Blomberg and Adler, 1992; Magan, 1997; Spencer and Spencer, 1978). They were added to de-ionised water at the concentration to obtain the same (isotonic) water potential as the cells (Table 1). The water potential of the cells, ψ_c , was measured by thermocouple psychrometry with a HR-33T Dew Point Microvoltmeter coupled to a C-52 chamber (Wescor Inc, Logan, Utah, USA). The water potential of the liquid preservation media varied with the growth medium and was adjusted to -0.31, -1.04, -2.30, -2.42, -2.86 and -2.97 MPa for

control, glucose, glycerol, proline, NaCl and sorbitol modified media respectively (Abadias et al., 2000b).

Table 1. Concentration of solutes (M) for liquid formulation media, depending on the solute used to modify the a_w of growth media to 0.98. Control is the unmodified molasses based media.

Solute in preservation medium	Solute in growth medium					
	Control	Glucose	Glycerol	Proline	NaCl	Sorbitol
Arabitol	0.17	0.48	1.04	1.07	1.20	1.25
Erythritol	0.17	0.46	1.07	1.09	1.26	1.30
Glycerol	0.10	0.40	0.95	0.98	1.13	1.16
Glycine	0.17	0.42	0.91	0.96	1.08	1.20
Mannitol	0.13	0.39	0.93	0.97	1.12	1.13
Proline	0.17	0.42	0.91	0.96	1.09	1.22
Sorbitol	0.14	0.43	0.93	0.94	1.07	1.09
Trehalose	0.14	0.36	0.81	0.84	0.93	0.96

Viability of *C. sake* in isotonic liquid formulations

In the first experiment, 200 ml of the six studied media in 500 ml conical flasks were inoculated with 10^4 CFU ml⁻¹ of *C. sake*, and were held at 25°C on a shaker at 150 rpm for 48 h. Thereafter, 10 ml subsamples of each treatment were distributed in 15 ml sterile Universal bottles and centrifuged immediately for 15 min at $250 \times g$ in a MSE Centaur 2 centrifuge. Yeast cells were resuspended with 10 ml of sterile preservation solution prepared as described above. For each combination of culture medium and preservation solution, the initial concentration of viable cells (CFU ml⁻¹) was determined by the agar plate method. The samples were stored at 25°C in an incubator. After 10 days of storage, the number of viable cells was determined. The percentage of viability was calculated by comparing results obtained after the storage period with the initial concentration. The results obtained in this test were used to determine the best combination of culture medium and isotonic solution to carry out future experiments.

In the second experiment, 500 ml of unmodified molasses medium and glycerol and sorbitol modified media were prepared in 1000 ml conical flasks, and were inoculated and incubated as described above. One-hundred milliliter subsamples of each medium were placed in 250 ml centrifuge tubes and centrifuged at $8315 \times g$ for 10 min at 10°C

in an Avanti™ J-25 centrifuge (Beckman, Palo Alto, CA, USA). The growth medium was decanted and the yeast pellet was resuspended with 80 ml of the isotonic solution tested as a preservation medium. The initial concentration of viable cells was determined. Thereafter, 10 ml subsamples of each treatment were distributed in eight 15 ml Universal bottles. Four of them were stored at 4°C and the rest at 25°C. Furthermore, in this experiment the effect of the isotonic solutions was compared with both water and 0.05 M potassium phosphate buffer (PB, pH 6.5). Non-destructive sampling was done at different periods of time according to the storage temperature. The experiment was repeated twice.

Efficacy of liquid formulations

The antagonistic activity of stored liquid formulations of *C. sake* against *P. expansum* was studied in apples. The efficacy of all liquid formulations was tested after 4 months of storage at 4°C. In addition, isotonic trehalose liquid formulations were also tested after 7 months of storage. Formulations of *C. sake* cells were adjusted with PB to 10^7 CFU ml⁻¹. The efficacy was compared with fresh cells, which were obtained by growing them in 100-ml conical flasks containing 50 ml of the unmodified media (control) or modified to 0.98 a_w with glycerol or sorbitol. After 48 h incubation at 25°C, the cells were centrifuged at $8,315 \times g$ for 10 min and resuspended in 50 ml of PB. The cell concentration was determined with a haemocytometer and then also adjusted to 10^7 CFU ml⁻¹ with PB.

Golden Delicious apples were wounded with a nail by making an injury 2 mm in diameter and 2 mm deep at the stem (top) and calyx (bottom). A 25 µl suspension of the appropriate concentration of *C. sake* suspensions from each liquid formulation tested and fresh cells was applied to the wounds. The fruits were left to dry, and then the wounds were inoculated with 20 µl of an aqueous suspension of *P. expansum* (10^4 conidia ml⁻¹) which had been isolated from decayed apples and had shown to be highly pathogenic to apples. Five apples constituted a single replicate and each treatment was repeated three times. The treated apples were incubated at 20°C and 85% relative humidity for 7 days, after which the percentage of infected wounds (incidence) and the lesion diameters (severity) caused by *P. expansum* were measured.

Statistical analysis of results

The General Linear Model procedure (GLM) of SAS software (SAS Institute, version 6.12, Cary, NC, USA) was performed on the percentage of viable cells. In order to improve the homogeneity of variances, the percentages were transformed to their square root. Data normality of the transformed and non-transformed values was

studied. The effect of growth, preservation media and their interaction were studied as variables. Statistical significance was judged at the level $P < 0.05$. When the analysis was statistically significant, the Least Significance Difference Test (LSD) was used for means separation.

A GLM procedure was also performed on disease incidence and severity data. The incidence of blue mold data was transformed with the square root of the arcsine of the proportion of infected fruits. This transformation was used to improve the homogeneity of variances. Statistical significance was also judged at $P < 0.05$ and the LSD Test was used for means separation.

RESULTS

Viability of *C. sake* in isotonic liquid formulations

(i) After 10 days of storage at 25°C. The viability of *C. sake* cells decreases greatly after 10 days of storage at 25°C. Isotonic solutions of trehalose were the best preservation solutions found among those tested, with viabilities of 25, 30 and 21% when *C. sake* cells had been grown in the unmodified molasses medium and the sorbitol and glycerol modified ones respectively (Table 2). The viability of isotonic solutions of arabitol, erythritol, glycine and sorbitol were <9% after 10 days of storage at 25°C.

Statistical analyses showed that data transformation was necessary in order to improve the homogeneity of variance. There were significant differences ($P < 0.05$) in *C. sake* viability according to the growth and preservation media tested. However, there was no interaction between growth and preservation media. Viabilities of *C. sake* cells grown in the unmodified- a_w molasses medium (control) followed by that modified with glycerol, sorbitol and proline were higher than those of cells grown in the glucose and NaCl modified ones (Table 3). Isotonic solutions of trehalose, glycerol and proline had the highest protective effect among those tested (Table 4). Consequently, the unmodified molasses medium and those modified to 0.98 a_w with glycerol or sorbitol were selected as growth media and isotonic solutions of trehalose, glycerol and proline as preservation media to carry out experiments of long-term storage.

Table 2. Viability (%) of *C. sake* cells grown in unmodified molasses media (control) and modified to 0.98 a_w with glucose, glycerol, NaCl, proline and sorbitol after liquid preservation at 25°C for 10 days. The water potential of the preservation solution was adjusted to the same water potential of the cell with arabitol, erythritol, glycerol, glycine, mannitol, proline, sorbitol and trehalose. The values are averages of four determinations, and the value in brackets shows standard errors.

Solute in preservation medium	Solute in growth medium					
	Control	Glucose	Glycerol	Proline	NaCl	Sorbitol
Arabitol	8.3 (0.7)	3.0 (0.3)	8.4 (0.9)	6.5 (0.9)	2.8 (1.6)	5.4 (0.4)
Erythritol	6.5 (1.0)	3.3 (0.5)	6.5 (1.1)	5.0 (0.6)	2.4 (1.0)	6.4 (0.7)
Glycerol	12.0 (1.1)	3.8 (0.4)	10.4 (0.7)	7.8 (0.4)	10.2 (5.6)	6.9 (0.2)
Glycine	7.7 (0.9)	2.9 (0.4)	8.5 (0.4)	7.5 (1.2)	2.5 (1.3)	5.0 (0.3)
Mannitol	10.3 (0.8)	3.4 (0.4)	7.6 (0.9)	5.7 (0.8)	2.3 (0.5)	6.0 (0.3)
Proline	10.7 (0.9)	2.9 (0.6)	8.7 (0.5)	5.6 (0.7)	1.9 (0.5)	12.3 (0.6)
Sorbitol	8.7 (1.0)	2.7 (0.6)	8.5 (1.1)	6.6 (0.8)	2.4 (0.3)	5.9 (0.7)
Trehalose	24.7 (3.2)	10.9 (1.4)	21.4 (1.8)	15.5 (1.7)	6.5 (3.7)	29.9 (8.9)

Table 3. Statistical results of the LSD test for viability results according to the variable growth media. Means with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Solute in growth medium	Mean	T grouping
Control	10.5	a
Glycerol	9.6	ab
Sorbitol	8.2	bc
Proline	7.2	c
Glucose	3.8	d
NaCl	2.7	e

Table 4. Statistical results of the LSD test for viability results according to the variable preservation media. Means with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Solute in preservation medium	Mean	T grouping
Trehalose	15.6	a
Glycerol	7.7	b
Proline	6.3	bc
Mannitol	5.5	cd
Sorbitol	5.4	cd
Arabitol	5.2	cd
Glycine	5.1	cd
Erythritol	4.7	d

(ii) **After storage at 25°C and 4°C.** Temperature greatly influenced *C. sake* survival. More cells remained viable at 4°C than at 25°C. After 30 days of storage at 25°C (Fig. 1) there were log reductions of >1.2 whereas at 4°C (Fig. 2) they were <0.4 .

In all tested solutions, the number of viable cells decreased rapidly during the first 10 days of storage at 25°C (Fig. 1), and cells grown in sorbitol-modified media and preserved with the isotonic trehalose solution again obtained the highest viability after 10 days of storage (25%). The viability of all treatments after 30 days of storage was $<7\%$.

At 4°C, regardless of the growth media used, isotonic trehalose solutions proved to give the cells more protective effect and their viability was therefore evaluated over 7 months. The other treatments were rejected after 4 months (Fig. 2).

When the cells were grown in the unmodified molasses medium, PB and trehalose were the best protective solutions tested for 30-day storage (Fig. 2A). The viability of *C. sake* cells preserved with isotonic trehalose solution decreased progressively and was 30%, 21% and 9% after 90, 120 and 210 days of storage respectively. When the cells were preserved with glycerol solution, their viability decreased rapidly from 30 to 90 days (80% to 3% viability), and then stabilized and after 120 days of storage at 4°C they reached similar viable counts to those preserved with water and PB ($<10^7$ CFU ml⁻¹).

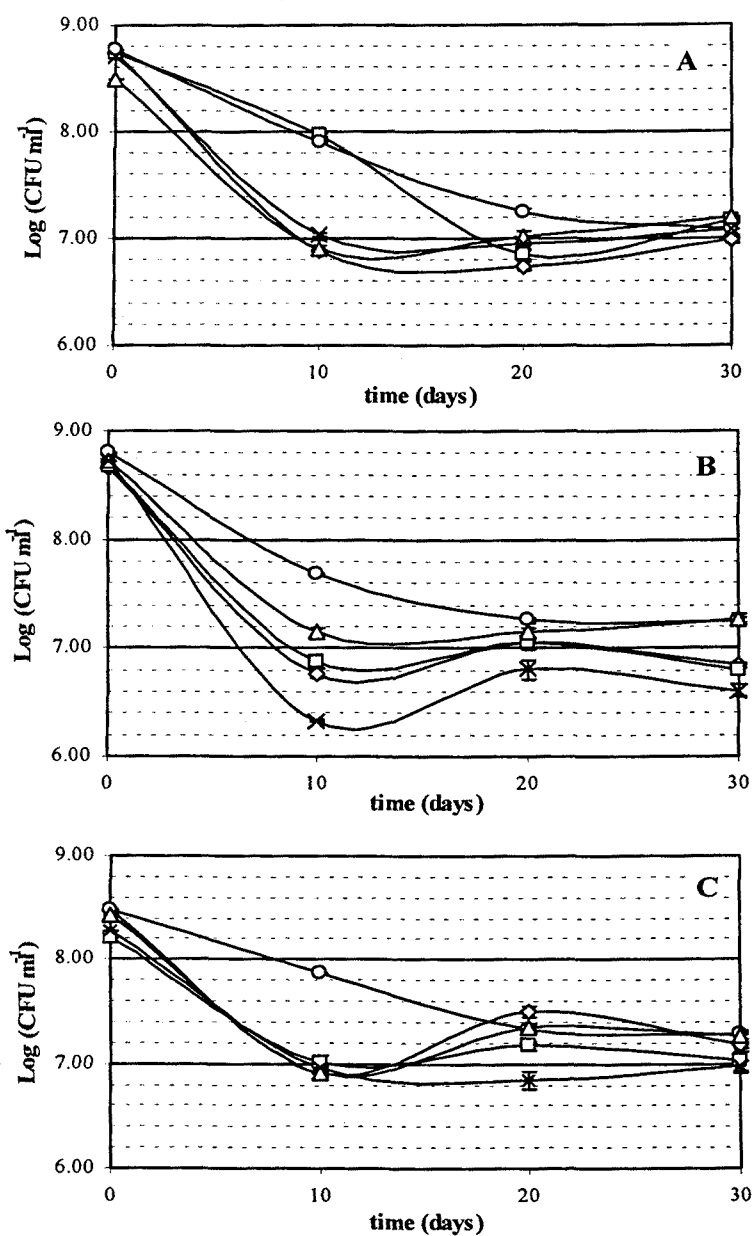


FIG. 1. Viable counts of liquid formulations of *C. sake* stored at 25°C. (A) Cells grown in the unmodified a_w molasses medium (control), (B) cells grown in the molasses medium modified to 0.98 a_w with the addition of glycerol, and (C) cells grown in the molasses medium modified to 0.98 a_w with the addition of sorbitol. The cells were centrifuged and preserved with (◊) water; (◻) potassium phosphate buffer, PB; (○) isotonic solution of trehalose; (×) isotonic solution of proline; and (△) isotonic solution of glycerol. Vertical bars indicate the standard error of means.

Trehalose, glycerol and proline were the best isotonic solutions of cells grown in the glycerol-modified medium for the first 30 days of storage, while water was the worst (Fig. 2B). From 30 days of storage on, the differences between trehalose treatment and the rest were more marked. The number of viable cells preserved with trehalose remained almost constant throughout the storage period and after 90 and 120 days storage at 4°C their viability was 56 and 46% respectively. After 210 days, 10% of cells remained viable. The viability of cells stored with the other preservation media dropped more than 1.5 log units after 90 days of storage.

When the biocontrol agent *C. sake* was grown in the sorbitol modified medium and stored at 4°C (Fig. 2C), there was an increase in viable cells during the first 30 days when they were stored with trehalose, proline, and PB. Afterwards, proline and PB treatments showed a constant decrease, whereas the number of viable cells in the trehalose treatment remained constant at about 100% during the 210 days of the storage period. Viable cell counts of *C. sake* preserved with water, PB or glycerol were $<10^7$ CFU ml⁻¹ after 120 days storage at 4°C.

Efficacy of liquid formulations stored at 4°C

After 120 days of storage, the incidence of decay for the untreated control was 83%, with a 1.2 cm lesion diameter. In contrast, fresh cells grown in the different media reduced the incidence of decay by more than 88% (Fig. 3).

All liquid formulations of cells grown in the unmodified molasses media, except PB, significantly reduced the incidence of decay compared to untreated apples. Cells preserved in water and isotonic trehalose solution performed as well as fresh cells, with <20% infected wounds (Fig. 3A).

Eighty-six percent of fruits treated with cells grown in the glycerol-modified medium and preserved in the isotonic proline solution rotted and did not show statistical differences from untreated fruits (Fig. 3B). Liquid formulations prepared with glycerol had the same incidence and severity of decay as fresh cells ($P<0.05$). The efficacy of the PB suspension of *C. sake* was not tested because it was contaminated.

The percentage of infected wounds of apples treated with *C. sake* cells grown in the sorbitol-modified medium and preserved in isotonic proline suspension was not significantly different from that of untreated fruits (Fig. 3C). All other treatments performed as well as fresh cells, with rot incidences of <23% and lesion diameter reductions of >86%.

In the unmodified molasses medium and in the medium modified with sorbitol to 0.98 a_w , isotonic trehalose *C. sake* formulations stored at 4°C for 7 months performed as well as fresh cells, with incidences of decay of <10% (Fig. 4).

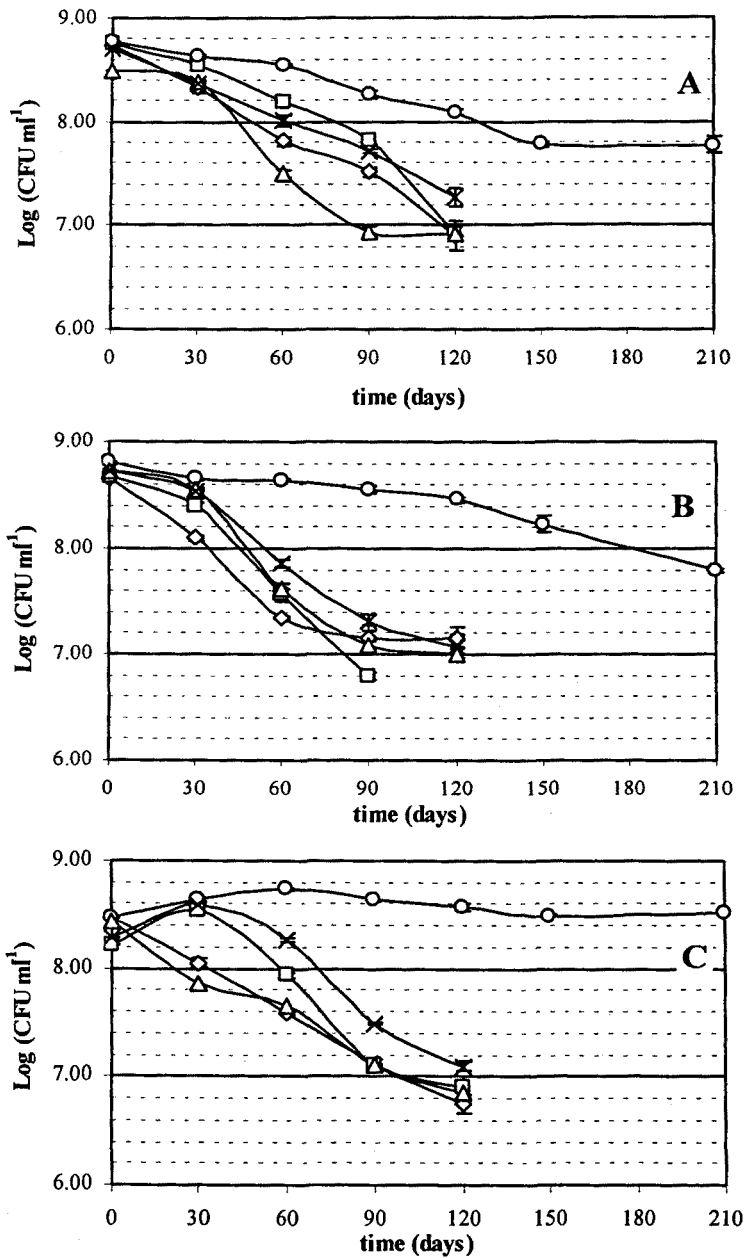


FIG. 2. Viable counts of liquid formulations of *C. sake* stored at 4°C. (A) Cells grown in the unmodified a_w molasses medium (control), (B) cells grown in the molasses medium modified to 0.98 a_w with the addition of glycerol, and (C) cells grown in the molasses medium modified to 0.98 a_w with the addition of sorbitol. The cells were centrifuged and preserved with: (◇) water; (□) potassium phosphate buffer, PB; (○) isotonic solution of trehalose; (×) isotonic solution of proline and (△) isotonic solution of glycerol. Vertical bars indicate the standard error of means.

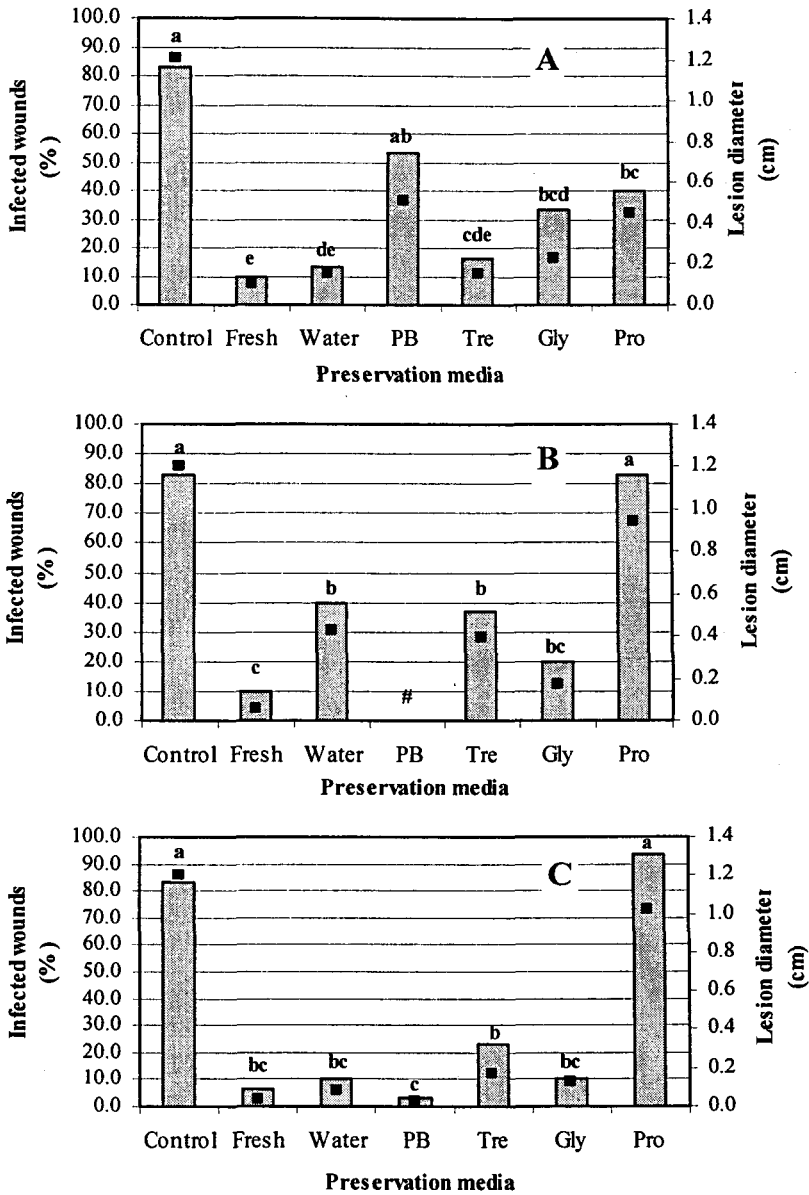


FIG. 3. Efficacy of liquid formulations of *C. sake* stored for 4 months at 4°C against *P. expansum* on Golden Delicious apples, compared with no treatment and with fresh cells. Fruits were wounded and inoculated with fresh or formulated cells at 10^7 CFU ml⁻¹, and *P. expansum* at 10^4 conidia ml⁻¹. Fruits were stored at 20°C for 7 days. (A) Cells grown in the unmodified a_w molasses medium (control), cells grown in the molasses medium modified to 0.98 a_w with the addition of glycerol (B) and sorbitol (C). PB: cells preserved in potassium phosphate buffer, cells preserved in isotonic solutions of trehalose (Tre), glycerol (Gly) and proline (Pro). Bars represent the percentage of infected wounds and points the lesion diameter. For each growth media, different letters indicate that there were significant differences ($P < 0.05$) between treatments according to an LSD Test. (#) This treatment was not evaluated because it was contaminated.

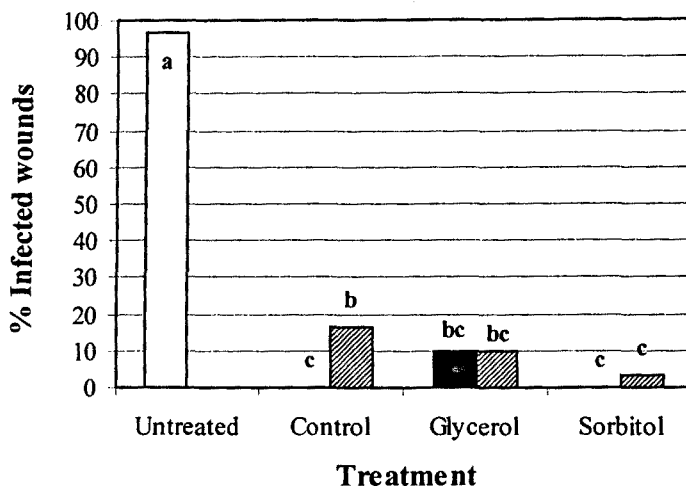


FIG. 4. Efficacy of liquid formulations of *C. sake* stored for 7 months at 4°C against *P. expansum* on Golden Delicious apples. Fruits were wounded and inoculated with fresh or formulated cells at 10^7 CFU ml⁻¹, and *P. expansum* at 10^4 conidia ml⁻¹. Fruits were stored at 20°C for 7 days. Control: unmodified molasses medium, Glycerol: molasses medium modified to 0.98 a_w with the addition of glycerol and Sorbitol: molasses medium modified to 0.98 a_w with the addition of sorbitol. (□): Untreated, (■): fresh cells and (▨): isotonic trehalose liquid formulations. Different letters indicate that there were significant differences ($P < 0.05$) between treatments according to a LSD Test.

DISCUSSION

This study has demonstrated that culture and preservation media and also storage temperature have a strong influence on the viability of *C. sake* in liquid formulations. It has shown that storage of liquid formulations at 25°C is not recommended because cell viability decreases rapidly in few days. In addition, it has shown that some of the liquid formulations stored at 4°C performed as well as fresh cells in controlling blue mold rot in apples.

According to the results obtained in the first experiment at 25°C, the growth medium could improve the resistance of *C. sake* cells to storage conditions. Interestingly, for all isotonic solutions, the viability of *C. sake* cells grown in the unmodified molasses medium was the highest. When the a_w of growth medium was modified using glucose and NaCl, cell survival was lower than when it was modified with sorbitol, glycerol or proline. Among the isotonic solutions tested, those of trehalose, glycerol and proline were found to give the highest viability for *C. sake* cells. It is noteworthy that the increase of the solute concentration in the preservation media did not necessary

increase *C. sake* viability, and similar concentrations of the solute in the preservation media gave different *C. sake* viability rates for different growth media.

In the experiment at 4°C, it was demonstrated that the idea of preserving *C. sake* cells with isotonic solutions that maintain the water equilibrium of the cell with its environment did not work properly for the solutes tested, except for trehalose, as the viability achieved with isotonic solutions of glycerol and proline was in general similar to that obtained with water or a phosphate buffer. The experiment also showed that there was little difference among the three growth media selected for the 4°C experiment, as the viability of cells preserved in water, phosphate buffer and isotonic solutions of glycerol and proline was similar for all the growth media. For all three media, isotonic solutions of trehalose were the best protective medium found among those tested. Cells grown in the sorbitol-modified medium and preserved with isotonic trehalose solutions remained stable for 7 months at 4°C. A liquid formulation of chlamydospores of *Phytophthora palmivora*, DeVine™, is not very stable and has only 6 weeks of shelf life when the product is refrigerated (Daigle and Connick, 1990).

The presence of trehalose in liquid formulations appeared to help to preserve cell viability during storage. It was observed that in the three media used in the experiment at 4°C, cell viability increased with increased concentrations of trehalose. High levels of trehalose in yeast cells have been associated with increased osmotolerance, thermotolerance, and ethanol tolerance (Van Laere, 1989). Gadd et al. (1987) pointed out that there is a strong correlation between intracellular trehalose concentration and the ability of yeast cells to survive long-term frozen storage. In recent years evidence has been accumulated that trehalose may protect cell viability during drying by replacing the water around polar residues in enzymes and other essential proteins, thus maintaining their integrity in the absence of water (Crowe et al. 1984; Leslie et al. 1994). However, there are no studies on the role played by external addition of this sugar in protecting yeast cells in liquid formulations. Teixidó et al. (1998b) found that when *C. sake* was grown in an a_w modified media with the addition of trehalose, the intracellular level of trehalose increased. It is possible that *C. sake* could have a trehalose-specific carrier in the cells. Similarly, in *Saccharomyces cerevisiae* cells, external addition of trehalose can replace endogenous synthesis because there appears to be a trehalose-specific carrier (Salek and Arnold, 1995). Trehalose is accumulated in the cytosol of yeasts (Keller et al., 1982) and could have a profound influence on the a_w of the cytosol, slowing down the metabolism and thereby promoting the transition to a resting state of the cells. Thus, trehalose might act as a general inhibitor of metabolic activities to prevent function and preserve the structure of the cells in the stationary state (Wiemken, 1990). This inhibition of metabolic activities could probably be enhanced at low storage temperatures.

Blue mold of apples was controlled effectively by fresh cells of *C. sake* grown in the different molasses-based media. Some isotonic liquid formulations of *C. sake* stored at 4°C for 4 months were as effective as the fresh cells. The efficacy of isotonic trehalose formulations stored at 4°C for 7 months was the same as that obtained by fresh cells. Isotonic proline solutions did not control *P. expansum* rot on apples when the cells were grown in glycerol and sorbitol media. The percentages of infected wounds increased with increased proline concentrations in the preservation medium. It is likely that proline stimulated *P. expansum* growth. Previous studies showed that, at concentrations of 1 mM, L-proline and L-asparagine strongly stimulated conidial germination of *P. expansum*, but had little effect on radial growth (Janisiewicz et al., 1992). In laboratory conditions, Janisiewicz and Jeffers (1997) found that Bio-Save® 11 WP performed as well as fresh cells in controlling *P. expansum* Link and *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. diseases on apples. In the same study, Bio-Save® 10 WP significantly reduced the incidence of disease, but less effectively than the fresh cells.

We have found a liquid formulation of the biocontrol agent *C. sake* with retained viability and efficacy and composed of safe materials. Our results indicate that trehalose could play an important role in the preservation of *C. sake* viability in liquid formulations. Thus, the effect of the trehalose concentration should be investigated for the different growth media in order to optimize its concentration, because the addition of high concentrations of trehalose would significantly increase the cost of the biocontrol product.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Government (MEC, Ministerio de Educación y Cultura) and CICYT (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, grant AL199-0652-C02-01).

REFERENCES

- Abadias, M., N. Teixidó, J. Usall, I. Viñas, and N. Magan. 2000a. Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation. *Can. J. Microbiol.*, in press.
- Abadias, M., N. Teixidó, J. Usall, I. Viñas, and N. Magan. 2000b. Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. *J. Appl. Microbiol.*, in press.

- Atlas, R. M., and R. Bartha.** 1998. Physiological ecology of microorganisms. Adaptations to Environmental conditions, p. 281-331. *In* Microbial Ecology: Fundamentals and applications, 4th ed. Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, CA, USA.
- Blomberg, A., and L. Adler.** 1992. Physiology of osmotolerance in fungi, p. 145-212. *In* A.H. Rose (ed.), Advances in microbial physiology, vol. 33, Academic Press Ltd., New York.
- Crowe, J. H., L. M. Crowe, and D. Chapman.** 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223**:701-703.
- Daigle, D. J., and W. J. Jr. Connick.** 1990. Formulation and application technology for microbial weed control, p. 288-304. *In* R. E. Hoagland (ed.), Microbes and Microbial Products as Herbicides. American Chemical Society, Washington DC.
- Droby, S., E. Chalutz, B. Horev, L. Cohen, V. Gaba, C. L. Wilson, and M. E. Wisniewski.** 1993. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathol.* **42**:418-424.
- Droby, S., L. Cohen, A. Daus, B. Weiss, B. Horev, E. Chalutz, H. Katz, M. Keren-Tzur, and A. Shachnai.** 1998. Commercial testing of Aspire: A yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control* **12**:97-101.
- Gadd, G. M., K. Chalmers, and R. H. Reed.** 1987. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**:249-254.
- Gervais, P., and P. A. Maréchal.** 1994. Yeast resistance to high levels of osmotic pressure. *J. Food Eng.* **22**:399-407.
- Hofstein, R., and B. Fridlender.** 1994. Development of production formulation and delivery systems, p. 1273-1280. *In* Proceedings of Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Janisiewicz, W. J., and S. N. Jeffers.** 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protect.* **16**:629-633.
- Janisiewicz, W. J., and J. Roitman.** 1988. Biological control of blue-mold and gray-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* **78**:1697-1700.
- Janisiewicz, W.J., J. Usall, and B. Bors.** 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology* **82**:1364-1370.

Keller, F., M. Schellenberg, and A. Wiemken. 1982. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Arch. Microbiol. **131**:298-301.

Koch, A. L. 1984. Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic challenge. J. Bacteriol. **159**:919-924.

Leslie, S. B., S. A. Teter, L. M. Crowe, and J. H. Crowe. 1994. Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. Biochim. Biophys. Acta **1192**:7-13.

Magan, N. 1997. Fungi in extreme environments, p. 99-114, Wicklow and Söderström (ed.), *In The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships*, Springer-Verlag, Berlin.

Rhodes, D. J. 1993. Formulation of biological control agents, p. 411-439. *In* D.G. Jones (ed.), *Exploitation of microorganisms*, Chapman & Hall, London.

Salek, A.T., and Arnold, W.M. 1995 Trehalose-Stabilisation of osmophilicity and viability of baker's and distiller's yeast: applications to storage and drying. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. **17**:14-24.

Smilanick, J. L., and R. Denis-Arrue. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. Plant Dis. **70**: 106-108.

Spencer, J. F. T., and D. M. Spencer. 1978. Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts, p. 393-425. *In* A.H. Rose (ed.), *Economic Microbiology*, vol. 2, Academic Press, London.

Stock, J. B., B. Rauch, and S. Roseman. 1977. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. J. Biol Chem. **252**:7850-7861.

Teixidó, N., I. Viñas, J. Usall, and N. Magan. 1998a. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. Phytopathology **88**:960-964.

Teixidó, N., I. Viñas, J. Usall, and N. Magan. 1998b. Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content. Mycol. Res. **102**:1409-1417.

Usall, J., N. Teixidó, E. Fons, and I. Viñas. 2000a. Biological control of blue mold on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. Int. J. Food Microbiol. **58**:83-92.

Usall, J., N. Teixidó, R. Torres, X. Ochoa de Eribe, and I. Viñas. 2000b. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biol. Tec.*, in press.

Van Laere, A. 1989. Trehalose, reserve and/or stress metabolite. *FEMS Microbiol. Lett.* **63**:201-210.

Viñas, I., J. Usall, N. Teixidó, and V. Sanchis. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* **40**:9-16.

Whitesides, S. K., R. S. Daoust, and R. J. Gouger. 1994. Commercialization of biological control agents: An industry perspective, p. 107-121. *In* C.L Wilson and M.E. Wisniewski (ed.), *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables-Theory and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Wiemken, A. 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek* **58**:209-217.

Capítol 8

Discussió general

1. ESTUDI DE LA LIOFILITZACIÓ COM A MÈTODE DE DESHIDRATACIÓ DE L'AGENT DE BIOCONTROL *C. sake*

En principi, la deshidratació es presenta com el mètode més efectiu per a presentar els productes biològics i facilitar la seva conservació, distribució i aplicació (Rhodes, 1993). L'exclusió de l'aigua ralenteix el metabolisme de les cèl·lules, preveu l'acumulació de productes tòxics i disminueix la desnaturalització de les proteïnes (Lapage i Redway, 1974; Kirsop i Doyle, 1991). El baix contingut d'humitat del producte també evita la seva contaminació durant la seva conservació. Per tant, el primer objectiu de la tesi va ser estudiar la deshidratació com a mètode de formulació de l'agent de biocontrol *C. sake*.

L'agent de biocontrol *C. sake* es mor a 37°C (Usall, 1995) una temperatura massa baixa per aplicar un procés d'assecat convencional a alta temperatura. Així doncs, es van iniciar les proves de deshidratació mitjançant la liofilització, amb l'objectiu d'obtenir un producte amb una viabilitat acceptable, que tingués una efectivitat similar a la de les cèl·lules fresques i una llarga vida útil. També es buscava un producte amb unes característiques físiques, com per exemple la solubilitat, òptimes.

1.1. Efecte del mètode de congelació

El procés de liofilització requereix d'un pas previ de congelació de la mostra. Com ja s'ha esmentat anteriorment, la velocitat de refredament és un factor crític per a la supervivència dels microorganismes. Així doncs, l'objectiu d'aquest primer estudi va ser determinar quin era el millor mètode de congelació del llevat *C. sake*.

Els millors resultats es van obtenir quan les cèl·lules es van congelar a -12 i -20°C (90 i 85% de viabilitat, respectivament). La congelació ràpida amb nitrogen líquid va resultar el pitjor mètode, reduint-se significativament la viabilitat de les cèl·lules fins un 52%. És probable que la congelació amb N₂ fós tan ràpida que no va deixar que l'aigua intracel·lular sortís cap a l'exterior, formant-se cristalls a l'interior de la cèl·lula que van causar danys letals en un gran percentatge de les cèl·lules de *C. sake*. A més a més, les cèl·lules que van romandre viables després del procés de congelació per nitrogen líquid, devien quedar més danyades perquè van sobreviure menys al procés de liofilització. Quan les temperatures de congelació són més altes, el procés de congelació és més lent i l'aigua es va congelant fora de la cèl·lula. Els soluts extracel·lulars es concentren en el medi residual no congelat i, per equilibrar la pressió osmòtica, l'aigua intracel·lular surt cap a l'exterior. Es concentren els soluts intracel·lulars, la cèl·lula es deshidrata per òsmosi i evita la congelació d'aigua a l'interior de la cèl·lula.

En funció dels resultats obtinguts en aquests assaigs, es va decidir continuar congelant les mostres a -20°C .

1.2. Efecte de l'addició de medis protectors

Un cop fixat el millor mètode de congelació per a les cèl·lules de *C. sake*, es va estudiar l'efecte de l'addició de diferents protectors a diferents concentracions. Es van utilitzar sucres, polímers, poliols, alguns compostos nitrogenats i la llet en pols.

La utilització de la llet en pols al 10% (p/v) va donar els millors resultats de viabilitat (22%). Berny i Hennebert (1991) van obtenir resultats similars amb *Saccharomyces cerevisiae* (30% viabilitat). La viabilitat de *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *S. lactis* va ser de 40, 38, 14 i 50%, respectivament, quan es van liofilitzar utilitzant el 10% de llet en pols com agent protector. Es creu que les proteïnes que conté la llet proporcionen un revestiment protector a les cèl·lules (Champagne i cols., 1991). Altres components de la llet, com la lactosa i el lactosèrum, també poden augmentar la supervivència de les bacteries làctiques liofilitzades. A més a més de l'efecte protector, amb la llet es va obtenir un producte deshidratat, amb molt bona estructura, porós i que es va rehidratar fàcilment.

Generalment, l'increment de la concentració de l'agent protector va provocar un increment en la viabilitat de les cèl·lules de *C. sake*, obtenint-se els millors resultats quan es van utilitzar al 10%. Aproximadament, un 13% de les cèl·lules van resultar viables quan es va utilitzar la trealosa al 10% (p/v) com agent protector. Aquests resultats van ser similars als dels altres disacàrids testats. No obstant, Berny i Hennebert (1991), van obtenir viabilitats més elevades (74%) en liofilitzar *S. cerevisiae* amb un 10% de trealosa com a protector. Entre els sucres, la trealosa ha estat el més utilitzat. El seu paper en l'estabilització de les membranes biològiques deshidratades mitjançant ponts d'hidrogen al grup polar de la membrana fosfolipídica ha estat ampliament indicat (Crowe i Crowe, 1986). Aquest mecanisme de protecció també ha estat atribuït a altres substàncies, com la sacarosa i el glicerol (Aguilera i Karel, 1997).

Aquest estudi també va demostrar que els poliols assajats (glicerol, manitol, adonitol i inositol) no són apropiats per a la protecció de *C. sake* enfront la liofilització. Només el sorbitol va donar resultats similars als obtinguts amb els disacàrids. Font de Valdez i cols. (1983) van obtenir resultats similars amb el glicerol, que no va resultar ser un bon agent protector en la liofilització de bacteries làctiques. En el mateix estudi, però, l'adonitol sí que va mostrar un fort efecte protector. El manitol també va tenir un efecte positiu en la liofilització de bacteries làctiques (Efiuvwevwere i cols., 1999).

El glutamat sòdic, utilitzat al 10%, va donar un dels millors resultats (20% viabilitat). Anteriorment, Font de Valdez i cols. (1983) van aconseguir el 100% de viabilitat en *Leuconostoc cremoris* ATCC 12254 quan van utilitzar el glutamat sòdic dissolt en aigua com a protector. Es creu que l'efecte protector dels aminoàcids és degut a la reacció entre els grups carboxil de les proteïnes dels microorganismes i el grup amino del protector, que fan que s'estabilitzi l'estructura proteica (Moriche, 1970).

Aquests resultats, van demostrar que l'agent de biocontrol *C. sake* és bastant susceptible al procés de deshidratació per liofilització, i per això es va decidir que, per a aconseguir augmentar la viabilitat, potser caldria protegir encara més les cèl·lules. Com en els resultats obtinguts quan els protectors es van utilitzar sols, la llet va mostrar un doble efecte, protecció i bona estructura al producte liofilitzat, es va decidir combinar els millors protectors amb la llet.

En general, la combinació de la llet en pols amb glucosa, fructosa, trealosa, sacarosa, lactosa, rafinosa i sorbitol va incrementar la viabilitat de les cèl·lules de *C. sake* respecte quan la llet es va utilitzar sola. No obstant, un increment en la concentració dels protectors no va significar, en tots els cassos, un increment en el nombre de cèl·lules viables després de la liofilització. Quan la llet en pols es va combinar amb dextrà, glutamat o midó, la viabilitat de les cèl·lules de *C. sake* no va ser significativament diferent a quan aquesta es va utilitzar sola. Mitjançant la combinació del 10% de llet + 10% lactosa, es va aconseguir augmentar la viabilitat de *C. sake* fins un 40%. Com la viabilitat obtinguda encara no era satisfactòria, calia doncs, estudiar l'efecte d'algun altre factor que jugués un paper important en la viabilitat de les cèl·lules liofilitzades, com ara el medi de rehidratació.

1.3. Efecte del medi de rehidratació

Font de Valdez i cols. (1985) i Sinha i cols. (1982), van demostrar que el medi de rehidratació juga un paper important en la recuperació d'algunes bactèries. Beker i Rapoport (1987) també ho van indicar en el cas dels llevats. Així doncs, el proper objectiu va ser l'estudi de viabilitat de *C. sake* després d'un procés de liofilització utilitzant diferents medis de rehidratació. Els estudis de rehidratació es van iniciar amb les millors combinacions obtingudes en les proves anteriors.

Es va demostrar que el medi de rehidratació és de gran importància per a la recuperació de les cèl·lules de *C. sake* i que l'efecte del medi de rehidratació depèn del protector utilitzat. La rehidratació amb el 10% de llet o bé amb la mateixa solució amb què s'havien protegit les cèl·lules durant la liofilització, va incrementar la viabilitat del producte deshidratat, aconseguint viabilitats superiors al 60%. D'altra banda, les

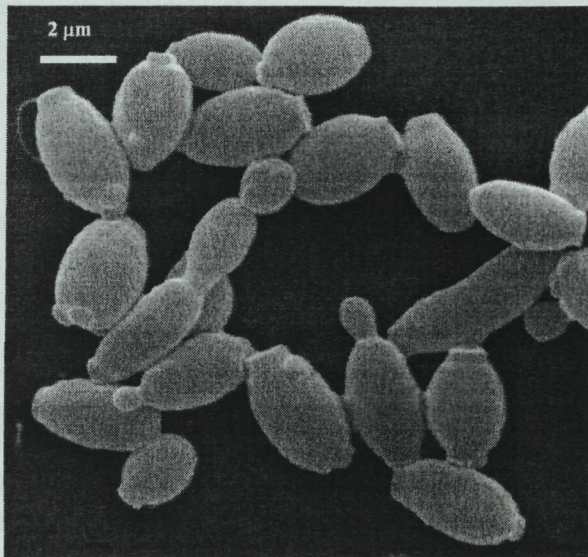
cèl·lules rehidratades amb aigua, van presentar la viabilitat més baixa. En la mateixa línia, Costa i cols. (2000) van demostrar que la viabilitat de l'agent de biocontrol *Pantoea agglomerans* CPA-2, liofilitzat utilitzant 10% de sacarosa com a protector, va ser del 100% quan es va utilitzar la llet com a medi de rehidratació, mentre que quan les cèl·lules liofilitzades es van redissoldre amb la solució amortidora de fosfat o aigua la viabilitat va ser del 80 i 50%, respectivament.

És possible que la llet proporcioni una gran varietat de nutrients que fa que es millori la recuperació de les cèl·lules de *C. sake* danyades durant el procés de liofilització. Ray i cols. (1971) van indicar que és probable que la rehidratació de les cèl·lules amb una solució d'alta pressió osmòtica controli la velocitat de rehidratació i així reduïxi els possibles danys. Sinha i cols. (1982) van demostrar que la sacarosa, la dextrosa, la llet i la peptona, tots ells al 10%, van ser els millors medis de rehidratació per cèl·lules d'estreptococs liofilitzades. En la fotografia 3 es pot observar l'aspecte microscòpic de cèl·lules fresques de *C. sake* i comparar-lo amb el de les cèl·lules liofilitzades i rehidratades (Fotografia 4). Un cop rehidratades algunes de les cèl·lules no arriben a recuperar el seu aspecte original i l'aspecte de la paret cel·lular no és el mateix, ha sofert alteracions morfològiques, que han pogut causar la mort d'algunes d'elles.

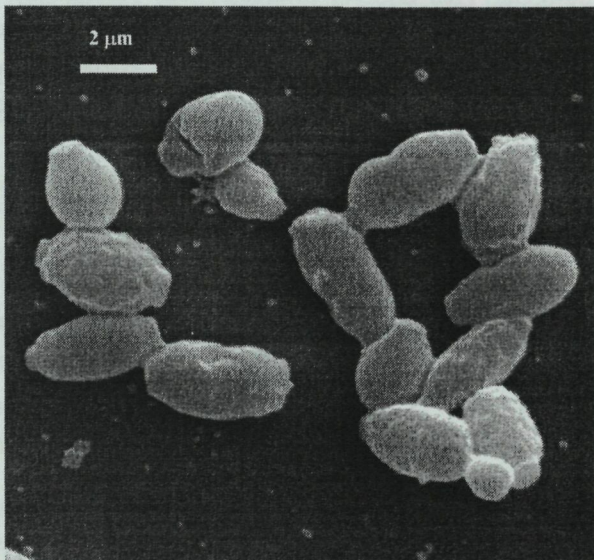
Després dels primers assaigs de liofilització, combinant l'efecte d'ambdós, suspensió protectora i medi de rehidratació, es van obtenir quatre productes liofilitzats amb viabilitats entre 59-85%. Tots aquests productes van resultar de l'ús de diferents combinacions de lactosa i llet al 10% com a protectors. Els productes liofilitzats, després d'un procés de trituració, van presentar una estructura porosa i fàcilment rehidratable (Fotografia 5), amb una humitat d'aproximadament 1-2% i una concentració de cèl·lules viables entre $3,0-7,0 \times 10^9$ ufc g⁻¹.

1.4. Efectivitat de les cèl·lules de *C. sake* liofilitzades

Un cop obtingut un producte liofilitzat d'alta viabilitat i fàcilment rehidratable calia comprovar la seva efectivitat i comparar-la amb les cèl·lules fresques del llevat. Els assaigs d'efectivitat es van realitzar contra *Penicillium expansum* en pomes "Golden Delicious".



Fotografia 3. Aspecte al microscopi electrònic de rastreig (SEM) de cèl·lules de *C. sake* abans de ser liofilitzades, en una solució protectora de 10% llet en pols + 10% lactosa.



Fotografia 4. Aspecte al microscopi electrònic de rastreig (SEM) de cèl·lules de *C. sake* liofilitzades utilitzant com a protector 10% llet + 10% lactosa i rehidratades durant 10 min amb llet 10%.



Fotografia 5. Aspecte macroscòpic de les cèl·lules de *C. sake* liofilitzades utilitzant 10% llet en pols + 10% lactosa com a protector. El pols que es mostra s'ha triturat prèviament.

Els resultats obtinguts van demostrar que les cèl·lules deshidratades, tot i reduir la incidència (percentatge de fruits podrits) i la severitat (diàmetre de podridura) causada per *P. expansum*, no van ser tan efectives com les cèl·lules fresques, utilitzades ambdues a la mateixa concentració. Els millors resultats es van obtenir quan les cèl·lules es van liofilitzar amb la combinació 10% lactosa + 10% llet en pols i es van rehidratar amb una solució a l'1% de peptona. Aquest tractament va presentar una reducció de la incidència i de la severitat d'un 66 i 74%, respectivament, mentre que les cèl·lules fresques ho van fer en un 93 i 98%, respectivament. A més a més, aquest producte liofilitzat va presentar una viabilitat més baixa que els altres quatre assajats (59%) i per tant, la quantitat de producte necessari per aconseguir tractar amb el mateix nombre de cèl·lules va ser més elevat.

El fet que les cèl·lules liofilitzades de *C. sake*, tot i ser viables, no fossin tan efectives com les cèl·lules fresques podria ser degut a què quan es van aplicar a la fruita encara no haguessin recuperat totalment les seves funcions. El mode d'acció de *C. sake* és, probablement, competició per nutrients i/o espai (Viñas i cols., 1998). Llavors, si les cèl·lules rehidratades encara no havien recuperat totalment les seves funcions no haurien pogut reproduir-se i colonitzar les ferides d'una manera suficientment ràpida per evitar el creixement del patogen. Una de les possibles solucions podria ser rehidratar les cèl·lules i deixar-les durant un període més llarg en el medi de

rehidratació, així, quan s'apliquessin a la fruita podrien estar ja en més bones condicions.

Janisiewicz i Jeffers (1997) van testar l'efectivitat del Bio-Save 10 i 11 i la van comparar amb les cèl·lules fresques. Van demostrar que les cèl·lules deshidratades de *Pseudomonas syringae* ESC-10 (Bio-Save 10) van ser igualment efectives que les cèl·lules fresques en el control de *P. expansum* en pomes, mentre que el Bio-Save 11, tot i ser efectiu, ho va ser menys que les cèl·lules fresques. Fora del camp de la postcollita, Utkhede i Smith (1997) van demostrar que una preparació liofilitzada de l'agent de biocontrol *Enterobacter agglomerans* E8, va ser igual efectiva que les cèl·lules fresques en el control la podridura de les arrels en pomeres.

1.5. Viabilitat de les cèl·lules de *C. sake* liofilitzades durant la conservació

Una vegada demostrada l'efectivitat de les cèl·lules de *C. sake* liofilitzades, es va voler determinar si la seva viabilitat es mantenia en el temps, i així poder fixar una temperatura de conservació i el període de vida útil del producte.

Els resultats obtinguts van mostrar que la viabilitat del llevat liofilitzat i conservat a 25°C decreix ràpidament en pocs dies, independentment del protector i el medi de rehidratació utilitzat. El percentatge de cèl·lules viables després de 15 dies de conservació va ser inferior al 10%. De forma similar, la vida útil de la formulació seca del llevat *Candida oleophila* (Aspire) és de 20 dies quan s'emmagatzema a temperatura ambient.

La conservació a 4°C va millorar l'estabilitat de les cèl·lules liofilitzades respecte la conservació a 25°C. No obstant, el percentatge de cèl·lules viables després de 2 mesos de conservació va ser inferior al 10%. Es pensa que aquesta disminució de la viabilitat pot ser deguda a reaccions d'oxidació, ja que les cèl·lules es trobaven en contacte amb l'aire. Aquestes reaccions podrien ser més lentes a 4 que a 25°C. El-Sadek i cols. (1975) van indicar que els cultius liofilitzats sobreviuen millor quan s'emmagatzemen en condicions de buit o N₂ i a baixa temperatura. Pedreschi i Aguilera (1997) van demostrar que la vida útil de les espores seques de l'agent de biocontrol *Trichoderma harzianum* podia allargar-se considerablement mitjançant la seva conservació en envasos segellats i sota condicions de refrigeració. D'altra banda, Beker i Rapoport (1987) van suggerir l'addició d'antioxidants, tiourea, ester de sorbitol o altres additius en les cèl·lules de *S. cerevisiae* abans de la seva deshidratació amb la funció d'augmentar l'estabilitat de les cèl·lules seques durant l'emmagatzematge.

Després de tots els assaigs, vam concloure que l'agent de biocontrol *C. sake* és molt sensible a la deshidratació mitjançant la liofilització. Tot i obtenir resultats de viabilitat i efectivitat bastant satisfactoris, l'estabilitat en el temps va ser molt baixa, i més encara quan el producte es va conservar a temperatura ambient. A partir dels resultats obtinguts i tenint en compte que el mètode de liofilització és molt car, es podria indicar que, en les condicions estudiades, aquest mètode no és molt recomanable per a la seva aplicació comercial. Tot i això es podrien realitzar estudis complementaris per tal d'intentar millorar la seva viabilitat i estabilitat en el temps.

2. ESTUDI ECOFISIOLÒGIC DE L'AGENT DE BIOCONTROL *C. sake* CRESCUT EN MEDIS DE MELASSA AMB a_w NO MODIFICADA I MODIFICADA MITJANÇANT L'ADDICIÓ DE DIFERENTS SOLUTS

El següent objectiu de la tesi va ser l'estudi d'alguns aspectes ecofisiològics de *C. sake* en el medi a base de melassa de canya de sucre que podria utilitzar-se quan la seva producció es fés a nivell comercial. També es volia millorar l'agent de biocontrol *C. sake* enfront condicions d'estrès hídric, per veure si així es podia millorar la seva resistència al procés de formulació. Estudis previs (Teixidó i cols., 1998b) van demostrar que la resistència de *C. sake* a l'estrès hídric millorava mitjançant la modificació del medi de cultiu. Les cèl·lules de *C. sake* crescudes en medi NYDB amb a_w reduïda (0,96) van mostrar més resistència a baixes condicions d' a_w que les crescudes amb el medi amb a_w no modificada. Aquest increment de resistència es creu lligat a la modificació de les reserves endògenes acumulades quan es modifica l' a_w del medi de creixement. Aquestes cèl·lules de *C. sake* amb les reserves endògenes modificades van ser igualment efectives en el control de *P. expansum* en pomes (Teixidó i cols., 1998a).

No obstant, no s'havia estudiat si aquesta millora a les condicions d'estrès també es donaria quan el medi de cultiu fós un medi preparat a base de melassa de sucre de canya i enriquit amb urea. Aquest medi de cultiu és molt més econòmic que el NYDB i és el que es podria aplicar en un futur per a la producció d'aquest agent de biocontrol a nivell comercial. Així doncs, es van iniciar els estudis ecofisiològics de *C. sake* en medis a base de melassa.

2.1. Creixement de l'agent de biocontrol *C. sake* en condicions d'estrès hídric

El primer estudi va pretendre conèixer el rang d' a_w en el qual *C. sake* era capaç de créixer. Aquest estudi es va fer en medi melassa sòlid. El rang d' a_w per al creixement

de *C. sake* CPA-1 en medi melassa sòlid va estar situat entre 0,996-0,94 quan es va utilitzar el solut iònic NaCl per ajustar l' a_w i entre 0,996-0,92 quan es van utilitzar glicerol, glucosa, sorbitol o prolina. No obstant, *C. sake* va demostrar un rang més ampli d' a_w en estudis previs duts a terme per Teixidó i cols. (1998c). En aquest estudi, el rang d' a_w en medi NYDA modificat va estar situat entre 0,995-0,92 quan s'utilitzava NaCl per ajustar l' a_w i entre 0,995-0,90 amb el glicerol. Tot i això, *C. sake* en ambdós medis, tolera a_w més baixes en presència de soluts no iònics que de soluts iònics com el NaCl. Van Eck i cols. (1993) van obtenir també resultats similars amb altres espècies del gènere *Candida*, que van mostrar més tolerància a baixes a_w en presència de glucosa que de NaCl. No obstant, aquestes altres espècies van presentar més tolerància a baixos nivells d' a_w : les a_w mínimes per al creixement de *C. cacaoi* van ser de 0,83/0,84, per a *C. magnoliae* 0,82/0,88 i per a *C. tropicalis* 0,88/0,89 per al NaCl i la glucosa, respectivament.

Els resultats obtinguts en aquest treball també van demostrar que la fase de latència augmentava en disminuir l' a_w i que el nombre de colònies presents en les plaques, es veia reduït amb la disminució d' a_w . La prolina va resultar ser el solut que més va tolerar *C. sake*, seguit pel glicerol i el sorbitol, que van presentar resultats similars, a continuació la glucosa i finalment el NaCl.

Com el nostre objectiu era treballar amb medis d' a_w restrictiva però que mantinguessin una bona producció del llevat en poc temps, es van seleccionar per a les proves de creixement en medi líquid, les a_w 0,98 i 0,96, ja que per sota d'aquests nivells, el creixement es veu reduït i augmenta significativament la fase de latència.

A continuació es va avaluar el creixement de *C. sake* en el medi de melassa líquid amb a_w no modificada i en els d' a_w ajustada a 0,98 i 0,96 mitjançant l'addició de glicerol, glucosa, NaCl, prolina o sorbitol. Mesurant la densitat òptica del cultiu com a paràmetre de creixement, es va observar que en el medi no modificat (a_w 0,996), el creixement va ser superior en tots els temps analitzats. A més a més, per cadascun dels soluts assajats, el creixement va ser menor quan l' a_w es va reduir. Així, el creixement del cultiu a a_w 0,98 no va provocar una disminució tan dràstica en el creixement com quan aquest es va fer a 0,96. *C. sake* va presentar millor creixement quan l' a_w del medi de cultiu es va ajustar amb prolina, glicerol i glucosa que quan es va fer amb sorbitol i NaCl. En la mateixa línia, Hallsworth i Magan (1994a) també van trobar que la velocitat de creixement d'algunes espècies de fongs entomopatògens depenia tant del l' a_w del cultiu com del solut utilitzat per ajustar-la.

No obstant, quan aquest creixement es va avaluar mitjançant el mètode de recompte de viables en placa, es va observar que a les 48 h d'incubació, el creixement de *C. sake* en els medis de melassa modificats amb prolina o sorbitol a a_w de 0,98 va ser inclús més

gran que en el medi de melassa no modificat (control). L' aminoàcid prolina, utilitzat al 10% podria ser que afavorís el creixement del llevat. Així doncs, és possible que la mesura de la densitat òptica no fós tan fiable com la del recompte de viables en placa, ja que en el primer mètode es fa un recompte total de cèl·lules en el que comptem també cèl·lules mortes, mentre que en el segon mètode, només es tenen en compte aquelles que són capaces de desenvolupar-se.

2.2. Mesura del potencial hídric de les cèl·lules de *C. sake* i la seva relació amb els soluts intracel·lulars

En aquest estudi es pretenia mesurar el potencial hídric de les cèl·lules de *C. sake* (ψ_c) crescudes en el medi de melassa no modificat (a_w 0,996) i els medis d' a_w modificada a 0,98 i 0,96 mitjançant l'addició de glucosa, glicerol, NaCl, sorbitol o prolina. Es va estudiar l'efecte que podrien tenir tant el valor de l' a_w com el solut utilitzat per ajustar-la, així com també el temps de creixement. Aquests resultats també s'utilitzarien per a la formulació líquida de l'agent de biocontrol *C. sake*.

Es va demostrar que el potencial hídric de les cèl·lules depèn de l' a_w del medi de cultiu, del solut que s'ha utilitzat per modificar-la i del temps de creixement. A més a més, també es va provar que les seves interaccions estadístiques van ser significatives. El potencial hídric de les cèl·lules va resultar menor quan aquestes van créixer en medis de menor potencial hídric o a_w . Així, les cèl·lules crescudes en el medi amb a_w no modificada ($\cong -0,54$ MPa) van presentar valors més alts de potencial, entre $-0,28$ i $-0,41$ MPa, les crescudes en el medi modificat a a_w 0,98 ($\cong -2,73$ MPa) van presentar valors $< -0,84$ MPa i les crescudes en el medi modificat a a_w 0,96 ($\cong -5,51$ MPa) van presentar el valor de potencial hídric més baix ($< -2,39$ MPa). En general, tant a 0,98 com a 0,96 d' a_w , el NaCl i el sorbitol van ser els soluts que, afegits al medi, van modificar més el potencial hídric de les cèl·lules, mentre que la glucosa no hi va influir tant.

Excepte en el cas de la glucosa, sembla que el potencial hídric de les cèl·lules tendeix a equilibrar-se amb el del medi. Magan (1997) va indicar que l'equilibri entre el potencial hídric de la cèl·lula i el del medi ambient que l'envolta és crític per a prevenir l'inflament del citoplasma. No obstant, el valor del potencial hídric de la cèl·lula no arriba mai a igualar el del medi ambient. Aquesta diferència entre el potencial hídric de les cèl·lules i el del medi és el que permet el fluxe d'aigua cap a l'interior de les cèl·lules (Jennings, 1995; Papendick i Mulla, 1986).

Ja s'ha comentat en la introducció, que els llevats acumulen glicerol, arabitol, manitol i eritritol quan són sotmesos a condicions d'estrès (Spencer i Spencer, 1978; Van Eck i cols., 1993). Aquesta acumulació de soluts intracel·lulars pot fer variar el potencial

hídric de les cèl·lules. Així doncs, es va mesurar el contingut intracel·lular d'aquests soluts més referenciats i de glucosa i trealosa en les cèl·lules de *C. sake* crescudes en els medis de melasses modificats i en el no modificat, i es va estudiar si hi havia alguna correlació entre la seva concentració i el ψ_c .

Es va demostrar que quan les cèl·lules van créixer en el medi modificat amb glicerol, hi va haver una bona correlació (Coeficient de Pearson=0,71) entre la concentració intracel·lular de glicerol i el potencial hídric de les cèl·lules. Així doncs, el glicerol podria ser un dels principals responsables de la disminució del potencial hídric de les cèl·lules. Magan (1997) ja va indicar que el glicerol és més important en relació als altres poliols perquè produeix una a_w més baixa que els altres poliols a la mateixa concentració molar, seguit per l'arabitol, l'eritritol i després el manitol (el de més pes molecular). Des del punt de vista energètic, la producció de glicerol també representa la manera més eficaç d'osmoregulació, ja que és el polihidroxialcohol més petit (Hocking, 1993).

No obstant, quan les cèl·lules de *C. sake* van créixer en els medis modificats amb els altres soluts, tot i acumular glicerol en resposta a l'estrès hídric, no ho van fer en igual quantitat i els coeficients de correlació amb el glicerol van ser més baixos. En el cas dels medis modificats amb prolina o glucosa, més del 50% del potencial hídric de les cèl·lules va quedar explicat per la presència dels soluts analitzats. Ions inorgànics, aminoàcids, àcids orgànics i fins i tot, altres sucres o poliols no analitzats poden també contribuir a disminuir el potencial hídric de les cèl·lules. En el cas de les cèl·lules crescudes en el medi modificat amb NaCl, els ions Na^+ podrien ser els responsables de la disminució del ψ_c . Jennings (1995) va indicar que quan el potencial osmòtic del medi es disminueix amb ions, aquests poden ser absorbits amb la finalitat de generar el potencial osmòtic necessari. Beever i Laracy (1986) van indicar que aproximadament el 32% del potencial hídric intracel·lular d'*Aspergillus nidulans* podria ser degut a cations, principalment el K^+ quan l' a_w del medi es redueix mitjançant l'addició de NaCl. En el cas de *Penicillium chrysogenum*, un 74% del potencial hídric intracel·lular es degut a l'acumulació d'ions inorgànics quan creix en el medi amb l' a_w reduïda amb NaCl, mentre que quan l' a_w es redueix al mateix valor amb glucosa, només un 15% del potencial intracel·lular es degut als ions inorgànics i els carbohidrats passen a ser els principals responsables de la disminució del ψ_c (Kelly i Budd, 1990). No obstant, en general, es pensa que els soluts inorgànics no juguen un paper tan important com els orgànics en l'osmoregulació dels llevats (Hobot i Jennings, 1981).

Quan les cèl·lules van créixer en els medis amb l' a_w modificada amb sorbitol, només el 39% del total del ψ_c quedava explicat per l'acumulació de glicerol. En aquest cas, es va pensar que el ψ_c podia ser degut a l'acumulació de sorbitol. Jennings (1995) va indicar

que en *Wallemia sebi* i *Xeromyces bisporus* crescuts en medi amb baixa a_w , el sorbitol té una gran contribució en el potencial osmòtic.

Com a conseqüència dels resultats obtinguts es va pensar en produir una formulació líquida en la que les cèl·lules de *C. sake* es farien créixer en el medi de melassa no modificat i en els medis modificats obtenint cèl·lules amb diferent ψ_c . Aquestes cèl·lules es conservarien en solucions líquides amb el mateix potencial hídric per mantenir l'equilibri osmòtic. A més a més, aquestes solucions es prepararien amb alguns dels soluts que estan referenciats com a compatibles i que hem vist que s'han acumulat en les cèl·lules de *C. sake*.

2.3. Caracterització de les reserves endògenes (sucres i poliols) acumulades pel llevat *C. sake* crescut en els medis a base de melassa

L'objectiu d'aquest estudi va ser veure quins eren els soluts intracel·lulars que sintetitzava *C. sake* en resposta a condicions d'estrès en els medis de cultiu a base de melassa, comparant-los amb els que s'acumulaven quan creixia en el medi de melassa no modificat. Les cèl·lules crescudes en el medi melassa no modificat (a_w 0,996) van acumular glucosa, glicerol i manitol independentment del temps d'incubació. L'eritritol i l'arabitol no van ser acumulats fins després de 48 h d'incubació, i la trealosa no es va detectar fins a les 72 h.

El glicerol i l'arabitol van ser els principals soluts acumulats en cèl·lules de *C. sake* en resposta a la disminució de l' a_w del medi melassa. La concentració d'aquests soluts va variar més en funció del solut utilitzat per a modificar l' a_w que en l' a_w per ella mateixa. La concentració intracel·lular de glucosa i de manitol no va modificar-se quan es va disminuir l' a_w del medi de cultiu, suggerint que potser aquests soluts no es sintetitzen en resposta a canvis osmòtics. De forma similar, l'arabitol i el glicerol van ser els principals soluts intracel·lulars acumulats en *Candida albicans* (Pfyffer i Rast, 1988) i *C. cacaoi* (Van Eck i cols., 1993) com a resposta al creixement en medi amb a_w modificada. No obstant, en el cas de *C. sake*, l'arabitol, la trealosa i la glucosa van ser els principals soluts acumulats quan les cèl·lules van créixer en medi NYDB no modificat (a_w 0,995, Teixidó i cols., 1998b). Així doncs, sembla ser que el tipus de solut acumulat depèn, també, del medi base amb què es parteix.

El principal solut acumulat en cèl·lules crescudes en medi modificat amb glicerol va ser el mateix glicerol. Això suggereix que les cèl·lules el van agafar directament del medi de cultiu. L'absorció i l'acumulació de soluts externs representa una opció alternativa per a l'osmoregulació, en particular quan el solut extracel·lular presenta les característiques de solut compatible (Blomberg i Adler, 1992). En canvi, quan el medi

es va modificar amb glucosa, el principal solut acumulat en resposta a baixa a_w va ser l'arabitol, i el contingut intracel·lular de glucosa va ser el mateix que quan les cèl·lules van créixer en medi no modificat.

Les reserves endògenes analitzades no van variar significativament respecte el medi melassa no modificat quan es va disminuir l' a_w amb NaCl. No obstant, estudis previs van demostrar que la concentració intracel·lular de glicerol es va veure augmentada quan *C. sake* va créixer en medi NYDB modificat amb NaCl (Teixidó i cols., 1998c). El glicerol també va ser el principal solut trobat en cèl·lules de *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, i *Debaryomyces hansenii* crescudes en un medi que contenia NaCl (Reed i cols., 1987).

En els medis amb a_w modificada mitjançant l'addició de prolina i sorbitol, les diferències més marcades respecte el medi no modificat es van observar a les 48 h de creixement, quan les concentracions d'arabitol i glicerol van ser, respectivament, més elevades que en el medi no modificat.

En tots els medis analitzats, el contingut intracel·lular de trealosa va ser molt baix, mostrant-se la quantitat més elevada en el medi ajustat a 0,96 d' a_w amb NaCl. Estudis previs van demostrar que la trealosa s'acumulà en petites quantitats en cèl·lules de *C. sake* crescudes en medi NYDB modificat amb glucosa i trealosa (Teixidó i cols., 1998b, c).

Per tant, els resultats obtinguts en aquest assaig van indicar que no tan sols l' a_w i el solut utilitzat per a modificar-la tenen un efecte important en l'acumulació de soluts intracel·lulars, sinó que el medi base de creixement també juga un paper destacat. Així, els resultats obtinguts en els medis a base de melassa van resultar diferents dels que es van obtenir prèviament en medi NYDB (Teixidó i cols., 1998b, c). Probablement la composició del medi base també pot jugar un paper important. Hallsworth i Magan (1994a, b, 1996) ja van indicar que a més a més del solut utilitzat per modificar l' a_w , la temperatura, el pH i la relació carboni:nitrogen del medi de cultiu poden influir significativament en l'acumulació de glicerol, manitol i eritritol en els conidis de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* i *Paelomyces farinosus*.

El contingut de soluts intracel·lulars va canviar amb l'edat del cultiu. Generalment, la quantitat de glicerol i arabitol acumulada en les cèl·lules de *C. sake* va augmentar de les 24 a les 48 h d'incubació i després es van mantenir o van créixer. No obstant, en els medis modificats amb glicerol, el contingut intracel·lular de glicerol va augmentar amb l'edat del cultiu. El manitol, que va ser el principal solut acumulat en la fase de creixement exponencial, va deixar de ser-ho en estats més avançats de creixement.

Amb el present estudi quedava demostrat que canviant l' a_w del medi de creixement del llevat *C. sake* amb diferents soluts, es podia afectar significativament l'acumulació intracel·lular de poliols (principalment glicerol i arabitol) i en menys grau, la trealosa. Calia veure ara, si realment les cèl·lules crescudes en els medis restrictius i que havien acumulat unes reserves endògenes diferents a les que van acumular en el medi no modificat, presentaven una major tolerància a condicions d'estrès hídric. Això és el que es va intentar veure en la següent experiència del present treball.

2.4. Millora del microorganisme *C. sake* enfront a condicions d'estrès hídric

En aquesta experiència es va comparar la resistència de les cèl·lules del llevat antagonista crescudes en els medis de melassa modificats i en el medi no modificat, examinant-ne la capacitat que van tenir a desenvolupar-se en un medi NYDA normal (a_w 0,995) i en NYDA amb l' a_w reduïda (0,95). També es va estudiar la influència de l'edat del cultiu en la resistència a l'estrès hídric. Es va demostrar que les cèl·lules de *C. sake* són més resistents a l'estrès hídric quan es troben en una fase de creixement més avançada. Així, les cèl·lules crescudes durant 24 h en els diferents medis a base de melassa no van mostrar resistència a l'estrès, ja que el recompte de viables en medi amb més baixa a_w (NYDA, a_w 0,95) van ser significativament més baixos que els que es van fer en el medi NYDA no modificat. En canvi, els recomptes de viables en medi NYDA amb estrès hídric de les cèl·lules crescudes durant 48 h en el medi melassa no modificat i en els medis modificats amb glicerol o NaCl a a_w 0,98, no van ser diferents dels recomptes en el medi NYDA no modificat. A les 72 h de creixement, les cèl·lules crescudes en la major part dels medis de melassa van mostrar gran resistència a l'estrès, excepte aquelles crescudes en el medi de melassa modificat a a_w 0,98 amb sorbitol o en els modificats a 0,96 amb sorbitol o prolina. Mackenzie i cols. (1988) ja van indicar que en cultius de *S. cerevisiae*, la generació de cèl·lules resistents té lloc en la segona meitat de la fase exponencial de creixement.

Per tant, les cèl·lules de *C. sake* crescudes en el medi de melassa no modificat, presenten una gran resistència a l'estrès hídric, inclús a les 48 h d'incubació. Per tant, en el cas que s'utilitzi el medi a base de melassa com a medi per a la producció de l'agent de biocontrol *C. sake*, podria no ser necessària la seva modificació per a obtenir una gran quantitat d'inòcul de gran qualitat. Sorprenentment, al contrari del que es podia suposar, les cèl·lules crescudes en el medi de melasses líquid amb a_w ajustada a 0,96 amb NaCl, tot i presentar l'acumulació de trealosa més gran, no van ser capaces de desenvolupar-se en el medi NYDA amb a_w 0,95.

En aquest estudi, caldria destacar que la resistència a l'estrès hídric es va relacionar amb la concentració intracel·lular de glicerol, eritritol i el total de poliols analitzats. No

obstant, els coeficients de correlació calculats van resultar baixos, 0,38, 0,36 i 0,44, respectivament. Estudis previs amb *C. sake*, van indicar el manitol com a responsable de l'increment de la resistència i aquesta va ser més gran en els medis NYDB ajustats a 0,96 d' a_w amb glucosa o glicerol que la que van presentar les cèl·lules crescudes en el medi NYDB no modificat (Teixidó i cols., 1998b). Mackenzie i cols. (1988) van demostrar una forta relació entre resistència a l'estrès hídric i acumulació de trealosa a l'interior de les cèl·lules. Altres estudis amb fongs filamentosos, agents de biocontrol d'insectes i patògens, van demostrar que l'acumulació de glicerol i eritritol en el miceli i els propàguls fúngics van millorar la germinació i/o l'extensió del tub germinatiu (Frey i Magan, 1998; Hallsworth i Magan, 1995, 1996; Pascual i cols., 1996). Els conidis dels fongs entomopatògens *B. bassiana*, *M. anisopliae* i *P. farinosus* que van acumular alts continguts de trealosa, van romandre viables durant 17 setmanes més d'emmagatzematge que aquells on no es va observar acumulació de trealosa (Hallsworth i Magan, 1994b)

Així doncs, el proper pas en l'estudi era veure si la viabilitat de l'agent de biocontrol *C. sake* en condicions de conservació es podia millorar o no amb la modificació del medi de cultiu. Donat que anteriorment, els resultats obtinguts havien demostrat que els productes liofilitzats, tot i ser viables, tenien molt poca estabilitat en el temps, vam testar un mètode de conservació que mantingués les cèl·lules en estat líquid.

3. ESTUDI DE LA CONSERVACIÓ DE L'AGENT DE BIOCONTROL *C. sake* EN SOLUCIONS ISOTÒNIQUES LÍQUIDES

Basant-nos en els assaigs anteriors, es van eliminar els medis de cultiu amb a_w de 0,96, ja que les cèl·lules crescudes en aquells medis no van mostrar un gran canvi en les reserves endògenes ni tampoc una millora substancial de la resistència a condicions d'estrès hídric. D'altra banda cal tenir en compte que l'addició de certs soluts per disminuir l' a_w incrementaria significativament el preu del medi de cultiu.

La idea era fer créixer el microorganisme en els medis de cultiu a base de melassa modificats i en el no modificat, amb la qual cosa es veurien alterades tant les reserves endògenes com el potencial hídric de les cèl·lules. Un cop crescudes, s'eliminaria el medi de cultiu i es guardarien en una solució que mantingués el potencial hídric (solució isotònica). Així doncs, el sistema cèl·lula-mediambient que l'envolta romandrien en equilibri osmòtic. Les solucions isotòniques es van preparar amb diferents soluts. Es va estudiar la seva estabilitat a 25 i a 4°C, així com també la seva efectivitat després d'un període de conservació.

3.1. Viabilitat de *C. sake* conservat amb solucions líquides isotòniques

Aquest estudi va demostrar que tant el medi de creixement com la solució amb què es preserven les cèl·lules són d'una gran importància en la viabilitat de les cèl·lules durant un procés de conservació líquida.

En l'assaig preliminar es va estudiar la viabilitat de les cèl·lules de *C. sake* crescudes en el medi de melassa amb a_w no modificada i en els d' a_w modificada a 0,98 amb els cinc soluts utilitzats anteriorment i conservades en solucions isotòniques d'arabitol, eritritol, glicerol, glicina, manitol, prolina, sorbitol o trealosa durant 10 dies a 25°C. Es va demostrar que les cèl·lules crescudes en el medi melassa no modificat i aquelles crescudes en els d' a_w modificada a 0,98 amb glicerol o sorbitol, van ser les més adequades per a ser conservades, independentment de la solució isotònica amb què es van mantenir. Per a tots els medis assajats, les cèl·lules conservades en solucions isotòniques de trealosa, glicerol i prolina van presentar la viabilitat més alta després de 10 dies de conservació a 25°C. Tot i això, les viabilitats aconseguides van ser molt baixes (< 29%). En aquest estudi també es va veure que l'augment de la concentració del solut en el medi de conservació no va implicar necessàriament un increment en la viabilitat de les cèl·lules. A més a més, quan la concentració dels soluts en el medi de conservació va ser similar (per exemple en les solucions isotòniques de les cèl·lules crescudes en el medi modificat amb NaCl o sorbitol) la viabilitat de les cèl·lules de *C. sake* després de 10 dies de conservació a 25°C va ser diferent. Així doncs, a part del medi de conservació, podria ser que el medi de creixement proporcionés unes característiques que fessin que les cèl·lules fossin més resistents durant la conservació líquida.

En el segon experiment, es va veure que la temperatura de conservació de les cèl·lules formulades amb les solucions isotòniques també juga un paper molt important. A 25°C, la viabilitat del cultiu decreix ràpidament. La viabilitat de les cèl·lules conservades a 25°C va ser del 25% després de 10 dies de conservació i inferior al 7% al cap de 30 dies. És molt probable que les cèl·lules continuïn el seu metabolisme, ja el que el potencial hídric de les solucions no és suficientment baix per aturar-lo, la temperatura és òptima per al seu desenvolupament i poden quedar restes del medi de cultiu; inclús els soluts utilitzats per ajustar el potencial del medi de conservació poden servir com a nutrients. Tant el glicerol com la trealosa poden ser utilitzats com a font de carboni per *C. sake* (Meyer i cols., 1998). En el medi modificat amb prolina, aquest aminoàcid també va donar bon creixement del llevat. En conseqüència, en no aturar-se per complet el creixement del llevat, en pocs dies s'arriba a la fase de mort de la població.

La viabilitat de les cèl·lules de *C. sake* en les solucions líquides va millorar quan es van conservar a 4°C. Tot i això, la conservació de les cèl·lules crescudes en els diferents

medis i conservades a 4°C en les solucions isotòniques de glicerol i prolina no va millorar significativament respecte la conservació en aigua o en la solució amortidora de fosfat. Al cap de 4 mesos de conservació, la viabilitat d'aquestes suspensions va ser inferior al 7%. Només en el cas de les solucions isotòniques de trealosa es va observar una notable millora, i la viabilitat de les solucions isotòniques de trealosa va ser, al cap de 4 mesos de conservació a 4°C del 20, 41 i 100% quan les cèl·lules havien crescut en el medi de melassa no modificat, modificat amb glicerol i modificat amb sorbitol, respectivament. Per aquests tractaments, la viabilitat es va continuar avaluant fins els 7 mesos. Durant aquest període de conservació, la viabilitat de les cèl·lules de *C. sake* crescudes en el medi melassa modificat amb sorbitol i conservades en la solució isotònica de trealosa es va mantenir constant i al voltant del 100%, mentre que les solucions isotòniques de trealosa de cèl·lules crescudes en els altres dos medis va baixar fins el 10%.

En l'experiment a 4°C, la viabilitat de les cèl·lules conservades en aigua, solució amortidora de fosfat o en les solucions isotòniques de glicerol o prolina va ser similar, independentment del medi de cultiu on havien crescut. No obstant, la viabilitat de les cèl·lules conservades en la solució isotònica de trealosa va ser més alta en el medi melassa modificat amb sorbitol, seguida de les cèl·lules crescudes en el medi modificat amb glicerol i, finalment, les crescudes en el medi no modificat. Curiosament, aquest increment en la viabilitat coincideix amb l'augment de trealosa en el medi de conservació. Això però, només es compleix en aquests tres medis, ja que en el primer experiment, els medis isotònics de les cèl·lules crescudes en el medi melassa modificat amb NaCl i en el modificat amb sorbitol, estaven preparats amb quantitats de trealosa similars, i la viabilitat de les cèl·lules crescudes en el medi modificat amb NaCl va ser molt més baixa que la de les crescudes en el modificat amb sorbitol.

La presència de trealosa en les solucions líquides sembla que va ajudar a mantenir la viabilitat durant la conservació. L'efecte de la trealosa com a protector enfront condicions adverses d'estrès hídric, temperatura i tolerància a l'etanol ja s'ha comentat anteriorment (Van Laere, 1989), així com també la relació entre l'acumulació de trealosa i la resistència a la congelació (Gadd i cols., 1987; Hino i cols., 1990) i a la deshidratació (Aguilera i Karel, 1997; Beker i Rapoport, 1987; Van Dijck i cols., 1995). No obstant, es desconeix el paper que pot realitzar la trealosa en la protecció de les cèl·lules durant la conservació líquida. Teixidó i cols. (1998b) van demostrar que el creixement de *C. sake* en medi NYDB ajustat a 0,97 d' a_w amb trealosa, va provocar l'augment de trealosa intracel·lular. Podria ser possible que *C. sake* tingués un transportador específic de trealosa i que introduís cap a l'interior la trealosa present en el medi de conservació. De manera similar, en les cèl·lules de *S. cerevisiae* l'addició de trealosa exògena pot substituir la síntesi endògena perquè sembla ser que té un

transportador específic de trealosa. De ser així, el contingut intracel·lular d'aquest sucre augmentaria en l'interior de les cèl·lules de *C. sake*, inhibint les activitats metabòliques i promovent la transició de les cèl·lules a un estat de repòs, tal i com va indicar Wiemken (1990). Aquest estat de repòs s'hauria vist afavorit també per la baixa temperatura a la que es va mantenir el format.

Un cop demostrada la viabilitat dels formulats, calia també demostrar-ne la seva efectivitat, ja que no té sentit produir un format viable no efectiu.

3.2. Efectivitat de les formulacions líquides isotòniques de *C. sake*

L'efectivitat dels formulats líquids de *C. sake* conservats a 4°C es va estudiar als 4 mesos de conservació en tots els tractaments, i als 7 mesos en aquells que s'havien preparat amb les solucions isotòniques de trealosa. Les cèl·lules fresques van ser efectives independentment del medi on es van produir. Als 4 mesos de conservació a 4°C, algunes de les formulacions líquides van ser tan efectives com les cèl·lules fresques. Les úniques formulacions que no van controlar la podridura causada per *P. expansum* en pomes van ser les suspensions isotòniques de prolina preparades a una concentració superior a 0,90 M. Podria ser que la prolina estimulés el desenvolupament de *P. expansum* en les ferides de les pomes. Anteriorment, Janisiewicz i cols. (1992) van demostrar que la L-prolina, a concentracions d'1 mM va estimular fortament la germinació de *P. expansum*.

En el cas de les formulacions isotòniques de trealosa també es va testar la seva efectivitat als 7 mesos de conservació. Els resultats obtinguts van demostrar que les cèl·lules formulades van resultar molt efectives en el control de *P. expansum* en pomes "Golden Delicious". La fotografia 6 mostra com a exemple l'efectivitat de les cèl·lules fresques de *C. sake* crescudes en el medi melassa modificat amb sorbitol comparat amb les cèl·lules crescudes en el mateix medi i conservades en la solució isotònica de trealosa. Aquest format va presentar una reducció en el percentatge de fruits podrits del 97% i una reducció del diàmetre de la lesió del 99%. Les cèl·lules, a més a més de ser viables, van tenir una gran capacitat per a colonitzar les ferides i impedir el desenvolupament del patogen.

Anteriorment, ja havíem comentat que algunes de les formulacions sòlides utilitzades en postcollita, com l'Aspire i el Bio-Save 10, no van presentar la mateixa eficàcia en el control de podridures que les cèl·lules fresques. Per tal de millorar-ne l'eficàcia, han sortit al mercat noves formulacions de *P. syringae* ESC-10 i ESC-11 (BioSave 100, 110 i 1000) que es comercialitzen com a pel·lets concentrats i congelats que han de ser conservats i distribuïts en condicions de congelació.



Per concloure, podem indicar que en aquest estudi es va aconseguir un formulat que va romandre estable durant 7 mesos a 4°C i que va presentar una efectivitat igual que les cèl·lules fresques. L'únic inconvenient que té és que la seva distribució i conservació s'hauria de dur a terme en condicions de refrigeració. No obstant, en els magatzems de conservació de fruita això no hauria de ser cap inconvenient, ja que tots disposen de cambres frigorífiques.



Fotografia 6. Efectivitat de l'aplicació de l'agent de biocontrol *C. sake* CPA-1 a una concentració de 10^7 ufc ml^{-1} enfront *P. expansum* (10^4 conidis ml^{-1}) en pomes "Golden Delicious". D'esquerra a dreta: pomes no tractades amb l'antagonista (testimoni), tractament amb cèl·lules fresques de *C. sake*, crescudes en el medi modificat amb sorbitol, i finalment, cèl·lules de *C. sake*, crescudes en el medi sorbitol i conservades durant 7 mesos a 4°C en una solució isotònica de trealosa. La fruita es va mantenir a 20°C durant 7 dies.

4. CONCLUSIONS

1. El mètode de congelació influeix notablement en la viabilitat de *C. sake* CPA-1, essent la congelació amb N₂ el mètode que més redueix el nombre de cèl·lules viables (52%), mentre que la congelació a -12°C o a -20°C mantenen un percentatge de cèl·lules vives més elevat que amb els altres procediments assajats (90 i 85%, respectivament).
2. D'entre tots els assajats, els millors protectors de les cèl·lules de *C. sake* enfront el procés de liofilització són la llet en pols, el glutamat sòdic, la rafinosa i la galactosa, tots ells utilitzats al 10% (p/v), amb viabilitats mitjanes del 22, 20, 19 i 17%, respectivament. A més a més, la llet i els sucres donen al producte liofilitzat una estructura porosa i fàcilment rehidratable.
3. Les combinacions de llet en pols amb glucosa, fructosa, trealosa, sacarosa, lactosa, rafinosa i sorbitol, utilitzades com agents protectors enfront la liofilització, incrementen la viabilitat de *C. sake* respecte a la llet utilitzada sola, essent la combinació 10% lactosa + 10% llet en pols la que proporciona un efecte protector més gran, incrementant la viabilitat de les cèl·lules fins el 40%.
4. El medi de rehidratació és un factor important en la recuperació de les cèl·lules de *C. sake* CPA-1 liofilitzades. La rehidratació de les cèl·lules liofilitzades mitjançant la utilització d'una solució al 10% de llet en pols o amb la mateixa solució que s'utilitza com a protector durant la liofilització, millora la seva recuperació.
5. Utilitzant la combinació de 10% llet en pols + 10% lactosa durant la liofilització i rehidratant les cèl·lules amb 10% de llet en pols, s'aconsegueix incrementar la viabilitat de les cèl·lules de *C. sake* CPA-1 fins un 85% de mitjana.
6. L'efectivitat de les cèl·lules de *C. sake* CPA-1 liofilitzades en el control de *P. expansum* en pomes "Golden Delicious" és significativament més baixa que la de les cèl·lules fresques aplicades a la mateixa concentració. Les cèl·lules liofilitzades utilitzant com a protector la solució que conté 10% de llet en pols + 10% de lactosa i rehidratades amb peptona a l'1% presenten una reducció de la incidència del 66% i de la severitat d'un 74%.
7. La viabilitat de les cèl·lules liofilitzades de *C. sake* CPA-1 disminueix significativament durant la seva conservació. En el millor dels casos, després d'un període de conservació de 2 mesos a 4°C, només el 10% de les cèl·lules romanen viables.

8. Les condicions de creixement de l'antagonista *C. sake* CPA-1 en medi melassa sòlid a 25°C estan limitades per una a_w de 0,94 en presència de NaCl o de 0,92 en presència de glicerol, sorbitol, glucosa o prolina. *C. sake* creix poc i molt lentament en a_w per sota de 0,96.
9. En cadascun dels soluts analitzats, el creixement de *C. sake* CPA-1 en medi melassa líquid modificat amb a_w de 0,96 és menor que en 0,98, excepte pel glicerol. El NaCl és el solut que mostra un efecte més negatiu per al creixement de *C. sake*. La població obtinguda amb els medis amb a_w modificada a 0,98 amb prolina o sorbitol és igual o inclús superior que l'obtingut en el medi melasses no modificat (a_w 0,996).
10. El potencial hídric de les cèl·lules (Ψ_c) crescudes en el medi melassa no modificat, està entre -0,28 i -0,41 MPa. El potencial hídric de les cèl·lules decreix quan disminueix el potencial del medi de cultiu, essent el NaCl el solut que provoca una disminució més marcada del potencial hídric de les cèl·lules i la glucosa el que menys.
11. Les cèl·lules de *C. sake* CPA-1 crescudes en el medi melassa no modificat (a_w 0,996) acumulen glucosa, glicerol i manitol, independentment del temps d'incubació. L'eritritol i l'arabitol no s'acumulen fins les 48 h d'incubació, i la trealosa fins les 72 h.
12. El glicerol i l'arabitol són els principals soluts compatibles acumulats en resposta a la disminució de l' a_w del medi de cultiu, mentre que la concentració intracel·lular de glucosa i manitol no varia amb l' a_w .
13. El temps d'incubació de les cèl·lules de *C. sake* CPA-1 té una gran influència en la seva resistència a l'estrès hídric. A mesura que s'incrementa l'edat del cultiu, n'augmenta la seva resistència.
14. Les cèl·lules de *C. sake* CPA-1 incubades durant 48 h en el medi melassa no modificat i en els modificats a a_w 0,98 amb l'addició de glicerol o NaCl, presenten una gran resistència a l'estrès hídric.
15. La resistència de les cèl·lules de *C. sake* CPA-1 a l'estrès hídric es relaciona positivament amb la concentració intracel·lular de glicerol, eritritol i el total de poliols acumulats, amb uns coeficients de correlació de 0,38, 0,36 i 0,44, respectivament.

16. Els millors medis per a la producció de cèl·lules de *C. sake* CPA-1 més resistents a la conservació líquida són el de melassa no modificat i els d' a_w 0,98 modificada amb glicerol o sorbitol. Les millors solucions isotòniques per a la conservació de l'agent de biocontrol són les de trealosa, glicerol i prolina.
17. Entre totes les solucions isotòniques assajades, aquelles que contenen trealosa mostren un gran efecte estabilitzador de les cèl·lules de *C. sake* CPA-1. Després de 4 mesos de conservació a 4°C, la viabilitat observada és del 20, 41 i 100% quan les cèl·lules han crescut en el medi no modificat, modificat a a_w 0,98 amb glicerol i modificat amb sorbitol, respectivament.
18. Les solucions isotòniques de *C. sake* amb glicerol i trealosa i les conservades amb aigua a 4°C durant 4 mesos, són efectives contra *P. expansum* en pomes. Les solucions isotòniques de prolina de concentració >0,90 M no redueixen ni la incidència ni la severitat de la malaltia.
19. Les formulacions isotòniques de trealosa preparades amb cèl·lules crescudes en el medi de melassa no modificat i en els d' a_w modificada a 0,98 mitjançant l'addició de glicerol o sorbitol són igualment efectives en el control de *P. expansum* en poma "Golden Delicious" després de 7 mesos de conservació a 4°C.
20. El formulat líquid obtingut a partir de cèl·lules crescudes en el medi sorbitol amb a_w 0,98, conservades en solucions isotòniques de trealosa durant 7 mesos a 4°C, mostren una viabilitat del 100% i un control de la incidència del *P. expansum* en pomes "Golden Delicious" de gairebé el 100%.

CONCLUSIONS

1. The freezing method significantly influenced *C. sake* CPA-1 cell viability. Freezing with N₂ was the method that reduced the number of viable cells (52%) the most, while freezing at -12°C or at -20°C maintained a higher percentage of viable cells than the other methods tested (90 and 85%, respectively).
2. Among all tested treatments, powdered skimmed milk, sodium glutamate, raffinose and galactose, all at 10% concentration (w/v), were the best protectants for *C. sake* cells against freeze-drying, with viabilities of 22, 20, 19 and 17%, respectively. Moreover, skimmed milk and sugars provided the freeze-dried product with a porous structure that made rehydration easier.
3. Viability of *C. sake* after freeze-drying increased when combinations of skimmed milk and glucose, fructose, trehalose, sucrose, lactose, raffinose and sorbitol were used. The combination of 10% lactose + 10% skimmed milk resulted in a higher protective effect, increasing the viability of cells by up to 40%.
4. Rehydration medium was an important factor in the recovery of freeze-dried *C. sake* cells. Cells rehydrated using a solution of 10% skimmed milk or the same solution which has been used for protecting the cells against freeze-drying improve their recovery.
5. The viability of *C. sake* cells increased by up to 85% using the combination of 10% skimmed milk + 10% lactose as a protectant in the freeze-drying process and rehydrating the freeze-dried cells with 10% skimmed milk.
6. The efficacy of freeze-dried *C. sake* cells against *P. expansum* on Golden Delicious apples was significantly lower than that obtained with fresh cells applied at the same concentration. Freeze-dried *C. sake* cells using 10% skimmed milk and 10% lactose as a protectant and 1% peptone as a rehydration medium reduced the incidence and severity of decay by 66 and 74%, respectively.
7. Viability of *C. sake* cells decreased significantly during its preservation. In the best treatments, after 2 months preservation at 4°C, only 10% of cells remain viable.
8. Growth conditions of the antagonist *C. sake* in a solid molasses medium at 25°C was limited at 0.94 a_w in the presence of NaCl or 0.92 in the presence of glycerol, sorbitol, glucose or proline. *C. sake* grows poorly and slowly when the a_w is lower than 0.96.

9. For each solute studied, growth of strain CPA-1 of *C. sake* in liquid molasses media modified to 0.96 a_w was lower than at 0.98, except for glycerol. NaCl shows a negative effect on *C. sake* growth. Populations obtained in media modified to 0.98 a_w with proline or sorbitol was equal or even higher than that obtained in the unmodified a_w medium (a_w 0.996)
10. Water potential of *C. sake* cells (ψ_c) grown in the unmodified molasses medium was in the range -0.28 and -0.41 MPa. Water potential of cells decreases with decreasing water potential of the growth medium. NaCl is the solute that caused the most marked decrease of cell water potential and glucose the least.
11. *C. sake* cells grown in the unmodified molasses medium (a_w 0.996) accumulate glucose, glycerol and mannitol, regardless of culture age. Erythritol and arabitol were not accumulated until 48 h incubation and trehalose until 72 h.
12. Glycerol and arabitol were the main compatible solutes accumulated in response to lowered a_w of growth medium, while intracellular concentration of glucose and mannitol does not change with a_w .
13. The age of the culture of *C. sake* cells had a profound influence on its resistance to water stress. As the age of the culture increased, an increase in its resistance was observed.
14. *C. sake* cells grown for 48 h in the unmodified molasses medium and in media modified to 0.98 a_w with the addition of glycerol or NaCl showed the highest resistance to water stress.
15. Water stress resistance of *C. sake* cells was correlated positively with the intracellular concentration of glycerol, erythritol and the total polyols accumulated, with Pearson coefficients of 0.38, 0.36 and 0.44, respectively.
16. *C. sake* cells grown in the unmodified molasses medium and in that modified to 0.98 a_w with the addition of glycerol or sorbitol were more resistant to a liquid preservation process.
17. Among all the isotonic solutions tested, those that contained trehalose showed an important stabilizing effect in *C. sake* cells. After 4 months preservation at 4°C, the viability observed was 20, 41 and 100% when the cells were grown in the unmodified molasses medium and in these modified to 0.98 a_w with the addition of glycerol or sorbitol, respectively.

18. Glycerol and trehalose isotonic liquid solutions of *C. sake* stored at 4°C for 4 months were effective in controlling *P. expansum* rot on apples. Isotonic proline solutions with proline concentration >0.90 M did not reduce incidence or the severity of decay.
19. Isotonic liquid solutions of trehalose prepared with cells grown in the unmodified molasses medium and in those modified to 0.98 aw with the addition of glycerol or sorbitol and preserved at 4°C were equally effective in controlling *P. expansum* on Golden Delicious apples.
20. Liquid formulations obtained from cells grown in the sorbitol modified medium to 0.98 a_w , preserved with trehalose isotonic solutions at 4°C for 7 months had 100% viability and completely controlled the incidence of *P. expansum* on Golden Delicious apples.

5. PERSPECTIVES DE FUTUR

Un cop arribat aquest punt de la tesi, no podem dir que aquest en sigui el final. Més aviat, i tal i com indica el títol, hem trobat algunes de les bases per a la formulació de l'agent de biocontrol *C. sake* i hem deixat un ventall de possibilitats obertes per a continuar amb les investigacions.

Cal destacar que l'estudi dels biopesticides a la UE està esdevenint un objectiu prioritari en el camp de la investigació agrària i alimentària. Tant és així que aquest any s'ha concedit un PROJECTE EUROPEU on intervenen el Laboratori de Patologia del Centre UdL-IRTA i el Departament de Tecnologia d'Aliments de la UdL com a coordinador. Aquest projecte està destinat a la producció, formulació, estudi dels modes d'acció, marcatge molecular, combinació amb diferents mètodes fisicoquímics i aplicació a petita i gran escala de quatre agents de biocontrol, entre els quals es troba el llevat *C. sake* CPA-1 i un altre agent descobert també en el laboratori de Patologia del Centre UdL-IRTA, *Pantoea agglomerans* CPA-2, una bactèria efectiva en el control de malalties de postcollita en cítrics. A més a més d'onze centres de recerca de set països de la UE hi participen vuit empreses del sector agrícola. Queda doncs palesa la importància que tenen els agents de biocontrol, no tan sols a nivell de la investigació més bàsica sinó també a nivell pràctic.

No s'ha d'oblidar que si volem que el control biològic esdevingui una realitat com a alternativa als productes químics de síntesi en el control de malalties en postcollita, s'ha de trobar una formulació òptima del producte, que el mantingui viable, estable i en faciliti la seva distribució i aplicació, i que posteriorment, aquesta formulació ha de passar per un procés de registre.

Hem aconseguit una formulació líquida, d'alta viabilitat i que manté la seva efectivitat inclús després de 7 mesos de conservació a 4°C, només amb l'addició d'un sucre, la trealosa i fent créixer el microorganisme amb un medi melasses amb a_w modificada amb sorbitol. No obstant, crec que seria molt interessant estudiar en profunditat l'efecte de la trealosa i el medi de cultiu. La trealosa és un sucre molt car i l'addició de sorbitol al medi de cultiu també repercutiria en el preu del producte final. Així doncs, una futura línia d'investigació es podria destinar a estudiar si es pot reduir la concentració de trealosa en el producte formulat quan les cèl·lules s'han produït en el medi modificat amb sorbitol o incrementar-ne la concentració en el medi melassa no modificat. En aquest cas, potser obtindríem un efecte similar i no caldria modificar el medi de cultiu. Una altra alternativa seria augmentar la concentració de cèl·lules en el producte, per abaratir-ne els costos de distribució.

De les conclusions que s'han derivat d'aquest estudi, jo no descartaria totalment la liofilització com a mètode de deshidratació, ja que s'ha vist que en un medi que podria utilitzar-se per a la producció industrial de *C. sake*, s'obté una gran quantitat d'inòcul i que a més a més aquest inòcul és resistent a condicions d'estrès. Caldria doncs, estudiar si les cèl·lules produïdes en aquest medi a base de melasses amb a_w no modificada o algun dels medis en el que s'ha modificat, són més resistents a la liofilització que aquelles produïdes amb el medi sintètic NYDB. Les condicions de liofilització també podrien ser millorades: una optimització del temps del procés, per a què la humitat del producte no fós tan baixa, potser augmentaria la viabilitat de les cèl·lules. Altres aspectes en els que es podria aprofundir podrien ser la velocitat de congelació, així com també la pressió en el liofilitzador.

També convindria estudiar la possibilitat de conservar les cèl·lules liofilitzades en condicions de buit o en atmosfera inert, inclús l'estudi de l'addició d'algun agent antioxidant. No obstant, caldria recordar que es tracta d'un agent biològic, amb el que s'intenta reduir l'addició de productes de síntesi en els aliments. Caldria tenir molta cura, doncs, en l'addició de qualsevol producte químic que podria contradir aquesta "filosofia" de producte biològic.

Tot i que hem vist que l'efectivitat de les cèl·lules liofilitzades és una mica inferior a les cèl·lules fresques, es podria optimitzar la seva aplicació, per exemple, allargant el període de suspensió de les cèl·lules en el medi de rehidratació.

Segons la bibliografia, l'augment de trealosa intracel·lular en les cèl·lules de *C. sake* podria ser un factor clau per a mantenir la seva viabilitat quan són sotmeses a un procés de deshidratació. Hem vist que la modificació de l'activitat d'aigua del cultiu no augmenta significativament la concentració de trealosa en les cèl·lules de *C. sake*. Per tant, caldria estudiar la possibilitat d'afegir algun micronutrient en el medi de cultiu o variar les condicions de creixement per afavorir-ne la seva síntesi.

Desitjo que els resultats obtinguts en aquesta tesi i les idees aportades siguin útils per a què en un futur els agents de biocontrol esdevinguin una realitat i puguem consumir, així, una fruita lliure de residus i amb mètodes de producció més respectuosos amb el medi ambient.

6. REFERÈNCIES

- Aguilera, J.M., Karel, M. 1997. Preservation of biological materials under desiccation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37: 287-309.
- Beever, R.E., Laracy, E.P. 1986. Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.*, 168: 1358-1365.
- Beker, M.J., Rapoport, A.I. 1987. Conservation of yeasts by dehydration. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 35:127-171.
- Berny, J.F., Hennebert, G.L. 1991. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, 83: 805-815.
- Blomberg, A., Adler, L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. A: *Advances in microbial physiology*. Rose, A.H. (Ed.), Academic Press, London, pp. 145-212.
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., García, N., Viñas, I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.*, in press.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M. 1986. Stabilization of membranes in anhydrobiotic organisms. A: *Membranes, metabolism and dry organisms*. Leopold, A.C. (Ed.), Cornell University Press, Ithaca, pp. 188-209.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Brochu, E., Beaulieu, Y. 1991. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Can. Inst. Sci. Technol. J.*, 24: 118-128.
- Efiuvwevwe, B.J.O., Gorris, L.G.M., Smid, E.J., Kets, E.P.W. 1999. Mannitol-enhanced survival of *Lactococcus lactis* subjected to drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 100-104.
- El-Sadek, G.M., Shehata, A.E., Shassaw, A.A. 1975. The effect of freeze-drying on viability and activity of lactic streptococci cultures. *Egypt. J. Dairy Sci.*, 3: 38-42.
- Font de Valdez, G., de Giori, G.S., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G. 1983. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology*, 20: 560-566.
- Font de Valdez, G., de Giori, G.S., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G. 1985. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, 49: 413-415.
- Frey, S., Magan, N. 1998. Improving quality and quantity of *Ulocladium atrum* for enhanced biological control of *Botrytis cinerea*. *Proceedings of British Crop Protection Conference-Pests and diseases*. Brighton, pp. 305-306.
- Gadd, G.M., Chalmers, K., Reed, R.H. 1987. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 48: 249-254.

- Hallsworth, J.E., Magan, N. 1994a. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology*, 140: 2705-2713.
- Hallsworth, J.E., Magan, N. 1994b. Improved biological control by changing polyols/trehalose in conidia of entomopathogens. *Proceedings of British Crop Protection Conferences-Pests and Diseases*, Brighton, pp. 1091-1096.
- Hallsworth, J.E., Magan, N. 1995. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology-UK*, 141: 1109-1115.
- Hallsworth, J.E., Magan, N. 1996. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2435-2442.
- Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K., Takano, H. 1990. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1286-1391.
- Hobot, J., Jennings, D.H. 1981. Growth of *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to pH and salinity. *Exp. Mycol.*, 5: 217-228.
- Hocking, A.D. 1993. Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. A: *Stress tolerance of fungi*. Jennings, D.H. (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 233-256.
- Janisiewicz, W.J., Usall, J., Bors, B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology*, 82: 1364-1370.
- Janisiewicz, W.J., Jeffers, S.N. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Prot.*, 16: 629-633.
- Jennings, D.H. 1995. Water relations and salinity. A: *The physiology of fungal nutrition*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 398-446.
- Kelly, D.J.A., Budd, K. 1990. Osmotic adjustment in the mycelial ascomycete *Neocosmospora vasinfecta*. *Exp. Mycol.*, 15: 55-64.
- Kirsop, B.E., Doyle, A. (Eds.). 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells. Academic Press, London.
- Lapage, S.P., Redway, D.F. 1974. Preservation of bacteria with notes on other microorganisms. HMSO, London.
- Mackenzie, K.F., Singh, K.K., Brown, A.D. 1988. Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 1661-1666.
- Magan, N. 1997. Fungi in extreme environments. A: *The Mycota IV. Environmental and microbial relationships*. Wicklow, B., Söderström, D.T. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 99-114.

- Meyer, S.A., Payne, R.W., Yarrow, D. 1998. Descriptions of anamorphic ascomycetus genera species. A: *The yeasts. A taxonomic study*. Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.). 4th Ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 437-605.
- Moriche, T. 1970. Nature and action of protective solutes in freeze-drying of bacteria. Proceedings of the First International Conference on Culture Collections. Tokyo, p. 121.
- Papendick, R.I., Mulla, D.J. 1986. Basic principles of cell and tissue water relations. A: *Water, fungi and plants*. Ayres, P.G., Boddy, L. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-25.
- Pascual, S., Magan, N., Melgarejo, P. 1996. Improved biocontrol of peach twig blight by physiological manipulation of *Epicoccum nigrum*. Proceedings of British Crop Protection Conference-Pests and Diseases. Brighton, pp. 411-412.
- Pedreschi, F., Aguilera, J.M. 1997. Viability of dry *Trichoderma harzianum* spores under storage. *Bioprocess Eng.*, 17: 177-183.
- Pfyffer, G.E., Rast, D.M. 1988. The polyol pattern of fungi as influenced by the carbohydrate nutrient source. *New Phytol.*, 109: 321-326.
- Ray, B., Jezeski, J.J., Busta, F.F. 1971. Effect of rehydration on recovery, repair and growth of injured freeze-dried *Salmonella anatum*. *Appl. Microbiol.*, 22: 184-189.
- Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R., Gadd, G.M. 1987. Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2119-2123.
- Rhodes, D.J. 1993. Formulation of biological control agents. A: *Exploitation of microorganisms*. Jones, D.G. (Ed.), Chapman & Hall, London, pp. 411-439.
- Sinha, R.N., Shukla, A.K., Lal, M., Ranganathan, B. 1982. Rehydration of freeze-dried cultures of lactic streptococci. *J. Food Sci.*, 47: 668-669.
- Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. 1978. Production of polyhydroxy alcohols by osmotolerant yeasts. A: *Economic microbiology*. Vol. 2. Rose, A.H. (Ed.). Academic Press, London, pp. 393-425.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N. 1998a. Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology*, 88: 960-964.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N. 1998b. Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* by manipulation of intracellular sugar alcohol and sugar content. *Mycol. Res.*, 102: 1409-1417.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Sanchis, V., Magan, N. 1998c. Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* to water, temperature and pH stress. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 192-200.

- Usall, J. 1995. Control biològic de *Penicillium expansum* en postcollita de fruita de llavor. Tesi doctoral. Universitat de Lleida, Lleida.
- Utkhede, R.S., Smith, E.M. 1997. Effectiveness of dry formulations of *Enterobacter agglomerans* for control of crown and root rot of apples trees. Can. J. Plant Pathol., 19: 397-401.
- Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P., Thevelein, J.M. 1995. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. Appl. Environ. Microbiol., 61: 109-115.
- Van Eck, J.H., Prior, B.A., Brandt, E.V. 1993. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. J. Gen. Microbiol., 139: 1047-1054.
- Van Laere, A. 1989. Trehalose, reserve and/or stress metabolite? FEMS Microbiol. Rev., 63: 201-210.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Sanchis, V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. Int. J. Food Microbiol., 40: 9-16.
- Wiemken, 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. Antonie van Leeuwenhoek, 58: 209-217.



M. ABADIAS

BASES PER A LA FORMULACIÓ DE L'AGENT DE BIOCONTROL *Candida sake* CPA-1

El control de les malalties de postcollita de fruita mitjançant la utilització de microorganismes antagònics s'ha presentat com l'alternativa més prometedora als productes químics de síntesi. La soca CPA-1 del llevat *Candida sake* aïllada i desenvolupada en el laboratori de Patologia del Centre UdL-IRTA, ha demostrat ser un excel·lent agent de biocontrol en fruita de llavor.

En aquesta tesi s'estudien aspectes fonamentals i aplicats per tal d'obtenir formulacions efectives d'aquest agent de biocontrol, necessàries per a la seva aplicació comercial. La liofilització s'apunta com un possible mètode de deshidratació del llevat *C. sake*. Els estudis ecofisiològics realitzats han servit de base per a desenvolupar una formulació isotònica líquida que presenta resultats molt interessants.

BASES FOR THE FORMULATION OF THE BIOCONTROL AGENT *Candida sake* CPA-1

Biological control of postharvest diseases of fruit using antagonistic microorganisms has emerged as the most promising alternative to chemicals. The strain CPA-1 of the yeast *Candida sake* isolated and developed in the Pathology laboratory of the UdL-IRTA Centre has shown to be an excellent biocontrol agent of pome fruit.

In this thesis, fundamental and applied studies have been carried out in order to obtain effective formulations of this biocontrol agent. Such formulations are needed for its commercial application. Freeze-drying may be suggested as a possible method for *C. sake* dehydration. Ecophysiological studies have been used to develop an isotonic liquid formulation that has shown interesting results.

