

Perspectivas del empleo del control biológico en post-cosecha de fruta

Los estudios realizados por los investigadores del Centre UdL-IRTA han permitido patentar dos agentes de biocontrol

En el campo agroalimentario, el concepto de calidad ha ido cambiando a lo largo del tiempo y, en los últimos años, algunos sectores han empezado a valorar los productos producidos mediante métodos más ecológicos y respetuosos con el medio ambiente que los utilizados tradicionalmente, al darse cuenta que hay que producir y consumir pensando en la sostenibilidad del Planeta.

La fruta, consumida mayoritariamente en fresco, no es una excepción. Pero ésta, al ser un producto perecedero, precisa de una tecnología adecuada para su conservación, conservando en el tiempo sus características organolépticas, así como su apariencia. Para poder conseguir estos objetivos hay que hacer frente a varios problemas, entre ellos, la pérdida de peso, las alteraciones fisiológicas y las patológicas, en estas últimas, los mohos son sus principales causantes. Desgraciadamente, las mismas enfermedades de post-cosecha que se presentaban hace más de 60 años, todavía hoy causan pérdidas económicas, aunque no en la misma intensidad.

Problemática de la utilización de productos químicos

Históricamente, las pérdidas causadas por esas enfermedades se han intentado paliar mediante la utilización de productos químicos de síntesis. Este método es actualmente el más utilizado, fundamentalmente a causa de su relativo bajo coste y la comodidad en su aplicación. Pero la utilización masiva de estos pesticidas, y en algunos casos poco controlada, ha generado una serie de problemas como son la aparición de cepas fúngicas resistentes a los fungicidas habitualmente utilizados, el incremento de residuos en los frutos y la posible aparición de enfermedades iatrogénicas.

Debido al problema que representan los residuos de productos químicos para la salud humana, los diferentes Estados y en especial los más desarrollados económicamente han establecido una serie

Actualmente se estudian diversos métodos alternativos a los procedimientos habituales de control de plagas y enfermedades de la fruta en post-cosecha, algunos de los cuales se utilizan ya a nivel comercial, como el empleo de microorganismos antagonísticos, método en el que se centra el presente artículo. La fruta almacenada en cámaras frigoríficas supone una buena oportunidad para emplear sistemas de lucha biológica en el control de las enfermedades de post-cosecha, puesto que la fruta se encuentra bajo condiciones ambientales controladas, tanto de humedad relativa y temperatura como por la concentración de gases.

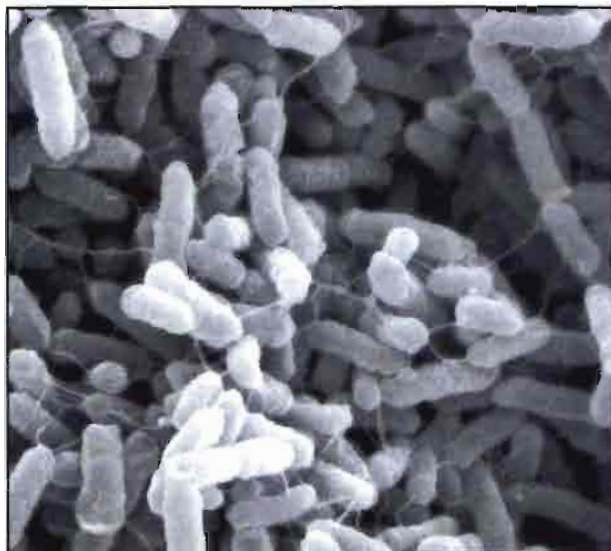
J. Usall, N. Teixidó, M. Abadías, R. Torres, I. Viñas.

Unitat de Patologia. Àrea de Postcollita.
CeRTA. Centre UdL-IRTA.

de límites máximos de residuos (LMR) bastante restrictivos, en muchos casos por debajo de los recomendados por el "Codex Alimentarius" (FAO/OMS). La existencia de diferencias entre los Estados miembros de la UE, con respecto a los contenidos máximos permitidos de estos residuos de plaguicidas, representa en algunos casos una barrera para el comercio y en especial para las exportaciones de nuestra fruta al resto de los países de la UE. Para eliminar estos obstáculos y favorecer la libre circulación de mercancías, el Consejo de la UE en la Directiva 76/895/CEE y la modificada en la 89/186/CEE, intenta uniformizar las legislaciones de los diferentes Estados, objetivo que no se ha conseguido todavía, ya que queda por regular la mayoría de los plaguicidas.

La sociedad actual se encuentra ante un dilema a este respecto, por un lado hay una demanda creciente de productos de alta calidad, con buen aspecto físico y estado sanitario adecuado, lo que representa obtener fruta lo más limpia posible y por lo tanto libre de podredumbres. Por otro lado, la mayoría de los métodos utilizados de forma habitual para controlar plagas y enfermedades son poco adecuados por todos los problemas ambientales y de salud que comportan.

Toda esta problemática ha hecho reflexionar a la Opinión Pública, que solicita productos cada vez menos tóxicos y un medio ambiente menos contaminado. La preocupación es creciente en estos temas y lo que actualmente puede suponer un incremento en el precio de venta de los productos obtenidos mediante métodos respetuosos con el medio ambiente, puede llegar a ser, en los próximos años, una razón "sine qua non" de venta. En esta línea, muchas cadenas de supermercados europeas están exigiendo a los productores normas mucho más estrictas de producción y manejo de la fruta, un ejemplo claro es la reciente aparición de las normas EUREP, que vienen a unirse a las de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico de la Administración Sanitaria o a las de producción integrada de algunas comunida-



Observación al microscopio electrónico de barrido de los agentes de biocontrol *C. sake* CPA-1 y *P. agglomerans* CPA-2.

des autónomas. Todas estas normativas favorecen la futura implantación de sistemas de control biológico.

Sistemas alternativos

Estos factores anteriormente descritos han incentivado los estudios de métodos alternativos a los procedimientos habituales de control de plagas y enfermedades. Para buscar un sistema alternativo hay que tener en cuenta los siguientes conceptos preliminares:

- El nuevo sistema de control, a la larga, no ha de generar los mismos problemas ni otros peores que los surgidos con los productos químicos de síntesis.

- Se tiene que introducir paralelamente el concepto de umbral de daño económico, es decir, convivir con un nivel de daño que sea compatible con nuestra estrategia comercial, no hay que pensar en niveles de control totales.

- El concepto de control ha de ir relacionado con el de calidad, ya que los sistemas alternativos no han de actuar negativamente contra el concepto global de calidad, el cual incluye la no presencia de residuos químicos perjudiciales para la salud.

- Se tiene que educar a los consumidores, para que entiendan que la apariencia exterior no es siempre síntoma de "buena" fruta.

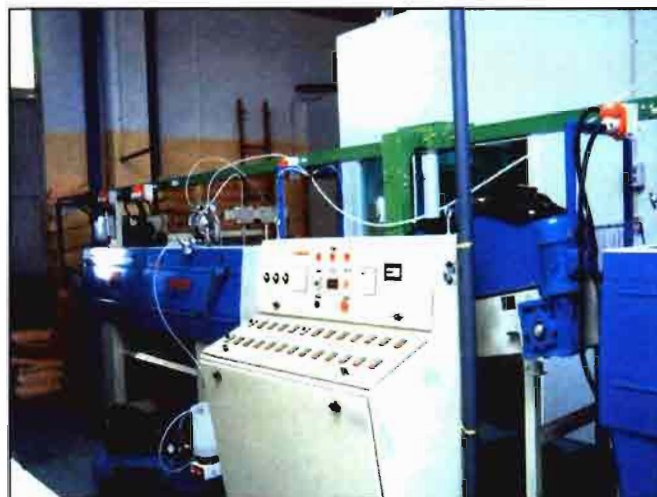
Entre los sistemas alternativos estudiados podemos destacar:

- Atmósferas controladas.
- Medidas profilácticas.
- Incremento e inducción de la resistencia natural.
- Tratamientos de calor.
- Tratamientos con gases (CO₂, Ozono, O₂, ...).
- Pesticidas naturales.
- Productos químicos de bajo riesgo.
- Irradiación.
- Revestimientos.
- Microorganismos antagonicos.

La mayoría de ellos están en fase experimental o han sido descartados por su elevado coste de aplicación o por su insuficiente capacidad de control. Pero hay algunos de ellos que ya se están utilizando a nivel comercial, entre los que destacan los baños de carbonato sódico con agua caliente en cítricos y los agentes de biocontrol. En este artículo vamos a centrarnos en este segundo método, la utilización de microorganismos antagonicos.



Ensayo de efectividad a nivel laboratorio de la levadura *C. sake* en el control de *Penicillium expansum* en manzanas Golden Delicious dañadas e inoculadas con el patógeno. Se puede observar el testigo totalmente podrido en comparación al tratamiento biológico.



Vista general de una línea de tratamientos de planta piloto utilizada en ensayos de efectividad en la que pueden reproducirse fielmente las condiciones comerciales usuales.

Control biológico

Definición y antecedentes

En 1988 Nigam y Mukerji indicaban que el control biológico es la manipulación directa o indirecta por parte del hombre de los agentes vivos que, de forma natural, tienen capacidad de control provocando, esta manipulación, un incremento de su capacidad de inhibición de las enfermedades. Apuntaban también que la relación biológica entre los agentes de control y los patógenos es bastante específica, de tal forma que se debe buscar un método de control para cada enfermedad.

Debemos remarcar que la fruta almacenada en cámaras frigoríficas representa una buena oportunidad para utilizar sistemas de

lucha biológica, para el control de las enfermedades de post-cosecha, ya que la fruta se encuentra bajo condiciones ambientales controladas, tanto en humedad relativa, temperatura, como por la concentración de gases.

La supervivencia del antagonista en el hábitat bajo las condiciones ambientales a las que ha de proteger el material vegetal, será uno de los principales factores que determinen su utilidad como agente de biocontrol. En el caso de la post-cosecha el antagonista deberá sobrevivir y conservar su efectividad después de exponerlo a tratamientos de post-cosecha y bajo condiciones de almacenamiento, tanto de humedad relativa como a bajas temperaturas, y a diversas relaciones de O₂/CO₂ (Janisiewicz, 1991). Algunos microorganismos, sobretodo las levaduras, pueden crecer y sobrevivir sin agua libre si tienen la humedad relativa alta en la atmósfera. Por otra parte, las bajas temperaturas pueden permitir una buena supervivencia de los antagonistas pero disminuir su efectividad.

Modos de acción de los agentes de biocontrol

Según Droby y Chalutz (1994), el conocimiento del modo de acción de los antagonistas es importante por toda una serie de razones: para la optimización de los métodos y los momentos de aplicación de los antagonistas; para el desarrollo de formulaciones apropiadas que incrementen su utilización, pues proporciona una buena base para seleccionar nuevos antagonistas efectivos y, finalmente, para el registro de los agentes de biocontrol para su posterior uso comercial. Los principales modos de acción referenciados han sido:

a) Competencia por los nutrientes y/o el espacio

Los antagonistas que tienen este tipo de modo de acción a menudo están mejor adaptados a las condiciones adversas del medio que los patógenos. El antagonista ha de mostrar un rápido crecimiento en las heridas, tiene que ser capaz de utilizar nutrientes a bajas concentraciones y sobrevivir y desarrollarse en la superficie del fruto o en el lugar de infección a bajas temperaturas, pH extremos o condiciones osmóticas que no son beneficiosas para el crecimiento del patógeno. Normalmente, en este tipo de antagonismo, se inhibe el desarrollo del patógeno, pero no se le destruye.

b) Por producción de antibióticos y otros inhibidores

En la búsqueda de antagonistas naturales para el control de las enfermedades de post-cosecha, también se ha apuntado en algunos casos que la causa de la inhibición del crecimiento del patógeno podría ser la producción de algún antibiótico por parte del antagonista, este es el caso de *Pseudomonas cepacia*, productora de Pirrolnitrina y que controla un amplio abanico de patógenos en distintos frutos, entre los cuales destaca *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en fruta de pepita (Janisiewicz y Roitman, 1988).

c) Por inducción de procesos de resistencia en el huésped

La presencia de algunos metabolitos secundarios producidos por algunos microorganismos puede inducir a procesos de resistencia en el huésped, como en la producción de sustancias inhibitoras, en estos casos no se elimina el patógeno en su totalidad, pero se mantiene bajo unos niveles económicamente aceptables (Schönbeck y Dehne, 1988).

d) Por interacción directa con el patógeno

Existe suficiente bibliografía sobre la acción de bacterias del suelo que producen la lisis de esporas fúngicas, tubos germinativos e hifas. En cambio hay pocas referencias de esta acción en hojas, y mucho menos en post-cosecha de fruta (Blakeman y Brodie, 1976).

e) Efecto del pH

La existencia de un pH inadecuado en el lugar de actuación del patógeno puede inhibir su desarrollo. Los agentes de biocontrol podrían actuar variando el pH de la fruta, para que éste fuera desfavorable al crecimiento de los patógenos.

Programa de control biológico

Para que un microorganismo se convierta en un agente de biocontrol y pueda comercializarse, es imprescindible la colaboración de todos los grupos implicados en el proceso, entre los que se incluye a los investigadores y a las empresas del sector de los agroquímicos. Al contrario de lo que cabría esperar, en algunos momentos estas empresas han actuado en contra de estos nuevos métodos, por temor a su competencia. Aunque actualmente muchas de ellas han iniciado programas de investigación para desarrollar productos alternativos a los químicos de síntesis.

Las etapas a cubrir son las siguientes:

- Descubrimiento e identificación del agente de biocontrol (aislamiento).



Sistema de baño para ensayos de efectividad a pequeña escala.

- Realización de los ensayos de eficacia.
- Realización de los ensayos de seguridad, tanto para el hombre como para el ambiente, y para los organismos que no ha de controlar.
- Estudio de la estabilidad genética del agente de biocontrol, ya que durante su utilización no tendría que perder su virulencia.
- Estudio de su potencial para la producción en masa.
- Formulación del agente de biocontrol con elementos que incrementen su eficacia.
- Realización de ensayos de estabilidad y caducidad del producto.
- Estudio del mercado potencial.
- Evaluación de los costes del producto.
- Realización de análisis de inversiones.
- Realización de ensayos a nivel comercial.
- Patente del agente de biocontrol.



Fermentador de laboratorio en el que se lleva a cabo la optimización de la producción de los diversos agentes de biocontrol estudiados.

- Registro del agente de biocontrol.
- Comercialización y venta del pesticida biológico a los usuarios.

Un aspecto muy importante en la comercialización de los agentes de biocontrol es la aceptación por parte de la sociedad de la aplicación de microorganismos "vivos" en los alimentos. Esta idea no es nueva ya que, desde tiempos muy antiguos, las fermentaciones mediante microorganismos ha sido un método importante para preservar los alimentos. La adición de microorganismos en la preparación del pan y en productos derivados de la leche ha sido ampliamente aceptada. Por esto parece que la sociedad aceptaría los antagonistas microbianos si éstos llegasen a ser una alternativa segura y efectiva a los fungicidas sintéticos (Wilson y cols., 1991).

Si lo analizamos a nivel de competitividad, podremos ver que los agentes de biocontrol tienen grandes ventajas frente a productos de síntesis, las cuales se podrían resumir en:

- Actualmente las empresas de agroquímicos no están desarrollando nuevos productos químicos de síntesis para post-cosecha de fruta.
- El coste de los ensayos de toxicología oscila entre los 80.000 y los 150.000 dólares y pueden realizarse en 6 meses. En cambio, un estudio toxicológico para un producto químico puede costar entre 2,5 y 3 millones de dólares y se necesitan entre 4, 5 y 6 años para realizarlo (Woodhead y cols., 1990).
- Los productos químicos son demasiado baratos, ya que en su precio de venta al público de momento no se tienen en cuenta algunos costes que asume la administración o el consumidor final, como son la cura de intoxicaciones, de enfermedades crónicas, la eliminación de los residuos o el deterioro del medio ambiente, producidos por la utilización de estos químicos.

Situación actual de la utilización de agentes de biocontrol

En los últimos años se ha intensificado la investigación en el campo de la lucha biológica de las enfermedades de post-cosecha en fruta; podemos destacar en manzana y pera (Janisiewicz, 1987; 1991), en frutos de hueso (Pusey y cols, 1988), en cítricos (Smilanick y Dennis, 1992), en plátanos (Kanapathipillai y Jantan, 1985) y en frutas pequeñas como son las fresas (Janisiewicz, 1988). En Europa hay que destacar los estudios realizados por nuestro equipo de investigación en el Centre UdL-IRTA de Lleida, que han conducido a la paten-

te de dos agentes de biocontrol, *Candida sake* CPA-1 (Viñas y cols. 1998; Usall y cols. 2001) y *Pantoea agglomerans* CPA-2 (Teixidó y cols. 2001).

Actualmente también se están realizando muchos estudios para la mejora de la capacidad antagonista de los agentes de biocontrol ya descubiertos, como la adición de nutrientes (Janisiewicz y cols., 1992) o la combinación con otros sistemas de lucha (El Ghaouth y Wilson, 1995). También se están dedicando muchos esfuerzos en nuevos trabajos de manipulación genética (Pusey, 1994).

Muchos analistas sobre industrias y negocios de pesticidas están de acuerdo en afirmar que la transición desde el control químico al biológico, si bien será gradual, es inevitable. Los dos principales factores que determinan que sea o no factible la utilización de un determinado agente de biocontrol son su fiabilidad y la rentabilidad económica. En los últimos años se ha avanzado mucho en la búsqueda de agentes de biocontrol de post-cosecha, con unos buenos resultados, debido principalmente a la facilidad de reproducir los resultados en condiciones de atmósfera controlada.

Pero este avance en la investigación no ha tenido frutos concretos en Europa, debido principalmente a que en la Unión Europea no existe una legislación específica para estos productos que favorezca su registro. Prueba de ello es que actualmente no hay ningún agente de biocontrol registrado en post-cosecha. Contrariamente a lo que podría suponerse, en los EEUU ya existe una normativa específica de registro de los agentes de biocontrol, que consiste en una serie de niveles de estudios toxicológicos, cada vez más costosos, pero si el agente de biocontrol supera el primero, ya se acepta. Esta gran diferencia de costos y tiempo es principalmente debida al gran interés por parte de la EAP (Agencia de Protección Medio-ambiental) de los EEUU, en facilitar la aparición de pesticidas biológicos. Este hecho ha comportado que a principios de 1995 aparecieran dos productos biológicos en el control de las enfermedades de post-cosecha de fruta, Biosave 10 y 11, (posteriormente el 100, 110 y 1000), formulados con la bacteria *Pseudomonas syringae*, comercializados por la casa EcoScience y Aspire, producto basado en la levadura *Candida oleophila* y comercializado por Ecogen.

Esta dificultad de registrar en Europa contrasta con las ayudas que reciben los grupos de investigación para desarrollar agentes de biocontrol. Este es el caso de nuestro equipo

del "Área de Postcosecha del Centre UdL-IRTA", el cual viene trabajando en el control biológico de enfermedades de post-cosecha de fruta desde 1990. Durante estos 12 años se han aislado y ensayado más de 1.500 microorganismos para determinar su capacidad de control frente a *Penicillium expansum*, el principal agente causal de podredumbres en fruta de pepita. Más del 40% de los microorganismos ensayados mostraron una cierta capacidad antagonista (>15% de reducción de la



Ensayo de efectividad a nivel laboratorio del agente de biocontrol *P. agglomerans* en el control de *Penicillium digitatum* en naranjas Valencia Late dañadas e inoculadas con el patógeno. Se puede observar el testigo totalmente podrido en comparación al tratamiento biológico.

podredumbre), pero solamente el 9,8% redujeron el nivel de podredumbre por encima del 50%. Después de realizar y evaluar los resultados de un ensayo de efectividad a mayor escala que el anterior, se seleccionaron 5 microorganismos como potenciales agentes de biocontrol, para determinar posteriormente su capacidad inhibidora a temperatura de refrigeración y a diferentes relaciones O₂/CO₂.

Las dos cepas que mostraron mayor capacidad inhibidora fueron identificadas como *Candida sake* y *Pantoea agglomerans*. Esta segunda cepa también ha mostrado una alta efectividad en el control de las principales enfermedades de cítricos. El resto de cepas, también con un alto potencial antagonista, están actualmente en fase de estudio.

Si a la buena colaboración existente entre investigadores, productores y una buena parte de las empresas de agroquímicos se nos unieran realmente los legisladores (y no solamente en sus discursos), facilitando el registro de los agentes de biocontrol y aumentando los fondos para la investigación, entre otras actuaciones, podríamos conseguir el noble objetivo de comer fruta sana y sin residuos, respetando el medio ambiente. ■

BIBLIOGRAFÍA

BLAKEMAN, J.P. y BRODIE, D.S. 1976. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. En: Microbiology of Aerial Plant Surfaces. C.H. Dickinson y T.F. Preece (Eds.) Academic Press. London. 529-557.

DROBY, S. y CHALUTZ, E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. En: Biological control of postharvest diseases: theory and practice. Wilson, Ch.L. y Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press Inc., Boca Raton Florida. p: 63-75.

EL-GHAOUTH, A. y WILSON, CH.L. 1995. Biologically-based technologies for the control of postharvest diseases. Postharvest News and Information 6: 5-11.

JANISIEWICZ, W.J. 1987. Postharvest biological control of blue-mold on apples. Phytopathology 77: 481-485.

JANISIEWICZ, W.J. 1988. Biological control of diseases of fruit. En: Biocontrol of Plant Diseases. K.G. Mukerji y K.L. Garg (Ed.). Vol II CRC Press. Boca Raton, FL, USA. p. 153-165.

JANISIEWICZ, W.J. 1991. Biological control of postharvest fruit diseases. En: Handbook of Applied Mycology Vol I. Marcel Dekker, Inc. p. 301-325.

JANISIEWICZ, W.J. y ROITMAN, J. 1988. Biological control of blue-mold and gray-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. Phytopathology 78: 1697-1700.

JANISIEWICZ, W.J.; USALL, J. y BORS, B. 1992 Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. Phytopathology 82: 1364-1370.

KANAPATHIPILLAI, V.S. y JANTAN, R. 1985. Approach to biological control of anthracnose fruit rot of bananas. En: Proceeding of the First Regional Symposium on Biological Control: Biological Control in the Tropics. University Pertanian Malasia. p. 387-398.

NIGAM, N. y MUKERJI, K.G. 1988. Biological control. Concepts and practices. En: Biocontrol of Plant Diseases. Vol 1. Mukerji, K.G. y Garg, K.L. (Eds.). CRC Press Boca Raton. Florida.

PUSEY, L. 1994. Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies. En: Biological control of Postharvest diseases. Theory and practice. Wilson C.L., Wisniewski, M.E. (Eds.). CRC Press p. 77-89.

PUSEY, P.L., HOTCHKISS, M.W., DULMAGE, H.T., BAUMGARDNER, R.A., ZEHR, E.J., REILLY, C.C. y WILSON, C.L. 1988. Pilot test for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B3) for postharvest control of peach brown rot. Plant Dis. 72: 622-626.

SCHÖNBECK, F. y DEHNE, H.W. 1988. Use of microbial metabolites inducing resistance against plant pathogens. En: Microbiology of the Phyllosphere. N.J. Fokkema y J. Van del Heuvel (Ed.). Cambridge University Press. 365-375.

SMILANICK, J.L. y DENIS-ARRUE, R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. Plant. Dis. 76: 481.

TEIXIDÓ, N., USALL, J., PALOU, L., ASENSIO, A., NUNES, C. y VIÑAS, I. 2001. Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. Eur. J. Plant Pathol. 107: 685-694.

USALL, J., TEIXIDÓ, N., TORRES, R., OCHOA DE ERIBE, X. y VIÑAS, I. 2001. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. Postharvest Biol. Technol. 21: 147-156.

VIÑAS, I., USALL, J., TEIXIDÓ, N. y SANCHIS, V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. International J. Food Microbiol. 40: 9-16.

WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M.E., BILES, C.L. MCLAUGHLIN, R., CHALUTZ, E. y DROBY, S. 1991. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Alternatives to synthetic fungicides. Crop Prot. 10: 172-177.

WOODHEAD, S.H.; O'LEARY, A.L.; O'LEARY, D.J. y RABATIN, S.C. 1990. Discovery, development and registration of a biocontrol agent from an industrial perspective. Can. J. Plant Pathol. 12: 328-331.