

## Evaluación del potencial de dos cepas de *Kluyveromyces thermotolerans* como agentes de biocontrol de *Aspergillus* sección *Nigri* y reducción en la acumulación de ocratoxina en viñedos

M. Lorena Ponsone<sup>1,2,a</sup>, M. Laura Chiotta<sup>2,3</sup>, M. Cristina Nally<sup>4</sup>, Mariana Combina<sup>1,2</sup> y Sofía N. Chulze<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Microbiología Enológica, Centro de Estudios de Enología EEA Mendoza INTA. San Martín 3853 (5507) Lujan de Cuyo-Mendoza, Argentina

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

<sup>3</sup> Orientación Micología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional N°36 Km 601, (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina

<sup>4</sup> Instituto de Biotecnología- Facultad de Ingeniería- Universidad Nacional de San Juan., Av. Libertador San Martín 1109 oeste, San Juan, Argentina

**Resumen.** Argentina ocupa el cuarto lugar en el mundo como productor de vinos con excelentes características organolépticas. La producción vitivinícola de nuestro país se ubica en las provincias de Mendoza y San Juan. En estas regiones las condiciones de temperatura y humedad son adecuadas para la colonización de las uvas por especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri*, potencialmente productoras de ocratoxina A. En estudios previos se demostró que existen cepas de *Kluyveromyces thermotolerans* que pueden reducir tanto el crecimiento como la producción y acumulación de ocratoxina A en cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* tanto in vitro como en invernadero. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de dos cepas de *K. thermotolerans* RCKT4 y RCKT5 en prevenir la acumulación de OTA en uvas para producción de vinos a campo. El ensayo a campo fue repetido durante tres vendimias: 2010/2011, 2011/2012 y 2012/2013. Durante la (2010/2011) los resultados no fueron concluyentes. Durante las vendimias 2011/2012 y 2012/2013 la micoflora observada mostró una mayor diversidad y la acumulación de OTA fue reducida exitosamente por la aplicación de los potenciales biocontroladores. Los resultados son promisorios para el futuro desarrollo de un biopesticida a base de levaduras nativas.

### Introducción

Argentina ocupa el cuarto lugar en el mundo como productor de vinos con excelentes características organolépticas. La producción vitivinícola de nuestro país se ubica en las provincias de Mendoza y San Juan [1]. En estas regiones se ha encontrado una elevada incidencia de especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri*, potencialmente productoras de ocratoxina A (OTA) en uvas [2]. Las ocratoxinas constituyen, luego de las aflatoxinas, el primer grupo mayoritario de micotoxinas con elevada toxicidad en humanos y animales, con efectos nefrotóxicos, carcinogénicos, teratogénicos e inmunosupresores [3]. A causa de esto la Agencia Internacional del Cáncer clasificó a la OTA en el grupo 2B reconocido como posible carcinógeno para humanos [4]. Entre las estrategias de control, la más efectiva es la prevención del crecimiento de los hongos productores de OTA, controlando así la entrada de esta micotoxina en las cadenas alimenticias. En relación a las estrategias de prevención, el control biológico ofrece una alternativa confiable en oposición a la utilización de los plaguicidas a nivel pre y post cosecha. Este enfoque biológico es una herramienta promisoriosa para controlar el crecimiento fúngico en las uvas, ayudando a reducir los residuos de agroquímicos tanto en éstas como en los productos derivados (jugos, vinos y productos relacionados) [5,6]. Las

levaduras poseen un gran número de cualidades que las hacen elegibles como agentes de biocontrol en frutas u otros alimentos: (i) poseen requerimientos nutricionales simples, (ii) su capacidad de crecer en fermentadores en medios de cultivo de bajo costo, (iii) poseen la habilidad de sobrevivir en un rango amplio de condiciones medioambientales; (iv) no producen compuestos antrotopóxicos [7]. Además se ha observado que las levaduras poseen la capacidad de reducir el crecimiento de los hongos filamentosos durante el almacenamiento en condiciones “*in vitro*” e “*in vivo*” [8,9]. En estudios previos se seleccionaron dos cepas de *Kluyveromyces thermotolerans* con potencial para reducir tanto el crecimiento como la producción y acumulación de ocratoxina A de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* tanto *in vitro* como *in situ* y en invernadero [10].

### Materiales y métodos

El ensayo se llevó a cabo a campo, en una de la zona de mayor riesgo de contaminación con OTA, de acuerdo a datos obtenidos por nuestro grupo de trabajo en estudios previos [11] utilizando la variedad de uvas Cabernet Sauvignon utilizadas para el ensayo “*in situ*” (sustrato natural) [2]. El diseño experimental fue de bloques al azar donde cada unidad experimental estuvo compuesta por cinco plantas y los tratamientos incluyeron:

- Uvas control sin inocular (flora ocratoxigénica normal).

<sup>a</sup> e-mail: [lorenaponsone@gmail.com](mailto:lorenaponsone@gmail.com)

- b. Uvas inoculadas con las cepas de *K. thermotolerans* (potencial agente de biocontrol) en diferentes niveles de inóculo ( $10^4$  a  $10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ ).
- c. Uvas intactas inoculadas con las cepas de *K. thermotolerans* (potencial agente de biocontrol) en diferentes niveles de inóculo ( $10^4$  a  $10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ ).
- d. Uvas dañadas inoculadas con las cepas de *K. thermotolerans* (potencial agente de biocontrol) en diferentes niveles de inóculo ( $10^4$  a  $10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ ).

Se realizaron dos aplicaciones de los antagonistas a campo, la primera durante el estadio de envero, la segunda un mes después del envero. Se recolectaron muestras de uvas de los distintos tratamientos en 3 etapas: envero, un mes después del envero y a cosecha.

El ensayo se repitió durante tres vendimias: 2010–2011, 2011–2012 y 2012–2013.

**Evaluación del efecto antagonista:** a cosecha se evaluó el grado de infección por *Aspergillus* sección *Nigri* determinando el porcentaje de infección de las bayas por el método de siembra directa [12]. Se determinaron los niveles de OTA por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) siguiendo la metodología propuesta por Solfrizzo y col (2007) [13].

## Resultados

El ensayo se realizó por primera vez durante la vendimia 2010–2011, durante la cual se observó que las especies pertenecientes a la sección *Nigri* aumentaban su incidencia natural en uvas un mes después del envero y a cosecha y la población de levaduras logró establecerse exitosamente comparando la microflora presente en las uvas tratadas con las uvas controles. Durante dicha vendimia no se observó incidencia natural de OTA tanto en las uvas tratadas como en las uvas controles.

Durante la vendimia 2011–2012 se observó que luego de la primera y la segunda aplicación de los agentes de biocontrol la población de levaduras totales aumentó. A cosecha se observó que la población total de levaduras fue totalmente restablecida en las uvas, tanto tratadas como en las no tratadas. Se observó también una gran diversidad de hongos filamentosos, probablemente a causa de las condiciones climáticas durante la vendimia 2011–2012 debido a un incremento considerable en las precipitaciones, particularmente durante el verano. Se logró establecer que si bien la población total de levaduras en uvas se encuentra entre  $10^2$  y  $10^4$  UFC/g en los tratamientos dicha población incrementó en el orden de  $10^5$  UFC/g, pudiendo inferir que este incremento se debe al inóculo de las levaduras biocontroladoras.

La acumulación de ocratoxina A fue mayor en las uvas dañadas y no tratadas. Es importante destacar que tanto el control como el control de adyuvante contenían cantidades similares de OTA.

Por otro lado, el contenido de OTA disminuyó entre un 50 y un 90% en las uvas tratadas con los agentes de biocontrol. La mayor disminución del contenido de OTA se observó en uvas tratadas (dañadas y no dañadas) con RCKT4  $10^6$  UFC/mL.

Durante la vendimia 2012–2013 se repitió la experiencia, se recolectaron los datos durante los meses de

diciembre, febrero y marzo a fin de determinar actividad biocontroladora a campo de *K. thermotolerans* RCKT4 y RCKT5. En los casos en los cuales se observó una disminución de la acumulación de OTA dicha reducción estuvo entre el 60 y el 100% únicamente en presencia de RCKT4 en ambas densidades de inóculo probadas ( $10^4$  y  $10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) y RCKT5 en la mayor densidad de inóculo ( $10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ). Los resultados son promisorios para el futuro desarrollo de un biopesticida a base de levaduras nativas.

## Referencias

- [1] Informe del Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2007. <http://www.inv.gov.ar>
- [2] Chiotta M.L., Ponsone M.L., Sosa D.M., Combina M., Chulze S.N. Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. *Food Microbiol.* **36**: 182–190 (2013)
- [3] Bragulat M.R., Abarca M.L., Accensi F., Cabañez F. J. New screening method for ochratoxicogenic molds in pure cultures. *Revue. Médecine Veterinaire* **149**: 6: 515 (1998)
- [4] European Commission. Commission Regulation (EC) N°1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **364**: 5–24 (2006)
- [5] Cabras P., Angiorni A., Garau V.L., Prisi F.M., Farris G.A., Adau G., Emonti G. Pesticides in fermentative processes of wine. *J. Agr. and Food Chemistry* **47**: 3854–3857 (1999)
- [6] Cabras R., Angioni A. Pesticide residues in grapes, wines and their processing products. *J. of Agr. and Food Chem.* **48**: 967–973 (2000)
- [7] Wilson C.L., Wisniewski M.E. Biological control of post harvest diseases of fruit and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathol.* **27**: 425–441 (1989)
- [8] McGuire R.G. Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grape fruits. *Biological Control* **4**: 1–7 (1994)
- [9] Peterson S., Schnürer J. Biocontrol of mould in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Environ.l Microbiol.* **61**: 1027–1032 (1995)
- [10] Ponsone M.L., Chiotta, M.L., Combina M., Dalcero A., Chulze S. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *Int. J. of Food Microbiol.* **151**: 70–77 (2011)
- [11] Chiotta M.L., Ponsone M.L., Combina M., Torres A.M., Chulze S.N. *Int. J. of Food Microbiol.* **136**: 137:141 (2009)
- [12] Pitt J.I., Hocking A.D. (eds) (1997). Fungi and food spoilage. CSIRO Division of Food Res. Sydney. Academic Press. Australia
- [13] Solfrizzo, M., Panzarini, G., Visconti, A. (2007). XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins