

## Levaduras inhibidoras de *Penicillium*

M.R. BENÍTEZ AHRENDTS, L. CARRILLO\*

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy, Alberdi 47, 4600 SS Jujuy

\*Correspondencia. E-mail: lcarrillo@arnet.com.ar

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la acción inhibitoria *in vitro* e *in vivo* de algunas cepas de levaduras de la zona citrícola jujeña sobre el crecimiento de los mohos patógenos post-cosecha y seleccionarlas para elaborar un producto de biocontrol. Se aislaron de frutos cítricos cepas de los mohos patógenos post-cosecha *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *P. ulaiense*, *Phyllosticta* sp. y *Galactomyces geotrichum*, así como de levaduras saprófitas de los géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Pichia* y *Rhodotorula*. También se obtuvieron algunas levaduras de otras fuentes. Se identificaron las levaduras por las características macro y micromorfológicas y las pruebas fisiológicas. La actividad *in vitro* e *in vivo* de las diferentes cepas fue diferente según se enfrentaran a *P. digitatum* o *P. ulaiense*. *Candida cantarellii* y una cepa de *Pichia subpelliculosa* produjeron una reducción significativa del área de las lesiones provocadas por estas especies de *Penicillium*, y podrían ser empleadas en la formulación de un producto para biocontrol.

**Palabras clave:** levaduras, cítricos, patógenos post-cosecha, biocontrol.

### SUMMARY

**Inhibitory *Penicillium* yeasts.** The objective of this work was to establish the *in vitro* and *in vivo* inhibition of post-harvest pathogenic moulds by yeasts in order to make a biocontrol product. Post-harvest pathogenic moulds *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *P. ulaiense*, *Phyllosticta* sp., *Galactomyces geotrichum* and yeasts belonging to genera *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula* were isolated from citrus fruits. Some yeasts strains were also isolated from other sources. The yeasts were identified by their macro and micro-morphology and physiological tests. The *in vitro* and *in vivo* activities against *P. digitatum* or *P. ulaiense* were different. *Candida cantarellii* and one strain of *Pichia subpelliculosa* produced a significant reduction of the lesion area caused by the pathogenic moulds *P. digitatum* and *P. ulaiense*, and could be used in a biocontrol product formulation.

**Key words:** yeasts, citrus, post-harvest pathogens, biocontrol.

### INTRODUCCIÓN

El control de las enfermedades de los frutos cítricos se lleva a cabo por pulverizaciones pre-cosecha y lavados post-cosecha adicionados de fungicidas. Debido a un aumento creciente de cepas resistentes y a los residuos inaceptables que dejan ciertos fungicidas, se buscan alternativas para el control de las enfermedades (11).

La necesidad del biocontrol en los establecimientos empaques de cítricos surgió en California (EEUU) cuando en 1992 apareció un penicilio con resistencia a los fungicidas de uso habitual (16). En el mismo año ese penicilio también fue aislado en Jujuy pero la cepa era sensible a los antifúngicos (7) y fue identificada por Pitt como *Penicillium ulaiense* e incorporada a la colección CSIRO - Australia bajo el número FRR 4477 (15).

Las levaduras saprófitas se hallan comúnmente sobre la superficie de las hojas y los frutos (24) y algunas parecen competir efectivamente con los patógenos post-cosecha *Penicillium digitatum*, *P. expansum* y otros (19, 20). Algunas levaduras producen agentes antimicrobianos

como sulfito, etanol o proteínas "killer" (2) y en determinadas condiciones, forman biosurfactantes y bioemulsificadores que facilitan la adhesión (8, 12).

Katz *et al.* (18) elaboraron un producto comercial en base a *Candida oleophila* y un fungicida selectivo, para el control de los patógenos post-cosecha de cítricos, mientras que McGuire y Hagenmaier (20) usaron dicha levadura mezclada con la cera aplicada a las frutas durante el empaque. Wilson & Chalutz (25) observaron que *Candida guilliermondii* y *Debaryomyces hansenii* eran activas contra *P. digitatum* sobre pomelos. Por otra parte, Hua *et al.* (17) comprobaron que las levaduras *C. oleophila*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *P. anomala* inhibían en distinto grado el crecimiento de mohos y la producción de micotoxinas, por lo que podrían ser usadas para reducir la contaminación fúngica (4).

El objetivo de este trabajo fue determinar la acción inhibitoria, *in vitro* e *in vivo*, sobre el crecimiento de los mohos patógenos post-cosecha de las cepas de levaduras de la zona citrícola jujeña y seleccionarlas para elaborar un producto de biocontrol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

Se obtuvieron frutos de distintas variedades de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, *Citrus limon* (L.) Burm, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus grandis* (L.) Osbeck provenientes de las plantaciones del departamento Ledesma, provincia de Jujuy.

### Aislamiento de mohos y levaduras

Se procedió a aislar los mohos y levaduras de la superficie de los frutos deteriorados, mediante estrías sobre placas de agar triptona glucosa levadura (TGY) y agar rosa Bengala cloranfenicol (RBC) hechas con los hisopos humedecidos en diluyente estéril preparado según Beuchat *et al.* (5). Las placas se incubaron a 25 °C durante 3 a 15 días dentro de bolsas plásticas junto a un vaso con agua para evitar la desecación. En algunos casos se lavaron los frutos con diluyente estéril y se hicieron estrías sobre los mismos medios. Las colonias desarrrolladas se repicaron en TGY o en agar Czapek levadura (CYA), según se tratara de una levadura o un moho respectivamente.

Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo a Pitt & Hocking (23).

### Identificación de los mohos

Se hicieron cultivos por punción en tres puntos de cada placa de medio y se incubaron a 25 °C. Se utilizaron agar extracto de malta (MEA), CYA y agar nitrato 25% glicerol (G25N). Se hicieron otros cultivos sobre CYA que se incubaron a 37 y 25 °C durante igual tiempo. Las especies de *Penicillium* además se sembraron en agar sacarosa creatina neutro (CSN). Estos medios también fueron preparados según Pitt & Hocking (1997). Luego de incubar en la obscuridad durante 7 días, se midieron los diámetros de las colonias, se observaron las características del anverso y reverso, y los detalles micro-morfológicos. Se consultaron las claves Bridge *et al.* (6), Hanlin (13), Pitt (22) y Pitt & Hocking (23).

### Identificación de las levaduras

Se hicieron cultivos por punción en agar papa glucosa (PDA) y por estría en TGY y agar triptona glucosa levadura acético

**Tabla 1.** Cepas aisladas de la superficie de frutos cítricos.

Hongos	Fuentes	Cepas
<i>Brettanomyces bruxelliensis</i> Kuff. & van Laer (n°3)	<i>C. grandis</i>	1
<i>Candida</i> Berkhout spp.	<i>C. grandis</i> <i>C. limon</i>	5
<i>C. versatilis</i> (Ettchells & TA Bell) SA Meyer & Yarrow (n°5)	<i>C. grandis</i>	1
<i>Cryptococcus albidus</i> (Saito) CE Skinner	<i>C. sinensis</i>	1
<i>Galactomyces geotrichum</i> (EE Butler & LJ Paterson) Redhead & Malloch	<i>C. sinensis</i>	1
<i>Kloeckera</i> Janke sp.	<i>C. limon</i>	1
<i>Penicillium digitatum</i> (Pers.:Fr.) Sacc.	<i>C. grandis</i> <i>C. limon</i> <i>C. sinensis</i>	6
<i>P. italicum</i> Wehmer	<i>C. aurantifolia</i> <i>C. sinensis</i>	2
<i>P. ulaiense</i> HM Hsieh <i>et al.</i>	<i>C. limon</i>	1
<i>Phyllosticta</i> Pers. sp.	<i>C. sinensis</i>	3
<i>Pichia</i> Hansen sp.	<i>C. grandis</i> <i>C. sinensis</i>	4
<i>P. anomala</i> (Hansen) Kurtzman (n° 1, 2 y 6)	<i>C. grandis</i> <i>C. sinensis</i>	3
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (A Jörg.) FC Harrison	<i>C. grandis</i>	1

**Tabla 2.** Levaduras aisladas de jugos u otras fuentes cuya acción inhibitoria fue ensayada.

Levaduras	Número de cepas
<i>C. boidinii</i> Ramirez (n°11)	1
<i>C. cantarellii</i> (van der Walt & van Kerken) SA Meyer & Yarrow (n°4)	1
<i>C. zeylanoides</i> (Castellani) Langeron & Guerra (n° 9)	1
<i>P. anomala</i> (Hansen) Kurtzman (n°10)	1
<i>P. subpelliculosa</i> Kurtzman (n°7 y 8)	2

(TGYA), que se incubaron a 25 °C. Se hizo otro cultivo sobre TGY que se incubó a 37 °C durante igual tiempo. Se sembraron las cepas en agar base carbonado (YCB) y en caldo urea (RUB) para ensayar la asimilación de nitratos y comprobar la presencia de ureasa, respectivamente. Para observar la asimilación de azúcares o polialcoholes (celobiosa, eritritol, galactosa, glucosa, inositol, maltosa, manitol, rafinosa, trehalosa y xilosa) se utilizó agar base nitrogenado (YNB). La siembra se hizo con una suspensión de las levaduras en agua estéril adicionada de dos o tres gotas de una solución de extracto de levadura al 2% como fuente de vitaminas. El medio TGYA se preparó según Pitt & Hocking (23) y los otros de acuerdo a Déak & Beuchat (9).

A los 3, 7 y 14 días se registró crecimiento, aspecto macroscópico (color, forma y tamaño de las colonias) y microscópico (forma y tamaño celular, posición de los brotes, presencia de pseudomicelio, tipo y número de ascosporas). También se hicieron preparaciones microscópicas teñidas según el método de Wirtz para detectar ascosporas. Con los datos obtenidos se consultaron las claves de Déak & Beuchat (9).

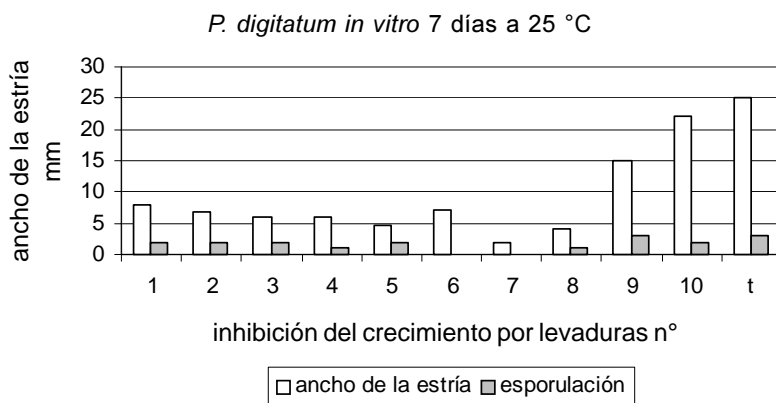
#### Acción inhibitoria *in vitro* de levaduras sobre mohos

Las cepas de *Penicillium* spp. fueron sembradas sobre CYA a 25°C durante 7 días. Los conidios fueron suspendidos en diluyente estéril y centrifugados a 1.000 rpm durante 10 minutos y luego de volcar el sobrenadante se resuspendieron para preparar una suspensión con 10<sup>4</sup> conidios/mL por recuento en cámara de Neubauer (26). La suspensión de levaduras se llevó a una concentración de 10<sup>5</sup> células/mL con diluyente estéril.

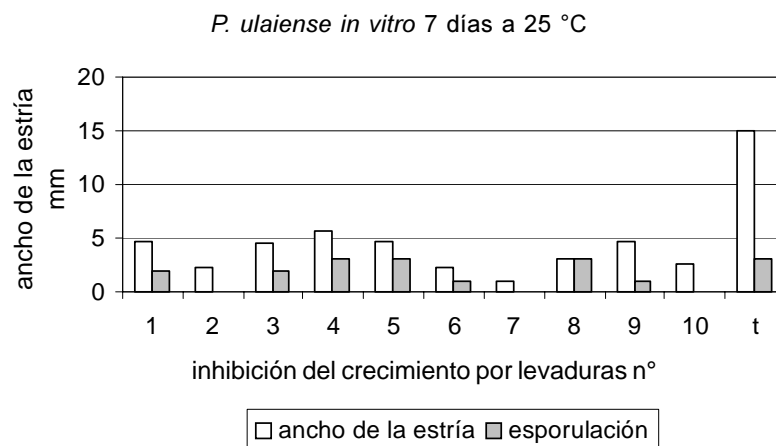
En placas de MEA y CYA se sembraron 10 µL de la suspensión de levaduras en cada una de dos estriás paralelas separadas 3 cm una de otra, y luego entre ambas 10 µL de la suspensión de esporas de penicilios. A los 7 días se registró el ancho del crecimiento del moho en milímetros y la producción de esporas como abundante, regular, escasa o nula (3 a 0), de acuerdo a la densidad de color comparada con una placa testigo donde solo se cultivó el moho (17).

#### Acción inhibitoria *in vivo* de levaduras sobre mohos

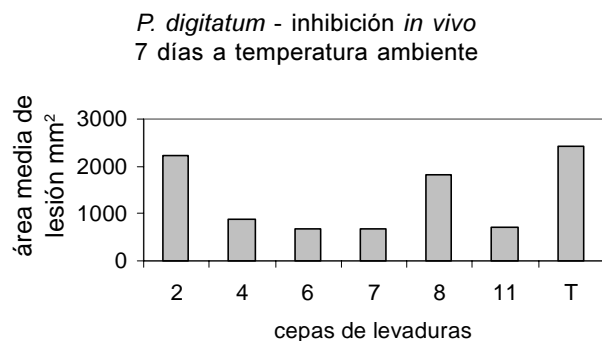
Se trabajó con *C. sinensis* variedad Valencia tardía, calidad mercado interno. Las frutas fueron desinfectadas con hipoclorito



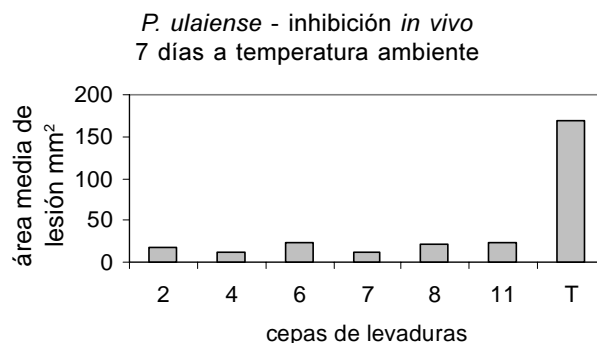
**Figura 1.** Crecimiento de *P. digitatum* expresado como ancho de la estría y esporulación en escala arbitraria de 0 a 3, solo (t) y frente a diez cepas de levaduras: *B. bruxellensis* (n° 3), *C. cantarellii* (n° 4), *C. versatilis* (n° 5), *C. zeylanoides* (9), *P. anomala* (n° 1, 2, 6 y 10) y *P. subpelliculosa* (n° 7 y 8).



**Figura 2.** Crecimiento de *P. ulaiense* expresado como ancho de la estría y esporulación en escala arbitraria de 0 a 3, solo (t) y frente a diez cepas de levaduras: *B. bruxellensis* (n°3), *C. cantarellii* (n° 4), *C. versatilis* (n° 5), *C. zeylanoides* (9), *P. anomala* (n° 1, 2, 6 y 10) y *P. subpelliculosa* (n° 7 y 8).



**Figura 3.** Las columnas representan el área relativa de las lesiones en los frutos inoculados simultáneamente con *P. digitatum* y diferentes cepas de levaduras: *C. boidinii* (nº11), *C. cantarellii* (nº 4), *P. anomala* (nº 2 y 6) y *P. subpelliculosa* (nº 7 y 8); así como el testigo (T) sin levaduras.



**Figura 4.** Las columnas representan el área relativa de las lesiones en los frutos inoculados simultáneamente con *P. ulaiense* y diferentes cepas de levaduras: *C. boidinii* (nº11), *C. cantarellii* (nº 4), *P. anomala* (nº 2 y 6) y *P. subpelliculosa* (nº 7 y 8); así como el testigo (T) sin levaduras.

de sodio (solución comercial diluida 1/10) durante 5 minutos y lavados con agua estéril. En cada fruta se hicieron cuatro heridas de 3 mm de diámetro y 2 mm de profundidad, donde se depositaron 10  $\mu$ L de la suspensión con  $10^4$  conidios de *Penicillium*/mL y 10  $\mu$ L de la suspensión con  $10^5$  levaduras/mL.

El experimento consistió en probar por triplicado seis levaduras más un testigo por cada patógeno. Las bandejas se colocaron dentro de bolsas plásticas para mantener el ambiente húmedo. Se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. El ensayo se realizó dos veces (26). Después de la incubación se determinó el diámetro de cada lesión y el grado de esporulación en comparación con el testigo del patógeno (14). Se determinó la diferencia significativa de los resultados respecto al testigo mediante la prueba de las comparaciones múltiples complementaria de la de Kruskal-Wallis para  $\alpha = 0,05$  (10).

## RESULTADOS

Se recolectaron 22 muestras de *C. aurantifolia*, 8 de *C. limon*, 64 de *C. sinensis* y 7 de *C. grandis*, y de la superficie de estos frutos se aislaron 13 cepas de mohos patógenos post-cosecha y 17 de levaduras, según se indica en la Tabla 1. En la Tabla 2 se mencionan las levaduras, aisladas de jugos y otras fuentes, cuya acción inhibitoria también fue ensayada.

El crecimiento normal de *P. digitatum* y *P. ulaiense*, en las condiciones de ensayo sin levadura, tiene un ancho de 25 y 15 mm respectivamente. El ancho de la estría de *P. digitatum* osciló entre 2 y 22 mm frente a las cepas de levaduras ensayadas, y la esporulación varió entre nula y similar al testigo (0 a 3), mientras que el ancho de la estría de *P. ulaiense* fue de 1 a 6 mm frente a las cepas de levaduras probadas, y la esporulación entre nula y similar al testigo, como se indica en las figuras 1 y 2.

Las cepas de levaduras más activas *in vitro* frente a *P. digitatum* correspondían a las especies *C. cantarellii*, *C. versatilis*, *P. anomala* y *P. subpelliculosa*, mientras que las más inhibitorias de *P. ulaiense* fueron algunas cepas de *P. anomala* y *P. subpelliculosa*. Las levaduras *B. bruxellensis*, *C. zeylanoides*, *C. albidus* y una cepa de *P.*

*anomala* presentaron menor acción inhibitoria, mientras *R. mucilaginosa* desarrolló entremezclada con ambos penicilios.

Las figuras 3 y 4 muestran que las cepas de *C. boidinii*, *C. cantarellii*, *P. anomala* y *P. subpelliculosa* produjeron una reducción significativa del área de las lesiones causadas por *P. digitatum* y *P. ulaiense* en comparación con los testigos, según la prueba de las comparaciones múltiples para  $\alpha = 0,05$ . Las levaduras más activas frente a *P. ulaiense* fueron *C. cantarellii* y *P. subpelliculosa* pues el área de lesión fue menor y el micelio carecía de esporas.

## DISCUSIÓN

Las especies aisladas de frutos cítricos en el presente trabajo pertenecen a los géneros de levaduras comúnmente hallados en los mismos. Según Déak & Beuchat (1996), Pitt & Hocking (23) y Spencer *et al.* (24) además suelen estar presentes *Candida famata*, *C. guilliermondii*, *C. holmii*, *C. krusei*, *C. magnoliae*, *C. stellata*, *C. tropicalis*, *Pichia fermentans*, *P. kluyveri*, *P. membranaefaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Trichosporon moniliforme* y *Zygosaccharomyces rouxii*. Estas especies no son inhibidas por los aceites esenciales y no provocan deterioro cuando son depositadas sobre la superficie "sana" de los cítricos, pero *Kloeckera apiculata* y *C. boidinii* poseen acción pectinolítica (9, 21). Por otra parte, *C. albidus* y *C. zeylanoides* se suelen encontrar sobre hojas y tallos de cultivos tropicales (1).

En este trabajo, la actividad *in vitro* e *in vivo* de las levaduras fue algo distinta según se enfrentaran con *P. digitatum* o *P. ulaiense*. *C. cantarellii* y una cepa de *P. subpelliculosa* fueron las más activas. El comportamiento de *P. anomala* y *P. subpelliculosa* fue variable según las cepas.

Las cepas de las levaduras *C. cantarellii* y *P. subpelliculosa* cuya acción inhibitoria *in vitro* e *in vivo*

sobre los patógenos post-cosecha en frutos cítricos fue comprobada aquí, podrán ser empleadas en la formulación de un producto para biocontrol si nuevos estudios a campo lo confirman.

**Agradecimiento:** A SECTER, UNJu, por el subsidio recibido.

## REFERENCIAS

1. Azeredo LAI de, Gomes EAT, Mendoça-Hagler LC, Hagler A (1998) Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *Internat. Microbiol.* 1: 205-208.
2. Bakalisky T (1992) Metabolites of yeast as biopreservatives. En: Ray B, Daeschel M, (Eds), *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, CRC, Boca Raton, p. 347-371.
3. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (1990) *Yeasts, Characteristics and Identification*. Second edition, Cambridge University Press, Cambridge.
4. Benbow J, Sugar D (1999) Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by pre-harvest yeast applications. *Plant Dis.* 83: 839-844.
5. Beuchat LR, Scouten AJ, Jablonska J (2002) Influence of composition of diluent on populations of yeasts and molds recovered from raw fruits. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 399.
6. Bridge PD, Kozakiewicz Z, Paterson RRM (1992) PENIMAT: A Computer assisted identification scheme for terverticillate *Penicillium* Isolates. International Mycological Institute, CAB International, Wallingford.
7. Carrillo L (1995) *Penicillium ulaiense* Hsieh, Su & Tzean, un patógeno post-cosecha de cítricos del noroeste argentino. *Rev. Arg. Microbiol.* 27: 107- 113.
8. Cirigliano M, Carman M (1985) Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 846-850.
9. Déak T, Beuchat LR (1996) *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Boca Raton
10. de Campos H (1985) Curso de Estadística No Paramétrica. Colegio Profesional de Agrimensores, Arquitectos e Ingenieros, Jujuy.
11. De Jager ES, Korsten L (1998) Biological control of citrus pre- and post-harvest pathogens. ICPP98 paper n° 5.2.22
12. Desai J, Banat I (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:47-64.
13. Hanlin RT (1989) *Illustrated Genera of Ascomycetes*. APS Press, St. Paul.
14. He D, Zheng XD, Yin YM, Sun P, Zhang HY (2003) Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 211-216.
15. Hocking A, Charley NJ, Pitt JI (Eds) (1994) *FRR Culture Colection Catalogue*. CSIRO Division of Food Science and Technology, North Ryde.
16. Holmes G, Eckert J, Pitt JI (1994) Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of citrus fruits. *Phytopathology*, 84: 719-727.
17. Hua SST, Baker JL, Flores-Espíritu M (1999) Interactions of saprophytic yeast with a nor mutant of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2738-2740
18. Katz H, Berkovitz A, Chalutz E, Droby S, Hofstein R, Keren-Tzoor M (1995) Compatibility of ecogens biofungicide Aspire, a yeast based preparation, with other fungicides commonly used for the control of post-harvest decay of citrus. *Phytopathology* 85: 1123.
19. Leibinger W, Breuker B, Hahn M, Mendgen K (1997) Control of post-harvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87: 1103-1110.
20. McGuire R, Hagenmaier R (1995) Storage waxes that support growth of *Candida oleophila* for biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus. *Phytopathology*. 85:1166.
21. Nakagawa T, Miyaji T, Yurimoto H, Sakai Y, Kato N, Tomizuka N (2000) A methylotrophic pathway participates in pectin utilizacion by *Candida boidinii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4253-4257.
22. Pitt JI (1990) PENNAME, A Computer Key to Common *Penicillium* Species. CSIRO Division of Food Science and Technology, North Ryde.
23. Pitt JI, Hocking A (1997) *Fungi and Food Spoilage*. Blackie A&P, London, p. 28-37.
24. Spencer D, Spencer JFT, Figueroa L de (1992) Yeast associated with rotting citrus fruit in Tucumán, Argentina. *Mycol. Res.* 96:891-892.
25. Wilson CL, Chalutz E (1989) Postharvest biological control of *Penicillium* rots with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae* 40: 105-112.
26. Zhou T, Chu CL, Liu WT, Schaneider KE (2001) Postharvest control of blue mold and gray mold on apples using isolates of *Pseudomonas syringae*. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 246-252.