



Universidad de Valladolid

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS
AGRÁRIAS**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGROFORESTALES

TESIS DOCTORAL:

**HIGIENIZACIÓN DE SARMIENTOS DE LA
PODA DE VID MEDIANTE MÉTODOS
TÉRMICOS Y BIOFUNGICIDA**

Presentada por **Petruta Mihaela Matei** para
optar al grado de
doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dra. Mercedes Sánchez-Báscones
Dra. María Teresa Martín Villulla
Dr. Pablo Martín Ramos

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado, de una forma u otra en la elaboración de este trabajo:

A la Dra. Mercedes Sánchez Báscones directora de esta Tesis, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y a los codirectores, Dra. Teresa Martín Villulla y Dr. Pablo Martín Ramos, a todos ellos por iniciarme en la investigación, y descubrir a cada paso un mundo que me apasiona.

Al Dr. Salvador Hernández Navarro, por sus valiosos consejos, por su amabilidad y por el apoyo en los momentos claves con sus acertadas orientaciones.

Al Dr. Pedro Martín Peña, por el trato y los conocimientos recibidos durante mis estudios predoctorales y a todos los miembros del Departamento de Producción Vegetal, compañeros del doctorado ahora doctores, Lorena, Álvaro y Raquel.

A Pilar Zaldívar, Juan-Carlos Arranz, Carmen Blanco, Carmen Teresa Bravo, Lourdes Martínez, Arancha Otaño, Felicidad López, Evelio Alonso, Juan Manuel por sus ayudas en el trabajo de laboratorio, por crear un ambiente de trabajo inmejorable y por sus buenos consejos.

Al todo el equipo del Centro de Formación Agraria de Viñalta, José Manuel Ruíz Turzo, a Marisol, Cesar, Ausencio, Jesús por la ayuda en el montaje y mantenimiento de las pilas y los compostadores, por las facilidades técnicas que han permitido que este proyecto salga adelante.

A Julian Gutiérrez, Ricardo Martín, Ana Bombín por estar siempre a la entrada, la primera imagen de la escuela es la de "tu cara", de forma amable, atendiéndome... aunque a veces me costaba expresarme observaba la desenvoltura para indicarme dónde estaba lo que buscaba o quién es el que puede dar respuesta a las preguntas...

A mi querida amiga Naty por mostrarte siempre dispuesta a ayudar, por tu apoyo personal en los momentos más difíciles de mi vida, por las risas, los lloros, los momentos de estrés..... y sin estrés en la finca...

A mis compañeros Norlan, Iosody y Amparo, sin duda haberlos conocido y disfrutar de su amistad, es una de las mejores cosas que me llevo de este trabajo, os agradezco por vuestro apoyo y ayuda.

A mi Profesora Reyes por ayudarme en aprender inglés y disfrutar de buenos momentos en el curso, por animarme en los momentos en los que parecía imposible seguir adelante.

Agradecimiento muy importante a mi familia, en especial a mi querido esposo Gigi y mis queridos niños Valentin y Matei por haber estado siempre junto a mí, por cariño infinito, por ayudarme siempre, por su infinita paciencia....

A mi familia de mi país, especial a mi hermana Valeria y mi cuñado Marius, por sus consultas "psicológicas" por teléfono, que han hecho que 3500 Km parecieran tan sólo metros, y a mi madre, que ha sufrido y ha celebrado cada momento "a mi lado", este trabajo está dedicado especialmente a ella, por ser como es.

También me gustaría recordar a el que hoy no está, mi padre que me ha ayudado a ser lo que hoy soy.

Quiero expresar mi agradecimiento por el apoyo financiero por parte de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León por la concesión de los proyectos de investigación VA233A12-1 y VA036A12-2 que ha permitido desarrollar el trabajo descrito en la presente memoria.

Además, la investigación no hubiera sido posible sin las facilidades técnicas que han permitido la Universidad de Valladolid por el Laboratorio de Materiales Avanzados del Campus de Palencia y también mi gratitud al Instituto Técnico Agrario de Castilla y León (ITACyL).

Muchas gracias a todos.

**A mi familia de aquí
y de mi país**

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS 10

ÍNDICE DE FIGURAS 12

RESUMEN 15

1 INTRODUCCIÓN 17

 1.1 Viticultura en España 18

 1.2 Impacto de las enfermedades fúngicas en el viñedo 21

 1.3 Técnicas de adaptación y mitigación para la higienización y el control de hongos patógenos 23

 1.3.1 Procesos de compostaje para la higienización de residuos vitícolas 27

 1.3.2 Tratamientos térmicos para la higienización de sarmientos inoculados con el hongo *Diplodia seriata* 39

 1.3.3 Métodos biológicos y químicos de higienización 45

 1.3.4 Otros métodos de control 50

 1.4 Referencias 52

2 MARCO Y OBJETIVOS DE LA TESIS 64

 2.1 Marco de referencia del proyecto de tesis 65

 2.1.1 Elección de los procesos de compostaje en distintas estaciones para la higienización de sarmientos de la vid 73

 2.1.2 Elección de método térmico de control *in vitro* de *Diplodia seriata* 89

 2.1.3 Síntesis de bioproductos como estrategia curativa 96

 2.1.4 Técnicas combinadas de control de la población microbiana 102

 2.2 OBJETIVOS 106

 2.3 Referencias 110

3 Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems 123

 3.1 Abstract 124

 3.2 Introduction 125

 3.3 Materials and methods 127

 3.3.1 Raw materials 127

 3.3.2 Inoculation experiment 128

 3.3.3 Composting procedures 128

 3.3.4 Microorganisms analysis 130

 3.3.5 Chemical, physical and phytotoxicity germination analyses 130

 3.3.6 Statistical analysis 131

3.4	Results and discussion	131
3.4.1	Physicochemical parameters	132
3.4.2	Biological parameters and compost quality control	136
3.5	Conclusions	139
3.6	References	141
4	Thermal death kinetics of <i>Diplodia seriata</i> fungus inoculated <i>in vitro</i> in pruned vine shoots	144
4.1	Abstract.....	145
4.2	Introduction	146
4.3	Material and methods.....	147
4.3.1	Fungal isolates	147
4.3.2	Inoculation process.....	148
4.3.3	Thermal treatments and mycelium growth studies.....	148
4.3.4	<i>D. seriata</i> fungus thermal death studies using kinetic models	149
4.4	Results and discussion	152
4.4.1	Effect of the treatment temperature/holding time on the growth of the <i>D. seriata</i> inoculates	152
4.4.2	Thermal death kinetic model for <i>D. seriata</i> fungus	153
4.5	Conclusions	158
4.6	References.....	159
5	Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against <i>Diplodia seriata</i>	164
5.1	Abstract.....	165
5.2	Introduction	165
5.3	Materials and methods	168
5.3.1	Reagents and characterization equipment.....	168
5.3.2	Culture media and activity assays	168
5.3.3	Synthesis of solutions and films of chitosan oligomers, chitosan oligomers/propolis and chitosan oligomers/propolis/Ag NPs	170
5.4	Results and discussion	172
5.4.1	Vibrational characterization.....	172
5.4.2	X-ray characterization.....	174
5.4.3	Silver NPs characterization.....	175
5.4.4	Textural properties.....	176
5.4.5	Antifungal activity of chitosan	176

5.4.6	Antifungal activity of the propolis, chitosan oligomers/propolis and chitosan oligomers/propolis/silver NPs colloidal solutions against <i>Diplodia seriata</i> fungus.....	177
5.4.7	Future lines of research: replacement of propolis with gentisic acid...	180
5.5	Conclusions	181
5.6	References	183
6	RESUMEN DE RESULTADOS	189
6.1	Resumen de resultados.....	190
6.2	Referencias	198
7	CONCLUSIONES.....	202

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Principales países exportadores de vino en el mundo (mil hl).	19
Tabla 1.2 Principales enfermedades de la madera de la vid, hongos implicados, sintomatología y métodos de control.	24
Tabla 1.3 Microorganismos presentes en los estiércoles (UGC/g) a utilizar en la elaboración de compost (Tortosa et al., 2012).	30
Tabla 1.4 Ventajas y desventajas en los procesos aerobios y anaerobios de compostaje 31	
Tabla 1.5 Características de los microorganismos del proceso de compostaje	35
Tabla 1.6 Ventajas y desventajas en la aplicación de tratamientos térmicos para la higienización y esterilización	41
Tabla 1.7 Ventajas y desventajas en la aplicación de tratamientos biológicos y químicos para la higienización.	47
Tabla 2.1 Sistema de compostaje abierto y cerrado con varios materiales, ventajas para la higienización.....	74
Tabla 2.2 Análisis de los materiales precursores seleccionados para el proceso de compostaje.	78
Tabla 2.3 Métodos térmicos de higienización, temperatura (°C) y tiempo de higienización.....	90
Tabla 2.4 Aislados procedente de Castilla y León, de la especie <i>Diplodia seriata</i> utilizados para la inoculación de los sarmientos de la vid.....	91
Tabla 2.5 Composite con acción fungicida y bactericida, método de síntesis y su eficacia.	103
Tabla 2.6 Técnicas combinadas de tratamiento sobre agentes patógenos, parámetros de higienización.....	105
Tabla 3.1 Composition of the starting materials	129
Tabla 3.2 Evolution of the germination index (GI) for <i>Lepidium sativum</i> , using aqueous extracts of the initial and final compost, for the open pile and the closed biodigester in the different seasons. Reported values are the average of the four repetitions.	138
Tabla 3.3 Evolution of the nutrients and heavy metals contents at the beginning (P0 and B0) and at the end (P and B) of the composting process for the open pile (P) and the closed batch biodigester (B).	139
Tabla 4.1 Regression analysis of the effect of temperature and holding time on mycelial growth for the two <i>D. seriata</i> isolates.....	153
Tabla 4.2 Coefficients of determination (R^2) from each of the n -order kinetic models for the thermal mortality of <i>D. seriata</i> at four different temperatures.....	154
Tabla 4.3 Thermal death constants for the 1 st -order kinetic model for <i>D. seriata</i> fungus at different temperatures.	155
Tabla 4.4 Comparison of the lethal time obtained experimentally for <i>D. seriata</i> at 65 °C with those estimated from the 1 st -order kinetic model.....	155

Tabla 4.5 Inhibition parameters for *D. seriata* mycelia from the fits of the Weibull model to the inactivation curves..... 157

Tabla 5.1 Composition of each of the solutions mixed with MEA for the antifungal activity tests 169

Tabla 5.2 Assignment of FTIR spectra bands 173

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Superficie vitícola en Europa (mil ha) en el año 2014 (GAIN-USDA Report, 2014).....	18
Figura 1.2 Producción mundial de vino (excluidos zumo y mosto) (mil hl) en el año 2014 (GAIN-USDA, Report, 2014).....	19
Figura 1.3 Ciclo de la vida de los patógenos responsable del decaimiento de la vid por <i>Botryosphaeriaceae</i> (Gramaje et al, 2014, COST Action FA 1303).....	26
Figura 1.4 Ciclo de la vida de los patógenos responsable de la Yesca y la enfermedad de Petri (Gramaje et al, 2014, COST Action FA 1303).....	27
Figura 1.5 Tipos de poda aplicados en un viñedo de Rumania y sus incidencia (Yesca) sobre la variedad Feteasca regala (Matei et al., 2010).....	28
Figura 1.6 Esquema de los procesos de compostaje (abierto y cerrado) en pila y biodigestor cerrado utilizando una mezcla de gallinaza y sarmientos de la poda de la vid en una relación C/N de 2:1 (Matei et al., 2014, Sánchez et al., 2014).....	32
Figura 1.7 Estructura química del quitosano.....	46
Figura 2.1 Síntomas y características de troncos de la madera de la vid afectados por hongos. Fotografías de Josep Armengol Forti y José García Jimenez (1, 2, 4, 5 y 6) y Anastasio Bazán (3) en MAGRAMA 2014.....	67
Figura 2.2 Planteamiento general de la Tesis Doctoral en base a artículos científicos redactados: “ <i>Higienización de sarmientos de la poda de vid mediante métodos térmicos y biofungicida</i> ”.....	72
Figura 2.3 Esquema del proceso de compostaje en pila abierta y/o biodigestor cerrado, parámetros de seguimiento del proceso.....	73
Figura 2.4 Compostaje de sarmientos de la poda de la vid con gallinaza (SG) y estiércol de oveja (SE) (1:2, v/v) en un biodigestor cerrado con aireación y volteo automático (Matei et al., 2013).....	75
Figura 2.5 Triturado de residuos de la poda de la vid mediante astilladora móvil con reducido tamaño y gran facilidad de acceso a las explotaciones agrícolas (pueden procesar entre 1.000 y 10.000 kg/h).....	77
Figura 2.6 Montaje de una pila abierta (a) y de un biodigestor cerrado discontinuo (b) con gallinaza y restos del a poda de la vid triturados (2:1, v/v).....	83
Figura 2.7 Temperaturas en diferentes secciones de una pila de compost (Atlas y Bartha, 2002).....	84
Figura 2.8 Esquema del control <i>in vitro</i> (termoterapia) del hongo <i>Diplodia seriata</i> inoculado en sarmientos de la vid y su higienización.....	89
Figura 2.9 Esquema del control <i>in vitro</i> con Nanopesticidas (quitosano/porpoleo/nAg) del hongo <i>Diplodia seriata</i> (Y207-1-1c).....	96
Figura 2.10 Daños causados por hongos patógenos (<i>D. seriata</i>) de la madera de la vid, necrosis, desecamiento, pudrición, afecciones en las hojas y uvas.....	97

Figura 3.1 Evolution of temperature (°C) and humidity (%) of the samples collected on a daily basis for piles (top) and closed batch biodigesters (bottom). All measurements were conducted in triplicate: the reported values correspond to the average and the e.s.d. was <4.20% in all cases.	133
Figura 3.2 pH and electrical conductivity variation in the samples taken from open piles (top) and closed batch digesters (bottom). The reported values are the average of three measurements, and the e.s.d. was <1% in all cases.	134
Figura 3.3 C/N ratio variations in the samples taken from (a) open piles and (b) closed batch biodigesters. All reported values correspond to the average of the three repetitions, and e.s.d. was <1.9% in all cases.	135
Figura 3.4 <i>Diplodia seriata</i> fungus variations in the samples taken from (a) open piles and (b) closed batch biodigesters.	136
Figura 3.5 Other fungi and bacteria time evolution for open piles (top) and closed biodigesters (bottom).	137
Figura 4.1 Percentage of mycelial growth at different treatment temperatures and for various holding times for the two isolates of <i>D. seriata</i> : (a) Y84-1-1a and (b) Y207-1-1c. The same temperature-time combinations were assessed for the two isolates. All values are given in average and standard deviations have been determined from the five repetitions conducted for each assay.	152
Figura 4.2 Thermal mortality curves of <i>D. seriata</i> at different temperatures and holding times with their 1 st -order linear fits.	154
Figura 4.3 (a) Thermal mortality curve for <i>D. seriata</i> and (b) Arrhenius plot for temperature effects on thermal death rates of <i>D. seriata</i>	156
Figura 4.4 Survival curves of <i>D. seriata</i> at different temperatures in dry hot air as a function of the exposure time and their corresponding Weibull fits.	157
Figura 5.1 ATR-FTIR spectra of the chitosan- and propolis-based materials under study.	172
Figura 5.2 X-ray powder diffraction pattern for chitosan oligomers (<i>solid line</i>) and chitosan oligomers/propolis composite (<i>dashed line</i>). The inset shows a photograph of the chitosan oligomers/propolis film.	175
Figura 5.3 UV-Vis spectrum (<i>left</i>) and X-ray powder diffraction pattern, smoothed with a Savitzky–Golay 10 pt. window filter (<i>right</i>).	175
Figura 5.4 SEM micrographs (<i>left</i>) and TEM micrograph (<i>right</i>) of the ternary chitosan oligomers/propolis/silver NPs composite.	176
Figura 5.5 Antifungal action of medium molar mass chitosan (from Sigma Aldrich (1) and from Hangzhou Simit Chemical Technology Co. Ltd (2)) compared to that of chitosan oligomers.	177
Figura 5.6 Antifungal action of the aqueous and hydroalcoholic media for bare propolis (a), chitosan oligomers/propolis (b) and chitosan oligomers/propolis/silver NPs (c) composites.	179

Figura 5.7 Inhibition percentage and growth diameter of the *Diplodia seriata* fungus mycelia for propolis (P), chitosan oligomers (A), chitosan oligomers/propolis (B), chitosan oligomers/propolis/silver NPs (C), chitosan oligomers/silver NPs (D) and control, in aqueous solutions (wo/ EtOH) and in hydroalcoholic solutions (w/ EtOH). 180

Figura 5.8 Comparison of the antifungal activity of pure propolis, a propolis:gentisic acid mixture (1:1) and pure gentisic acid. R1, R2 and R3 stand for 1st, 2nd and 3rd repetition. 181

RESUMEN

Abstract

In the first article, entitled “**Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems**” was study after the ban on sodium arsenite, waste management alternatives to the prevalent burning method for the pruned material from grapevines affected by various fungi, such as the sanitization and biodegradation in solid phase by composting. In this work the dynamics of a fungus associated with vine decay (*Diplodia seriata*) during the composting process of a mixture of laying hen manure and vine pruning waste (2:1 w/w) have been investigated in open piles and batch closed biodigesters. Through the optimization of the various physical–chemical parameters, simultaneous revalorization and hygienization of the infected waste materials was attained, yielding class-A organo-mineral fertilizers. Nevertheless, dramatic differences in the efficiency of each system were observed: whereas in open piles it took 10 days to control *D. seriata* and 35 additional composting days to achieve full inhibition, in the closed biodigesters the fungus entirely disappeared within the first 3-4 days. Finally, the impact of seasonal variability has been assessed, observing greater significance in the summer for the open pile.

In the second article, entitled “**Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots**” the upsurge in fungal diseases that cause grapevine wood rot in young and adult plants remains a major concern for the wine sector. So as to study the effectiveness of heat treatments for the sanitization of pruning waste, the thermal death of two inocula of *Diplodia seriata* fungus -associated to black dead arm disease- was studied in vitro at different temperatures in a dry air incubator, confirming that inhibition increased as a function of temperature and exposure time. First-order and Weibull models were compared to describe *D. seriata* fungus survival curve kinetics, with high R² values (0.923 and 0.930, respectively) and high significances ($p < 0.001$) for both models. According to the first-order model, the time required to reach 100% mortality at 65 °C was 120 min (or 93 min to 95%), whereas for the Weibull model a 90% reduction was attained after 73 min.

In the third article, entitled “**Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata***”, the synthesis and characterization of composites of oligomeric chitosan with propolis extract which allow the incorporation of a third component (silver nanoparticles) are reported, together with their application in aqueous or hydroalcoholic solutions with a view to the formation of adhesive substances or nanofilms for the protection of vineyards against harmful xylophagous fungi. The antimicrobial properties of the association of the two biological products or resulting from the incorporation of silver nanoparticles (NPs) are studied and discussed. The efficacy of the chitosan oligomers/propolis/silver NPs ternary system is assessed in vitro for *Diplodia* fungi. A preliminary study on the convenience of replacing propolis with gentisic acid is also presented.

Key words: biodigester; composting; grapevine disease; laying hen manure; vine pruning waste; activation energy, *Diplodia seriata*, isolated fungus, pruned vine shoots, thermal death kinetics; chitosano, propolis, sonication, nanosilver, xylophagous fungi.



1 INTRODUCCIÓN

1.1 Viticultura en España

La vid es la planta cuyo cultivo está más extendido a lo largo de las diversas latitudes de nuestro mundo. De hecho, se cultiva en 45 países y en 2014, la superficie vitícola mundial ha sido de 7.55 millones ha. Los tres principales países productores han sido España, Francia e Italia, cuyos cultivos suman una superficie de 2.48 millones ha (GAIN-USDA Report, 2014) (Figura 1.1).

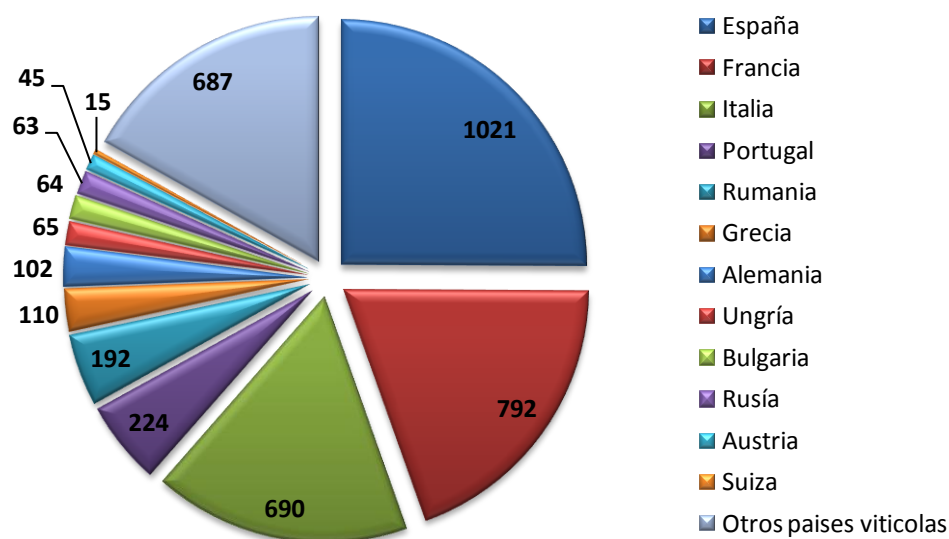


Figura 1.1 Superficie vitícola en Europa (mil ha) en el año 2014 (GAIN-USDA Report, 2014)

En 2014 la producción mundial de vino (excluido zumo o mosto) ha sido de 278.8 millones hl, solo 12 millones hl menos que la producción del 2013. España está en el tercer lugar después de Francia e Italia, con una producción de 41.6 mil hl (Figura 1.2).

La viticultura es una ocupación antigua que se desarrolla principalmente en los viñedos famosos por la calidad del vino y de la uva de mesa. Está claro que todo el proceso del trabajo vitícola, desde su inicio en el campo hasta la comercialización del vino, implica una forma de existencia económica que ha perdurado a lo largo de la historia y actualmente se mantiene.

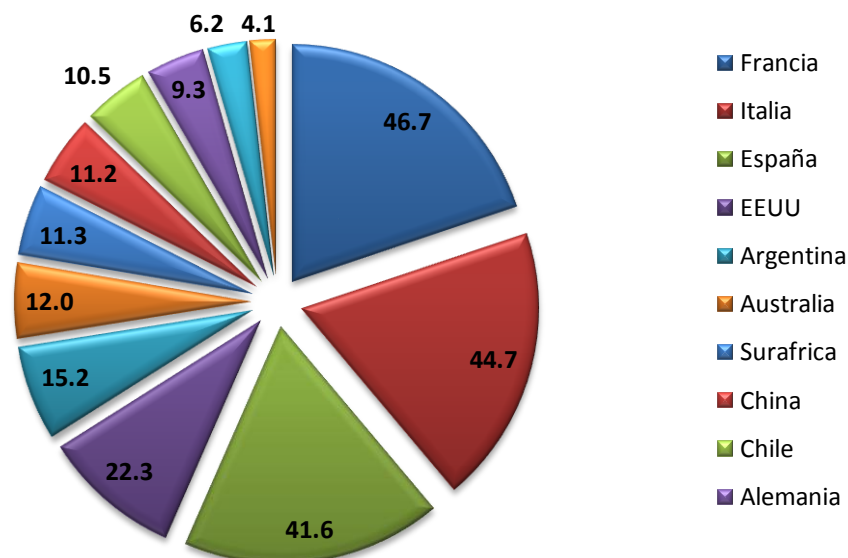


Figura 1.2 Producción mundial de vino (excluidos zumo y mosto) (mil hl) en el año 2014 (GAIN-USDA, Report, 2014).

La comercialización del vino, en el año 2014, ha estado dominada por los tres principales países productores, España, Francia e Italia, cuyo volumen conjunto de exportaciones, 57.4 millones hl, acapara el 56% del mercado mundial (Tabla 1.1).

España es el principal exportador mundial por el aumento de la producción en 2013 y por la desaparición de la intervención de la UE que orientaba una parte importante de la producción española hacia la destilación. (GAIN-USDA, Report, 2014).

Tabla 1.1 Principales países exportadores de vino en el mundo (mil hl).

	Volumen (mil hl)		Valor (millones EUR)		Tipo	2014		2014/2013 variación	
	2013	2014	2013	2014		Volumen (%)	Valor (%)	Volumen (%)	Valor (%)
España	18.53	22.56	5.60	2.46	embotellado	35	64	3	-1
					espumoso	8	16	3	-13
	21.7% variación		5% variación		granel y >2L	57	20	38	-10
Italia	20.32	20.54	5.01	5.07	embotellado	60	76	-1	1
					espumoso	12	17	18	14
	1.1% variación		1.4% variación		granel y >2L	28	8	-2	17
Francia	14.54	14.39	7.83	7.73	embotellado	71	62	0	-5
					espumoso	12	34	5	8
	1.1% variación		1.3% variación		granel y >2L	18	4	-9	-4

(GAIN-USDA, Report, 2014)

Otras de las bondades de la vid es que permite aprovechar los terrenos no aptos para otros cultivos, e incluso las laderas, con lo que los viñedos han pasado a desempeñar un papel importante en la conservación y la prevención de la erosión del suelo. No ha de pasarse por alto la función cultural de la vid, siendo considerada desde la antigüedad como un elemento de civilización.

De las uvas se puede obtener una amplia gama de vinos de calidad superior: (tintos, blancos, rosados, secos, semidulce, dulce y espumosos) así como bebidas espirituosas obtenidas por destilación (coñac, vermut, aguardiente etc.). Las uvas de mesa se puede comer frescas desde mediados de julio hasta finales de octubre, aunque mediante conservación adecuada puede extenderse su consume 2 o 3 meses más. También pueden ser reducidas a zumo y como tal comercializadas. Las pasas representan un producto muy valorado, fácil de transportar y almacenar, obtenido por deshidratación de las uvas sin semillas. El hollejo como producto secundario del proceso de vinificación permite múltiples usos: de su destilación puede obtenerse aguardiente; de las semillas, un aceite de uso alimentario; y del residuo, tras la extracción de las semillas, abono para la fertilización orgánica del suelo. El valor alimenticio de las uvas se debe a sus componentes químicos y sus formas accesibles para el organismo humano: azúcares, minerales, vitaminas, compuestos fenólicos, aromas y ácidos orgánicos, todo ello con efectos positivos sobre la salud humana (Dejeu, 2011).

La importancia ornamental de la vid se puede evidenciar en la decoración de los muros, paredes de las casas, terrazas, merced al cambio del color de las hojas durante el año, desde la primavera hasta el otoño.

Cada vez con más frecuencia la vid es apreciada como una planta con propiedades terapéuticas. Aunque son conocidas desde la antigüedad las virtudes terapéuticas del vino, la medicina moderna y las investigaciones recientes han mostrado la importancia de los compuestos fenólicos del vino como protectores de la salud cardiovascular, y en la prevención del cáncer y de las enfermedades específicas para la tercera edad.

Las virtudes referidas para los productos vitivinícolas junto a la importancia económica de la viña justifican la realidad de la viña como especie vegetal más cultivada en el Planeta (Dejeu L., 2010).

1.2 Impacto de las enfermedades fúngicas en el viñedo.

El déficit de precipitaciones durante el verano determina una aceleración de los estados fenológicos, una reducción del crecimiento de la baya, un contenido en azúcares, la recolección de la uva con dos semanas de antelación, y una acumulación de biomasa vegetativa que influye tanto en la producción y la calidad de la uva como en la resistencia de la viña (Matei et al., 2009). El desarrollo de la vid, como el resto de los cultivos, se ve influenciado no solo por las condiciones climatológicas (temperatura y humedad) sino también por la naturaleza del suelo, las características de la propia planta (variedad, patrón) y las labores agronómicas (tipo de poda, fertilización, riego). El conjunto de estos factores condiciona el ataque de los diversos parásitos, y en función de ellos se debe establecer la estrategia de protección.

De acuerdo con la Convocatoria de proyectos de 2014 “Retos de la I+D+i en Viticultura y Enología: nuevas demandas y cambio climático”, el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentación de España (I.N.I.A. hizo un llamamiento a los investigadores para fomentar la participación, la concentración de esfuerzos y la cooperación entre los sectores público y privado en materia de I+D+i como mecanismo para afrontar los retos tecnológicos generados por el cambio climático.

La Junta de Castilla y León presenta periódicamente en su página web de Agricultura y Ganadería sus Boletines Fitosanitarios e informa periódicamente a través de informes del Instituto Tecnológico Agrario (ITACyL) a la Asociación Agraria de Jóvenes Agricultores (ASAJA) del control de enfermedades y plagas. Por ejemplo, el Boletín Fitosanitario de la JCyL nº 4 de 2010 informó de la “Excoriosis de la vid” o enfermedad producida por el hongo *Phomopsis viticola* (Sacc.) en época de lluvias en el inicio de la brotación de los cultivos; y el Boletín Fitosanitario nº 1 de 2011 preconizó la forma de erradicación de la “Flavescencia Dorada de la vid” producida por una bacteria sin pared celular y transmitido de cepa en cepa por un insecto (la cicadela). Aparte los informes periódicos agroganaderos del ITACyL han venido informando del progresivo avance de la yesca y cómo ocurre cada vez en plantas más jóvenes, llegando a ser una situación generalizada en todas las zonas vitícolas.

Aunque el control de la enfermedad de la yesca es muy complicado, es importante que el sector disponga de herramientas o medidas que eviten su propagación y por ello la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León ha venido estableciendo desde el año 2014 un programa de monitorización y seguimiento del viñedo y la creación de un Plan Director de lucha contra las plagas agrícolas. El ITACyL ha establecido niveles de afectación en cada plantación, en base a la incidencia de la enfermedad (porcentaje de las cepas evaluadas presentando sintomatología compatible con yesca), y de su severidad (porcentaje de cada planta afectada por la expresión de síntomas, desde menos de un tercio de la planta a afectación total traducida en su muerte).

Es preciso reseñar que se han detectado plantas con sintomatología compatible con la yesca y eutipiosis en todas las provincias, si bien en las que se ha observado un mayor porcentaje de incidencia han sido: Ávila (5,79%), Zamora (3,69%), Burgos (3,64%), Soria (2,13%) y Valladolid (1,69%), mientras que en los casos de León, Palencia, Salamanca y Segovia la incidencia observada parece más testimonial, menor del 1%. En cuanto a Figuras de Calidad, las Denominaciones de Origen de Toro (5,76%) y Ribera de Duero (3,20%) han sido las que mayor incidencia han presentado. Incidencias globales entre el 2% y el 3% se han detectado en los casos de Cigales y Tierra del Vino de Zamora. Por encima del 1% en Arlanza, Arribes, Bierzo, Rueda y Valles de Benavente. En Tierra de León, Sierra de Salamanca y Valtiendas la incidencia ha sido menor al 1%.

Las principales enfermedades señaladas con una clara evidencia son Yesca, Eutipiosis, Enfermedad de Petri, Pie Negro y Enfermedad de brazo muerto en las cuales están involucradas una variedad de hongos patógenos que afectan la madera de la vid y que finalmente conduce a la muerte de la planta. El control es problemático tanto por el desconocimiento existente sobre el grado de resistencia de las diversas variedades como por la indefensión derivada de la prohibición de uso de los fungicidas tradicionales.

El Real Decreto 1311/2012, traspuso la Directiva Marco Comunitaria de Uso Sostenible de los productos fitosanitarios a nuestro marco normativo. Por su parte, el Plan de Acción Nacional ha establecido las medidas a adoptar durante el periodo 2013-2017 y en la Guía de Gestión integrada de plagas de la uva de transformación (GIP) del

MAGRAMA de 2014, se ha aportado nueva información de carácter técnico, así como un apartado de bibliografía especializada en la que se deja atrás la forma convencional de abordar los problemas fitosanitarios para el control agronómico de plagas y enfermedades de la vid. Al tiempo, se preconiza la investigación sobre nuevas tecnologías de higienización y control.

1.3 Técnicas de adaptación y mitigación para la higienización y el control de hongos patógenos.

Partiendo del hecho de que los fungicidas con potencial control sobre las enfermedades de la madera de la vid han sido prohibidos y no hay un tratamiento disponible eficaz, resulta imprescindible por lo tanto se requiere un desarrollo de alternativas sostenibles e innovadoras para la gestión de estas enfermedades. Obviamente, las investigaciones han de basarse en la Ecología de los microorganismos implicados que habitan en la madera de la vid pero se hace necesario desarrollar nuevas estrategias de control biológico (Tabla 1.2).

El problema derivado de las enfermedades fúngicas y bacterianas de la madera por pérdidas de rendimiento y de calidad de los productos de las parcelas afectadas ha hecho que la comunidad científica este aplicando enormes esfuerzos para tratar de paliar sus efectos. Sin embargo, hasta que los resultados esperados sean alcanzados, solo las medidas profilácticas y las buenas prácticas culturales constituyen la única estrategia práctica para minimizar la incidencia de los decaimientos de la vid. En los últimos años varias líneas de trabajo están desarrollando métodos dirigidos a mejorar la multiplicación de plantas en vivero que presenten menos problemas fitosanitarios (Bleach et al., 2013; Gramaje et al., 2010).

De acuerdo con las fichas y registros de productos fitosanitarios del Ministerio Español (MAGRAMA), el tratamiento de las plantas enfermas puede realizarse con sales de cobre, como oxiclورو de cobre y sulfato tribásico de cobre, una vez que

Tabla 1.2 Principales enfermedades de la madera de la vid, hongos implicados, sintomatología y métodos de control.

Enfermedad	Hongos patógenos implicados	Ref.	Estado de la planta	Método de contaminación	Sintomatología	"Prácticas culturales"	"Lucha biológica y química"	Ref.
Yesca	<i>Fomitiporia punctata</i> <i>Stereum hirsutum</i>	Larignon & Dubos, 1997; Mugnai et al., 1999; Armengol et al., 2001; Martin & Cobos, 2007	Planta adulta	A través de las heridas de poda.	Forma crónica: decoloraciones y necrosis internerviales en las hojas, manifestación errática, racimos pasificados. Forma rápida (apoplejica): muerte repentina en verano, muerte de uno o varios brazos de la cepa entera.	Marcar las cepas enfermas en verano. Posterior poda o arranque durante el invierno. Poda tardía, en tiempo seco y no en los 4 días posteriores a la lluvia. Primero podar las cepas sanas. En viña joven poda en verde.	<i>Trichoderma spp.</i> Cubiet 50%, Ciproconazol 10% [WG] P/P (para la Yesca)	Jaspers & Mostert 2008; Gramaje et al., 2009; Herche & Gubler, 2010 (VV.AA. 1987); MAGRAMA, 2014
Eutipiosis	<i>Eutypa lata</i>	Lecomte et al., 2012; Martin & Martin 2013; Martin et al., 2009	Planta adulta	A través de las heridas de poda, viento, lluvia.	Aparición de brotes débiles y hojas pequeñas, necrosis dura, oscurecimiento de la madera.	Evitar los grandes cortes, o más verticales posibles. Sellar con un mastic protector las heridas de poda. Destruir residuos de poda.	Sales de cobre (oxicloruro de cobre y sulfato tribásico de cobre).	Armengol et al. 2004a, 2004b; Beltran et al. 2004
Enfermedad de Petri	<i>Pa. chlamydospora</i> <i>Phaeoacremonium spp.</i> Nuevo: <i>Cladosphora luteo-olivacea</i>	Petit & Gubler, 2005; Alaniz et al., 2009; Martin et al., 2011	Plantas jóvenes, en viveros y nuevas plantaciones	A través de las heridas de poda, viento, lluvia, suelo	Crecimiento raquíptico de la planta, exudado gomoso, decaimiento progresivo y marchitez de la planta, fallos en la soldadura del injerto.	No fertilización nitrogenada en los primeros 5 años.	Agua caliente (54°C/30 min)	Bleach et al., 2008; Gramaje et al., 2010, 2013)
Pie negro	<i>Cylindrocarpon spp.</i> <i>Ilyonectria</i>	Petit & Gubler, 2005; Alaniz et al., 2009; Martin et al., 2011	Plantas jóvenes hasta 10 años de edad	A través del proceso de enraizamiento en vivero.	Lesiones necróticas, reducción en la masa radicular.	Desinfectar la herramienta de poda con formol, alcohol al 70%, sulfato de cobre o lejía al 10% durante 1 o 2 minutos.	Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada al 25%) a la dosis de 1%,	Garaia, 2014
Brazo muerto (BDA)	<i>Botryosphaeriaceae:</i> <i>Diplodia seriata</i> , <i>Neofusicoccum parvum</i>	Savocchia et al., 2007; Martos Arias, 2008; Úrbez-Torres et al., 2009; Spagnolo et al., 2010; Martín, 2013	Planta adulta	A través de las heridas de poda, viento, lluvia.	Desecaciones foliares aparición de zonas necróticas en la corteza del. Puede confundirse con la yesca o la eutipa.	En nuevas plantaciones, utilizar material sano.	Tebuconazol 2%+resinas sintéticas 82% Compostaje cerrado y abierto Biopesticidas (Quitosano/Propoleo)	Armengol et al. 2002 Matei et al. 2014, 2015

finalice la caída de la hoja y al objeto de limitar la incidencia de esta enfermedad (Armengol et al. 2001, 2001b; Beltran et al. 2004). El tratamiento debe ser efectuado asegurando un buen mojado de las plantas.

Como método alternativo algunos grupos de investigación de la UPM (Prof. José María Duran Altisent), y Cooperativas, han demostrado la eficacia de la aplicación por pulverización de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada al 25%) a la dosis de 1%, inmediatamente después de la caída de la hoja (Garaia, 2014).

El grupo de trabajo del Prof. Durán de Hortofruticultura de la UPM y el ITACYL viene haciendo ensayos con antifúngicos naturales y con productos comercializados (algunos, sustancias activas que hoy están excluidas del Anexo I de la Directiva 91/414/CEE, como el DNOC (4,3-dinitro-o-cresol)). También se han efectuado ensayos sin éxito utilizando Cubiet 50%, mediante pulverización normal, mojando bien los cortes de poda y el tronco, y en periodo de parada vegetativa (VV.AA. 1987), ensayado sin éxito con resinas sintéticas al 82% y tebuconazol al 2% aplicado con pincel sobre las heridas o cortes de poda (Armengol et al.2002, 2001b).

Más reciente se han presentado estudios sobre la eficacia de oligómeros de quitosano (Matei et al., 2015) como también de quitosano y nanometales frente a *Diplodia seriata*, hongo patógeno xilófago que habita en las heridas de la poda de la vid (Patente OEPM Madrid, Cod: P201431591, 2014).

Es preciso destacar, dentro de los proyectos europeos de cooperación en Ciencia y Tecnología sobre el tema de control sostenible, el proyecto europeo LIFE AGRO integra, liderado por el Gobierno de Navarra y cuyo objetivo es minimizar el riesgo medioambiental en la protección de cultivos de cereales, hortícolas, frutales y viña, en el control de plagas, enfermedades y malas hierbas.

Gramaje et al. (2014) presenta como primer estudio epidemiológico dentro del proyecto COST Action FA 1303 “Sustainable control of grapevine trunk diseases” (2013-2017), el ciclo de la vida de los patógenos responsables de las principales enfermedades criptogámicas. Este estudio demuestra la influencia de los factores medioambientales y estacionales en la aparición de los síntomas de la enfermedad. Se observa que en la estación de verano y otoño no hay cambios en el tejido sano en la

actividad de los hongos pero sí en el de las bacterias y en particular en invierno (Figura 1.3).

La madera de las vides maduras (15-25 años) es siempre necrótica y pocas especies fúngicas colonizan estas áreas dañadas (Bruezi et al., 2013). La apoplejía o Yesca normalmente solo aparece en verano (Figura 1.4) debido a una variación entre los periodos lluviosos y secos, además de por la aparición de lesiones o heridas causadas por heladas o granizo que favorecen la penetración de *Fomitiporia punctata*, *Di. seriata*, *Phaeoacremonium* ssp., y otros hongos a partir de las heridas resultantes también por la poda de invierno.

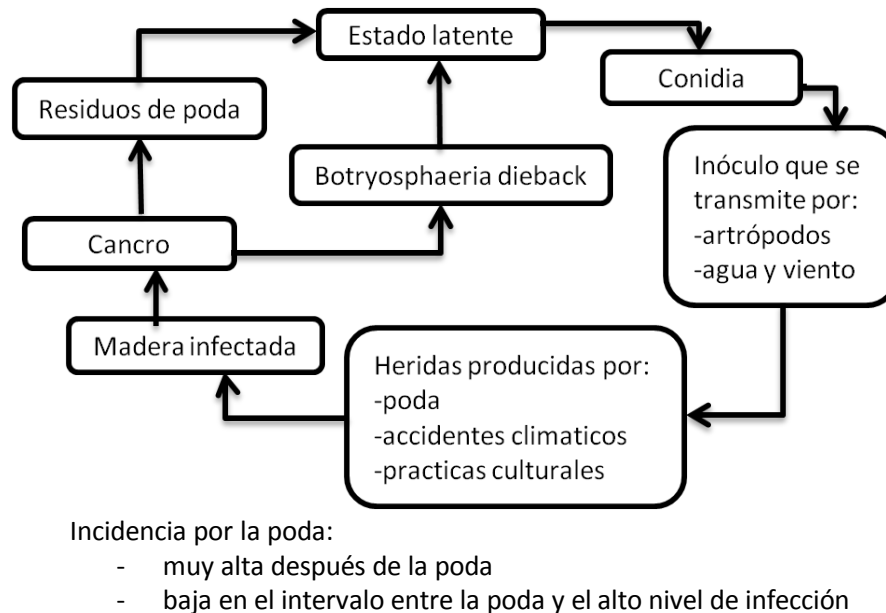


Figura 1.3 Ciclo de la vida de los patógenos responsable del decaimiento de la vid por *Botryosphaeriaceae* (Gramaje et al, 2014, COST Action FA 1303)

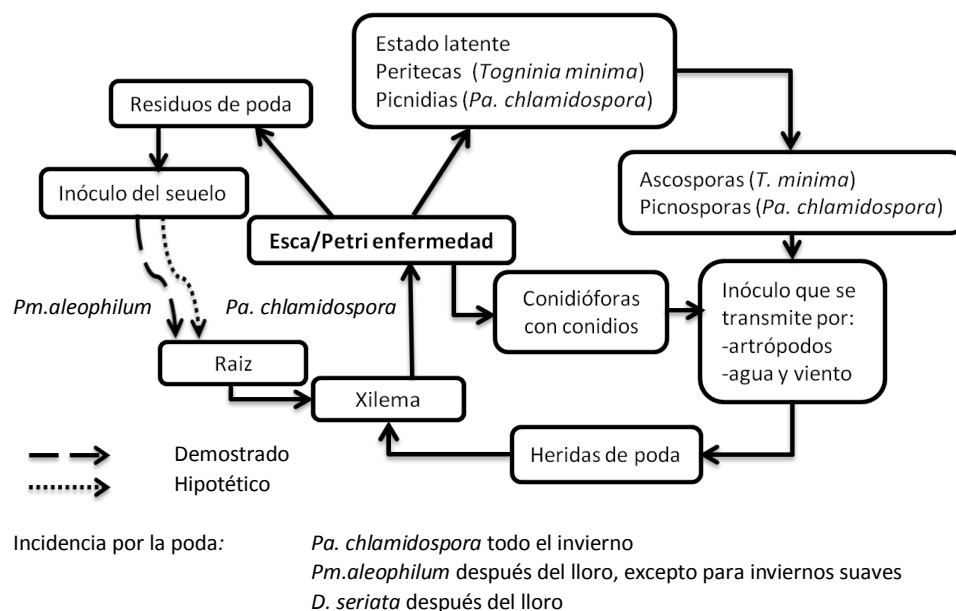


Figura 1.4 Ciclo de la vida de los patógenos responsable de la Yesca y la enfermedad de Petri (Gramaje et al, 2014, COST Action FA 1303)

1.3.1 Procesos de compostaje para la higienización de residuos vitícolas.

1.3.1.1 Residuos lignocelulosicos de la poda de la vid

Los residuos lignocelulosicos más importantes de la industria enológica son los sarmientos de la poda en seco de las cepas. Como se ha indicado anteriormente, España alcanzó, en el año 2013, la producción record de 50.5 millones hl, alcanzando con ello el primer lugar, a nivel mundial, entre los países productores. Asimismo, se generaron por poda 2.9 t (entre 2-5 t/año, Mancera et al., 2012) de sarmientos cuyo volumen y tratamiento reviste especial significación. De hecho, tales sarmientos son abandonados por los viticultores cerca de las parcelas y durante un tiempo indeterminado para que sufran un proceso de descomposición descontrolada (no higieniza los sarmientos) y que una vez incorporados de nuevo a la viña como fuente de materia orgánica (también práctica habitual) contribuyen a infectar y extender la contaminación por hongos en plantas sanas.

Los sarmientos de la poda de la vid se consideran como residuos fósiles y cuando se queman, incrementan el nivel de CO₂ en la atmosfera y si se abandonan en las parcelas, constituyen una fuente de inóculo para las enfermedades criptogámicas e incrementan su incidencia, siendo inclusive mayor en las cepas podadas en comparación

con las cepas sin podar (Larignon, 2012). Ensayos efectuados por nosotros en una estancia en Rumania (Matei et al., 2010) demuestran que un número elevado de intervenciones o cortes de poda (Royat doble) producidos sobre la variedad Feteasca regala, determina una mayor incidencia de la enfermedad de yesca (Figura 1.5).

Por su propia naturaleza, este tipo de biomasa (sarmientos de la poda de la vid), requiere de una serie de pretratamientos o transformaciones para ser objeto de un aprovechamiento eficiente debido a los siguientes inconvenientes: gran tamaño de las piezas; gran dispersión de los residuos; dificultad de transporte y manipulación; heterogeneidad y poca uniformidad; elevado contenido en humedad e incremento de la humedad; reducida densidad; presencia de residuos no aprovechables como arena, piedras, metales, etc.; fermentación de la biomasa amontonada.

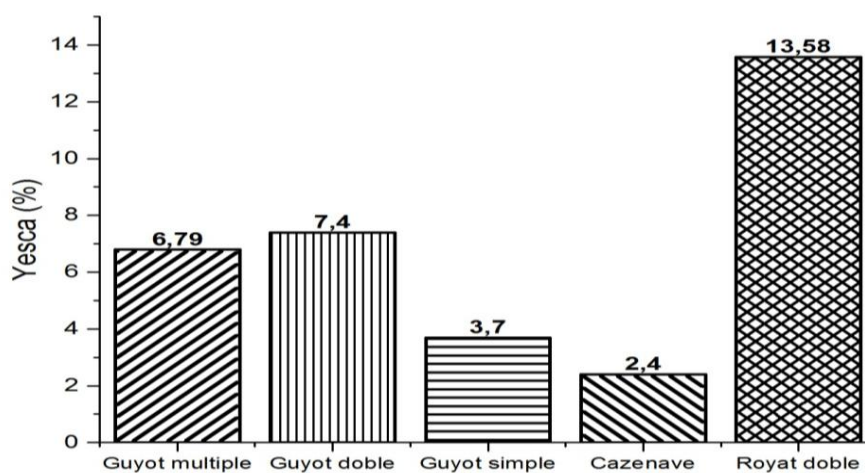


Figura 1.5 Tipos de poda aplicados en un viñedo de Rumania y sus incidencia (Yesca) sobre la variedad Feteasca regala (Matei et al., 2010).

Los residuos lignocelulósicos presentan una gran resistencia a la biodegradación. Las fibras vegetales se pueden considerar como compuestos de fibras de celulosa que se mantienen unidos por una matriz formada por lignina y hemicelulosa (Jayaraman, 2003), cuya función es actuar como una barrera natural a la degradación microbiana y como protección mecánica. Según Spiridon y Popa (2008) los xilanos son uno de los principales componentes de los materiales lignocelulosicos, correspondiendo a 25-35% de la masa total de la hemicelulosa. Los sarmientos de la vid tienen menos hemicelulosa (67%) que otros residuos agrícolas (paja de trigo, tallos de girasol, tallos de algodón, paja de arroz etc.), pero similar a la del pino y superior al de las podas de olivo. El

contenido de lignina (20%) es similar al del eucalipto y al de los materiales arriba mencionados (Jiménez et al., 2004).

Se ha visto que utilizando sarmientos de la poda de la vid como materia prima para la obtención de la pasta para papel por el método kraft, presenta mayor calidad con mayor contenido de celulosa (74%) y también en lignina (17%) que las pastas de paja de trigo y de podas de olivo consideradas (Jiménez et al., 2004).

La hemicelulosa comprende entre 20 y 50% de los polisacáridos presentes en el material lignoceluloso, y por lo tanto contribuye significativamente a la producción de biocombustible. Los sarmientos son considerados como residuos con un potencial interés energético por su poder calorífico (0.28-0.35 Kcal t⁻¹) (De Juana et al., 2003). Se utilizan como combustible en calderas y hornos, y permite obtener agua caliente para ser utilizada en diferentes instalaciones de bodegas, ya sea para el lavado de los tanques, calefacción o incluso generación de electricidad (Celma et al., 2001).

La utilización de los sarmientos de la poda de la vid como biomasa presenta una serie de inconvenientes medioambientales y económicos derivados del bajo rendimiento de las calderas de biomasa respecto al rendimiento de las de combustibles fósiles (Demirbas, 2005). Esto se debe a que los sistemas de alimentación y de eliminación de partículas de los gases de escape son muy complejos, y se necesita gran espacio para su almacenamiento (Fernández, 2009) y así como la dispersión del recurso en el espacio que conlleva costes significativos (Johnson et al., 2012).

La eliminación de los residuos lignocelulosos se puede realizar mediante procesos de compostaje como un control fitosanitario de higienización para conseguir un producto libre de hongos fitopatológicos contaminantes o tóxicos acumulados, y ayuda a mejorar las características del suelo.

El compostaje de los sarmientos de la poda de la vid requiere de la adición de materiales orgánicos biodegradables como fuentes de nitrógeno y humedad.

1.3.1.2 Materiales orgánicos nitrogenados

La aportación nitrogenada para llevar a cabo el proceso de compostaje requiere materia orgánica rica en nitrógeno como el estiércol. El material original, que no ha

sufrido ninguna transformación o se encuentra iniciándola, no es apropiado para el uso agrícola y puede plantear problemas sanitarios.

A menudo se utiliza la relación C/N del sustrato para prevenir la importancia del fenómeno de inmovilización neta por la incorporación en el suelo de un abono orgánico. Los materiales con una relación C/N baja favorecen la mineralización neta del nitrógeno mientras que, los materiales con una relación C/N alta favorecen la inmovilización (Urbano Terrón, 2002). Antes de realizar el proceso de compostaje de los sarmientos debemos conocer qué tipo de aditivo nitrogenado es el más adecuado para la degradación de este tipo de residuo sabiendo que tiene un contenido muy alto en C y son residuos lignocelulosicos que compostan muy difícilmente. Los estiércoles son residuos agrícolas muy ricos en nitrógeno (sobre todo inorgánico) y sirven como inoculantes microbianos (ej.: estiércol de gallina y el estiércol de oveja) (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 Microorganismos presentes en los estiércoles (UGC/g) a utilizar en la elaboración de compost (Tortosa et al., 2012).

Fuentes	Microorganismos log (UFC/g)		
	Aeróbicos Mesofílicos	Hongos y Levaduras	Actinomycetes
Estiercol de ovejas	6,30	3,30	1,00
Estiercol de gallina	9,00	4,50	1,00
Promedio	7,65	3,90	1,00
σ	1,91	0,85	0,00

(UGC/g): unidades formadoras de colonias por gramo de muestra
 σ : Errores estándar

En la actualidad la aplicación agronómica del estiércol de gallina constituye la opción de gestión más importante por razones económicas como de valorización de nutrientes. Como tratamientos para este residuo agrícola destacamos la incineración o gasificación (calor aprovechado para la producción de energía eléctrica), la digestión anaerobia, el aprovechamiento de biogás (Flotats et al. 2004) y el proceso de co-compostaje. La gallinaza, es un residuo poco manejable por su fuerte olor y los problemas que genera en el sitio de disposición final.

Estos olores desagradables provocados por la degradación en condiciones anaeróbicas tienen como consecuencia la generación de gases orgánicos (biogás) como

metano, gases de efecto invernadero que deben ser captados y tratados antes de ser emitidos a la atmósfera (Bueno et al, 2008), lo que también supone dificultades técnicas y económicas.

Otro estiércol con alto contenido en nitrógeno, aunque inferior al de gallinaza, es el estiércol de oveja, que no desprende demasiado mal olor. Presenta la peculiaridad de ser especialmente rico en cloruro potásico. El estiércol de oveja es bastante seco por lo cual es necesario regar las capas en el proceso de compostaje. Composta más tarde y con una temperatura termofílica de solo 55-60°C, fase que dura alrededor de dos semanas del inicio.

1.3.1.3 Sistemas de compostaje abiertos y cerrados para la higienización de hongos patógeno

En la naturaleza el compostaje de la materia orgánica se desarrolla en condiciones de aerobiosis. No obstante, en un proceso industrial puede realizarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (microorganismos diferentes) presentando ventajas y desventajas conocidas como las que aparecen resumidas en la tabla 1.4.

Tabla 1.4 Ventajas y desventajas en los procesos aerobios y anaerobios de compostaje

Compostaje aerobio	Compostaje anaerobio
<u>Ventajas</u>	
Se efectúa en presencia de oxígeno y de forma controlada. Es un proceso rápido y se obtiene un producto con una buena higienización y calidad.	Se efectúa en defecto de oxígeno y por medio de digestores anaerobios. En condiciones de hermeticidad no da problemas de olores y posibilita la utilización de biogás.
<u>Desventajas</u>	
Emisión de malos olores y vapor de agua. Caída de temperatura por las condiciones climáticas.	Mala higienización, interrupción del proceso de nitrificación, peligros de incendios y necesidad de llevar a cabo un compostaje aerobio al final del proceso en condiciones de aerobiosis.

El factor sobre el que más se puede influir durante el proceso de compostaje es el suministro de oxígeno, por lo que en todos los sistemas la aireación es fundamental la aireación natural, forzada y por volteo (Allué, 1993).

La elección del método de compostaje, teniendo en cuenta las condiciones económicas, depende de otros factores tales como la disponibilidad de espacio, la cantidad de residuo a tratar, etc. En la Figura 1.6 se presenta un resumen de los dos procesos de compostaje (abierto y cerrado) empleados con una mezcla de estiércol de gallina en combinación con los sarmientos de la poda de la vid en una proporción de 2:1 (C/N) para una correcta higienización (Matei et al, 2014 y Sánchez et al 2014).

El compostaje en sistema abierto más simple conocido es la pila. Requiere mucho espacio, aunque es más barato que los sistemas de compostaje cerrados.

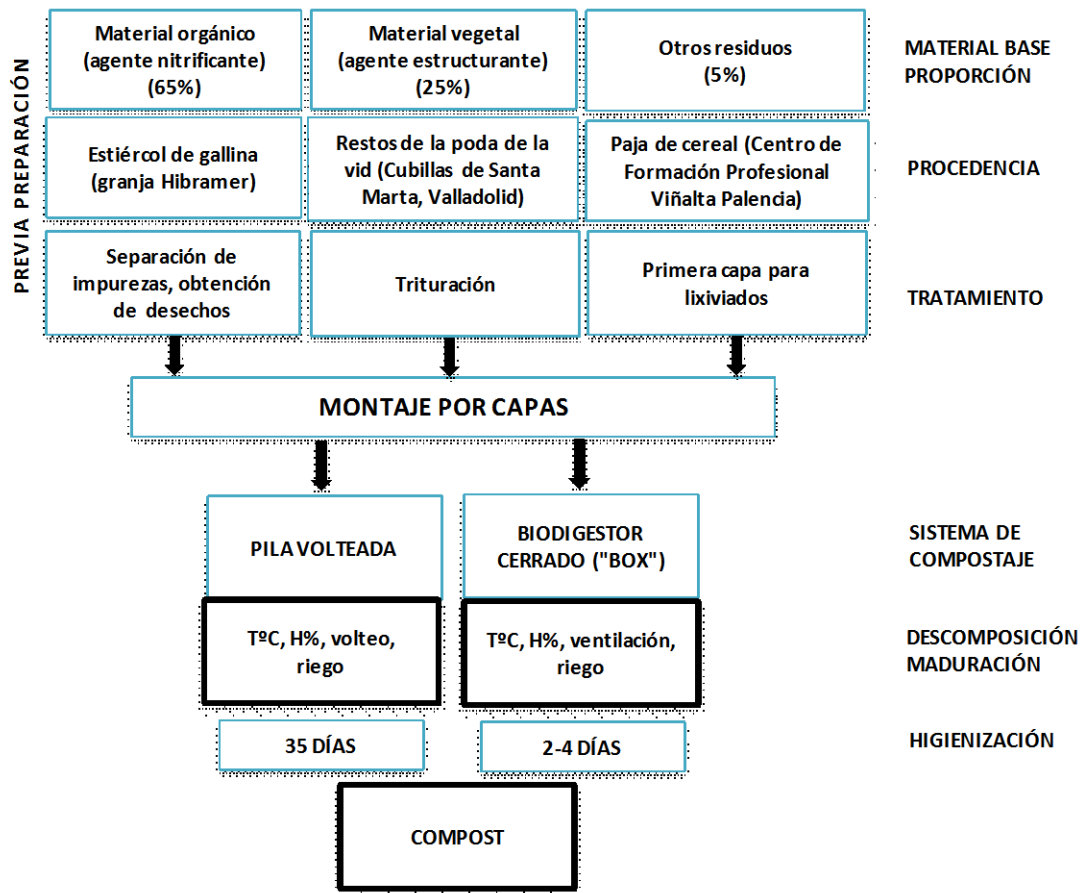


Figura 1.6 Esquema de los procesos de compostaje (abierto y cerrado) en pila y biodigestor cerrado utilizando una mezcla de gallinaza y sarmientos de la poda de la vid en una relación C/N de 2:1 (Matei et al., 2014, Sánchez et al., 2014).

Este sistema de compostaje da buenos resultados si se voltea periódicamente la masa apilada (a medida que la temperatura baja), con objeto de introducir el material de la parte externa al interior e higienizar así toda la masa por igual. El riego se emplea para evitar el desecamiento del montón que puede producirse más fácilmente cuando la materia orgánica que se va a compostar tiene una alta proporción de lignina y celulosa, y en zonas o épocas calurosas. Si la temperatura sobrepasa los 70°C se puede regar el montón para hacer descender la temperatura.

La duración del proceso de higienización, como el de biodegradación, depende del tipo de materiales utilizado. Al utilizar los sarmientos de la poda de la vid como agente estructurante (agent bulking) para compostar en varias mezclas con estiércol de vacuno se observa la higienización del material por la inactivación de *Fusarium oxysporum* por las altas temperaturas (Bustamante et al., 2012). El aumento de la temperatura se ve afectado por el aumento del volumen de la carga de material puesto a compostar. El compost obtenido muestra grados suficientes de estabilidad y madurez como también una dilución de metales pesados en el contenido. La utilización alternativa de purines de cerdo para el compostaje de sarmientos de la poda de la vid, realizada por Bustamante et al (2015) ha servido para constatar el efecto supresor contra *Fusarium oxysporum* de este compost aparte de mostrar propiedades físicas adecuadas para su uso como sustrato de cultivo.

Las altas temperaturas del proceso de compostaje dependen también de la estación en cual se desarrolla. La eficiencia del proceso de compostaje de lodos de depuradora con la inactivación de los microorganismos patógenos es más alta en verano (9 días) que en invierno (29 días), debido a las altas temperaturas que se alcanzan (Kaszewska et al., 2006).

El sistema cerrado de compostaje se suele utilizar para la fase de higienización y descomposición, mientras que para la de maduración se suele emplear el sistema de pilas volteadas. Estos sistemas requieren menos espacio y reduce tanto el tiempo de compostaje como el de higienización (en 2 días después de alcanzar las temperaturas termofílicas) (Dunkley et al., 2011). Asimismo, minimizan el impacto por emisiones de sustancias volátiles que provocan malos olores (Sánchez et al., 2008). No obstante, estos

sistemas son mucho más caros, tanto en lo que se refiere a costes de equipamiento como de mantenimiento.

El biodigestor permanece cerrado en todo momento, salvo en las operaciones de adición de materiales y agua. Es evidente que, si por causas ajenas al propio proceso fuera necesario, se podría establecer la temperatura comprendidas entre 60-70°C por ventilación con aire caliente.

Los componentes del biodigestor cerrado discontinuo utilizado para los ensayos de la presente tesis (diseñado por el equipo de investigación del departamento de Ciencias Agroforestales, ETSIA UVA) (Sánchez et al., 2008) son dos fundamentalmente:

- Modulo Box-Compost, envolvente contenedora de los compostadores;
- Dispositivo Compostronic, encargado del acondicionamiento de temperatura y humedad del material tratado y el control automático de todo el proceso de biodigestión.

La operación de llenado se empieza colocando en capas los distintos materiales a compostar, en proporciones dependientes de los ingredientes de la mezcla y de los contenidos en carbono y nitrógeno. Erickson et al. (2009) observaron una buena higienización (*Salmonella* spp) del compost para una relación C/N 20:1 en comparación con la relación de 40:1 que desarrolla una temperatura más alta pero no una inhibición más rápida. Por último, a partir del contenido en humedad de cada uno de los materiales usados se calcula el peso de agua necesaria. Para camas muy secas, como la de los sarmientos de la poda de la vid, es imprescindible ajustar la humedad.

Para un buen control del proceso de compostaje se dispone de un dispositivo HOBO *data logger* dotado de registradores de datos con 4 canales externos y de 4 sensores externos de temperatura (60-70°C) que se introducen en varias alturas en las capas del biodigestor.

(i) *Microbiología del proceso de compostaje.*

El proceso de compostaje es un proceso dinámico de microorganismos quimioheterótrofos: una población comienza a aparecer mientras otras alcanzan su máximo o ya están desapareciendo. Se trata de poblaciones microbianas constituidas por bacterias, hongos, actinomicetos que degradan secuencialmente la materia orgánica en

presencia del oxígeno (Moreno, 2008) generando energía en forma de calor (Tabla 1.5). El tipo predominante va a depender de las condiciones nutricionales y ambientales.

Tabla 1.5 Características de los microorganismos del proceso de compostaje

Grupo	Características
Bacterias	Siempre presentes en el compost y dominantes en calidad y cantidad. Fuerte crecimiento si la relación C/N es baja y la humedad elevada. Amplio espectro de actividad en gran margen de pH, sobre todo en sustratos frescos (<i>Pseudomonas</i> ; géneros <i>Bacillus</i> , <i>Thiobacillus</i> y <i>Enterobacter</i>).
Hongos	Dominantes en la degradación de celulosa y lignina. Biomasa superior a las bacterias si se desarrolla con niveles de humedad más bajos y toleran gamas de pH más amplias que las bacterias (<i>Aspergillus</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i>)
Actinomicetos	Degradan las sustancias que no han degradado bacterias ni hongos. Neutrófilos, toleran el pH ligeramente básico y son poco competitivos con otros grupos. Se desarrollan en las fases finales de maduración.
Algas	Organismos con clorofila, se sitúan en los primeros 10 cm de la capa superficial utilizando las sales minerales. En ausencia de luz se puede volver heterótrofos.
Protozoos	Grupo heterogéneo de unicelulares móviles. Necesitan un medio húmedo. Grandes consumidores de bacterias y de otros microorganismos.

Por lo que respecta al compostaje, se trata de un proceso microbiológico aerobio, realizado en condiciones controladas, que permiten el establecimiento de temperaturas termófilas y cuyo producto final es una materia orgánica análoga al humus del suelo, libre de patógenos y semillas de malas hierbas, y que ejerce un efecto beneficioso sobre las plantas (Haug, 1993).

En primer lugar, se trata de un proceso microbiológico aerobio. Conviene indicar que, en líneas generales, los microorganismos se pueden clasificar en aerobios y anaerobios.

Microorganismos aerobios: necesitan oxígeno molecular para vivir; cuando actúan sobre la materia orgánica que les sirve de alimento convierten aquella en un material que se puede asimilar al humus; su actividad se acompaña de desprendimiento de dióxido de carbono, agua y calor.

Microorganismos anaerobios: no necesitan oxígeno molecular para vivir; cuando actúan sobre la materia orgánica forman un lodo anaerobio y una mezcla de gases o biogás (metano y dióxido de carbono principalmente). En la digestión anaerobia se

forman muy diversos compuestos intermedios, muchos de los cuales son origen de malos olores.

El compostaje es un “proceso microbiológico aerobio”, por lo tanto no debe ser origen de malos olores. En la definición se habla de “condiciones controladas” para distinguir el compostaje de los procesos que pueden tener lugar cuando la materia orgánica biodegradable se abandona o se deja en un montón o pila sin adecuado control.

Como consecuencia de la actividad metabólica de estos microorganismos la temperatura aumenta rápidamente, la variación térmica tiene cuatro fases:

Al iniciarse el proceso de compostaje, *fase mesófilica* (10-42°C), la masa está a temperatura ambiente y empiezan a actuar las bacterias y los hongos mesófilos y termotolerantes que utilizan sustancias carbonadas solubles y de fácil degradación como los azúcares, grasas y aminoácidos. Las bacterias con metabolismo oxidativo y fermentativo son las que alcanzan mayores niveles en esta fase, sobre todo bacterias Gram negativas y productoras de ácido láctico (Ryckeboer et al., 2003). Son pocos los hongos presentes en esta fase.

En la *fase termófilica* (45–75°C) se alcanzan temperaturas suficientes para la eliminación de semillas de malas hierbas, patógenos y de humedad. En las primeras etapas de esta fase empiezan a predominar los actinomicetos (*Streptomycetos*) que, junto con los *Bacillus*, comienzan a metabolizar las proteínas, incrementando la liberación de amoníaco con la consiguiente alcalinización. En la fase termófila se metabolizan sustancias de fácil degradación y moléculas como la lignina (Tuomela et al., 2000).

La actividad microbiana continua siendo muy intensa y la temperatura sigue aumentando hasta 60°C, donde la degradación se produce exclusivamente por bacterias termófilas. Por encima de esta temperatura el calor inhibe a los microorganismos y solubiliza el oxígeno, lo que provoca la disminución de la actividad microbiana y como consecuencia un descenso de la temperatura.

La siguiente fase (*fase de enfriamiento*) comienza cuando la temperatura es elevada y la fuente de carbono limitada. Se caracteriza por el crecimiento de otra población mesófila y predominan hongos y actinomicetos que son capaces de degradar compuestos complejos. Estos microorganismos proceden del entorno o de esporas que

resistieron la fase termofílica y son atacados los compuestos como celulosas y hemicelulosas.

La *fase de maduración* se realiza a temperatura ambiente, y suele durar unos meses. Los microorganismos que aparecen en esta última etapa son muy diversos y estables: a la población de bacterias y hongos se suma la acción de protozoos, nematodos y miriápodos. Estos microorganismos ayudan a la degradación final de los compuestos más resistentes y a la estabilidad final de la materia orgánica.

La inactivación de los hongos patógenos en la obtención de varios abonos de origen diferente es un criterio clave para la selección del porcentaje para la comercialización. Hoitink and Fahy (1986) demostraron que esta capacidad de inactivación se adquiere en la mayoría de los casos después de la fase termofílica.

Gugino y Travis (2003) evaluaron la eficacia de varios tipos de compost en la supresión de la *Cylindrocarpon destructans*. En este estudio, la población de *Ca. destructans* se monitorizó en tiempo en las mezclas de suelo con series de diluciones de 0, 10, 25 y 50% de compost. Los resultados preliminares indicaron una reducción cada vez mayor en la población *Ca. destructans* a medida que la cantidad de compost aumentó de 0 a 50%. Por otra parte, varios microorganismos fueron aislados de estos compost, demostrando antagonismo *in vitro* frente a *Ca. destructans*.

El producto final de un buen compostaje debe ser:

- Un material análogo al humus del suelo que ejerce efectos beneficiosos sobre las plantas;
- Debe estar libre de patógenos y de semillas de malas hierbas. Esta ausencia se debe a la implantación de temperaturas termófilas durante un tiempo adecuado y a la formación de antibióticos durante la fase de maduración.

Con el fin de garantizar unas condiciones de higienización adecuadas, la legislación indica, sobre todo en el caso de determinados residuos, el tiempo durante el cual la temperatura debe ser superior a un determinado valor (generalmente, 60°C). Se puede hablar de (Lawson et al., 1999):

- Calidad física (color, humedad, olor, textura, granulometría, conductividad eléctrica y apariencia general);

- Calidad química (principalmente, relación C/N y contenido en nutrientes, que permiten su clasificación como sustituto de la turba, enmienda orgánica, abono orgánico o abono organo-mineral);
- Calidad biológica (índice de germinación, ausencia de patógenos y presencia de determinados microorganismos, generalmente, relacionados con su posibilidad de controlar enfermedades de las plantas).
- Dependiendo de su grado de madurez el producto final puede usarse (Cummins et al, 1993; Liao et al. 1994a; Donald et al. 1996):
- Como acondicionador del suelo: en mejora y aumento de fertilidad de suelos agrícolas, restauración de terrenos degradados, etc.
- Como abono orgánico. En este caso, contribuye, simultáneamente, a la mejora de la fertilidad del suelo y al ahorro de fertilizantes químicos, cuya obtención es siempre origen de contaminaciones. Quizás una de las dificultades para llegar a la obtención de un abono orgánico resida en la reticencia del ganadero y el agricultor a dedicarse a actividades que no son específicamente ganaderas o agrícolas.

La idea innovadora de este estudio (y primero de los objetivos de la Tesis Doctoral) es la eliminación de los restos de madera contaminada de los viñedos (sarmientos y restos de poda) mediante transformación por compostaje en un producto higienizado. El proceso de compostaje que se propone pretende conjugar las ventajas de los contenidos de carbono de los sarmientos y su naturaleza estructurante con los contenidos ricos en nitrógeno del estiércol de gallina. Nuestra hipótesis de investigación consiste en afirmar la posibilidad de obtener unas condiciones operativas de compostaje para los residuos vegetales con afecciones fúngicas que permita destruir las estructuras de supervivencia de los hongos (las esporas) y dar valor al producto resultante.

La verificación de esta hipótesis se realiza mediante análisis microbiológico después del proceso de compostaje y sobre el producto final después de encontrarse un tiempo en almacén.

1.3.2 Tratamientos térmicos para la higienización de sarmientos inoculados con el hongo *Diplodia seriata*

Los hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* son los hongos implicados en la incidencia de la enfermedad del brazo muerto (BDA) entre los que encontramos: *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Fusicoccum*, *Neofusicoccum* y *Lasiodiplodia*. Las especies de la familia *Botryosphaeriaceae* han despertado un notable interés científico y gran cantidad de equipos de investigación están realizando muestreos sobre extensas áreas para aislar e identificar las especies de la familia.

La terminología actual tiende a agrupar estas enfermedades bajo el nombre de decaimiento por botriosferia (*Botryosphaeria dieback*). En España, *Diplodia seriata* (también conocido como (*Botryosphaeria optusa*) es uno de los patógenos más prevalentes asociados a enfermedades de la poda de la vid (*Vitis vinifera* L.). Junto con *Diplodia mutila* es usual en plantas de más de cinco años, mientras que en plantas jóvenes es muy variable (Martín y Cobos, 2007). Es un patógeno que en condiciones normales convive con la planta y en periodos de debilidad de esta, produce enfermedad.

La patogenidad del hongo *D. seriata* es un tema que genera controversia. Este hongo, considerado como patógeno virulento ha sido aislado en múltiples ocasiones asociado a decaimiento de la madera de la vid en Europa, Australia, Sudáfrica y EEUU (Urbez-Torres et al., 2006). Otros estudios lo clasifican como patógeno débil (Phillips, 1998; Phillips, 2001) o incluso como un parasito secundario o saprofito en el Oeste Australiano (Taylor et al., 2005).

La enfermedad del brazo muerto (BDA) ha sido asociada con el cambio del sistema de conducción de vides en formas libres a vides emparradas (Lehoczky, 1996). Esta enfermedad ha sido citada como tal por Garcia et al. (2010) debido a que sus síntomas externos e internos son similares a los de otras patologías de madera (Armengol et al., 2001; Urbez-Torres et al., 2006a). A nivel interno, el síntoma típico del BDA es una necrosis sectorial sobre el xilema del brazo y tronco, de color marón oscuro y en forma de V (tal como ocurre en la eutipiosis) y una afección de las hojas que se puede confundir fácilmente con las de la Yesca (van Niekerk et al., 2006). *Diplodia seriata* y *Eutypa lata* se obtienen principalmente de las zonas necróticas de madera enferma en forma de “V”. Los daños internos producidos por ambos hongos son visualmente

indistinguibles (Gubler et al., 2004). El hongo más abundante en las lesiones de la poda de la vid es *D. seriata* aproximadamente el doble que *E. lata*.

Es conocido que las heridas de poda son la principal vía de infección por estos patógenos de enfermedades fúngicas y que su incidencia es mayor en cepas podadas que en cepas sin podar. La lluvia propaga los picnidiosporas infectando el xilema expuesto por las heridas de poda, donde empieza la germinación de esporas que colonizan los vasos de madera (Rolshausen et al, 2010; Úrbez-Torres, 2011). En los viveros, las fuentes de la infección más probable son bien los sarmientos infectados utilizados para la multiplicación vegetativa, o bien la contaminación de herramientas y materiales (Billones-Baaijens et al., 2014).

Toda vez que hongos patógenos que habitan en los tejidos del floema y xilema de la vid no pueden ser controlados con fungicidas (Groenewald et al., 2000; Jaspers, 2001) se hace preciso desarrollar métodos térmicos y biológicos alternativos que resulten eficaces para el control de plagas en agricultura (Matei, 2015) (Tabla 1.6).

1.3.2.1 Métodos térmicos de higienización y esterilización

Entre las condiciones ambientales extremas que los microorganismos pueden tolerar se encuentran temperaturas muy elevadas (próximas al punto de ebullición) o muy bajas (de congelación), valores bajos de pH, elevada alcalinidad, altas concentraciones de sal, niveles altos de radiación solar, grandes concentraciones de compuestos tóxicos, etc. (Atlas y Bartha, 2005).

La higienización/esterilización es el proceso mediante cual se inhibe todas las formas de vida microbianas, incluyendo bacterias y sus formas resistentes, hongos y sus esporas, y virus. Se entiende por inhibición total la pérdida irreversible de la capacidad reproductiva del microorganismo. Para controlar el proceso es preciso conocer previamente la cinética de la inhibición y que parámetros inciden sobre este efecto.

Tabla 1.6 Ventajas y desventajas en la aplicación de tratamientos térmicos para la higienización y esterilización

Métodos	Mecanismo	Ventajas y desventajas	Referencia
<i>Térmicos</i>			
Aire caliente	Aplicación de calor seco.	Conservación y esterilización. Pérdida de la estabilidad térmica de los ribosomas y el cese de la síntesis de proteínas y la desnaturalización de enzimas a temperaturas elevadas.	Jeng et al. (1987)
Agua caliente o explosión de vapor	Aplicación de calor húmedo y actividad del agua o agua disponible para uso microbiano y halotolerantes por afectar a la presión osmótica.	La vida microbiana necesita agua en estado líquido (hipertermófilos). Desnaturalización de proteínas e inactivación microbiana o enzimática, y la aparición de organismos resistentes e infecciones ya que con la temperatura aumentan la longitud de la cadena de los ácidos grasos de la membrana celular y el grado de instauración disminuye.	Gramaje et al. (2009) Evelyn et al. (2016) Zhao et al. (2015)
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
<i>Radiación y Presión</i>			
Ionizantes (gamma y rayos X)	Se producen iones inestables y radicales libres que interactúan con la materia viva.	Las endosporas bacterianas son muy resistentes. Fragmentan el DNA de los cromosomas bacterianos.	Rai et al. (2013)
Solar (UV, VIS, IR)	A 260 nM en el UV se deteriora o muere el DNA, o principal mecanismo del efecto microbicida.	Con la intensidad de la luz en el VIS se incrementa la fotosíntesis.	Syamaladevi et al. (2015), Jakób et al. (2010)
<i>Microondas</i>	Desnaturalización de las proteínas (calor), cambio de la permeabilidad de las membranas (no calor).	Esterilización de alimentos e inactivación de microorganismos o enzimas. Reducción de tiempo de calentamiento o ahorro de energía.	Jeng et al. (1987)
<i>Ultrasonido</i>	Presión de ultrasonidos, calor, el efecto de cavitación y efecto químico.	Cómodo manejo, ninguna contaminación, coste alto.	Gao and Lewis (2014)

(i) Cinética de inactivación de los hongos patógenos.

Cuando una población microbiana es expuesta a un agente letal físico o químico, se produce una progresiva reducción del número de sobrevivientes, de modo que la curva que representa el número de sobrevivientes en función del tiempo tiene forma exponencial decreciente. La curva de inhibición obtenida en una escala semilogarítmica es una recta con una pendiente (negativa) que representa la velocidad de muerte de la población, tal como cuanto mayor sea el valor absoluto de la pendiente, la muerte de los microorganismos resulta más rápida. Este comportamiento debe tenerse presente siempre, dado que el tiempo de exposición es fundamental para alcanzar el objetivo buscado. El efecto inhibitorio de un agente (ej. altas temperaturas) cambia en relación a

los distintos aislados del mismo hongo. Existe además un conjunto de condiciones fundamentalmente ambientales que afectan la cinética de destrucción, como son: nivel de temperatura, tiempo de exposición, pH del medio y resistencia propia del microorganismo

La relación entre el nivel de temperatura y el tiempo de exposición es inversamente proporcional por la mayor temperatura menor es el tiempo que modifica la cinética de sobrevivencia (inhibición)-tiempo. Existe un tiempo inicial de inhibición muy lento, tiempo mínimo de acción que se debe de respetar para conseguir el efecto buscado. El pH determina el grado de ionización del agente, siendo la forma no disociada la que atraviesa mejor las paredes del microorganismo. Gabriel et al. (2015) observaron diferencias en la aplicación de tratamiento con agua caliente (*Escherichia coli*) para valores de pH de 3.3-4.7 en zumo y néctar de frutas, con valores de 60°C y 5.9s (zumo naranja) y 60 °C y 12.4s (nectar guayaba). La eficacia del tratamiento depende también de las propiedades características de cada microorganismo contra el que de este modo se está aplicando, el tipo de pared, la presencia de esporos, la fase de desarrollo, etc., modifican la resistencia.

De estos datos de mortalidad térmica derivan modelos cinéticos útiles para conocer la velocidad de supervivencia y predecir los tiempos letales para poder diseñar nuevos protocolos de tratamiento.

El efecto de la temperatura sobre la germinación de esporas de hongos patógenos ha sido ampliamente estudiado con el fin de determinar las condiciones necesarias para la infección. Se considera temperatura óptima para la germinación de los conidios cuando un 50% ha germinado en un corto periodo de incubación (Martos, 2008). Arauz y Sutton (1991) estudiaron el efecto de la temperatura sobre la germinación de los conidios en especies de *D. seriata* (*Botryosphaeria obtusa*) y *Botryosphaeria dothidea* demostrando una buena germinación por valor de temperatura en un rango de 12 a 32°C.

Temperaturas por encima del margen de crecimiento del organismo suelen producir su muerte. Los hongos dan lugar a formas resistentes de reposo como esclerocios, pero incluso dichas formas de resistencias presentan límites de supervivencia. La resistencia de los organismos al calor se expresa como tiempo de muerte térmica (TMT) que es el tiempo necesario a una temperatura determinada para

matar un número determinado de organismos (Atlas y Bartha, 2005) y no tiene valor absoluto, sino que depende de número inicial de microorganismos presentes.

Las adaptaciones que presentan los organismos termófilos para sobrevivir a temperaturas elevadas comprenden, entre otras: la producción de enzimas que no se desnaturalizan a altas temperaturas, la de los ribosomas, la presencia de secuencias de aminoácidos poco frecuentes que estabilizan dichas proteínas, etc. (Atlas y Bartha, 2005).

Hoy parece enteramente comprobado que la termoterapia constituye un método eficaz y de fácil aplicación para la erradicación de patógenos (bacterias, hongos, nematodos, virus y fitoplasmas) tanto de semillas como de material vegetal utilizado en la reproducción vegetativa.

(ii) *Tratamientos térmicos*

Los tratamientos térmicos destruyen a los microorganismos en forma gradual por mecanismos de acción distintos y complejos que se van sucediendo a medida que aumenta la temperatura.

La aplicación de *aire caliente seco* provoca desnaturalización de proteínas, lesiones por oxidación y efectos tóxicos por niveles elevados de electrolitos. En la aplicación del calor seco se necesita alcanzar mayor tiempo y temperatura que en el autoclave (aire caliente húmedo) por la ausencia de agua que disminuiría el número de grupos polares de las cadenas peptídicas. Jang et al. (1987) utilizando un horno de calor seco de convección consigue la esterilización de esporas de *Bacillus subtilis*. subsp *niger* a una temperatura de 137°C en más de 45 minutos.

Uno de los métodos de termoterapia más usado es el tratamiento por *agua caliente* a causa de la mejor difusión del calor en el material vegetal y con un efecto final de desnaturalización y coagulación de las proteínas. La aplicación del calor húmedo a temperaturas más bajas se justifica por otros mecanismos como la producción de rupturas de cadena de DNA que provoca la muerte celular por activación o liberación de enzimas con actividad de endonucleasas. Tratamientos con agua caliente (HWT) a 53°C y 60 min sobre los hongos patógenos de la enfermedad de la madera de la vid *Phaeoacremonium* spp. y *Phaeomoniella chlamydospora* inhiben la germinación de las

esporas y el crecimiento miceliano de estos hongos (Gramaje et al., 2008). Milani et al (2015) han mostrado que la concentración de etanol en la cerveza se ve influida por el tiempo de tratamiento con agua caliente para la esterilización sobre *Saccharomyces* spp, con 60°C y 15.3min (4% etanol) y 60°C y 34.2min (7% etanol) respectivamente.

Un método más rápido de tratamiento con agua caliente es la *explosión de vapor*, automático y con un rápido efecto sobre la higienización. Este Sistema de tratamiento posee una bomba de vacío que extrae rápidamente el aire del equipo, y cuando esta llega a 15 o 20 mmHg, libera el vapor, que en estas condiciones se distribuye en forma homogénea por todo el espacio en breves minutos. Para sólidos lignocelulósicos, Zhao et al. (2015) observaron una esterilización completa en 172°C durante 2 min y en 128°C durante 5 min sobre *Bacillus subtilis* (termofílico).

Otro método preconizado como eficaz es la *irradiación* pudiendo utilizarse radiaciones ionizantes o de las regiones ultravioleta e infrarrojo. Parte del espectro de radiación electromagnética es continuo, las longitudes de onda alrededor de 265 nm son las que tienen mayor eficacia como bactericidas (200 - 295 nm). Para la higienización pueden utilizarse tanto las radiaciones ultravioletas (UV) como las ionizantes y rayos infrarrojos. Parte de la energía de un fotón (longitud de onda) es absorbida por los microorganismos cuando estos son expuestos a las radiaciones (produciendo ionizaciones), y es directamente proporcional a la intensidad de radiación y al tiempo de exposición. Este estado elevado de energía se denomina estado excitado. La molécula excitada podrá transferir ese exceso de energía a otras, en forma de energía vibratoria (produciéndose calor), o disiparla en forma de radiación electromagnética. Debido a la relativamente baja cantidad de energía que son capaces de transmitir los rayos *UV*, sólo afectan a los electrones de los átomos periféricos de las moléculas, produciéndose solo estados de excitación. Las *radiaciones ionizantes* son las que pueden extraer electrones de sus orbitales. Los *rayos infrarrojos* sólo pueden provocar energía vibratoria, por lo que sólo generan calor (Atlas y Bartha, 2005).

El mecanismo de acción de la luz UV sobre las bacterias, se atribuye a su absorción por el DNA y la inhibición de su síntesis que se traduce por la inhibición del crecimiento y de la respiración. La utilización de UV-C (254 nm) para la esterilización

de la superficie de frutas inoculadas inhibe $2 \log$ CFU/g en *Penicillium expansum*, en función de la morfología de superficie de la fruta (Syamaladevi et al., 2015).

Los *ultrasonidos* también se usan para la inactivación microorganismos, provocar la ruptura de las membranas celulares. El mecanismo de inactivación microbiana por ultrasonido de alta intensidad (UAI) se atribuye al fenómeno de cavitación y aumento de temperatura. Durante el proceso de sonicación, se generan ondas en el líquido creando microburbujas que implosionan de manera violenta creando choques de ondas de alto nivel de energía y generando puntos de alta temperatura y alta presión el colapso de burbujas en soluciones causa daño localizado de la pared celular y por actividades químicas de los radicales libres prosigue la desintegración de las estructuras externas e internas de la célula y liberación de material intracelular al medio externo (Piyasena y col., 2003). Gao and Lewis (2014) utilizando ultrasonido de alta intensidad (UAI) y baja frecuencia (20 kHz) para inactivar dos microorganismos con tamaños muy diferentes, *Enterobacter aerogenes* y *Aureobasidium pullulans* él relación de inactivación disminuyó linealmente con tiempo de sonicación, y la tasa de inactivación aumenta con el aumento del poder de sonicación.

1.3.3 Métodos biológicos y químicos de higienización

Tal como se ha venido indicando en anteriores epígrafes, la higienización por métodos biológicos es la única alternativa aceptable a la utilización de métodos químicos. De hecho, el uso indiscriminado de fertilizantes y productos químicos en la agricultura ha conducido a una contaminación significativa del aire, el agua y el suelo, que ha puesto en riesgo los ecosistemas terrestres y marinos y la salud humana (FAO, 2013).

La investigación actual sobre las enfermedades de la madera de la vid se desarrolla en tres direcciones: etiología de la enfermedad; identificación de los organismos endófitos como potenciales agentes de biocontrol y aplicación de sustancias fúngicas al suelo; medidas todas ellas, que pueden minimizar los riesgos medioambientales.

1.3.3.1 Métodos biológicos de control

- (i) *Síntesis de nuevos composites de oligómeros de quitosano, propóleo y nanoplata como biofungicidas*

Ha sido observado que el quitosano polimérico y los oligómeros de quitosano inducen fitoalexinas o compuestos antimicrobianos que ayudan a limitar la dispersión del patógeno (Kendra et al, 1989). Se ha encontrado que el quitosano (polímero de glucosamina con enlaces β -1,4) posee propiedades antifúngicas y el tamaño de sus oligómeros es muy importante para que ejerza su acción (Hadwiger et al. 1994).

En este sentido, el quitosano se ha convertido en un material prometedor. Se trata de un polímero natural, el segundo más abundante después de la celulosa, que se encuentra en forma de quitina en los caparazones de crustáceos, en las alas de los insectos y en las paredes celulares de hongos y algas (De la Paz et al., 2012). La estructura química del quitosano es la de un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) (Figura 1.7) (Murray et al., 2013). Este biopolímero catiónico se caracteriza por ser biocompatible, biodegradable, no tóxico, filmogénico y tener propiedades emulsionantes, absorbentes, adsorbentes, antimicrobianas, antivirales y antifúngicas (INTI, 2010).

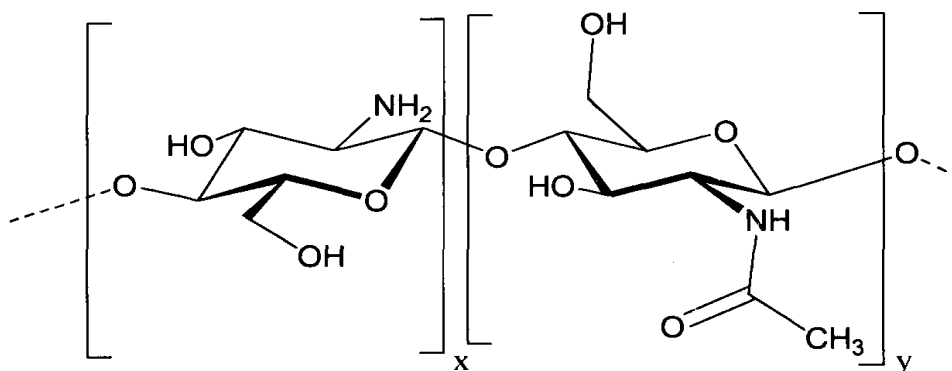


Figura 1.7 Estructura química del quitosano

En un estudio de investigación *in vitro* e *in vivo* realizado por Nascimento et al (2007) se mostró que el quitosano es eficaz en la reducción del crecimiento micelial de todos los hongos y mejora significativamente el crecimiento de las plantas (Tabla 1.7).

Además, el efecto del quitosano se muestra similar al efecto de algunos fungicidas como tebuconazol y mezclas de carbendazim con flusilazol, y ciprodinil con fludioxonil. En un estudio *in vitro* realizado por nosotros sobre los hongos patógenos de la Yesca con una concentración de 25% de quitosano observamos la inhibición completa de estos hongos (Matei et al., 2010).

Tabla 1.7 Ventajas y desventajas en la aplicación de tratamientos biológicos y químicos para la higienización.

Métodos	Mecanismo	Ventajas y desventajas	Referencia
<i>Biológicos</i>			
Biopesticidas	Interactúa a nivel de la membrana plasmática, biodegradación de la pared celular, cambios en la morfología de las esporas.	Quitosano/Propóleo como biofungicida	Matei et al. (2010, 2015) Nacimiento et al. (2007)
Agente de control biológico.	Estabilización de la materia orgánica por calor. Hongos endófitos, interacción entre microorganismos.	Biopesticidas de productos naturales y agentes de control biológico, fitorremediación y micoremediación.	Mutawila et al, 2011
Compostaje	Estabilización de la materia orgánica por la oxidación de moléculas que desarrolla calor que produce la higienización y eliminación de hongos patógenos y semillas.	Higienización y revalorización de residuos, proceso lento, y coste bajo.	Matei et al.(2014)
<i>Químicos</i>			
Ozono (O ₃)	Destrucción de células por <i>lisina</i> .	Alta velocidad de acción oxidativa, no imparte olor, color, sabor.	Patil et al., (2010)
Hidrólisis alcalina	La hidrólisis alcalina produce la destrucción de la cisteína, cistina, serina y treonina, y la racemización de los aminoácidos.	Modifica la digestibilidad y las propiedades funcionales de las proteínas (solubilidad), precipitación.	Pinho et al., (2015)
Pesticidas	Cambios drásticos en la organización de las hifas y muerte celular, oxidación de células.	Higienización química, caso de sustitución del tratamiento térmico, contaminación/no fitotoxicidad (FeSO ₄).	Fleurat et al. (2011)

El efecto fungicida del quitosano resulta especialmente potenciado cuando se aplica *in vitro* sobre el hongo *Diplodia seriata* inoculado en sarmientos de la vid (Matei et al., 2015). El presente trabajo reporta un método de síntesis basado en la aplicación de sonicación para la obtención de nuevos composites basados en una matriz polimérica de oligómeros de quitosano, con la incorporación de extractos de propóleo y nanopartículas de plata. Los nuevos composites fueron caracterizados por espectroscopía UV-Vis, FT-IR, DRX, SEM y TEM y se ha demostrado la óptima producción de los

materiales compuestos y la formación de nuevos tipos de enlaces e interacciones en las mezclas binarias y ternarias.

Otro compuesto natural que ha sido ampliamente utilizado por sus propiedades antisépticas, principalmente en medicina tradicional, es el propóleo: es un material resinoso recolectado por las abejas de diferentes brotes y exudados de cortes de los árboles, que mezclan con enzimas propias, transformándolo para usarlo como sellador de huecos o agente de higienización en la colmena (Marghitas et al., 2009), entre otros usos. El propóleo contiene cerca de 150 sustancias químicas, principalmente flavonoides y polifenoles -responsables probablemente de su fuerte poder antimicrobiano- además de aldehídos, quininas, aminoácidos y esteroides (Marcucci, 1995).

Las nanopartículas de plata (con tamaños entre 10 y 100 nm) se han desarrollado en la última década como un potencial elemento bactericida, por poseer una mayor actividad respecto a la plata o a los iones de Ag. Las nanopartículas tienen la capacidad de destruir las paredes celulares e intervenir con el proceso de replicación del ADN y producción de proteínas (Wei et al., 2009). La combinación de polímeros bactericidas y la nanoplata pueden mejorar sinérgicamente los efectos bactericidas, y existen muchos métodos para su incorporación en la matriz polimérica.

Con el fin de incrementar el efecto antifúngico de los oligómeros de quitosano, del propóleo y de las nanopartículas de plata por separado, se propone la síntesis de un nuevo biogel cohesivo de quitosano-propóleo y seguidamente la incorporación de las tecnologías de nanoplata mediante métodos de sonicación para constituir un nuevo material ternario.

(ii) *Agente de control biológico*

Se entiende por control biológico “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedador o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas” (Cook y Baker, 1996).

La utilización de aislados de *Trichoderma harzianum* como medida de biocontrol para estas enfermedades es uno de los métodos más estudiados actualmente, siendo capaces de controlar a los hongos patógenos en diferentes etapas de desarrollo. El tratamiento más efectivo es el realizado inoculando las raíces con *Trichoderma*, llegando a reducir las áreas necrosadas producidas por el hongo (Di Marco and Osti, 2007). Esto demuestra que el método nefelometric puede ser una buena alternativa de control biológico. El biocontrol con *T. atroviride* puede ayudar en la defensa de la planta antes de la infección (Mutawila et al, 2011). El método de aplicación utilizando *Trichoderma* como biocontrol se debe de investigar para mejorar su eficiencia (Fourie and Halleen, 2006; Halleen et al., 2007a).

1.3.3.2 Métodos químicos de control

Los fungicidas sistémicos sirven para controlar el ataque de hongos endófitos y su tratamiento es curativo. Los fungicidas se pueden aplicar al suelo para el control de hongos que parasitan órganos subterráneos y/o semillas en germinación o a la planta para controlar enfermedades provocadas por hongos que afectan a tallos, hojas, flores y frutos.

Debido a la prohibición del uso del arsenito sódico, y al no existir hasta el momento ninguna materia activa eficaz para el tratamiento de los decaimientos de la vid, durante los últimos años muchos grupos en todo el mundo han centrado sus investigaciones en la búsqueda de fungicidas que permitan frenar el aumento de estas enfermedades y ofrecer una solución a los viticultores que observan año tras año cómo aumentan las pérdidas en sus parcelas.

El principal problema que plantea el uso de fungicidas en el tratamiento de los decaimientos de la vid es la dificultad que supone vencer las distintas barreras de la planta y que el fungicida penetre en la madera. Una de las técnicas más recientes consiste en la inyección directa al tronco de distintos fungicidas. Actualmente existen varios grupos en todo el mundo estudiando la viabilidad de esta técnica (Darrieutort y Lecomte, 2007).

Resultados indican que tres fungicidas reducen la infección de la *E. lata*: tebuconazole (59-88% control), fluazinam (21-58%) y pyrimethanil (33-53%) y se

ofrece una alternativa rápida para el tratamiento de las heridas de la poda de la vid, la discusión de estos resultados se queda abierta (Sosnowski et al., 2008).

Tratamientos sobre las vides cultivadas en macetas utilizando benomyl, tebuconazole, y una mezcla de carbendazim con flusilazole y cyprodinil con fludioxonil demuestran una reducción de la incidencia de los hongos en comparación con las plantas no tratadas (Rego et al., 2006). Más tarde el autor utilizando fludioxonil y la mezcla de cyprodinil con fludioxonil y pyraclostrobin con metiram reduce la incidencia y severidad de los patógenos para la enfermedad del Pie negro. En 2012 Rego et al., estudia la efectividad de cinco fungicidas: azoxystrobin (Quadris®), difenoconazole (Score®), ciprodinil+fludioxonil (Switch®), cobre oxychloride (Cuprocol®) and tebuconazole (Horizon®) sobre Bot Canker (especies de la familia Botryosphaeriaceae) y Excoriosis (*Phomopsis viticola*) observando un porcentaje de inhibición de 50% y 65% respectivamente, y recomienda la utilización en el campo.

La aplicación del *ozono* tanto en fase gaseosa y acuosa, permite inactivar bacterias, virus, hongos empleando equipos generadores a partir de aire u oxígeno, por lo que no presenta inconvenientes de almacenamiento y transportación. En las últimas décadas, el desarrollo y mejora en la eficiencia de estos equipos ha sido acelerado. Estos son más compactos, presentan un menor consumo de energía y un elevado grado de automatización, alcanzan concentraciones en el gas hasta del 15 % en peso. El tratamiento con ozono parece ser un proceso eficaz para la reducción de las bacterias en el jugo de manzana pero el tiempo de aplicación depende de su nivel de acidez (Patil et al., 2010) También hay estudios de degradación de micotoxinas con ozono, las cuales son metabolitos secundarios producidos por las especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. McKenzie et al. (1997) lograron la degradación de varios tipos de alfatoxinas empleando ozono gaseoso. Aunque resulta un objetivo difícil, la prevención de la contaminación por hongos, este método es la mejor solución para el problema de las micotoxinas en los alimentos.

1.3.4 Otros métodos de control

Debido a la alta dificultad de control de los patógenos de la vid se han desarrollado algunas estrategias de gestión.

Gubler et al. (2004) observó que el portainjerto *Vitis riparia* 039-16 tenía buena resistencia a la Enfermedad de Petri. Ensayos posteriores por Jaspers et al. (2007) en invernadero mostraron que todas las variedades de portainjerto estudiados (Riparia Glorie, K5BB, 140-R, 3309-C y 420-A) eran sensibles a Black-foot Disease (BFD). Alaniz et al. (2011) que evaluó la susceptibilidad de los portainjertos de vid más utilizados en España (110-R, 1103-P, 140-R, 161-49C, 196-17C, Fercal y SO4) a *Ca. liriodendri* y *Ca. macrodidymum* encontró que todos los patrones inoculados se vieron afectados por la enfermedad, siendo el patrón 110-R los más susceptibles a ambos patógenos.

La harina de mostaza (*Brassica juncea* (L.) Coss.) incorporada en suelo (biofumigación) infestado con patógenos implicados en la enfermedad del pie-negro (Black-foot Disease) se puede utilizar con buenos resultados en caso de replantación en sitios con patógenos contaminados (Bleach et al., 2010).

Los resultados utilizando hongos arbusculares micorrizicos (AM) sugieren que las aplicaciones *Glomus intraradices* al suelo pueden ayudar a prevenir la enfermedad del pie-negro (BFD) en el vivero y en el viñedo (Petit y Gubler, 2006).

Recientemente, Sun et al. (2013) han referido la efectividad del metil jasmonato (MeJa) para inducir la defensa de las plantas contra *Cylindrocarpon*, mediante un mecanismo de estímulo de la actividad de las enzimas de defensa en las raíces de las cepas.

1.4 Referencias

- Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., Armengol, J. (2011). Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum* in vitro, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. *Crop Protection* **30**, 489-494.
- Alaniz, S., Armengol, J., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., León, M. (2009a) A multiplex PCR system for the specific detection of *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum* and *C. pauciseptatum* from grapevine. *Plant Disease* **93**, 821-825.
- Allué Gomez E. (1993) Procedimientos de fabricación y aplicación al suelo y cultivo de la fracción orgánica humificada de los residuos sólidos urbanos .Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- Anexo I de la Directiva 91/414/CEE (trasladadas al anexo I del REGLAMENTO (CE) N° 1107/2009) - Lista comunitaria de sustancias activas incluidas, excluidas y en evaluación comunitaria (<http://www.magrama.gob.es/>).
- Arauz, L.F., and T.B. Sutton. (1989) Temperature and wetness duration requirements for apple infection by *Botryosphaeria obtusa*. *Phytopathology* **79**:440-444.
- Armengol, J., Vicent, A., Torne, L., Garcia-Figueroles, F., Garcia-Jimenez, J. (2001) Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, **40**, 325–329.
- Armengol, J., Vicent, A., Torne, L., Garcia-Figueroles, F., Garcia-Jimenez, J. (2001b) Hongos asociados a decaimientos y afecciones de madera en vid en diversas zonas españolas. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **27**: 137-153.
- Armengol, J., Vicent, A. y García-Jiménez, J. (2002) El decaimiento y muerte de vides jóvenes (Enfermedad de Petri) en España. *Phytoma España* **138**: 91-93.
- Atlas, R.M. and Bartha, R. (2005) *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Education S.A., p 677.
- Beltrán, R., Ledó, C., Vicent, A., Armengol, J. and García-Jiménez, J. (2004). Variabilidad temporal de la expresión de síntomas externos en una parcela de vid afectada de “yesca”. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **30**: 77-84.

- Billones-Baaijens R., Jones E.E., Ridgway H.J., Jaspers M.V. (2014) Susceptibility of common rootstock and scion varieties of grapevines to Botryosphaeriaceae species. *Australasian Plant Pathology* 43, 25–31.
- Bleach, C. M., Jones, E. E. Jaspers, M. V. (2010) Biofumigation using brassicaceous plant products to control *Cylindrocarpon* black foot disease in New Zealand soils. *Phytopathology Mediterranea* **49**, 128.
- Bleach, C., Jones, E., Ridgway, H. and Jaspers, M (2013) Hot water treatment to reduce incidence of black foot pathogens in young grapevines grown in cool climates. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 2, 347–358.
- Boletín Fitosanitario de la Junta de Castilla y León nº 1 de 2011 preconizó la forma de erradicación de la “Flavescencia Dorada de la vid”.
- Boletín Fitosanitario de la Junta de Castilla y León nº 4 de 2010 informó de la “Excoriosis de la vid”.
- Bruez E (2013) Etude comparative des communautés fongiques et bactériennes colonisant le bois de ceps de vigne ayant exprimé ou non des symptômes d’esca. PhD Thesis, University of Bordeaux. 258 p.
- Bueno, M.P., Díaz, B.M.J. and Cabrera, C. F. (2008) – Compostaje- Cap.4. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Bustamante, M.A., Albuquerque, J.A., Restrepo, A.P., de la Fuente, C., Paredes, C., Moral, R., Bernal, M.P. (2012) Co-composting of the solid fraction of anaerobic digestates, to obtain added-value materials for use in agriculture. *Biomass Bioenergy*, 43, 26-35.
- Bustamante, M.A., Restrepo, A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Murcia, M.D., Medina, E.M., Marhuenda-Egea, F.C., Albuquerque, J.A. and Bernal, M.P. (2015) Optimization of composting from the solid phase of piggery digestates: added value properties. II Sigera - International Symposium on Agricultural and Agroindustrial Waste Management , Foz de Iguazú (Brasil).
- Celma, A.R., Miranda, M.T., Rojas Rodríguez, S. and Abdul-Rahman Ali Awf (2001) Potencial energético de la biomasa residual en Extremadura. *Revista técnica sobre la construcción e ingeniería de las instalaciones*, ISSN 0210-184X, Año nº 31, Nº 349, 2001, págs. 129-136.

- Cook, R. J.; Baker, K. F. (1996) The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press . St Paul, Minnesota. p. 60
- Cummins,CG., Wood CW. & Delaney DP. 1993. Co-composted poultry mortalities and poultry litter: composition and potential value as a fertilizer. *Journal of Sustainable Agriculture*, 4, 7-18.
- Darrietort, G, Lecomte P (2007) Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 50–7.
- De Juana, J.; De Francisco, A.; Santos, F.; Herrero, M.; Crespo, A. (2003) Energías renovables para el desarrollo. Thomson Editores. Paraninfo S.A. España.p 311.
- De la Paz, N., Fernández, M., López, O., Nogueira, A., García, C., Pérez, D., Tobella, J., Montes, Y., Díaz, D. (.(2012). Optimización del proceso de obtención del quitosano derivado de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(3), 103-116.
- Dejeu, L. (2011) *Vinul si sanatatea*. Editura Ceres Bucharest, p 272.
- Dejeu, L., (2010) *Viticultura*. Editura Ceres Bucharest, p 480.
- Demirbas Ayhan (2005) Potential applications of renewable energy sources, biomass combustion problems in boiler power systems and combustion related environmental issues. *Progress in Energy and Combustion Science* (31): 171–192.
- Di Marco S. and F. Osti, (2007) Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeoemoniella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 73–83.
- Donald J., Blake JP., Tucker K. & Harkins D. 1996. Minicomposters in poultry production. Alabama Cooperative Extension System, ANR-804.
- Dunkley, C., Cunningham, D., Ritz, C., Dunkley, K. and Hinton, A. (2011) Using mortality compost in vegetable production: A comparison between summer and winter composting and its use in cabbage production. *Agric. Food Anal. Bacteriol.*, 1, 6-14.
- Erickson, M.C., Liao, J., Maa, L., Jiang, X. and Doyle, M.P. (2009) Inactivation of *Salmonella* spp. in cow manure composts formulated to different initial C:N ratios. *Bioresource Technology* 100, 5898–5903.

- Evelyn, H.J. Kim, F.V.M. Silva (2016) Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. *Food Control* 59, 530-537.
- Fernández, J. (2009). *Biocombustibles sólidos modernos: producción y aplicaciones*. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Madrid. 30 p. ISBN 978-84-491-0883-9.
- Fleurat-Lessard, P., Dédaldéchamp, F., Thibault, F., Béré, E. and Roblin, G. (2011) Antifungal effects of iron sulfate on grapevine fungal pathogens *Scientia Horticulturae* 130, 517–523.
- Flotats, X., Campos, E., Palatsi, J. (2004). Concentración de deyecciones ganaderas mediante procesos térmicos. In *Actas del II Encuentro Internacional gestión residuos orgánicos*. Pamplona (Navarra), 28-29 octubre 2004.
- Fourie, P. H., Hallen, F. (2006) Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 116. 255-265.
- Gabriel, A.A., Albura, M.P. and Faustino, K.C. (2015) Thermal death times of acid-habituated *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in selected fruit beverages. *Food Control* 55.
- GAIN-USDA Report: Global Agriculture Information Network Report, USDA Foreign Agricultural Services, EU-28 Wine Annual Report and Statistics 2014, (www.gain.fas.usda.gov/; www.oiv.int/oiv).
- Gao, Sh. and Lewis, G.D., Ashokkumar, M. and Hemar, Y. (2014) Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 2. A simple model for the inactivation mechanism. *Ultrasonics Sonochemistry* 21, 454–460.
- García-Jiménez J., Raposo R. y Armengol J. (2010). Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Pgs.161-173 en: R. F. Jiménez Díaz y E. Montesinos Seguí, eds. *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos*. Naturaleza y control integrado. SEF-PHYTOMA-España. Valencia.
- Gramaje D., Armengol J., Salazar D., López-Cortés I., García-Jiménez J. (2009) Effect of hot-water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. *Crop Protection*, 28, 280–285.

- Gramaje, D., Garcia-Jimenez, J., Armengol, J. (2010). Field evaluation of grapevine rootstocks inoculated with fungi associated with Petri disease and esca. *American Journal of Enology and Viticulture* 61,512–20.
- Gramaje, D. and Larignon, Ph. (2014) *Epidemiology: Life cycles of Grapevine Trunk Disease Pathogens- European COST Action FA1303: Sustainable control of grapevine trunk diseases*” (2013-2017).
- Gramaje, D., Garcia-Jimenez, J., Armengol, J. (2008) Sensitivity of Petri disease pathogens to hot-water treatments in vitro. *Annals of Applied Biology*, 153,95–103.
- Gramaje, D., Mañas, F., Lerma, M.L., Muñoz, R.M., García-Jiménez, J. and Armengol, J. (2013). Effects of hot-water treatment on grapevine viability, yield components and quality of must. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, 144-148.
- Groenewald, M., Denman, S., Crous, P.W. 2000. Fungicide sensitivity of *Phaeomoniella chlamydospora*, the causal organism of Petri grapevine decline. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 59–61.
- Gubler, W.D., Baumgartner, K., Browne, G.T., Eskalen, A., Rooney, S., Latham, Petit, E. and Bayramian, L.A. (2004) Root disease of grapevines in California and their control. *Australasian Plant Pathology* 33, 157–165.
- Gugino, B. K. and Travis, J. W. (2003). Suppression of *Cylindrocarpon destructans* utilizing composted soil amendments. *Phytopathology*, 93: S31
- Guía para la Gestión Estratégica Institucional 2013 – 2017, AECI oficina de cooperación (www.aecid.org.gt/).
- Hadwiger, L.A., Ogawa, T., Kuyama, H. (1994). Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Mol Plant Microbe Interact.* 7(4):531-3.
- Halleen F., Fourie P.H., Crous P.W. (2007a) Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology*, 56, 637–645.
- Haug, R. T. (1993). “The Practical Handbook of compost Engineering”. Lewis Publishers. Boca Raton. Florida. Citado por Bueno et al., 2008.
- Herche R., Gubler W.D. (2010). Control strategies for trunk diseases of grapevine. 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Santa Cruz, Chile.

- Hoitink, H.A.J. and Fahy, P.C. (1986). Basis for the control of soil-borne plant pathogens with compost. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24, 93-114.
- Jakób, A., Bryjak, J., Wójtowicz, H., Illeová, V., Annus, J. and Polakovic, M. (2010) Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating. *Food Chemistry* 123,369–376.
- Jaspers, M. V., Bleach, C. M. and Harvey, I. C. 2007. Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon* disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 114.
- Jaspers, M.V., Mostert, L. (2008) Inhibitory interactions between Trichoderma isolates and grape Wood pathogens. 6th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Florencia, Italia.
- Jayaraman, K. (2003) Manufacturing sisañ-polypropylene composites with minimum fibre degradation. *Composites ciencia and technology* 63, 367-374.
- Jeng, D.K., Kaczmarek, K.A., Woodworth, A.G., Balasky, G. (1987) Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Appl. Environ. Microb.* 53, 2133–2137.
- Jiménez, L., Angulo, V., Garcia, E. and Rodriguez, A. (2004) Obtención de pastas celulósicas a partir de sarmientos de la vid. *Afinidad LXI*, 511, 194-203, Barcelona.
- Johnson, D.M., Jenkins, T.L., Fengli, L. (2012). Methods for optimally locating a forest biomass-to-biofuel facility. *Biofuels* 3(4): 489-503.
- Kaszewska, J.B, Paluszak, Z., Hermann, J. and Dziedzic, T. (2006) Sludge composting validation for minimizing environmental hazards. Anew indirect method of sanitation effectiveness assessment. *Ecohydrology and Hydrobiology* 6(s 1–4):205–210. DOI:10.1016/S1642-3593(06)70144-6
- Kendra, D.F., Christian, D.A., Hadwiger, L.A. (1989). Chitosan oligomers from fungal wall chitin actively inhibit fungal growth and enhance disease resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35:215-230
- Larignon, P (2012) Assessment of quality of plants in French grapevine nurseries with regard to fungi involved in wood diseases. In: ICGTD (International Council on Grapevine Trunk Disease) 8th International Workshop on Grapevine Trunk Disease. Valencia, Spain 18-21 June 2012

- Larignon, P., Dubos, B. (1997) Fungi associated with esca disease in grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 147-157.
- Lawson MJ. & Keeling AA. 1999. Production and physical characteristics of composted poultry carcasses. *Poultry Science*, 40, 706-708.
- Lecomte P., Darrietort G., Limiñana J.-M., Comont G., Muruamendiaraz A., Legorburu F.J., Choueiri E., Jreijiri F., El Amil R. and M. Fermaud, (2012) New insights into Esca of grapevine: the development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. *Plant Disease* 96 (7): 924-934.
- Lehoczy, J., (1974). Black dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9, 319–27.
- Liao PH., Chen A., Vizcarra AT. & Lo KV. 1994. Evaluation of the maturity of compost made from salmon farm mortalities. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 58, (4), 217-222.
- MAGRAMA – Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente – “*Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en España 2014*”. (www.magrama.gob.es).
- Mancera, C., El Mansouri, N.E., Ferrando, F. and Salvado, J. (2012) The suitability of steam exploded *Vitis vinifera* and alkaline lignin for the manufacture of fiberboard. *Bioresource* 6 (4), 4439-4453.
- Marcucci, M.C. (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, 26, 83-99.
- Marghitas, L.A., Stanciu O.G., Dezmiorean, D.S., Bobis, O., Popescu, O., Bogdanov, S. and Campos, M.G., (2009) In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, 115,878– 883.
- Martin N, Vesentini D, Rego C, Monteiro S, Oliveira H, Boavida Gerreira R, (2009) *Phaeomoniella chlamydospora* infection induces changes in phenolic compounds content in *Vitis vinifera*.

- Martín, L., Martín, M.T. (2013). Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. *Crop Protect.*, 52, 141-150.
- Martín, M.T., Cobos, R., (2007). Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathol. Mediterr.* 46, 18-25.
- Martin, M.T., Martin, L., Cuesta, M.J and García-Benavides, P. (2011). First report of *Cylindrocarpon pauciseptatum* associated with grapevine decline from Castilla y Leon, Spain. *Plant Disease* 95,361.
- Martos Arias S. (2008) El decaimiento de la vid. Enfermedades de la madera relacionadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae (Tesis doctoral). ISBN: 9788469165904.
- Matei, P., Dejeu, L. and Mereanu, D. (2009) Research concerning the influence of climate change on grapevine Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca, Horticulture 66 (1) 352-358, Vitis W0 10 1788, ISSN/ISBN 1843-5254.
- Matei, P., Iacomi, B., Dragan, G. (2010) Fungi associated with esca decline and their in vitro control by chitosan, Scientific Papers, UASVM Bucharest, Series A, 53 448-453.
- Matei, P.M., Martín-Ramos, P., Sánchez-Báscones, M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Navas-Gracia, L.M., Rufino, C.A., Ramos-Sánchez, M.C., Martín-Gil, J. (2015). Synthesis of Chitosan Oligomers/Propolis/Silver Nanoparticles Composite Systems and Study of Their Activity against *Diplodia seriata*. *Int. J. Polym. Sci.*, 2015, 1-11.
- Matei, P.M., Sánchez Báscones, M., Martín-Villullas, M.T., Diez-Gutiérrez, M.A., García-González, M.C. (2014). Eficiencia del compostaje de sarmientos de vid mediante pilas abiertas como metodode higienización. *IV Jornadas de la Red Española de Compostaje. De Residuo a Recurso: Estrategias de gestión tratamiento y valorización en el Horizonte 2020*, 12-14 November 2014, Murcia, Spain. Red Española de Compostaje. pp. 156-160.
- Matei, P., Sánchez Báscones, M., Hernández Navarro, S., Araujo Rufino, C., Martín Ramos, P., Pérez Lebeña, E., Martín Gil, J. (2014) Patente nº: ES P201431591,

Composite con actividad antimicrobiana que comprende dos componentes autoasamblados de origen natural y, opcionalmente, un componente (C) de tamaño manométrico.

- McKenzie, K.S., Sarr, A., Mayura, K., Bailey, R.H., Miller, D.R., Rogers, T.D., Norred, W.P., Voss, K.A., Plattner, R.D., Phillips, T.D. (1997). Chemical degradation of diverse mycotoxins using a novel method of ozone production. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 807-20.
- Milani, E.A., Gardner, R.C and Silva, F.V-M (2015) Thermal resistance of *Saccharomyces* yeast ascospores in beers. *International Journal of Food Microbiology* 206, 75–80.
- Moreno Casco, J. and Moral Herrero, R. (2008) *Compostaje*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, p 570.
- Mugnai L, Graniti A, and Surico G. 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive disease of grapevine. *Plant Disease* 83: 404-418.
- Murray, M.L., Villoslada, I., Donoso, S. L., Ampuero, F., Villa, M. A., Fonseca, A. G., Rojas, M. F., Hernández, C., Bascur, M., Rivas, S. P. (2013). Biomaterial que comprende quitosano y al menos glicosaminoglicano. Patente con Número de Aplicación PCT/CL2012/000023.
- Mutawila, C., Fourie, P.H., Halleen, F. & Mostert, L. 2011. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 50 (Supp): S264-S276.
- Nascimento, T., Rego, C. and Oliveira, H. (2007). Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 218–224.
- Patil, S., Valdramidis, V.P., Cullen, P.J., Frias, J. and Bourke, P. (2010) Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels *Food Microbiology* 27, 835-840.
- Petit, E. and Gubler, W.D. (2005). Characterization of *Cylindrocarpus* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease* 89, 1051–1059.
- Phillips, A. J. L. (1998): *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. *J. Phytopathol.* 146, 327-332.

- Phillips, A. J. L. (2002): Botryosphaeria species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathol. Mediterr.* 41, 3-18.
- Pinho, S.C., Nunes, O.C., Lobo-da-Cunha, A. and Almeida M. F. (2015) Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by alkaline hydrolysis applied to medical waste treatment. *Journal of Environmental Management* 161, 51-59.
- Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C (2003) Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology* Volume 87, Issue 3, Pages 207–216.
- Rai, R., Tallawi, M., Roether, J.A., Detsch, R., Barbani, N., Rosellini, E., Kaschta, J., Schubert, D.W and Boccaccini, A.R. (2013) Sterilization effects on the physical properties and cytotoxicity of poly(glycerolsebacate). *Materials Letters* 105, 32–35.
- Real Decreto 1311/2012, traspuso la Directiva Marco Comunitaria de Uso Sostenible de los productos fitosanitarios a nuestro marco normativo; BOE nº 223, 15/09/2015, páginas 65127 a 65171 (45 págs.).
- Rego A., Sousa F., Marques C., Cunha P. M. (2012) Hope and positive affect mediating the authentic leadership and creativity relationship *Journal of Business Research* Article in Press
- Rego, C., Nascimento, T. , Cabral, A., Silva, M.J. and Oliveira, H. (2009). Control of grapevine wood fungi in comercial nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 128–135.
- Rolshausen, P. E.; Urbez-Torres, J. R.; Rooney-Latham, S.; Eskalen, A.; Amith, R. J.; Gubler, W. D. (2010) Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *Am. J. Enol. Viticult*, 61, 113-119.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., Clercq, De D., Coosemans, J., Insam, H. and Swings, J. (2003) A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann. Microbiol.*
- Sánchez Báscones, M., Matei, P.M., Martín Villullas, M.T., Navas Gracia, L.M., Diez Gutiérrez, M.A. (2014) Biodegradación e higienización de sarmientos de vid en biodigestor cerrado discontinuo. *IV Jornadas de la Red Española de Compostaje.*

- De Residuo a Recurso: Estrategias de gestión tratamiento y valorización en el Horizonte 2020*, 12-14 November 2014, Murcia, Spain. Red Española de Compostaje. pp. 151-160.
- Sanchez, B. M., Navas, L.M., Diez, M.A., Correa, A., Hernandez, S. and Martín G. J. (2008) Compostaje de cadáveres de pollos en sistema cerrado discontinuo. I Jornadas de la Red Española de Compostaje, Barcelona; p. 272-278.
- Savocchia, S., Steel, C. C., Stodart, B. J., and Somers, A. (2007). Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis* 46:27-32.
- Sosnowski, MR, Creaser, ML, Wicks, TJ, Lardner, R, Scott, ES, (2008) Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape Wine Research* 14, 134–42.
- Spagnolo A., Marchi.G., Peduto F., Phillips A & Surico G. 2010 Detection of *Botryosphaeriaceae* species within grapevine woody tissues by nested PCR with particular emphasis on the *Neofusicocum parvum*/N. *ribis* complex. *Eur. J. Plant Pathol.*
- Spiridon, I. and Popa, V.I. (2008) Hemicelluloses: major sources, properties and applications. *Monomers, polymers and composites from renewable resources* 1, 289.
- Sun, H.W., Li, G.Y., Nie, X., Shi, H.X., Wong, P.K., Zhao, H.J., An, Environ, T.C. (2013) 9412–9419.
- Syamaladevi, R.M., Adhikari, A., Lupien, S.L., Dugan, F., Bhunia, K., Dhingra, A., Sablani, S.S. 2015. Ultraviolet-C light inactivation of *Penicillium expansum* on fruit surfaces. *Food Control*, 50, 297-303.
- Taylor, A., Hardy, G. E. St. J., Wood, P., and Burgess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia.
- Tortosa, G., Albuquerque, J.A., Ait-Baddi, G. and Cegarra, J. 2012. The production of commercial organic amendments and fertilisers by composting of two-phase olive mill waste (“alperujo”). *Journal of Cleaner Production* 26, 48-55.

- Tuomela, M., Vikman, M. and Hatakka, A., (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment. *Bioresour. Technol.* 72: 169-183.
- Urbano Terrón, P. (2002) *Fitotecnia: ingeniería de la producción vegetal*. Mundi Prensa.
- Urbez-Torres J, 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50, S5–45.
- Úrbez-Torres, J. R., and Gubler, W. D. (2009). Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Dis.* 93:584-592.
- Urbez-Torres, J. R.; Leavitt, G. M.; Voegel, T. M.; Gubler, W. D.; (2006): Identification and distribution of Botryosphaeria spp. Associated with grapevine cankers in California. *Plant Dis.* 90, 1490-1503.
- van Niekerk, J.M., Fourie, P.H., Halleen, F., Crous, P.W. (2006). Botryosphaeria spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 43-54.
- VV.AA. Grupo de trabajo en Vid del Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección Fitopatológica. 1987. Yesca; *Stereum hirsutum* Persoon, *Phellinus igniarius* Fr. Plagas y Enfermedades de la Vid, 1:1-8.
- Wei, F., Zhang , J., Zhou,S., He, R., Schaeffer, M., Collura, K., Kudrna, D., Faga, B.P., Wissotski, M., Golser, W., Rock, S.M., Graves, T.A., Fulton, R.S., Coe, Ed., Schnable, P.S., Schwartz, D.C., Ware, D., Clifton, S.W., Wilson, R.K., Wing, R.A (2009) The Physical and Genetic Framework of the Maize B73 Genome. *PLoS Genetics*, Volume 5, doi:10.1371/journal.pgen.1000715.
- XIII Foro INIA “Retos de la I+D+i en viticultura y enología: nuevas demandas y cambio climático”, 21 de noviembre de 2013, Logroño.
- Zhao, Z.M., Wang, L., Chen, H.Z. (2015) A novel steam explosion sterilization improving solid-state fermentation performance. *Bioresource Technology* 192, 547–555.



2 MARCO Y OBJETIVOS DE LA TESIS

2.1 Marco de referencia del proyecto de tesis

De acuerdo con McCarthy et al., 2001 los efectos del cambio climático se centran principalmente en los ecosistemas agrícolas mediterráneos y en estos países se espera no sólo un aumento de las temperaturas y una disminución de las precipitaciones, sino también una distribución más aleatoria durante todo el año (Regato, 2008; Cortina et al., 2011). El cambio climático determina una importante alteración en la distribución de especies, ritmos fenológicos, invasión de ecosistemas por otras especies y alteraciones ecológicas diversas (Gordo et al., 2011; IPCC, 2007; Thuiller et al., 2005). Todos estos cambios conllevan una modificación de la composición, estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Environmental Protection Agency, 2010). Las plantaciones de vid han tenido un importante crecimiento aprovechando la diversidad de condiciones agroclimáticas. Esta acelerada expansión del viñedo ha originado una demanda significativa por material de propagación, utilizando plantas de mala calidad y probablemente infectadas por hongos patógenos (Aroca et al., 2010) y ello contribuye a la propagación de las enfermedades de la madera de la vid.

Las afecciones causadas por los hongos de la madera de la vid dependen de las condiciones edáficas y climatológicas. En función de su sintomatología las enfermedades se conocen como “decaimientos de la vid” y producen una pérdida progresiva del vigor, e incluso puede llegar a producir la muerte de la planta y hasta el punto de que una planta enferma puede mostrar síntomas externos de estar aparentemente sana en unas campañas o asintomática en otras. Los “decaimientos de la vid” se asocian a un complejo fúngico de elevado número de especies, que interactúan en una misma planta, y que producen enfermedades tales como la yesca, el pie negro, la enfermedad de Petri, la eutipiosis, el brazo muerto y la excoriosis.

Dentro de los proyectos europeos de control de enfermedades del tronco de la vid o “Sustainable control of grapevine trunk diseases” (2013-2017), hemos seleccionado el proyecto europeo COST Action FA1303, liderado en España por D. Gramaje y J. Armengol, del Instituto Agroforestal Mediterráneo, de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). En el citado proyecto se ofrecen los primeros resultados en Budapest (Hungría) (26 -27 Febrero 2015) y se verifica que durante las dos últimas décadas se ha observado un aumento de la severidad del daño ocasionado por los hongos de la madera

de la vid debido al cambio climático y demuestran que entre las enfermedades más frecuentes se encuentra la apoplejía o Yesca, las rayas de tigre o *grapevine leaf stripe disease* (GLSD), y la enfermedad del brazo muerto (BDA). Aparte de la incidencia y la frecuencia de las enfermedades de la madera de la vid, el grupo de la UPV estudia la detección, caracterización y epidemiología de los patógenos implicados.

Actualmente no hay un claro consenso sobre la definición de los síntomas foliares de la yesca y de Black Dead Arm o del brazo muerto. Esta realidad nos hace asumir ambos síntomas externos como un todo que se podrá diferenciar al analizar en laboratorio los hongos aislados en cada muestra. Las especies del género *Phaeoacremonium*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Stereum hirsutum* y *Fomitiporia* spp. se asocian a yesca (Larignon & Dubos, 1997; Mugnai et al., 1999, Armengol et al., 2001; Martin & Cobos, 2007) mientras que las especies de la familia *Botryosphaeriaceae* se asocian a brazo muerto (Savocchia et al., 2007; Martos Arias, 2008; Urbez-Torres et al., 2009; Spagnolo et al., 2010; Martin, 2013). Sin embargo, la eutipiosis está presente en mayor porcentaje que la yesca y brazo muerto en la mayoría de los viñedos en producción (Martin et al., 2009). A esta enfermedad se le asocian las especies del género *Eutypa* spp. *Eutypa lata* la especie mayoritaria, pero también está presente *Phaeoacremonium aleophilum* (Martin & Martin, 2013). Se conoce que la incidencia de estas enfermedades es mayor en las cepas podadas en comparación con las cepas sin podar.

También se puede observar que el hongo *Diplodia seriata* es más activo y la infección se nota después del lloro y siempre cuando hay temperaturas de más de 10°C (hasta los 16°C) y en periodo lluvioso Larignon (2012). *Diplodia seriata* es un hongo fitopatógeno aislado de las plantas afectadas de Black Trunk Disease y que produce infecciones graves tanto en el viñedo como en los árboles frutales y que pertenece a la familia *Botryosphaeriaceae* (Larignon et al., 2001, Van Niekerk et al., 2006, Savocchia et al., 2007). En la planta joven, la escasa brotación y las hojas raquílicas y amarillentas son síntomas externos que no permiten diferenciar la enfermedad de Petri y el pie negro, por lo que también hay que recurrir al aislamiento e identificación en laboratorio de los hongos fitopatógenos asociados a cada una de estas enfermedades. La enfermedad de Petri se define por la presencia de especies del género *Phaeoacremonium* y/o

Phaeomoniella chlamydospora mientras que los hongos asociados al pie negro pertenecen al género *Cylindrocarpon* y al género *Ilyonectria* (Petit & Gubler, 2005; Alaniz et al., 2009; Martin et al., 2011). Son ya varias las publicaciones que sostienen que las plantas procedentes de los viveros se encuentran afectadas (Edwards & Pascoe, 2004; Halleen et al., 2003; Aroca et al., 2006). El problema es que probablemente los viveristas están multiplicados y vendiendo plantas afectadas sin saber que lo están. En la Figura 2.1 se recogen los síntomas y características de troncos de viñedos afectados por hongos tales como la yesca y así mismo se ofrecen los síntomas y características de la eutipiosis y/o brazo negro muerto y de la enfermedad de Petri en planta joven.



Figura 2.1 Síntomas y características de troncos de la madera de la vid afectados por hongos. Fotografías de Josep Armengol Forti y José García Jimenez (1, 2, 4, 5 y 6) y Anastasio Bazán (3) en MAGRAMA 2014.

La mayoría de los grupos que trabajan en estos temas llevan una línea de control con productos químicos fitosanitarios e incluso con lucha biológica que implica a especies de *Trichoderma* pero ninguno alcanza la eficacia del arsenito sódico (Jaspers & Mostert 2008, Gramaje et al., 2009; Herche & Gubler, 2010). Por ello, resulta importante evitar al máximo cualquier contaminación, reduciendo cuanto sea posible la

presencia de los hongos fitopatógenos y las heridas en las plantas. La prohibición de materias activas como el arsenito sódico queda justificada por su alta toxicidad, y es preciso el empleo de nuevos materiales activos basados en productos de origen natural.

Desde 2014, el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España (MAGRAMA) establece la forma de conseguir un uso sostenible de los plaguicidas en las diferentes explotaciones agrícolas de acuerdo con la Directiva 2009/128/CE, y evitar la reducción de los riesgos y los efectos del uso de los productos fitosanitarios en la salud humana y el medio ambiente. Asimismo, pretende que el fomento de la gestión integrada de plagas sea realizado mediante la aplicación de prácticas con bajo consumo de esos productos, dando prioridad cuando sea posible, a los métodos no químicos.

El único producto que está permitido para combatir la yesca en la actualidad es el Ciproconazol, o triazol sistémico con actividad preventiva y curativa, eficaz contra *Ascomycetos* (oídio y cercospora) y *Basidiomicetos* (royas). El producto activo “Ciproconazol 10% [WG] P/P” se suministra como nombre comercial y titular y referencia los dos productos registrados: Caddy 10 Pepite Bayer Cropscience, S.L. 18736 y Atemi 10 WG Syngenta España, S.A. 24900 (MAGRAMA, 2014).

Es muy importante el desarrollo de alternativas preventivas o de control biológico, la introducción de productos reguladores del crecimiento y vigorizante, el diseño de métodos térmicos (compostaje) y la puesta a punto de tratamientos curativos, que penetren en el interior de los tejidos vasculares de la planta en las concentraciones adecuadas para surtir los efectos deseados.

En el proyecto VA233A12-1 concedido por la JCyL y en cual se ha desarrollado uno de los objetivos de la tesis doctoral (“Higienización de restos de vid afectados por enfermedades fúngicas mediante procesos de compostaje”) se ha hecho especial hincapié en la eliminación de hongo patógeno presentes en los residuos vitícolas (sarmientos) bien en la periferia de la viña (compostaje en pilas) o en instalaciones propias de los gestores de estos residuos (compostaje cerrado en biodigestor), con el objetivo de incorporar después a la viña un producto higienizado que aporte una materia orgánica de buenísima calidad (compost). Los sarmientos actúan como agente estructurante y aportan carbono en el proceso de compostaje.

Los métodos de tratamiento térmicos han sido ampliamente estudiados para el control de plagas en agricultura. Los hongos patógenos y parásitos que infectan las plantas varían mucho en la tolerancia a los tratamientos térmicos. Por lo tanto, el conocimiento de la energía térmica mínima para el control ofrece la posibilidad de establecer un adecuado y eficaz modelo cinético para el tratamiento. Como método para controlar los hongos patógenos de la enfermedad de Petri en viveros (grapevine nursery) proporciona muy buenos resultados el procesado con agua caliente porque el calor y la duración del tratamiento (53°C y 60 min) es capaz de matar a los patógenos pero no afecta el tejido de la cepa (Waite and May, 2005; Waite and Morton, 2007, Gramaje y Armengol., 2010).

Tradicionalmente, la inactivación microbiana resultante de la aplicación de ambos procesos, térmicos y no térmicos, ha sido descrita por la ecuación de log-lineal (Bialka et al., 2008). Este modelo lineal sigue las reglas de la cinética de inactivación de primer orden para describir la inactivación de microorganismos (van Boekel, 2002). Teniendo en cuenta que la muerte o lisis de los microorganismos generalmente se expresa mediante una cinética de primer orden, Moreno y Moral (2008) han propuesto un modelo dinámico utilizando la alta temperatura como agente de higienización.

Un segundo objetivo de la presente Tesis Doctoral es evaluar *in vitro* la sensibilidad o muerte térmica de dos inóculos del hongo *D. seriata* en sarmientos de la vid frente a un tratamiento temperaturas-tiempo, y desarrollar un modelo cinético de muerte térmica del hongo *D. seriata* para predecir el tiempo de mantenimiento necesario para la higienización de los sarmientos de la vid inoculados. El aumento de las enfermedades fúngicas de los cultivos de las vides está siendo objeto de estudio en la ETS de Ingenierías Agrícolas de la Universidad de Valladolid.

Un tercer objetivo de la presente Memoria es la obtención de nuevos preparados objeto de estudio para obtención de nuevos preparados o nanopesticidas para combatir los hongos de la Yesca o del brazo muerto (BDA). Tal como se recoge en la patente obtenida (Patente nº: ES P201431591, fecha 30/10/2014: “*Composite con actividad antimicrobiana que comprende dos componentes autoasamblados de origen natural y, opcionalmente, un componente (C) de tamaño manométrico*”), el material compuesto, también llamado composite, es capaz de combatir estos hongos.

El objetivo se concreta en la consecución de sistemas ternarios en los que nanopartículas de diversas especies químicas son incorporadas a mezclas de quitosano y propóleo para uso como fungicida. Los ensayos de estas combinaciones ternarias se han llevado a cabo tanto en pruebas de laboratorio como de campo. La elección del propóleo y/o del quitosano para incorporar o estabilizar nanopartículas de diferentes especies químicas (nanoplatina) surge por las conocidas propiedades antifúngicas de estas dos sustancias y por los efectos sinérgicos que puede experimentar la planta cuando se trata por combinaciones o preparados de mezclas ternarias.

La síntesis química de diferentes tamaños de oligómeros de quitosano con actividad biológica determinada puede seguirse en los estudios de Kuyama et al. (1993), Prakongkha et al. (2013) y Aziz et al. (2006), quienes han propuesto la obtención de oligómeros octaméricos de quitosano dopados con sulfato de cobre como de inducir reacciones de defensa de la vid y resistencia al moho gris y al mildiú. Se ha demostrado que el quitosano polimérico y los oligómeros de quitosano inducen fitoalexinas o compuestos antimicrobianos que ayudan a limitar la dispersión del patógeno (Kendra et al., 1989). El propóleo también ha encontrado aplicación como antioxidante y en preservación de alimentos (Dotta et al., 2011; Kalogeropoulos, 2009). Su fuerte actividad antimicrobiana puede deberse al elevado contenido en fenoles totales y en flavonoides (Nedjiet al., 2014).

La Nanotecnología es en la actualidad el área que implica mayores inversiones e investigación por parte de las empresas, siendo las nanopartículas de plata una de las especies antimicrobianas de mayor interés, ya que su actividad antibacteriana es de muy amplio espectro y es muy superior a la de la plata en grados superiores de compactación. Las principales desventajas que limitan el uso de la nanoplatina son su facilidad de agregación y la liberación incontrolada de iones plata aparte de su citotoxicidad potencial (Silva et al., 2012). Precisamente, los nuevos preparados *in situ* de materiales poliméricos de quitosano/propóleo son capaces de inhibir la agregación de las partículas de nanoplatina y la liberación incontrolada de iones al tiempo que consiguen reducir su citotoxicidad.

La presente Tesis se basa, pues, en la investigación y desarrollo de métodos preventivos y curativos como principio de precaución. Cuando un efecto futuro de una

causa presente es incierto, pero puede ser muy dañino e irreversible determinando la muerte de la cepa, es prudente actuar inmediatamente para suprimir las causas más conocidas, entre aquellas sobre las que se puede actuar. Una de las causas más conocida en la diseminación e infección en las cepas de la vid con hongos patógenos xilófagos debida a la poda de invierno. Una de las principales formas para la diseminación de estos hongos de una cepa a otra es a partir de la poda y el abandono de los sarmientos y restos de poda en la propia viña, que actúa como *reservoir* y/o fuente de inóculo para la propagación de los hongos.

Las dos primeras partes de este trabajo doctoral han contado con la financiación de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León de un proyecto de investigación con participación del ITACYL e iniciado en el año 2012, referencias VA233A12-1 y VA036A12-2, para un estudio integrado de un proceso de higienización y biodegradación de residuos lignocelulósicos procedentes de la poda de la vid mediante procesos de compostaje e inactivación térmica de hongos. La segunda parte de la tesis ha contado con la colaboración del Laboratorio de Materiales Avanzados de la Universidad de Valladolid del Campus de Palencia para la consecución de un nuevo tipo de preparados naturales en base oligómeros de quitosano para su uso como fungicida para la protección de las heridas de la poda en el viñedo. El aislamiento y la identificación morfológica y molecular de los hongos patógenos han sido facilitados por ITACyL (Instituto Técnico Agrario de Castilla y León), y los ensayos de compostaje se han realizado en el Centro de Formación Agraria de Viñalta de la Junta de Castilla y León (Palencia, España).

En la Figura 2.2, se observa el planteamiento general de la tesis en base a su presentación en formato de artículos científicos/patentes redactados. La primera parte de la tesis se refiere al estudio de un nuevo método de higienización y biodegradación de restos de la poda de la vid, restos que representan fuente de inóculo para las enfermedades de la madera de la vid (*artículo científico 1: “Higienización y control del hongo *Diplodia seriata* en restos de la poda de la vid y su variabilidad estacional en compostaje abierto y cerrado”*). Esta aportación se completa con objeto de conocer la optimización del proceso de compostaje mediante un estudio cinético de termotolerancia para la inactivación térmica del hongo xilófago *Diplodia seriata* (*artículo científico 2:*

“*Cinética de muerte térmica in vitro de hongos inoculados de *Diplodia seriata* en sarmientos de la poda de la vid*”). La tercera parte de la tesis hace referencia a la síntesis de nuevos preparados antifúngicos (biofungicidas) para el control *in vitro* del hongo *D. seriata*, hongo presente en las heridas de la poda de la vid (*artículo científico 3: “Síntesis de composite de oligómeros de quitosano/propoleo/nanoplata y el estudio de su actividad contra *Diplodia seriata*”; Patente ES P201431591: “Composite con actividad antimicrobiana que comprende dos componentes autoasamblados de origen natural y, opcionalmente, un componente (C) de tamaño manométrico”*).

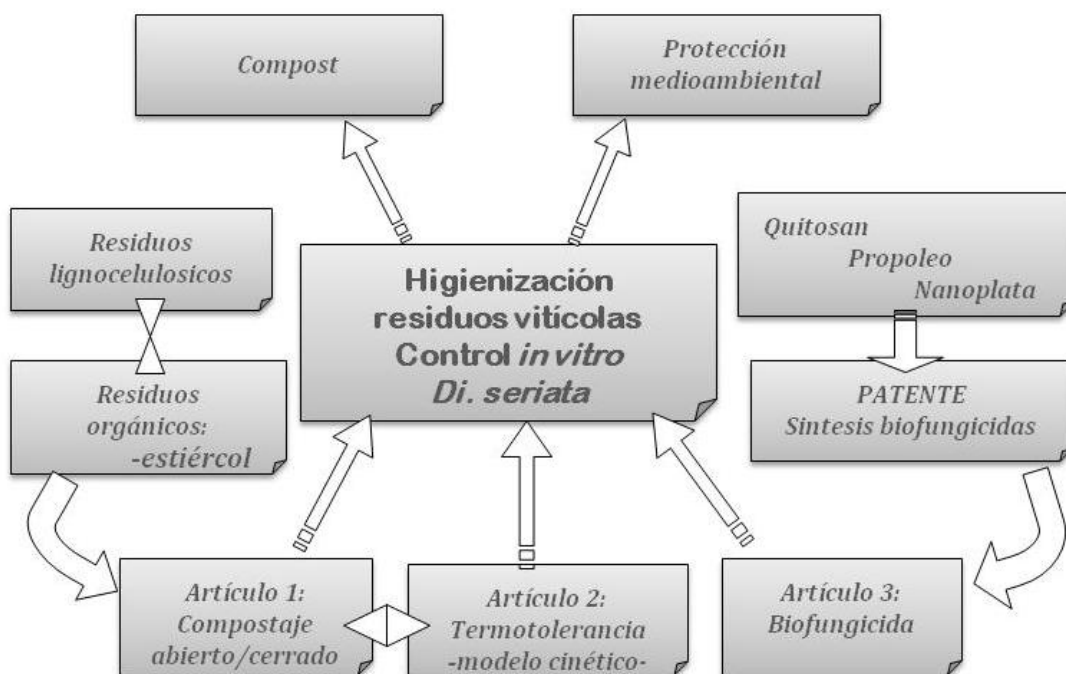


Figura 2.2 Planteamiento general de la Tesis Doctoral en base a artículos científicos redactados: “*Higienización de sarmientos de la poda de vid mediante métodos térmicos y biofungicida*”.

2.1.1 Elección de los procesos de compostaje en distintas estaciones para la higienización de sarmientos de la vid

En el primer artículo científico de la tesis, que lleva por título: “Higienización y control del hongo *Diplodia seriata* en restos de la poda de la vid y su variabilidad estacional en compostaje abierto y cerrado” se compara por primera vez la eficacia de eliminación de hongos en sarmientos mediante un compostador abierto o pila vs un biodigestor cerrado discontinuo y en diversas estaciones del año (Figura 2.3).

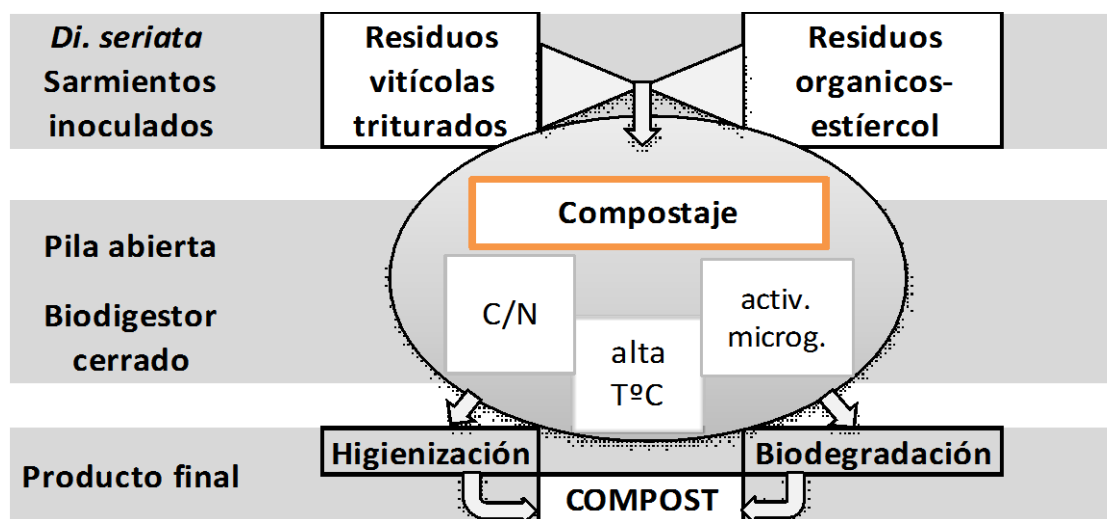


Figura 2.3 Esquema del proceso de compostaje en pila abierta y/o biodigestor cerrado, parámetros de seguimiento del proceso.

El proceso de compostaje o la transformación microbiana aerobia (Haug, 1993) es el modo de aprovechamiento de residuos más antiguo. Se basa en la fermentación microbiana de materia orgánica en presencia de aire. Durante el proceso la temperatura oscila entre 65-75°C y el pH entre 7-7.59 (Moreno and Moral, 2008). El proceso se puede desarrollar en pilas abiertas donde la aireación se hace por volteo después de un periodo de tiempo en cual la temperatura empieza a bajar o en biodigestores cerrados (Sánchez et al., 2008) dotados con un dispositivo para el acondicionamiento de la temperatura y la humedad del material tratado y del control automático de todo el proceso.

La estrategia que hemos seguido para la elección de métodos de higienización y biodegradación de restos de la poda de la vid se basa en el análisis de la extensa bibliografía especializada disponible sobre proceso de compostaje de residuos orgánicos

y en el estudio previo de compostaje en un biodigestor cerrado de baja capacidad (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Sistema de compostaje abierto y cerrado con varios materiales, ventajas para la higienización

Compostaje	Materiales	Ventajas	Referencia
<i>Abierto</i>			
pila con volteo 60-75°C	restos de poda de vid triturados, gallinaza	higienización en 35 días (<i>D.serriata</i>), uso como sustrato	Matei et al. (2014)
pila con aire continuo forzado 65°C	restos de poda de la vid, hollejos de la vid, purina de cerdo, paja de trigo	mejor mezcla con sarmientos, higienización (<i>F. oxysporum</i>), uso como sustrato	Bustamante et al. (2015)
pila con volteo 56°C	estiercol de cerdo	higienización 99% en 7 días (<i>Penicillin</i>), 40-80% mejora la actividad de microorg.	Zhang et al. (2015)
pila con volteo 60-70°C	estiercol ganadero y residuos verdes	higienización en 24h (<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp)	Avery et al. (2012)
pila con volteo 55-65°C	restos de poda de vid, hollejo de uva, hojas de olivo, hollejo de oliva, purin de cerdo, lodos de depuradora	materia organica alto contenido, mejor compost con mezcla, mejor mezcla con hollejos de uva, mejor 30% como sustrato, >% determina la fitotoxicidad	Manios (2014)
pila con volteo 61.9-73.8°C	restos de planta y raices	higienización después de 60 días (<i>virus</i>) y menos de 30 días (<i>Olpidium bormovanus</i>), uso como abono	Aguilar et al. (2010)
pila con aire continuo forzado 60-70°C	residuos de poda, hojas, hierba cortada	restos de la poda como “agent bulking”, infiltrar agua, aireación, influencia de las precipitaciones	Benito et al. (2006)
pila con volteo 65°C	estiércol de ganado, restos de cultivos de tomate, alcachofa, astillas de madera (65%)	higienización (<i>R. solani</i> , <i>Sclerotinia menores</i>) <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> por la distribución del C orgánico molecular de las astillas de madera	Pane et al. (2013)
pila con volteo 50-57°C	lodos de depuradora	higienización en 9 días en verano y 29 días capa central y 60 días capa inferior en invierno (<i>E.coli</i> , <i>S. senftenberg</i>)	Kaszewska et al. (2006)
pila con aire continuo forzado 50-55°C	paja de cereal, estiercol de cerdo	higienización de 2h (<i>E.coli</i>)	Turner (2002)
<i>Cerrado</i>			
biodigestor cerrado 65-75°C	restos de poda de vid triturados, gallinaza	higienización en 2días (<i>D.serriata</i>), uso como sustrato	Sanchez et al. (2014)
biodigestor cerrado 45-65°C	paja de cebada, viruta de madera blanda, estiércol de visón	higienización en 21 días (<i>virus</i>) y 65°C en comparacion con testigo identificado después de 1 día	Hussain et al. (2014)
biodigestor cerrado 58.3-68.8°C	gallinaza, cadaveres de aves de coral	higienización en 2 dias de temperaturas termofílica (en 9 días en verano y 42 días en invierno) (<i>Salmonella entérica</i> , <i>E.coli</i>)	Dunkley et al. (2011)
biodigestor cerrado 50°C	estiércol de vacuno, sulfato de amonio 0.08%	higienización a C/N 20:1 (<i>Salmonella</i> spp); con una relación de 40:1 el pH >8 y temp. mas altas pero no una inhibición mas rapida; mejor proceso con 0,08% (NH ₄) ₂ SO ₄	Erickson et al. (2009)
biodigestor cerrado 58-60°C	cadaveres de pollo, paja de cereal, gallinaza	higienización (cerrado), no olor, gases de baja presión, no influyen condiciones meteo, uso como abono	Sánchez et al. (2008)

Según el volumen que ocupa el material puesto a compostar, el calor generado será y solo cuando se supera el metro cúbico se producen solo en montones de mas un metro cubico se producen procesos de fermentación termofílica con una elevada temperatura de 65-75°C (Bueno, 2010). En la prueba previa hemos utilizado un biodigestor cerrado con dos módulos de 120 kg de capacidad cada uno y la aireación y el volteo automático. Debido a la poca cantidad de material a compostar la fase termofílica no se mantiene o no alcanza los valores para la higienización y biodegradación (Figur 2.4) (Matei et al., 2013). También los materiales orgánicos nitrogenados utilizados (estiércol de gallina y estiércol de oveja) influyen en el nivel de temperatura alcanzada en la fase termofílica del proceso de compostaje.

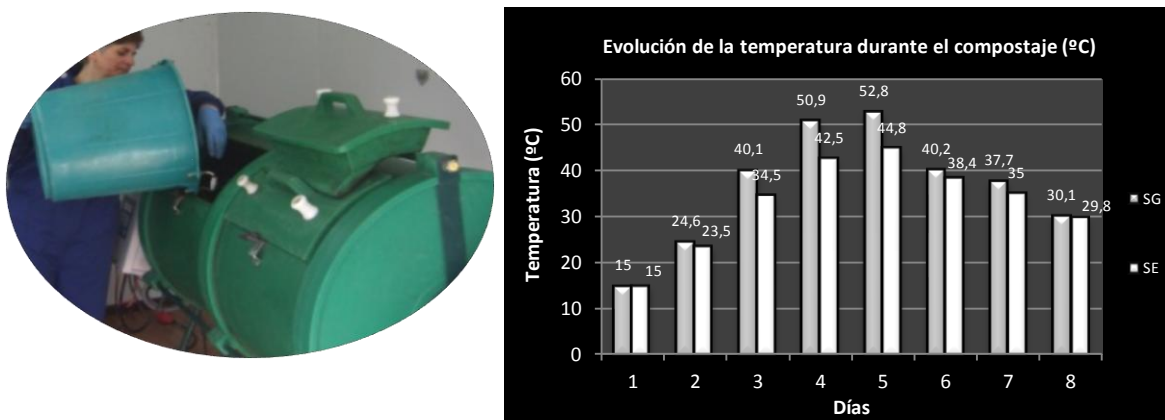


Figura 2.4 Compostaje de sarmientos de la poda de la vid con gallinaza (SG) y estiércol de oveja (SE) (1:2, v/v) en un biodigestor cerrado con aireación y volteo automático (Matei et al., 2013).

Para los hongos patógenos que habitan en los tejidos del floema y xilema de la vid se han propuesto métodos térmicos de higienización de restos de poda de vid mediante la aplicación de procesos de compostaje (Matei et al, 2014). En el proceso de compostaje la adición de gallinaza a los restos de la poda de la vid hace que la temperatura suba hasta 70°C y ello favorece la eliminación de potenciales patógenos en el producto final.

Sucesivamente al estudio anterior se ha realizado otro de carácter temporal sobre el proceso de higienización del hongo *Diplodia seriata* en restos triturados de poda de la

vid (tamaño no superior a 2-4 cm) en una pila abierta y un biodigestor cerrado y para diferente variabilidad estacional (primavera, verano e invierno).

Se ha visto que el proceso de compostaje depende de la estación en cual se desarrolla. Benito et al. (2006), operando con sarmientos de poda de vid compostado en pila abierta junto con residuos de jardinería, encontrándose diferencias significativas cuando se opera en verano probablemente debido a la lixiviación de sales solubles como resultado de la precipitación estacional. Dunkley (2011) también a advertido la efectividad del proceso de compostaje en pila abierta durante el periodo de verano para el proceso de inactivación de los microorganismos patógenos que pueden estar presentes en el proceso. Del mismo modo, Rodríguez et al. (2012) confirmaron la eficacia de un digestor cerrado (un reactor de tambor rotativo) usando restos de poda y polvo de aserrín como agentes estructurante, asegurando la completa eliminación de patógenos después de 3 días de compostaje.

Otro aspecto objeto de estudio ha sido la obtención de un producto (compost) más o menos estable, libre de patógenos y semillas de malas hierbas (Stoffella et al., 2005) para su utilización como corrector del suelo en Agricultura o como sustrato fertilizante mineral para la germinación de las semillas. En nuestra contribución presentamos los parámetros físico-químicos o de seguimiento del proceso de compostaje (temperatura, humedad, aireación, pH) así como los parámetros relativos a la naturaleza del sustrato (C/N y conductividad eléctrica) en diferentes estaciones del año; así como los parámetros biológicos (índice de germinación, % de hongos y bacterias) y la calidad del compost (contenido en nutrientes y metales pesados).

(i) *Material lignocelulósico.*

Los sarmientos de la poda han sido seleccionados como material lignocelulosico de las cepas asintomáticas de la variedad Tempranillo del viñedo de Cubillas de Santa Marta (Valladolid) donde previamente se marcaron las cepas enfermas, viñedo objeto de seguimiento del decaimiento de la vid desde el año 2003. Dichos sarmientos fueron obtenidos durante la poda anual, de un gestor que los recoge de las parcelas y los tritura mecánicamente para su posterior comercialización. Para reducir el volumen de los residuos de la poda de la vid se puede utilizar una máquina para el astillado y triturado que facilita el secado natural y también su transporte (Figura 2.5).



Figura 2.5 Triturado de residuos de la poda de la vid mediante astilladora móvil con reducido tamaño y gran facilidad de acceso a las explotaciones agrícolas (pueden procesar entre 1.000 y 10.000 kg/h).

De las cepas asintomáticas antes de la poda hemos recogido sarmientos para la inoculación con el hongo *Diplodia seriata*, hongo asociado al decaimiento de la vid.

La caracterización agroquímica de los sarmientos de la vid muestra un considerable aporte órgano-mineral como mejora de la estructura del suelo (Fregoni, 1977). Teniendo en cuenta estas cualidades, los sarmientos previamente triturados pueden ser utilizados como agente estructurante (agent bulking) en la mezcla con diferentes tipos de estiércol produciendo mediante el proceso de compostaje, e incluso en el propio campo, el denominado compost. Esta recuperación permite abonar la tierra sin necesidad de otro tipo de producto adicional.

(ii) *Material orgánico.*

Se conocen como “aditivos” los materiales ricos en nitrógeno que se pueden añadir a la masa para compostar, y que sirven para activar o acelerar el proceso de compostaje, o bien para equilibrar en nutrientes la materia prima para mejorar el producto final como la estimulación del metabolismo de los microorganismos (Uranga Belanzategui, 1995).

-El estiércol de gallina utilizado para el proceso de compostaje es procedente de una explotación avícola (Hibramer, Valladolid, España) y consiste en una mezcla del material de cama original (serrín) y de eyecciones sólidas y líquidas de los animales durante el ciclo productivo. Es un material con un alto contenido en nitrógeno y menor en carbono, por lo que se convierte en un buen *aditivo* nitrogenado en combinación con los residuos lignocelulosicos para el proceso de compostaje. Esta fracción orgánica con un gran contenido de humedad (50 a 80%) es una de las principales fuentes de generación de lixiviado en el sitio de disposición final de los residuos sólidos,

convirtiéndose en el principal problema ambiental. La captación de lixiviados y el tratamiento de estos es uno de los mayores problemas técnico-económico a que nos enfrentamos. La gallinaza normalmente suele mezclarse con otros sustratos para reducir su contenido en humedad, proporcionando así una adecuada porosidad y obteniendo una relación C/N entorno a un 25/1-30/1 (Urbano Terrón, 2002). Algunos de los sustratos utilizados son los restos de poda, la paja, el serrín o la corteza de pino.

Esto análisis químicos de micro y macroelementos (Tabla 2.2) nos han determinado a elegir el estiércol de gallina en la mezcla con los sarmientos de la poda de la vid para el proceso de compostaje.

Tabla 2.2 Análisis de los materiales precursores seleccionados para el proceso de compostaje.

Muestra	%C	%N	C/N	%K	%Ca	%Mg	Na (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)
Sarmientos	43.26	0.68	63,6	0.47	0.54	0.125	210.76	20.31	21.12	3.90	18.69
σ	0.04	0.02		0.01	0.01	0.00	14.45	0.84	0.83	0.36	1.62
Gallinaza	38.01	3.28	11.59	1.86	9.15	0.65	0.50	1222	347	44	273
σ	6.07	1.62		0.72	1.09	0.08	1.46	259.12	184.66	30.35	71.68

Métodos: LECO y absorción atómica

2.1.1.1 Identificación y aislamiento del hongo *Diplodia seriata*

Diplodia seriata es un hongo fitopatógeno aislado de las plantas afectadas de la enfermedad del brazo muerto (Black Trunk Disease, BDA) y que produce infecciones graves tanto en el viñedo como en los árboles frutales y que pertenece a la familia *Botryosphaeriaceae* (Larignon et al., 2001, Van Niekerk et al. y 2006, Savocchia et al., 2007). Armengol et al., 2001b confirma la mayor incidencia de *D. seriata* en viñedos españoles, siendo probablemente el hongo más abundante en los países de clima mediterráneo.

En base a estudios taxonómicos basados en la comparación de la secuencia ITS (Internal Transcribed Spacer) la especie *D. seriata* ha sido incluida en el género *Botryosphaeria* (familia *Botryosphaeriaceae*, orden *Dothiomycetes*, *incerta sedis*), genero con 12 grupos distintos (Phillips et al., 2007), con una distribución cosmopolita (Denman y col., 2000). En su caracterización se han tenido en cuenta caracteres de

colonias tales como la morfología y la tasa de crecimiento miceliar a diferentes temperaturas (Pennycook y Samuels, 1985, De Wet et al., 2003). *Diplodia* presenta conidios hialinos que puede septarse y pigmentarse cuando son maduros, de pared gruesa y ancho superior a los 10 μm (Phillips, 2002).

El aislamiento y la identificación morfológica y molecular de los hongos patógenos han sido facilitados por ITACyL. Durante el seguimiento anual de la incidencia de las enfermedades fúngicas en los viñedos de Castilla y León se recogieron muestras de cepas afectadas para su posterior análisis en el laboratorio.

Los aislados fúngicos y sus monospóricos entraron a formar parte de la colección de hongos del ITACyL. Para ello, se les asignó un número de colección y fueron conservados a 4°C y repicados periódicamente en medio PDA (Martin & Cobos, 2007).

Los medios de cultivo utilizados para cada uno de los ensayos realizados fueron MEA (malta extracto agar) y PDA (patata dextrosa agar) comercializados por Merk. Para la preparación se usa 17g MEA o 12g PDA que se disuelve en 750ml de H₂O destilada y se esteriliza en un autoclave (Mediclave J.P. Selecta) a 100°C durante 45 min. Para inhibir el crecimiento de las bacterias en los dos medios de cultivos descritos, se añadió 3.75 ml de Cloranfenicol (0.25g/l, Merk). El medio MEA ha sido suplementado con 0.75 ml del acaricida Dieldrin (0.2 g/l, Sigma).

(i) *Proceso de inoculación*

Para determinar la efectividad del proceso de compostaje en la higienización de restos de la poda de la vid, previamente hemos inoculados los sarmientos con el hongo patógeno *D. seriata*. Se recogen antes de la poda sarmientos de las cepas supuestamente sanas (variedad Tempranillo), del viñedo de Cubillas de Santa Marta (Valladolid, España). En este viñedo tres años seguidos (2003-2007) se marcaron las cepas consideradas enfermas por la sintomatología externa presentada. Los sarmientos se cortan en trozos de 15-20 cm, presentando 2 o 3 yemas. Estos trozos de sarmientos se lavan superficialmente con agua y jabón, se desinfectan y se secan bajo luz ultravioleta durante 30 min (Kowell UV, serie MV). Se reserva 5 sarmientos antes de inocular para analizar el saneamiento.

El proceso de inoculación se ejecuta bajo luz UV. Se renueva (refresca) el corte basal del trozo de sarmiento y seguidamente en este corte se aplica 5-6 mm de micelio del hongo. Se introducen con la base inoculada en tubos de ensayo y se guardan en gradillas a temperaturas de 25°C y en la oscuridad un periodo de 2-4 meses.

Después de la infección se recoge una muestra de 5 sarmientos inoculados para el análisis y establecer el control o el porcentaje inicial de infección.

Los análisis microbiológicos de los sarmientos no inoculados (saneamiento) e inoculados (control y muestras después del tratamiento) respecta el mismo procedimiento que se presenta a continuación.

(ii) *Análisis microbiológicos*

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo mediante extracción diaria de cinco sarmientos inoculados de las capas de compostaje de la pila y el biodigestor cerrado, la primera semana y después cada 10 días y hasta 60 días del experimento. Cada sarmiento se corta a una altura de 4-5cm de la base y se desinfectan por inmersión 5 min en una solución de lejía de 50% seguida de tres lavados en agua estéril de 5 minutos cada uno. Se extraen 6 astillas/sarmiento (es decir 30 astillas/muestra) que se sembraron en placas Petri con medio MEA previamente preparado. Las placas con las astillas se incuban a oscuridad y una temperatura de 25°C durante 10 días (Alaniz et al., 2007), periodo suficiente para determinar morfológicamente el crecimiento de *D. seriata* y otros hongos (*Aspergillus*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Fusarium*) y bacterias (*Actinomicetos*, *Bacillus*, *Thiobacillus* y *Enterobacter* spp), en cada astilla. Se repican en medio de patata dextrosa agar (PDA) los conidios del hongo resultado para inducir la esporulación a 25°C en ciclos alternos de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz ultravioleta cercano (Martín y Martín, 2013).

La lectura de las placas empieza después de 10 días y se repite cada dos semanas durante dos meses. El porcentaje de inhibición del hongo *D. seriata* se determina contando el número de astillas infectadas por placa y por muestra de residuo de poda inoculado en comparación con el control (sarmiento inoculado antes de compostaje), y recurrir a la PCR (ThermoCientífico™ SureTect™) para la confirmación cuando sea necesario.

(iii) Identificación morfológica

Los aislados de *D. seriata* han sido identificados por los caracteres macroscópicos como la textura de las colonias, color del micelio en el medio MEA, la forma de la margen del hongo en la placa Petri, así como la morfología de las esporas y células conidiógenas (Armengol et al., 2001, Alaniz et al., 2007).

(iv) Análisis estadísticos

Los valores medios de los porcentaje de inhibición se calcularon a partir de 5 replicas por cada tratamiento y la separación de las medias se calculan para el valor de $p < 0,05$, determinando las diferencias significativas con el programa Origin Pro® ANOVA tools.

2.1.1.2 Compostaje estacional abierto o cerrado óptimo para la higienización

Las pruebas de compostaje, realizadas en el Centro de Capacitación Agraria "Viñalta" en Palencia (España) se han llevado a cabo desde 3 de mayo hasta 19 de julio correspondientes al compostaje en el período de primavera, del 26 de julio al 12 de octubre correspondiente a la temporada de verano, y desde 12 noviembre hasta 2 de febrero para la campaña de invierno.

Un requisito previo para la optimización del proceso de compostaje, tanto en el abierto (pila) como en los sistemas de biodigestores (discontinua) cerrado es la determinación más apropiada de la relación gallinaza/residuos de poda de la vid (la relación C/N de la mezcla de partida) que ha de ser de ca. 30 (Moreno and Moral, 2008). Las relaciones C/N de los materiales de partida se midieron (después de secarlos a 100° C durante 48 horas y molidas en un molino ultracentrífugo Retsch ZM-100 a un tamaño de partícula < 0.08 mm) con un aparato LECO CHN2000 y los contenidos en micro y macronutrientes (incluidos metales) por espectrofotometría de Absorción Atómica (Atomic Absorption Spectrometers VARIAN AA240FS Fast Sequential AAS) con llama y cámara de grafito para metales (norma UNE-EN 13650:2001) (Tabla 2.3).

Las relaciones experimentales de C/N para el estiércol de gallina (A) y restos de la poda de la vid (B) fueron de 10.11 y 54.71, respectivamente, por lo que las proporciones

de mezcla de 100 kg de los dos materiales fueron determinadas fácilmente mediante el uso de la siguiente ecuación [1]:

$$A (C/N)_A + B (C/N)_B = 100 (C/N)_{mezcla} \quad [1]$$

Estos cálculos indican que la relación teórica entre el estiércol y los residuos de la poda de la vid debe ser 55/45, es decir, 1.22. Sin embargo, con el fin de alcanzar una buena higienización y la calidad del compost, también es necesario operar con una mezcla que puede alcanzar altas temperaturas de compostaje. Las pruebas preliminares con la relación estiércol/restos de poda de 1.22: 1, 1.5: 1 y 2: 1 mostraron que los mejores resultados para la higienización final y la calidad del compost se lograron con una proporción de 2:1 (w/w) (Matei et al., 2014).

Las experiencias de compostaje se realizan a escala real en abierto (pila) y en cerrado (biodigestor discontinuo) para poder realizar las adaptaciones técnicas a las necesidades del material a compostar. Para la preparación de la pila abierta (Figura 2.6 (a)), se coloca, inicialmente, una capa de paja a fin de absorber los lixiviados, seguida de una primera capa de 300 kg de estiércol de gallina, una segunda capa de 150 kg de restos de poda de vid, tercera capa de 300 kg de estiércol, cuarta capa de 150 kg de restos de poda de vid, y finalmente una capa de recubrimiento de estiércol.

En el biodigestor cerrado ((Figura 2.6 (b)), se prepararon 33 capas, con una capa inferior de paja para absorber lixiviados y capas alternas de estiércol (30-35 kg) y restos de poda (15-17.5 kg), cubiertos por una capa final de estiércol.

Se añadió agua a cada capa de sarmientos triturados para proporcionar un valor de humedad de 50%, y los parámetros humedad y temperatura se controlaron con las sondas indicadas a continuación. La aireación de la pila estaba asegurada con el proceso de volteo (después de 28 días).



Figura 2.6 Montaje de una pila abierta (a) y de un biodigestor cerrado discontinuo (b) con gallinaza y restos del a poda de la vid triturados (2:1, v/v).

En cuanto al biodigestor cerrado discontinuo diseñado por el equipo de investigación, está constituido por un modulo Box-Bompost, envolvente contenedora de los biodigestores y un dispositivo COMPOSTRONIC. Las dimensiones del contenedor Box-Compost eran $2.370 \times 1.080 \times 1.420$ mm, y fue construido con paneles de poliéster y espuma de poliuretano, con una estructura externa de acero inoxidable. En el interior del contenedor Box-compost, la temperatura, la humedad y el oxígeno contenido de la masa de compostaje se acondicionaron con un calentador de aire 7.5 KW, aspersores de agua y un ventilador externo de alta presión (3 HP), que se controla de forma automática con un dispositivo Compostronic Siemens equipado con un registrador de datos data logger HOBO U12 con 4 canales externos (Sánchez et al., 2008).

2.1.1.3 Parámetros que afectan el proceso de compostaje

En general, el manejo y confección de compost va a estar condicionado por el sustrato, por la cantidad, el producto final que se quiera obtener, el microclima, la estación del año etc. pero las técnicas a aplicar son esencialmente las mismas (Uranga Belanzategui, 1995).

2.1.1.3.1 Parámetros de seguimiento del proceso de compostaje

Temperatura: el proceso de compostaje se divide en cuatro etapas según la evolución de la temperatura: mesofílica, termofílica, enfriamiento y maduración (Bueno et al., 2008).

La temperatura es un factor fundamental para potenciar el proceso de compostaje y debe ser en torno a los 65°C con una duración de 15-20 días para conseguir una correcta higienización (Ekinci, 2013 y Bueno, 2010), solo en montones de más 1 metro cubico se produce una fermentación termofílica (Figura 2.7). Las poblaciones de los microorganismos que intervienen en el proceso de compostaje mueren o se mantienen en forma de esporas.

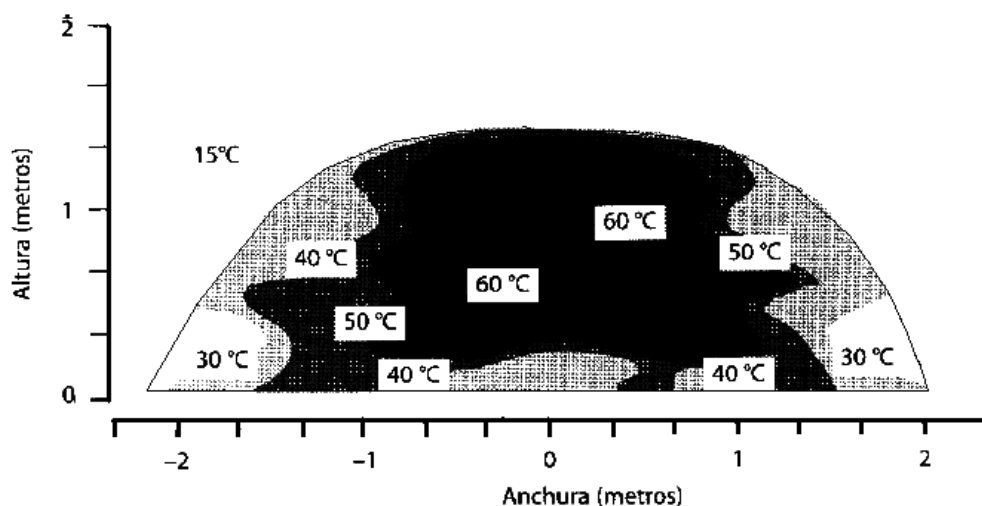


Figura 2.7 Temperaturas en diferentes secciones de una pila de compost (Atlas y Bartha, 2002).

Cuando operamos en un sistema de pila abierta o en un biodigestor cerrado observamos que no hay una clara delimitación entre las fases mesofílicas (10-40°C) y termofílica (40-75°C) ya que las dos fases ocurren secuencialmente (Schloss et al., 2003). Las temperaturas vuelven a descender momento en cual es necesario el volteo, en caso de las pilas abiertas sin posibilidad de aireación controlada (Matei et al., 2014). Para los biodigestores cerrados discontinuos disponemos de aireación forzada programada (Sánchez et al., 2008) y una vez superada la fase termofílica la temperatura disminuye ligeramente y de forma continua. Cuando se estudia la variabilidad estacional del compost, es preciso resaltar que las fluctuaciones de temperatura pueden ser atribuidas a la influencia de la temperatura ambiente, de acuerdo con Zhu (2006).

The US Environmental Protection Agency (EPA, 2002) considera suficiente mantener una temperatura mínima de 55 °C durante 3 días o 15 días en compostaje (fertilizante clase A), o un mínimo de 40 °C durante 5 días y durante 4 horas la temperatura en la masa que composta debe exceder de 55 °C (fertilizante clase B). Por último, a fin de garantizar la calidad del compost de acuerdo con el Reglamento Europeo (CE) N° 2003/2003 de fertilizantes, la evolución de los nutrientes y el contenido de metales pesados al principio y al final del proceso de compostaje se han monitorizado, tanto para la pila abierta y el biodigestor cerrado discontinuo.

Humedad: La generación de calor debida a la actividad biológica no se puede iniciar si no hay un equilibrio entre el aire y la humedad, que permita el desarrollo de los microorganismos aeróbicos que necesitan una cierta cantidad de agua para su metabolismo, también es necesario para el transporte de las sustancias solubles que sirven de alimento a las células y de los materiales de desecho.

Comparando la pila abierta con el biodigestor cerrado los cambios de humedad pueden deberse también a los factores climáticos; tanto precipitaciones, como la falta de ellas, así como la insolación directa, esto influye más en el caso de la pila abierta. Es imprescindible para iniciar el proceso de compostaje de los sarmientos añadir agua hasta que la humedad sea de aprox el 50% y mantener la humedad por encima del 40% (Bueno et al., 2008). Para materiales fibrosos o residuos forestales gruesos la humedad máxima permisible es del 75-85% mientras que para materiales vegetales frescos, ésta oscila entre 50-60 % (Jose and Maneses 2010). Al final del compostaje un contenido bajo en humedad indica un buen proceso de compostaje, la humedad es conveniente que esté comprendida entre el 35% y 40% conforme con la legislación vigente.

Para la pila abierta el exceso de humedad puede ser reducido por aireación por volteo y el déficit mediante riegos. En el biodigestor se producía una evaporación debido a la temperatura, pero al estar cerrado, posteriormente se producía una condensación, lo que mantenía constante la humedad.

El *pH* y la *conductividad eléctrica (CE)*: El pH influye sobre el proceso de compostaje debido a su acción sobre la actividad de los microorganismos (Bueno et al., 2008). Los hongos toleran un amplio rango de pH (5 - 8) mientras que las bacterias presentan una menor capacidad de tolerancia (6 – 7.5). Al pH por encima de 9 favorecen

la conversión del nitrógeno en amoníaco, afectando negativamente al crecimiento y a la actividad de los microorganismos (Moreno et al., 2007).

La mezcla de sarmientos y gallinaza que hemos utilizado para llevar a cabo el proceso de compostaje de los mismos, presenta un pH neutro que ha favorecido la actividad de los microorganismos.

Si durante el proceso de compostaje se originan unas condiciones fuertemente alcalinas y se producen pérdidas excesivas de nitrógeno en forma de amoníaco, conviene añadir cal a la pila. Si las condiciones iniciales son fuertemente ácidas puede que la pila no aumente su temperatura (Moreno et al., 2007).

No es necesario influir sobre el pH del proceso si se presta atención a la mezcla de los materiales, el contenido de humedad y la aireación (Dalzell et al., 1991). Las condiciones óptimas para un buen compostaje incluyen valores del pH próximos a la neutralidad (Uranga, 1995).

La conductividad eléctrica (CE) aunque no informa del desarrollo del proceso es fundamental ya que puede limitar en algún caso el tipo o dosis de aplicación del compost. Al final del proceso de compostaje los valores de la CE no deberían ser superiores a 2 g/l (expresada en NaCl). Hemos hecho el seguimiento de los valores de la CE demostrando su influencia sobre la capacidad de germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas.

Aireación: La aireación del montón no sólo proporciona oxígeno a los microorganismos sino que ayuda a regular el exceso de humedad por evaporación, y además ayudará a mantener la temperatura adecuada.

Una aireación adecuada es la condición base de un buen compostaje: el proceso de compostaje se desarrolla en condiciones aeróbicas con un contenido en oxígeno entre 15 y 20% (López-Real, 1995).

En nuestro caso tanto para el compostaje en invierno como en verano el exceso de aireación puede disminuir la temperatura del proceso y una alta desecación y un descenso en la actividad metabólica de los microorganismos (Zhu, 2006). Si no hay suficiente oxígeno, los microorganismos aerobios serán sustituidos por los anaerobios produciendo un retardo en la descomposición, aparición de sulfuro de hidrógeno y la producción de malos olores (Bueno et al., 2008). Existen varias formas de suministrar el

oxígeno, mediante volteo o agitación del material (pila abierta) y en otros, mediante equipos de ventilación que funciona por succión, o introduciendo aire forzado (biodigestor cerrado) (Barrena, 2006).

2.1.1.3.2 Parámetros relativos a la naturaleza del sustrato

Tamaño de partícula: Antes de realizar el proceso de compostaje es necesario triturar, desmenuzar o desfibrar los desechos orgánicos mediante tratamientos mecánicos, mediante machetes o más industrialmente con una astilladora especial para picar material vegetal verde y seco (Figura 2.6). Esta operación permite que los residuos orgánicos mejoren la capacidad de retener agua y aire, además de aumentar la superficie de aprovechamiento bacteriano. Este tamaño va a depender del tipo de flujo de aire que vayamos a emplear, para aire forzado el tamaño de partícula debe estar próximo a 10 mm (biodigestor cerrado) y en flujo natural de aire unos 50 mm (pila abierta) (Dalzell et al., 1991). La aireación y la capacidad de descomposición puede ser mejorada al reducir el tamaño de las partículas con el consiguiente aumento de superficie, mientras que la porosidad se mantenga por encima del 30% (Rynk, 1992).

Relaciones C/N: La relación C/N expresa el cociente entre el carbono orgánico y el nitrógeno total contenido en las materias orgánicas a compostar. Es necesario que la relación C/N esté entorno al 25-35 en la mezcla inicial (Jhorar et al., 1991).

Según Jeris y Regan (1973), en la práctica, el valor puede ser un poco más elevado debido a la existencia de bastante carbono en formas resistentes como celulosas y ligninas no utilizadas por los microorganismos, válido para los sarmientos de la poda de la vid, caso en cual la proporción en peso de gallinaza a sarmientos de poda es de 2:1 (2kg de gallinaza por 1 kg de sarmientos triturados), óptima para un buen compostaje. Un compost se considera maduro cuando la relación C/N es menor de 20 o cercano a 15.

Cuando utilizamos estiércol de gallina en el proceso de compostaje, para optimizar las propiedades del sustrato (espacio de aire, contenido de humedad, relación C/N, densidad de partículas, pH y estructura mecánica), es importante la adición de un agente estructurante. En este sentido los restos lignocelulosicos de la poda de la vid son un material idóneo para la mezcla, afectando positivamente la velocidad de descomposición (Bernal et al, 2009; Hao et al, 2004).

2.1.1.3.3 *Análisis físicos, químicos y de fitotoxicidad de las muestras de compost*

Antes de los análisis las muestras de compost se secaron a 100° C durante 48 horas en un horno de calentamiento y secado Thermo Scientific Heraeus T 6030, y han sido molidas en un molino ultracentrífugo Retsch ZM-100 a un tamaño de partícula <0.08 mm). Las concentraciones de carbono, hidrógeno y nitrógeno se miden con un analizador LECO CHN2000.

Para la toma de temperatura y de humedad hemos utilizado un termómetro portátil Crison 638 Pt y una sonda de humedad Theta Meter HH1, respectivamente. La conductividad eléctrica (CE) y el pH se midieron con un conductivímetro Crison micro CM 2200 y un pH metro Crison Básico 20 pH, respectivamente.

También se ha utilizado para procesar las muestras y su caracterización una incubadora Medilow JP Selecta, un microondas ETHOS 900 como un espectrofotómetro de absorción atómica Varian AA240 FS de llama y un horno de grafito para los análisis de metales (UNE-EN 13650: 2001 compatible)

Para la prueba fitotoxicidad, se incubaron diez semillas de berro (*Lepidium sativum*) con 1 ml de extracto de compost a dos concentraciones diferentes, ya sea 1.7 g o 5 g de de compost/100 ml de agua destilada, a 25 ° C en la oscuridad durante 72 horas en papel de filtro de celulosa esterilizado (Whatman No. 1), de acuerdo con Zucconi et al. (1981). Cuatro repeticiones se prepararon y se incubaron a 26°C en la oscuridad durante 48 horas. Los índice de germinación (IG%) de las muestras se calcularon usando la siguiente fórmula [2]:

$$IG\% = \frac{n^{\circ} \text{semillas germinadas} \times \text{longitud de la raíz (tratadas)}}{n^{\circ} \text{semillas garminadas} \times \text{longitud de la raíz (control)}} \times 100 \quad [2]$$

(i) *Análisis estadístico*

Los valores medios de los porcentaje de inhibición se calcularon a partir de 5 replicas por cada tratamiento y la separación de las medias se calculan para el valor de $p < 0,05$, determinando la diferencias significativas con el programa Origin Pro® ANOVA tools.

2.1.2 Elección de método térmico de control *in vitro* de *Diplodia seriata*

El segundo artículo científico de la tesis doctoral que lleva por título: “Cinética de muerte térmica *in vitro* de hongos inoculados de *Diplodia seriata* en sarmientos de la poda de la vid” se centra en utilizar la termoterapia para la inhibición de la germinación de dos aislados del hongo *Diplodia seriata* y desarrollar un modelo cinético de muerte térmica para predecir el tiempo de mantenimiento necesario para la higienización de los sarmientos de la vid inoculados (Figura 2.8).

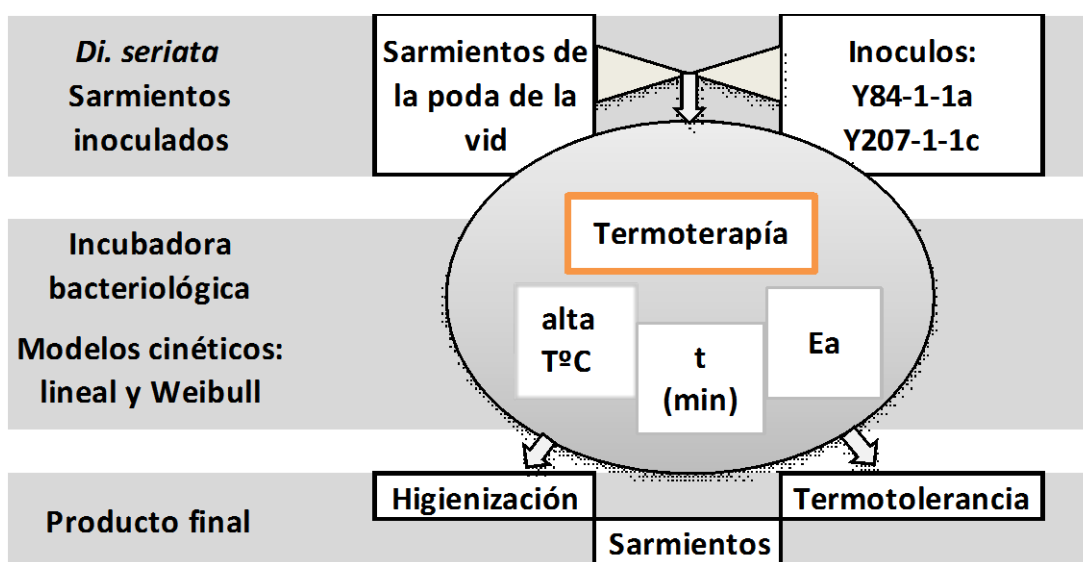


Figura 2.8 Esquema del control *in vitro* (termoterapia) del hongo *Diplodia seriata* inoculado en sarmientos de la vid y su higienización.

El efecto de la temperatura sobre la germinación de esporas de hongos patógenos ha sido ampliamente estudiado con el fin de determinar las condiciones necesarias para la infección. La mayoría de los aislados de los hongos comienzan a desarrollarse apreciablemente a partir de los 15°C, deteniendo el crecimiento hasta 35°C. El rango de temperatura óptima se registra entre 20 y 30 °C (mayoría entre 25 y 30°C), pero este óptimo varía dentro de un mismo aislado en función del medio de cultivo (mejor en PDA). En general la curva de crecimiento muestra perfiles similares, con un crecimiento exponencial hasta la temperatura óptima seguidas de unas reducciones más o menos bruscas de crecimiento (*D. seriata* tiene un crecimiento medio a 25°C (25mm ± 5.39) y a 30°C (22mm ± 2.59) (Martos, 2008).

La termoterapia se ha comprobado que es un método eficaz y de fácil aplicación para la erradicación de patógenos (bacterias, hongos, nematodos, virus y fitoplasmas) tanto de semillas como de material vegetal utilizado en la reproducción vegetativa (Tabla 2.3).

Tabla 2.3 Métodos térmicos de higienización, temperatura (°C) y tiempo de higienización.

Métodos de higienización	Tipo	T°C y tiempo de higienización	Referencia
Térmicos			
Compostaje	abierto	65-75°C y 35 días	Matei et al. (2014)
	cerrado	65-75°C y 2 días	
Aire caliente	convección	137°C y 45min	Jeng et al. (1987)
	bloque de calentamiento	52°C y 24h	Wang et al. (2002)
Agua caliente	termostático	80-90°C y 15min	Evelyn et al. (2016)
		73°C y 5.90s	Gabriel et al. (2015)
		50°C y 4min	Yan et al. (2014)
	calentador circulante	60°C y 15.3min (4% etanol)	Milani et al (2015)
		60°C y 34.2min (7% etanol)	
		53°C y 30min	Gramaje et al. (2013)
		63.9°C y 15min	Cheng Li (2014)
serpentín sumergido	60°C y 23.9s	Scanlon et al. (2015)	
	55°C y 180.2s		
Explosión de vapor		172°C y 2min	Zhao et al. (2015)

Por ejemplo, se han propuesto métodos térmicos de higienización de restos de poda de vid mediante la aplicación de procesos de compostaje (Matei et al, 2014), y de control de hongos patógenos mediante tratamientos con agua caliente (Bleach y col., 2013; Gramaje y col., 2010). En el proceso de compostaje la adición de gallinaza (poultry manure) a los restos de la poda de la vid hace que la temperatura suba hasta 70°C y ello favorece la eliminación de potenciales patógenos en el producto final (Matei et al., 2014). En viveros, es posible controlar los hongos patógenos de la enfermedad de Petri (grapevine nursery) mediante la aplicación de tratamientos con agua caliente a 53°C durante 60 min, y sin afectar los tejidos de la cepa de la vid (Waite and Morton, 2007, Gramaje y Armengol., 2013). Bleach et al. (2013) tratando con agua caliente *in vitro* los sarmientos de la poda inoculados con *Cn. liriodendri*, *Cn. macrodidymum* and *Cn. nestructans* observa la inhibición total de la germinación de las conidios a un rango

de 40-50°C para 15-30 min. Milani et al. (2015) demuestra que la concentración de etanol en la cerveza influye el tiempo de tratamiento con agua caliente para la esterilización sobre *Saccharomyces* spp, con 60°C y 15.3min (4% etanol) y 60°C y 34.2min (7% etanol) respectivamente.

Gramaje et al. 2010 han efectuado estudios del decaimiento de plantas de la vid jóvenes (declive) asociadas a la enfermedad pie-negro causada por *Cylindrocarpon* spp, y su inhibición mediante tratamientos de agua caliente *in vitro*. Bendek et al 2007, han evaluado el índice de peligro de infección y el efecto de la temperatura y humedad sobre la germinación de conidios de *Erysiphe necator*, pero poco se sabe sobre los efectos de la temperatura y tiempos de calentamiento sobre el crecimiento de hongos inoculados de *D. seriata* en sarmientos de la poda de la vid con aire caliente seco. Por consiguiente, es urgente desarrollar un método térmico alternativo para controlar el crecimiento de los inóculos del hongo *D. seriata* en sarmientos de poda de vid.

2.1.2.1 Tratamiento con aire caliente de convección para la inhibición del hongo *Diplodia seriata*

2.1.2.1.1 Aislados del hongo

Los aislados del hongo *D. seriata* (Y84-1-1a e Y207-1-1c) (Tabla 2.4) facilitados por ITACyL (Instituto de Tecnología Agraria Castilla y León, España) fueron obtenidos de viñedos de más de 5 años, de la variedad Tempranillo, pertenecientes a la D.O. Toro (Castilla y León) afectados por infecciones fúngicas (Eutipiosis y Yesca).

Tabla 2.4 Aislados procedente de Castilla y León, de la especie *Diplodia seriata* utilizados para la inoculación de los sarmientos de la vid

Aislado	Año	Locación	Variedad/ portainjerto	Edad	Zona de aislamiento	Síntomas
Y84-1-1a	2011	D.O.Toro	Tempranillo/	>5	Variedad	Eutipiosis
Y207-1-1c		(Burgos)	110Richter			Yesca

Los aislados fúngicos, tras asignación de un número de colección, fueron almacenados a 4°C, repicados periódicamente en medio de patata dextrosa agar (PDA)

(preparado a partir 12g PDA Merck en 750 mL agua destilada) y esterilizados en autoclave (Mediclave J.P. Selecta 4047725) a 100°C durante 45 min y para inhibir el crecimiento de las bacterias se añade 3.75 mL de Cloranfenicol (0.25g/L, Merk).

2.1.2.1.2 *Proceso de inoculación*

En una parcela de 16 ha de cepas supuestamente sanas (variedad Tempranillo), de un viñedo de Cubillas de Santa Marta (Valladolid, España) se marcan primero las cepas que se consideran enfermas por la sintomatología externa y se encuentra durante los años 2003 a 2007 un 1.5% de las cepas afectadas por Eutipiosis y 1.3% de las cepas afectadas por Yesca. Para el proceso de inoculación con el hongo patógeno *D. seriata* se recogen antes de la poda sarmientos de la cepas supuestamente sanas (variedad Tempranillo) y se cortan en trozos de 15-20 cm, presentando 2 o 3 yemas y se lavan superficialmente con agua y jabón, se desinfectan y se secan bajo luz ultravioleta durante 30 min en una cámara de flujo laminar con luz UV. La aplicación del micelio del hongo debe realizarse bajo luz UV efectuando previamente un corte basal en los trozos de sarmiento seleccionados. Los sarmientos inoculados se colocan en tubos de ensayo y se guardan en gradillas a temperaturas de 25°C y en la oscuridad por un periodo de 2-4 meses. Posteriormente se seleccionan cinco de estos inoculados para controlar su higienización o muerte térmica mediante tratamiento isotérmico en una estufa bacteriológica de convección de aire.

2.1.2.1.3 *Tratamientos térmicos y estudios de crecimiento miceliar*

El tratamiento térmico de muestras de sarmientos inoculados e infectados con aislados del hongo *D. seriata* (Y84-1-1a e Y207-1-1c) se efectúa en una estufa bacteriológica y de cultivo con aire caliente con convección natural “Incubat” de JP Selecta 2000994, de temperaturas regulables desde 5 a 80°C, estabilidad de $\pm 0.1^\circ\text{C}$ y homogeneidad de $\pm 0.5^\circ\text{C}$ a 37°C. En la estufa se introducen sarmientos inoculados de 15 a 20 cm recubiertos con papel de aluminio Albal R y se efectúan estudios isoterms a 40, 50, 60 y 65°C durante diferentes tiempos (20, 40, 60, 80, 120 y 150 min). Para el

análisis del crecimiento micelial se extraen astillas de la base del sarmiento y se siembran en placas Petri a temperatura ambiente y en un medio MEA (Merk) previamente preparado y esterilizado (17 g MEA en 750 ml agua destilada y 0,75 ml del acaricida Dieldrin (0.2 g/l, Sigma). Para inducir la esporulación y el crecimiento del hongo *D. seriata* se efectúan 5 repicaciones en placas Petri en medio PDA, que contienen discos de agar con micelio de 4 mm y se incuban en la oscuridad a 25°C durante 10 días, en ciclos alternantes de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz UV cercano (Martín & Martín, 2013). Para calcular el ratio de crecimiento diario de cada aislado en cm/día, se miden dos diámetros perpendiculares por cada placa, en función del tratamiento temperatura/tiempo aplicado previamente a los sarmiento. Posteriormente, se estima el porcentaje de crecimiento del micelio respecto al control (sin tratamiento térmico), que fue calculado como: $100(x/y)$, donde x = valor medio de las cinco placas sembradas por cada aislado (cm), y = valor medio de las cinco placas control (8,5 cm) y se presenta las desviaciones estándar. Los aislados de *D. seriata* son identificados por caracteres macroscópicos como la textura de las colonias, el color del micelio en el medio MEA, la forma de la margen del hongo en la placa Petri y la morfología de las esporas y células conidiógenas (Armengol et al., 2001).

2.1.2.1.4 Estudios de muerte térmica del hongo *D. seriata* mediante modelos cinéticos

Los análisis de la cinética de muerte térmica del hongo *D. seriata* se han efectuado con los valores promedio del porcentaje de crecimiento miceliano de los dos aislados del hongo *D. seriata* para los diferentes tratamientos temperatura-tiempo y utilizando el modelo cinético lineal y el modelo de Weibull.

(i) Modelo cinético lineal

La ecuación general utilizada ha sido la siguiente [1]:

$$\frac{d\left(\frac{N}{N_0}\right)}{dt} = -k \left(\frac{N}{N_0}\right)^{1-n} \quad [1]$$

La integración de la ecuación anterior y expresada en forma logarítmica para diferentes órdenes de reacción se muestra a continuación [2]:

$$\begin{aligned} \left(\frac{N}{N_0}\right)^{1-n} &= -kt + c \quad n \neq 1 \\ \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) &= -kt + c \quad n = 1 \end{aligned} \quad [2]$$

Donde N y N_0 son los porcentajes iniciales y de supervivencia (está mal dicho inhibición) del crecimiento en función del tiempo de exposición t (min) y el porcentaje inicial del hongo *D. seriata*, respectivamente, k es la constante de velocidad de muerte térmica, y n es el orden cinético de la reacción. Seguidamente se efectúa un análisis de regresión lineal (R^2) para cada temperatura y diferentes órdenes de reacción (0, 0.5, 1 y 1.5) y se selecciona el orden de reacción que mejor se ajusta para cada tratamiento (valores medios de R^2) y para el orden de reacción seleccionado se calculan las constantes k y c de la ecuación de regresión, y por último se estima el tiempo letal necesario para matar el 95%, 99%, 99.33% y 99.99% de los microorganismos (LT95, LT99, LT99.33 y LT99.99, respectivamente). Seguidamente se obtiene la curva de muerte térmica a partir del tiempo mínimo de exposición necesario y para a cada temperatura de trabajo conseguir el 100% de la mortalidad de los microorganismos (Wang et al., 2002b) y se determina la energía de activación de muerte térmica (E_a , J/mol) mediante la ecuación [3]

$$E_a = \frac{2.303 \cdot R \cdot T_{min} \cdot T_{max}}{z} \quad [3]$$

La energía de activación es la mínima energía necesaria para inhibir o impedir el crecimiento de los microorganismos y refleja la sensibilidad de la respuesta del hongo a cambios de temperatura. R es la constante de gases universal (8.14 J/molK), T_{min} y T_{max} son la temperatura mínima y máxima (K) y z es la inversa negativa de la pendiente de la curva de muerte térmica (°C) y es equivalente a la constante de velocidad (rate constant) y energía de activación (activation energy) de la teoría clásica de la cinética de reacción (Armstrong et al., 2009).

La energía de activación se puede también determinar a partir de la curva de inactivación de Arrhenius (Hallman et al., 2005) o ecuación [4], representando el log k frente a la inversa de la temperatura absoluta (1/T), siendo k_0 la constante de velocidad de muerte térmica de referencia (min^{-1}).

$$\log k = \log k_0 \cdot \frac{E_a}{2.303 \cdot R \cdot T} \quad [4]$$

(ii) *Modelo cinético Weibull*

La inactivación térmica del hongo *D. seriata* se puede estudiar a partir de los modelos cinéticos no lineales de Weibull que describen la inactivación microbiana por diferentes métodos (van Boekel, 2002, Wang et al., 2002b, Bialka et al., 2008) [5]:

$$\log \left(\frac{N}{N_0} \right) = - \frac{1}{2.303} \cdot \left(\frac{t}{\alpha} \right)^\beta \quad [5]$$

Donde N y N_0 son los porcentajes iniciales y de supervivencia en función del tiempo de exposición t (min) y el porcentaje inicial del hongo *D. seriata*, y α es el parámetro de escala de temperatura (min), y β el parámetro de la forma de la curva (adimensional).

En función de los valores del parámetro β la curva de inactivación puede ser ascendente cóncava ($\beta < 1$), si el hongo restante tiene la capacidad de adaptarse al esfuerzo aplicado y es más difícil de inactivarse; lineal ($\beta = 1$) o cóncava hacia abajo ($\beta > 1$), cuando el hongo restante se daña cada vez más. Además, puede determinarse a partir de α y β el tiempo residual (t_R), o percentil necesario para reducción del 90% de los microorganismos con la siguiente formula [6]:

$$t_R = \alpha \cdot (2.303)^{\frac{1}{\beta}} \quad [6]$$

2.1.2.1.5 *Ajuste de datos*

Los ajustes de datos para los modelos de inactivación linear (log linear) y non linear (Weibull) se ha efectuado con el programa ORIGIN Pro ® tolos. Se han determinado las curvas de regresión con sus ecuaciones correspondientes y el valor de R^2 , para un tratamiento óptimo de inhibición total.

2.1.3 Síntesis de bioproductos como estrategia curativa

En el tercer artículo científico de la tesis, que lleva por título: “Síntesis de composite de oligómeros de quitosano/propóleo/nanoplata y el estudio de su actividad contra *Diplodia seriata*” se ofrece por primera vez la síntesis de un material compuesto por un oligómero de quitosano, con otro de base propóleo y que permitan la incorporación de un tercer componente o nanoplata para la protección frente a hongos patógenos de la madera de la vid. Para ello se precisa que los materiales que utilizamos no solo presenten una elevada actividad antimicrobiana y propiedades antiadherentes frente a los microorganismos sino que sean biocompatibles y no manifieste citotoxicidad para las células de los mamíferos (biofungicida) (Figura 2.9).

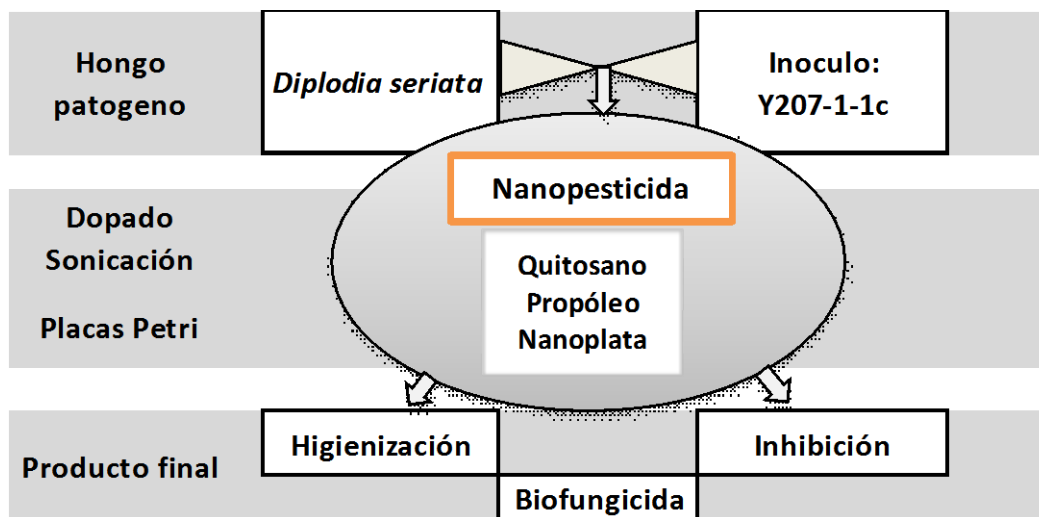


Figura 2.9 Esquema del control *in vitro* con Nanopesticidas (quitosano/propóleo/nAg) del hongo *Diplodia seriata* (Y207-1-1c).

El desarrollo de compuestos naturales que reemplacen a los productos convencionales es indispensable para la sostenibilidad agrícola y el manejo forestal. De acuerdo con la Agenda de Desarrollo post-2015 de las Naciones Unidas, “las prácticas agrícolas sostenibles deben utilizar al máximo la tecnología, la investigación y el desarrollo, integrando los conocimientos locales que en el pasado se practicaban” (FAO, 2015).

Los estudios de la síntesis química de quitina para obtención del quitosano se basan generalmente en la aplicación de tratamientos para su desacetilación, produciendo quitosano de alto peso molecular (Araya et al. 2010). El peso molecular es un factor determinante sobre la actividad del quitosano, pues las moléculas con mayor actividad son los oligómeros u oligosacáridos (Yang et al., 2006), similares a los que pueden obtenerse mediante la aplicación de técnicas químicas de hidrólisis ácida (Sivakami et al., 2013). Sin embargo, para la formación de cadenas poliméricas más cortas, es decir, de bajo peso molecular, es necesaria la aplicación de técnicas de microondas, radiación, ultrasonidos (Kumar et al., 2000, Sun et al., 2007, Taskin et al., 2104), etc.

La actividad antibacteriana del quitosano y compuestos derivados ha sido más estudiada que su actividad antifúngica, por estimarse que la segunda es menor (Zaini et al. 2009). No obstante, en el presente estudio se eligieron hongos patógenos de la madera de la vid (Figura 2.10) para determinar la mejora de dicha capacidad antifúngica a través de sinergias, utilizando compuestos en mezclas binarias y ternarias.



Figura 2.10 Daños causados por hongos patógenos (*D. seriata*) de la madera de la vid, necrosis, desecamiento, pudrición, afecciones en las hojas y uvas.

Como segundo material, se propone en esta invención utilizar *propóleo*, ya que es un producto natural utilizado en medicina tradicional, y que es producido por las abejas a partir de resina de brotes de los árboles y savia y con propiedades anti-adhesivas, antibacterianas, anti-inflamatorias y anti-tumorales, por su elevado contenido en fenoles totales y en flavonoides (Nedjiet al., 2014). El propóleo también ha encontrado aplicación como antioxidante y en preservación de alimentos (Dotta et al., 2011; Kalogeropoulos, 2009).

El material compuesto constituido por esos dos materiales anteriores debe ser capaz de incorporar un tercer material de origen inorgánico (óxido, metal, fluoruro, etc), y a nivel o escala nanométrica, y preferentemente entre 40 a 150 nm, y para esto se propone la *nanoplata*. La combinación de polímeros bactericidas y nanoplata mejoran sinérgicamente los efectos bactericidas, aunque la actividad bactericida de los polímeros generalmente suele ser más débil que la nanoplata (Yuan et al., 2003).

Hoy en día se disponen de los conocimientos necesarios para generar nanofungicidas y procedimientos o nuevas fórmulas de preservación frente a la salud, los cultivos, el patrimonio y la defensa medio natural (Yu et al., 2013).

2.1.3.1 Especies químicas y equipos de caracterización

El propóleo procede de Burgos, en la Cuenca del Duero, España y tiene un contenido de polifenoles y flavonoides que puede llegar a un 10% p/v. El quitosano de masa molecular media es de Sigma Aldrich (CAS 9012-76-4) o de El AgNO₃ es de Merck, y el Metóxido de potasio al 25% en metanol (CAS No. 124-41-4) de Sigma Aldrich como también el etano (utilizado como reactivo), en el estado puro, $\geq 99.5\%$ (CAS No. 64-17-5) de Sigma Aldrich.

La calidad de los oligómeros obtenidos puede determinarse por la espectrometría infrarroja por la transformación de Fourier (FTIR) con el aparato Thermo Nicolet 380 FT-IR equipado con el sistema Smart Orbit Diamond ATR, para identificar el grupo químico funcional. Para la absorción óptica espectral de la nanoplata (NP) hemos utilizado el espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 UV-Vis. Las imágenes microscópicas (SEM) han sido tomadas con FEI - Quanta 200FEG equipado con un sistema Genesis

energy-dispersive X-ray (EDS) espectrofotómetro y colectadas con un micrografo (TEM) equipado con JEOL JEM-FS2200 HRP y con una sonda INCA Energy TEM 250 EDS.

Se ofrece, por su sencillez, la síntesis del caso preferido o mezclas de oligómeros de quitosano/propóleo/nanoplatina. Primeramente, se ofrece una descripción detallada de la síntesis de las soluciones de oligómeros de quitosano, nanoplatina y propóleo por separado. Seguidamente, se ofrece la preparación de mezclas o soluciones de cubrimiento de quitosano/propóleo, quitosano/propóleo/platina, quitosano/platina y, por último, de propóleo/platina y testigo.

La actividad antifúngica se ha estudiado para las mezclas acuosas hidroalcohólicas de propóleo, oligómeros de quitosano/propóleo y oligómeros de quitosano/propóleo/nanoplatina, para evaluar la influencia del alcohol en las mezclas (concentraciones aproximadamente de 5%).

2.1.3.1.1 Método de preparación de oligómeros de quitosano, propóleo y nanoplatina

La preparación de las soluciones acuosas de oligómeros de quitosano, preferiblemente de concentración 0.005-0.01 M o soluciones del 1.25-2.5% p/v, se preparan a partir de una disolución de oligómeros de quitosano de PM 190000-310000 g/mol (Sigma Aldrich) o 140000-300000 g/mol (Hangzhou Simit Chemical Technology Co.) en AcOH al 2 % y pH 4-6. Las soluciones se mantienen estables en atmósfera inerte y en frío a 4-10°C, a pH entre 4-6. La hidrólisis se realiza por agitación durante 12 horas seguidas de 3-6 periodos de sonicación de 5 minutos cada uno, y con temperaturas de 30 a 60°C y concentraciones de H₂O₂ de 0.3 a 0.6 M, para reducir el PM de los oligómeros de 6000 a 2000 g/mol, y utilizando sonicación de las muestras en lugar de usar radiación de microondas (Sun et al., 2007). La masa molar de las muestras de quitosano se ha determinado mediante la medición de la viscosidad, de acuerdo con Yang et al. (2005), en un disolvente de 0,20 mol / L NaCl + 0,1 mol / L en CH₃COOH a 25°C usando Ubbelohde viscometro capilar. Para esto se ha utilizado la ecuación de Mark-Houwink $[\eta] = 1,81 \times 10^{-3} M^{0,93}$. Las soluciones se decantaron un periodo indeterminado para eliminar material insoluble en agua y se centrifugaron para aislar los

oligómeros de quitosano oligómeros. Estos se redisolviéron en AcOH 0.5%, obteniendo las soluciones para los análisis.

Las soluciones de propóleo se preparan triturando el propóleo de partida hasta polvo fino y posterior extracción, utilizando una solución hidroalcohólica 7:3 y dejando macerar durante una semana a temperatura ambiente, seguido de percolación (1 L/min) y subsiguiente filtración con una malla de acero inoxidable de 220 *mesh* y concentración a temperatura inferior a 60°C con un equipo de ultrasonidos de la solución resultante. Se eligió un medio hidroalcohólico de etanol absoluto porque da lugar a tinturas libres de cera que contiene cantidades más altas de sustancias polifenólicas (Woisky and Salatino, 1998). Las mezclas de quitosano-propóleo (1:1 w/v) se preparan a partir de la solución de propóleo sobre la de quitosano y una vez sonicadas a pH entre 4-6 se deja formar un gel o precipitado de color caramelo. Recientemente Mascheroni et al. (2014) utiliza el concepto de proceso de membrana para la formación de pellet de propóleo/quitosano.

La producción de soluciones de nanoplata se efectúan mediante sonicación a diferencia de otros métodos que estabilizan las soluciones con una lámpara UV de 30 W durante 3 horas (Montazer et al, 2012). La preparación se lleva a cabo a partir de soluciones acuosas de AgNO₃ (50 mM) que se tratan con citrato de sodio (30 mM) y posteriormente la solución resultante se enfría y agita a una temperatura entre 5 y 10°C y se desoxigena con un gas inerte (preferiblemente N₂) durante al menos 30 minutos y se adiciona polivinilpirrolidona (PVP) para evitar que no se agreguen las nanopartículas de plata y se ajusta el pH entre 7-8. La etapa más delicada es la adición de una solución de NaBH₄ (1 mL de una solución 10 mM NaBH₄ en frío 5-10°C y en medio inerte o atmósfera de N₂) y durante 1 hora aproximadamente, agitando fuertemente con un agitador magnético. La primera microgota hace virar la solución de incolora a amarilla y el aumento de NaBH₄, o de sucesivas gotas, da lugar a una intensificación del color amarillo hacia marrón. Para estabilizar antes el color amarillo se somete la muestra a sonicación durante 3-5 minutos con un equipo de ultrasonidos de 20 kHz y luego se permite reposar la solución y estabilizarse durante al menos 24 horas en un refrigerador entre 5 y 10°C.

El tamaño de las partículas (medidas con un SEM) corresponde a un tamaño medio de 40 a 150 nm, y un contenido de plata en solución entre 100 ppm y 200 ppm.

Estas soluciones se pueden caracterizar mediante su absorción en un espectrofotómetro de UV-Vis a 420 nm. Las soluciones se mantienen estables en atmósfera inerte y en frío a 4-10°C.

2.1.3.1.2 Método de preparación de soluciones binarios y ternarios de biofilm

Los biofilm de quitosano/propóleo se prepararon mezclando los dos componentes en una relación 1:1 (w/v ratio), seguido de sonicación, con la obtención de un gel de color caramelo o precipitado, similar a la obtenido por Mascheroni et al. (2014) utilizando un procedimiento basado en membrana alternativa. Para la formación de biofilm o composites de quitosano/propóleo/nanoplata se parte de soluciones de extracto de propóleo, y de nanoplata y se incorpora a la solución que contiene los oligómeros de quitosano y se utiliza glioxal al 4% v/v y se ajusta el pH a 8-9, utilizando una solución de metóxido de potasio al 25% en metanol y agitando la solución con un agitador magnético y por último sonicando las disoluciones durante dos o tres minutos cuidando que la solución siga transparente. Seguidamente, el material se puede aislar de la solución y secar, preferiblemente a vacío a 20°C en atmósfera seca, para obtener espesores óptimos de 0,3 a 0,6 mm. En la bibliografía se dispone de métodos para la síntesis de film de quitosano/propóleo sobre polypropylene Coating of polypropylene (PP) films (Torlak and Sert, 2013). Nuestro método de síntesis de soluciones y film de quitosano/propóleo y nanoplata incorporando la tecnología de sonicación ha sido recientemente objeto de patente (Patente n°: ES P201431591, fecha: 30/10/2014).

2.1.3.1.3 Medios de cultivo y ensayos de actividad

La acción fungicida de los productos analizados ha sido ensayada *in vitro* utilizando como medio de cultivo malta extract agar (MEA). En el estudio sobre el hongo se ha utilizado micelio de *Diplodia seriata* aislado Y207 1-1c previamente y repicado en las placas Petri con dos semanas de antelación. De la periferia del cultivo puro se cortan discos de 6-7 mm Ø y se repican en las placas Petri preparadas con el MEA en combinación con uno de los productos a analizar. Para la preparación del

testigo o control (T) se disuelve en agua destilada, 35g MEA/ 750ml agua destilada y se añade 2ml de antibiotico (cloranfenicol). Los botes con el medio de cultivo se esterizaron en autoclave a una temperatura de 100°C, 45 min. Para la preparación del testigo, el medio de cultivo se coloca en placas Petri esteriles y se deja enfriar para poder repicar los micelios del hongo *D. seriata*. Para preparar las placas Petri de los diferentes mezclas o combinaciones de quitosano/propóleo/nanoplata, el medio de cultivo se deja enfriar hasta 50°C y a esa temperatura se añade en cada placa las distintas disoluciones en la proporción 1:1:1. Una vez efectuada la preparación se dejan enfriar las soluciones a temperatura ambiente y se repican el micelio del hongo y las medidas de crecimiento se efectúan por triplicado. Se han utilizado para el ensayo 600 µg/ml de las diferentes preparados de quitosano solo (A); quitosano/ µg/ml propóleo (B); quitosano/ propóleo/ plata (C); y quitosano/ plata (D) en placas Petri con MEA a 50°C de temperatura. Cada día se procede a medir el diámetro del crecimiento del hongo durante un periodo de 20 días, y se calcula el porcentaje de inhibición (PI) en comparación con el testigo cultivado solo en MEA (Acosta et al., 2007) [1]:

$$PI (\%) = (D_{mt} - D_{var}) / D_{mt} \times 100 \quad [1]$$

Donde: D_{mt} = diámetro del micelio del testigo (sin tratamiento) y D_{var} = diámetro del micelio de la variante con producto.

Los ensayos han sido realizados por triplicado para determinar el grado de sensibilidad/resistencia a cada uno de los productos aplicados. Para las tres repeticiones se hizo la media de los diametros de crecimiento del micelio del hongo.

2.1.4 Técnicas combinadas de control de la población microbiana

Varios trabajos presentados en las reuniones anuales del Grupo de Trabajo de los Problemas Fitosanitarios de la Vid demuestran que en los restos de poda y sarmientos se aíslan hongos de la familia Botryosphaeriaceae con un alto porcentaje, especialmente el hongo patógeno *Diplodia seriata* (Larignon, 2012 y Savocchia et al., 2015).

De acuerdo con lo descrito anterior en esta tesis tratamos de encontrar formas eficientes para higienizar los restos de la poda, utilizando como método preventivo el

proceso de compostaje y para el control *in vitro* del hongo *D. seriata*, como métodos curativo la termoterapia y la aplicación de nuevos preparados biofungicidas sintetizados por técnicas de sonoquímica y de criogenia.

Los métodos de control combinados podrían ser una alternativa con gran potencial para su implantación en la prevención de este tipo de contaminación (Matei et al. 2015 - biofungicida y sonicación) (Tabla 2.5). Utilizando varios factores de prevención pueden actuar de forma sinérgica para inhibir o retardar el crecimiento microbiano, efecto no proporcionado cuando se usa en forma separada. Al sumar las acciones sobre los microorganismos de dos o más tecnologías se podría garantizar la inactivación de éstos y también permitiría reducir el tiempo de tratamiento (Evelyn et al., 2016 - temperatura y presión, Cheng et al., 2013 - termosonicación) como la posibilidad de transferir posteriormente los conceptos y know-how adquiridos sobre las nuevas tecnologías, o nuevos productos (Patente n°: ES P201431591, fecha 30/10/2014).

Tabla 2.5 Composite con acción fungicida y bactericida, método de síntesis y su eficacia.

Composite	Síntesis	Eficacia	Referencia
Acción fúngica			
Quitosano/propoleo/nAg	Sonicación, dopado con nAg	<i>Diplodia seriata</i>	Matei et al. (2015)
Quitosano/saponina/nCu	Métodos de gelificación iónica	<i>A. alternata</i> , <i>M. phaseolina</i> , <i>R. solani</i>	Saharan et al. (2013)
Quitosano/tween 20/Span 60	Métodos químicos	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. alternata</i> y <i>Rhizopus oryzae</i>	Ziani et al. (2009)
Acción bactericida			
Quitosano/vainillina/tween 60	Biocatálisis	<i>Escherichia coli</i>	Stroescu et al. (2015)
Quitosano/aceite de nim/óxido de zinc	Métodos químicos y Sonicación	<i>Escherichia coli</i>	Sanuja et al. (2015)
Quitosano/nisina	Biocatálisis	Bacterias Gram positivas y Gram negativas	Zhu et al. (2015)
Quitosano/nAg	Tratamiento térmico	<i>Escherichia coli</i>	Wei et al. (2009)
Quitosano/propoleo	Agitación	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i>	Torlak and Sert (2013)
Extracto etanólico de Propóleo	Mezcla	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bodini et al. (2013)
Nanoplata (nAg)	Sonicación	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>E. coli</i>	Montazer et al. (2012)

El desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido la generación de compuestos a base de oligómeros de quitosano con la incorporación de más de un elemento, lo cual es posible tanto por las propiedades intrínsecas del quitosano como por la adición de agentes que facilitan los enlaces dentro del compuesto: por ejemplo, quitosano con aceite de nim y óxido de zinc, preparado por un método de fusión (Sanuja et al., 2015), o quitosano con glucosa oxidasa y nanopartículas de oro, sintetizado por electrodeposición (Lou et al., 2004).

Con el objetivo de potenciar las aplicaciones del quitosano, específicamente como antimicrobiano y formador de films, se han llevado a cabo estudios que involucran el uso de métodos sol-gel en los cuales se introducen especies secundarias, naturales o sintéticas en la matriz polimérica del quitosano, formando así nuevos compuestos. Por ejemplo: quitosano-nisina, para evaluar su actividad antibacteriana (Zhu et al., 2015), o quitosano-vainillina, para valorar sus propiedades antimicrobianas (Stroescu et al, 2015), ambos con aplicaciones en películas plásticas para el envasado de alimentos.

La acción letal del calor es una relación de temperatura y tiempo afectada por muchas condiciones (Tabla 2.6). La alta temperatura combinada con un alto grado de humedad es un método efectivo para destruir microorganismos (Gramaje et al., 2008). La temperatura seleccionada se basa en el tiempo de muerte térmica de los microorganismos patógenos (es el tiempo más corto necesario para matar una suspensión de bacterias a una temperatura determinada).

Se pretende, por tanto, aprovechar las bases de estos trabajos para poner a punto unos métodos que eliminen los microorganismos fitopatógenos que incuban los restos de poda y sarmientos a distintas temperaturas y tiempos, y determinar las condiciones que aseguren su total inactivación y especialmente aplicando nuevos productos antifúngicos extraordinariamente eficaces contra las enfermedades de la planta.

Tabla 2.6 Técnicas combinadas de tratamiento sobre agentes patógenos, parámetros de higienización

Métodos combinados	Parámetros de higienización	Patógeno	Referencia
Térmico y agua (Hidroterapia)	54°C y 60min	Supresión de hogo xilófagos (<i>Phaeoacremonium spp</i> , <i>Cylindrocarpon liriodendri</i>)	Gramaje et al. (2008)
Térmico y microondas	137°C y 45min	Tratamiento esterilización (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>niger</i>)	Jeng et al. (1987)
Térmico y presión	600MPa, 75°C y 15min	Esterilización zumo manzana (<i>Neosartorya fischeri</i>)	Evelyn et al. (2016)
	650MPa, 90°C y 15.38min	Esterilización zumo piña y nectar (<i>Byssosclamyces nivea</i>)	Ferreira et al. (2010)
Térmico y ultrasonidos (Termosonicación)	0.33W/mL, 75°C y 15min	Esterilización zumo manzana (<i>Neosartorya fischeri</i>)	Evelyn et al. (2016)
	57.8 ± 6.1 min, 55-75°C, Ea (183 ± 32 kJ/mol)	Inactivación de polifenol oxidasa en setas (<i>Agaricus bisporus</i>)	Cheng et al., (2013)
Térmico y radiación	Fotocatalizador (Fe ₂ O ₃ -FeS ₂) pirrotita natural magnetica.	Inactivación fotocatalítica bajo luz visible K-12 (<i>Escherichia coli</i>)	Xia et al. (2015)

2.2 OBJETIVOS

En base a los antecedentes expuestos es necesario eliminar los hongos fitopatógenos de la madera en los sarmientos y restos de poda de la vid, que actúan como *reservoir* y fuente de inóculo en la propagación de enfermedades que no tienen tratamiento, utilizando para ello el proceso de desinfección de la planta de forma integrada.

Para conseguir este objetivo general hemos planificado la tesis en tres estudios o líneas de investigación con sus respectivos objetivos específicos y hemos redactado una patente y tres *full paper* que han sido remitidos a revistas especializadas para su evaluación.

El primer artículo científico trata de comparar por primera vez la eficacia de eliminación de hongos patógenos (*Diplodia seriata*) en sarmientos de la poda de la vid mediante un compostador abierto o pila vs un biodigestor cerrado discontinuo en diversas estaciones del año y se desarrolla en el capítulo 3 que lleva como título: “Higienización y control del hongo *Diplodia seriata* en restos de la poda de la vid y su variabilidad estacional en compostaje abierto y cerrado”.

Se ha elaborado un segundo artículo científico que es relativo a la higienización de sarmientos de la vid inoculados con *Diplodia seriata* mediante termoterapia, con el objetivo de encontrar un modelo cinético que se adapte, con un error mínimo a los datos del sistema. Estos aspectos se tratan en el capítulo 4 de la memoria y lleva por título: “Cinética de muerte térmica *in vitro* de hongos inoculados de *Diplodia seriata* en sarmientos de la poda de la vid”.

El tercer artículo científico, descrito en el capítulo 5 de la tesis doctoral, desarrolla un tema de síntesis de nuevos bioproductos y análisis de las propiedades antimicrobianas de la asociación de dos productos biológicos a base de quitosano/propoleo a efectos de explotar los efectos sinérgicos que puedan resultar debidos a su interacción o a la incorporación de la nanoplata. Se muestra en este artículo la eficacia *in vitro* de un nuevo preparado quitosano/propóleo/plata y sus mezclas sobre el hongo *Diplodia seriata* presente en la vid, artículo que lleva por título: “Síntesis de composite de oligómeros de quitosano/propoleo/nanoplatea y el estudio de su actividad contra *Diplodia seriata*”.

La patente presentada (Patente nº: ES P201431591, fecha: 30/10/2014) lleva por título: "Composite con actividad antimicrobiana que comprende dos componentes autoasamblados de origen natural y, opcionalmente, un componente (C) de tamaño manométrico" y encuentra aplicación en el campo de la lucha contra la contaminación producida por los microorganismos y agentes patógenos.

A continuación se exponen los objetivos específicos de acuerdo al marco de referencia previamente descrito y al hilo conductor que nos ha llevado a su definición.

El objetivo de la primera parte de la Memoria de Tesis Doctoral hace referencia a los procesos de: "Higienización y control del hongo *Diplodia seriata* en restos de la poda de la vid y su variabilidad estacional en compostaje abierto y cerrado" (artículo científico número 1)

Objetivos específicos

1.1 Estudiar la eficiencia de eliminación del hongo en los sarmientos de la vid tanto en pila abierta como en un biodigestor cerrado discontinuo y en distintas estaciones del año, primavera, verano e invierno.

1.2 Analizar la eficiencia del proceso de compostaje y por consiguiente de la higienización del hongo en el biodigestor abierto mediante un proceso de volteo y en el digestor cerrado mediante un proceso de aireación forzada utilizando como parámetros el seguimiento de la fase termofílica del proceso de compostaje y el estudio de la humedad.

1.3 Analizar parámetros de control como el estudio del pH, la conductividad eléctrica y el seguimiento de la relación C/N

1.4 Estimar la mejor mezcla agente estructurante/materia orgánica que permita una mayor degradación de los materiales lignocelulósicos.

1.5 Evaluar los parámetro biológicos frente a la calidad del compost obtenido de acuerdo con la normativa EPA, 2002 y la normativa europea Regulation (EC) No. 2003/2003.

1.6 Determinar los coeficientes de correlación entre la velocidad de desaparición del hongo *Diplodia seriata* y los diferentes parámetros físico-químicos, tanto para la pila abierta como para el biodigestor cerrado discontinuo.

Comentario: Es preciso destacar que en la realización de este estudio en diferentes estaciones, el parámetro fundamental de control de la higienización era la temperatura y que era necesario seguir estudiando este parámetro para optimizar la cinética de la desaparición del hongo frente al tiempo.

El segundo de los objetivos generales, perseguido en la segunda parte de la Tesis Doctoral es relativo a la higienización de los sarmientos extraídos de la poda de la vid y en concreto a la elucidación de la “*Cinética de muerte térmica in vitro de hongos inoculados de Diplodia seriata en sarmientos de la poda de la vid*” (artículo científico número 2).

Objetivos específicos

2.1 Evaluar el efecto del tratamiento temperatura-tiempo con aire caliente sobre el crecimiento *in vitro* de dos inóculos del hongo *Diplodia seriata*.

2.2 Estudiar los modelos cinética de muerte térmica del hongo *Diplodia seriata* con objetivo de determinar la velocidad de inhibición.

2.3 Determinar la energía de activación para la tasa de calentamiento sobre la mortalidad térmica.

2.4 Analizar los tiempos de inhibición y la opción de temperatura para predecir los tiempos letales para poder diseñar nuevos protocolos de tratamiento.

Comentario: En este punto de la investigación y tras comprobar la posibilidad de utilizar la termoterapia como método preventivo para la higienización de restos de vid afectados por enfermedades fúngicas, se plantea como experiencia, y aprovechar los conocimientos anteriormente adquiridos, la síntesis de nuevos productos antifúngicas, compatibles con el medio y biodegradables para el control de las enfermedades fúngicas como método curativo en el campo.

El tercero de los objetivos del trabajo, que se corresponde con la tercera parte de la Tesis, trata de analizar las propiedades antimicrobianas de la asociación de dos productos biológicos de base quitosano/propoleo y los efectos sinérgicos que puedan resultar de la incorporación de la nanoplata: “Síntesis de composite de oligómeros de quitosano/propoleo/nanoplata y el estudio de su actividad contra *Diplodia seriata*” (artículo científico número 3).

Obejtivos especificos

3.1 Sinterizar un material polimerico a base de oligómeros de quitosano y extractos de propoleo que incorpore nanoparticulas de plata mediante técnicas de dopado y sonicación.

3.2 Determinar la calidad del oligómero resultado utilizando la tecnología de UV-vis, ATR-FTIR, difracción de X-Ray y espectrofotometria SEM y TEM.

3. Evaluar el efecto sinergico del uso del composite sintetizado respecto a su capacidad biofungicida sobre los inoculos de *Diplodia seriata* en comparacion con los componentes individuales.

2.3 Referencias

- Acosta, T., Avellaneda, A., Cuervo, J. and Sánchez, L. (2007) Evaluación de microbiota de tomillo (*Thymus vulgaris*), como aporte al manejo agroecológico de aromáticas en invernaderos de la Universidad Nacional. *Perspectivas del Agronegocio de Hierbas Aromáticas Culinarias y Medicinales*, pp. 135–138, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Aguilar, M.I., Guirado, M.L., Melero-Vara, J.M. and Gómez, J. (2010) Efficacy of composting infected plant residues in reducing the viability of Pepper mild mottle virus, Melon necrotic spot virus and its vector, the soil-borne fungus *Olpidium bornovanus*. *Crop Protection* 29, 342–348
- Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., Armengol, J. (2011). Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum* in vitro, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. *Crop Protection* 30, 489-494.
- Alaniz, S., Armengol, J., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., León, M. (2009a) A multiplex PCR system for the specific detection of *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum* and *C. pauciseptatum* from grapevine. *Plant Disease* 93, 821-825.
- Anexo I de la Directiva 91/414/CEE (trasladadas al anexo I del REGLAMENTO (CE) N° 1107/2009) - Lista comunitaria de sustancias activas incluidas, excluidas y en evaluación comunitaria (<http://www.magrama.gob.es/>).
- Araya, A., Meneses, L. (2010). Influencia de algunos ácidos orgánicos sobre las propiedades físico-químicas de películas de quitosano obtenidas a partir de desechos de cangrejo. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(1), 143-148.
- Armengol, J., Vicent, A., Torne, L., Garcia-Figueres, F., Garcia-Jimenez, J. (2001) Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, 325–329.
- Armengol, J., Vicent, A., Torne, L., Garcia-Figueres, F., Garcia-Jimenez, J. (2001b) Hongos asociados a decaimientos y afecciones de madera en vid en diversas zonas españolas. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 27: 137-153.

- Armstrong, J.W., Tang, J., Wang, S. 2009. Thermal Death Kinetics of Mediterranean, Malaysian, Melon, and Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Eggs and Third Instars. *J. Econ. Entomol.*, 102(2), 522-532.
- Aroca A., García-Figueres F., Bracamonte L., Luque J., Raposo R. (2006) A survey of trunk disease pathogens within rootstocks of grapevines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 195–202.
- Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. y Raposo, R. (2010). Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 126: 165-174.
- Atlas, R.M. and Bartha, R. (2005) *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Education S.A., p 677.
- Avery, L.M., Booth, Ph., Campbell, C. Tompkins, D. and Houg, R.L. (2012) Prevalence and survival of potential pathogens in source-segregated green waste compost. *Science of the Total Environment* 431, 128–13.
- Aziz A., Trotel-Aziz P., Dhuicq L., Jeandet P., Couderchet M., Vernet G. 2006. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology*. (11):1188-94. doi: 10.1094/PHYTO-96-1188
- Barrena-Gomez, R. (2006) *Compostaje de Residuos Sólidos Urbanos. Aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento del proceso*. in: Departamento de Ingeniería Química, Vol. PhD, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.
- Benito, M., Masaguer, A., Moliner, A., De Antonio, R. (2006) Chemical and physical properties of pruning waste compost and their seasonal variability. *Bioresour. Technol.*, 97(16), 2071-2076.
- Bernal, M.P., Alburquerque, J.A., Moral, R. 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.*, 100(22), 5444-5453.

- Bialka KL, Demirci A, Puri VM (2008) Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on raspberries and strawberries resulting from exposure to ozone or pulsed UV-light. *J Food Eng* 85: 444-449.
- Bleach, C., Jones, E., Ridgway, H. and Jaspers, M (2013) Hot water treatment to reduce incidence of black foot pathogens in young grapevines grown in cool climates. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 2, 347–358.
- Bodini, R.B., Sobral, P.J.A., Favaro-Trindade, C.S., Carvalho, R.A. (2013) Properties of gelatin-based films with added ethanolepropolis extract. *LWT - Food Science and Technology* 51 104-110.
- Bueno, M.P (2010) Como hacer un buen compost. Manual para horticultores ecológicos. Ed. La Fertilidad de la Tierra, Navarra.
- Bueno, M.P., Díaz, B.M.J. and Cabrera, C. F. (2008) – Compostaje- Cap.4. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Cheng Li, Ch., Huang, L. and Chen, J. (2014) Comparative study of thermal inactivation kinetics of *Salmonella* spp. in peanut butter and peanut butter spread. *Food Control* 45, 143-149.
- Cortina J., Amat B., Castillo V., Fuentes D., Maestre F.T., Padilla F.M. & Rojo L. (2011) The restoration of vegetation cover in the semi-arid Iberian southeast. *Journal of Arid Environments* 75, 1377–1384.
- COST Action FA1303 “Sustainable control of grapevine trunk diseases” (2013-2017), WG1. Pathogen Characterization, Detection and Epidemiology. GWTDs European Survey : Analysis of the Questionnaire, Hungary 2015.
- Dalzell, H.W., Biddlestone, A.J., Gray, K.R., and Thurairajan, K. (1991) “Manejo del suelo: producción y uso del compostaje en ambientes tropicales y subtropicales” *Boletín de suelos de la FAO*. Roma.
- De Wet J., T. Burges, B. Slippers, O. Preisig, B.D. Wingfield and M.J. Wingfield, (2003) Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationship between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research* 107, 557–566.
- Denman, D., Crous, P.C., Taylor, J.E., Ji-Chuan K., Pascoe, I. y Wingfield, M.J. (2000). An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its

- anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45, 129-140.
- Dota K.F.D., Consolaro M.E.L., Svidzinski T.I.E., Bruschi M.L (2011) Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evid Based Complementary Altern Med*; doi: 10.1093/ecam/neq029.
- Dunkley, C., Cunningham, D., Ritz, C., Dunkley, K., Hinton, A. (2011) Using mortality compost in vegetable production: A comparison between summer and winter composting and its use in cabbage production. *Agric. Food Anal. Bacteriol.*, 1, 6-14.
- Ekinci, K., Keener, H.M. and Elwell, D.L. (2013) Composting Short Paper Fiber with Broiler Litter and Additives: Part I: Effects of Initial pH and Carbon/Nitrogen Ratio on Ammonia Emission. *Compost Science & Utilization* 8(2):160-172.
- EPA: U.S. Environmental Protection Agency Office of Resource Conservation and Recovery; *Municipal Solid Waste Generation, Recycling, and Disposal in the United States* (2010).
- Erickson, M.C., Liao, J., Maa, L., Jiang, X. and Doyle, M.P. (2009) Inactivation of *Salmonella* spp. in cow manure composts formulated to different initial C:N ratios. *Bioresource Technology* 100, 5898–5903.
- Evelyn, H.J. Kim, F.V.M. Silva (2016) Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. *Food Control* 59, 530-537.
- FAO. (2015). *Agenda de Desarrollo Post-2015*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Ferreira, E.H., Rosenthal, A., Calado, V., Saraiva, J., Mendo, S., Rodrigues De Massaguer, P. (2010) Thermal inactivation of *Byssoschlamys nivea* in pineapple juice combined with preliminary high pressure treatments. XVII World Congress of the International Commission of Agricultural and Biosystems Engineering (CIGR), Québec city, Canada.

- Fregoni, M. (1977). Effects of soil and water on the quality of the harvest. In: Proc. Int. Sym. Quality of the Vintage, February 1977, Cape Town, South Africa. pp 151-168.
- Gabriel, A.A., Albura, M.P. and Faustino, K.C. (2015) Thermal death times of acid-habituated *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in selected fruit beverages. *Food Control* 55.
- Gordon, H., Topp C. F. E., Nevison, I. M., Ball B. C., and Rees, R. M. (2011) Grassland Management and Climatic Effects on Nitrous Oxide Fluxes.: Tenth Conference Proceedings, Belfast, UK, British Grassland Society.
- Gramaje D., Armengol J., Salazar D., López-Cortés I., García-Jiménez J. (2009) Effect of hot-water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. *Crop Protection*, 28, 280–285.
- Gramaje, D, Garcia-Jimenez, J, Armengol, J. (2010). Field evaluation of grapevine rootstocks inoculated with fungi associated with Petri disease and esca. *American Journal of Enology and Viticulture* 61,512–20.
- Gramaje, D., Garcia-Jimenez, J., Armengol, J. (2008) Sensitivity of Petri disease pathogens to hot-water treatments in vitro. *Annals of Applied Biology*, 153,95–103.
- Gramaje, D., Mañas, F., Lerma, M.L., Muñoz, R.M., García-Jiménez, J. and Armengol, J. (2013). Effects of hot-water treatment on grapevine viability, yield components and quality of must. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, 144-148.
- Hallman, G.J., Wang, S., Tang, J. 2005. Reaction Orders for Thermal Mortality of Third Instars of Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 98(6), 1905-1910.
- Hao, X., Chang, C., Larney, F.J. 2004. Carbon, Nitrogen Balances and Greenhouse Gas Emission during Cattle Feedlot Manure Composting. *J. Environ. Qual.*, 33(1), 37-44.
- Haug, R. T. (1993). “The Practical Handbook of compost Engineering”. Lewis Publishers. Boca Raton. Florida. Citado por Bueno et al., 2008.
- Herche R., Gubler W.D. (2010). Control strategies for trunk diseases of grapevine. 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Santa Cruz, Chile.

- Hussain, I., Price, G.W., and Farid, A.H. (2014) Inactivation of Aleutian mink disease virus through high temperature exposure in vitro and under field-based composting conditions. *Veterinary Microbiology* 173, 50–58.
- IPCC: Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Core Writing Team, Pachauri, R.K. and Reisinger, A. (2007) (Eds.) Geneva, Switzerland. pp 104.
- Jaspers, M.V., Mostert, L. (2008) Inhibitory interactions between *Trichoderma* isolates and grape Wood pathogens. 6th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Florencia, Italia.
- Jeng, D.K., Kaczmarek, K.A., Woodworth, A.G., Balasky, G. (1987) Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Appl. Environ. Microb.* 53, 2133–2137.
- Jeris, J.S and Reban, R.W. (1973) “Controlling Environmental Parameters for Optimum Composting”. *Compost science*. Citado por Bueno et al. 2008.
- Jhorar, B.S., Phogat, V. and Malik, E. (1991). ”Kinetic of composting rice straw with glue waste at different C/N rations in a semiarid environment”. *Arid Soil Research and Rehabilitation* .5:297/306. Citado por Mendoza D.J., 2010.
- Jose J. and Meneses M. y D. (2010) *El compostaje*. Librería agrícola Agro Book.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinos, I., and Karathanos, V.T. (2009) Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus,” *Food Chemistry*, vol. 116, no. 2, pp. 452–461.
- Kaszewska, J.B, Paluszak, Z., Hermann, J. and Dziedzic, T. (2006) Sludge composting validation for minimizing environmental hazards. A new indirect method of sanitation effectiveness assessment. *Ecohydrology and Hydrobiology* 6(s 1–4):205–210. DOI:10.1016/S1642-3593(06)70144-6
- Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27.
- Kuyama H., Nakahara Y., Nukada T., Ito Y., Ogawa, T. 1993. Stereo-controlled syntheses of chitosan dodecamer. *Carbohydr. Res.* 243:C1-C7
- Larignon, P (2012) Assessment of quality of plants in French grapevine nurseries with regard to fungi involved in wood diseases. In: ICGTD (International Council on

- Grapevine Trunk Disease) 8th International Workshop on Grapevine Trunk Disease. Valencia, Spain 18-21 June 2012
- Larignon, P., Dubos, B. (1997) Fungi associated with esca disease in grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 147-157.
- Larignon, P.; Fulchic, R.; Cere, L.; Dubos, B. (2001) Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathol. mediterr.* 40,S336-S342.
- López-Real, J. (1995) Parámetros de control del compostaje y aplicación del compostaje a residuos orgánicos. *Gestión y Utilización de Residuos Urbanos en Agricultura* (Ed. Fundación “la Caixa”) pp 61-68. AEDOS, S.A. Barcelona.
- Lou, X. L., Xu, J. J., Du, Y., Chen, H. Y. (2004). A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidasa-gold nanoparticles biocomposites formed by one-step electrodeposition. *Analytical Biochemistry*, 334, 284-289.
- MAGRAMA – Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente – “*Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en España 2014*”. (www.magrama.gob.es).
- Manios, T. (2014) The composting potential of different organic solid wastes: Experience from the island of Crete. *Environment International* 29(8):1079-1089.
- Martin N, Vesentini D, Rego C, Monteiro S, Oliveira H, Boavida Gerreira R, (2009) *Phaeomoniella chlamydospora* infection induces changes in phenolic compounds content in *Vitis vinifera*.
- Martín, L., Martín, M.T. (2013). Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. *Crop Protect.*, 52, 141-150.
- Martín, M.T., Cobos, R., (2007). Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathol. Mediterr.* 46, 18-25.
- Martin, M.T., Martin, L., Cuesta, M.J and García-Benavides, P. (2011). First report of *Cylindrocarpon pauciseptatum* associated with grapevine decline from Castilla y Leon, Spain. *Plant Disease* 95,361.
- Martos Arias S. (2008) El decaimiento de la vid. Enfermedades de la madera relacionadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae (Tesis doctoral). ISBN: 9788469165904.

- Mascheroni, E., Figoli, A., Musatti, A., Limbo, A., Drioli, E., Suevo, R., Talarico, S., Rollini, M. (2014) An alternative encapsulation approach for production of active chitosan-propolis beads, *Int. J. Food Sci. Tech.*, 49 1401-1407.
- Matei, P., Sánchez Bascónes, M., Hernández Navarro, S., Araujo Rufino, C., Martín Ramos, P., Pérez Lebeña, E., Martín Gil, J. (2014) Patente nº: ES P201431591, Composite con actividad antimicrobiana que comprende dos componentes autoasamblados de origen natural y, opcionalmente, un componente (C) de tamaño manométrico.
- Matei, P.M., Martín-Ramos, P., Sánchez-Bascónes, M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Navas-Gracia, L.M., Rufino, C.A., Ramos-Sánchez, M.C., Martín-Gil, J. (2015). Synthesis of Chitosan Oligomers/Propolis/Silver Nanoparticles Composite Systems and Study of Their Activity against *Diplodia seriata*. *Int. J. Polym. Sci.*, 2015, 1-11.
- Matei, P.M., Sánchez Bascónes, M., Martín-Villullas, M.T., Diez-Gutiérrez, M.A., García-González, M.C. (2014). Eficiencia del compostaje de sarmientos de vid mediante pilas abiertas como método de higienización. *IV Jornadas de la Red Española de Compostaje. De Residuo a Recurso: Estrategias de gestión tratamiento y valorización en el Horizonte 2020*, 12-14 November 2014, Murcia, Spain. Red Española de Compostaje. pp. 156-160.
- Matei, P.M., Sánchez Bascónes, M., Martín-Villullas, M.T., Diez-Gutiérrez, M.A., López Sotelo, J.B. (2013). Higienización de sarmientos de la vid mediante procesos de compostaje; 36th World Congress of Vine and Wine. Conference: 36th World Congress of Vine and Wine. Organización Internacional de la Vid y del Vino., At Bucarest, Rumania.
- McCarthy J., Canziani O.F., Leary N.A., Dokken D.J. & White K.S. (eds.) (2001) *Climate change 2001: impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of Working Group II to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Milani, E.A., Gardner, R.C. and Silva, F.V-M (2015) Thermal resistance of *Saccharomyces* yeast ascospores in beers. *International Journal of Food Microbiology* 206, 75–80.

- Montazer, M., Shamei, A., Alimohammadi, F. (2012) Synthesizing and stabilizing silver nanoparticles on polyamide fabric using silver-ammonia/PVP/UVC, *Prog. Org. Coat.*, 75 379-385.
- Moreno Casco J., Mormeneo Bernat S. (2007). *Compostaje: Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje*. Ed. Mundi-prensa.
- Moreno Casco, J. and Moral Herrero, R. (2008) *Compostaje*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, p 570.
- Mugnai, L, Graniti, A, and Surico, G. 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive disease of grapevine. *Plant Disease* 83: 404-418.
- Nedji N., Loucif-Ayad W. (2014) Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4 (6): 433-437.
- Pane, C., Piccolo, A., Spaccini, R., Celanoc, G., Vilecco, D. and Zaccardella, M. (2013) Agricultural waste-based composts exhibiting suppressivity to diseases caused by the phytopathogenic soil-borne fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Applied Soil Ecology* 65, 43– 51
- Pennycook, S.R.; Samuels, G.J. 1985. Botryosphaeria and Fusarium species associated with ripe fruit rot of Actinidia deliciosa (kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon*. 24:445-458
- Petit, E. and Gubler, W.D. (2005). Characterization of *Cylindrocarpum* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease* 89, 1051–1059.
- Phillips A.J.L., P.W. Crous and A. Alves, 2007. *Diplodia seriata* the anamorph of “*Botryosphaeria*” *obtusa*. *Fungal Diversity* 25, 181–195.
- Phillips, A. J. L. (2002): Botryosphaeria species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathol. Mediterr.* 41, 3-18.
- Prakongkha, I., Sompong, M., Wongkaew, S., Athinuwat, D., Buensanteai, N., Changes in salicylic acid in grapevine treated with chitosan and BTH against *Sphaceloma ampelinum*, the causal agent of grapevine anthracnose, *African Journal of Microbiology Research*, 7 (2013) 557-563.

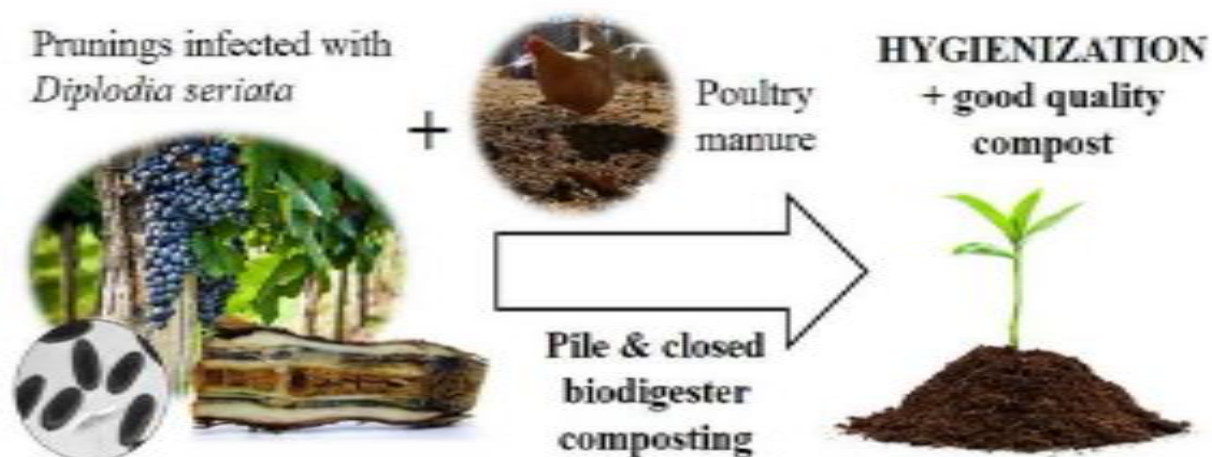
- Regato P, Salman R. (2008) Mediterranean Mountains in a Changing World: Guidelines for developing action plans. Malaga, Espagne : Centre de coopération pour la Méditerranée de l'UICN, xii & 88p.
- Rodríguez, L., Cerrillo, M.I., García-Albiach, V., Villaseñor, J. (2012) Domestic sewage sludge composting in a rotary drum reactor: Optimizing the thermophilic stage. *J. Environ. Manage.* 112(0), 284-291.
- Rynk, R., M. van de Kamp, G.B. Willson, M.E. Singley, T.L. Richard, J.J. Kolega, F.R. Gouin, L. Laliberty Jr., D. Kay, D.W. Murphy, H.A.J. Hoitink and W.F. Brinton. (1992) On-Farm composting handbook. (ed). R. Rynk. p. 6-13, 106-113. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, N.Y.
- Sánchez Báscones, M., Matei, P.M., Martín Villullas, M.T., Navas Gracia, L.M., Diez Gutiérrez, M.A. (2014) Biodegradación e higienización de sarmientos de vid en biodigestor cerrado discontinuo. *IV Jornadas de la Red Española de Compostaje. De Residuo a Recurso: Estrategias de gestión tratamiento y valorización en el Horizonte 2020*, 12-14 November 2014, Murcia, Spain. Red Española de Compostaje. pp. 151-160.
- Sanchez, B. M., Navas, L.M., Diez, M.A., Correa, A., Hernandez, S. and Martín G. J. (2008) Compostaje de cadáveres de pollos en sistema cerrado discontinuo. *I Jornadas de la Red Española de Compostaje*, Barcelona; p. 272-278.
- Sanuja, S., Agalya, A., Umaphaty, M. J. (2015). Synthesis and caracterización of zinc oxide-neem oil-chitosan bionanocomposite for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 76-84.
- Sanuja, S., Agalya, A., Umaphaty, M. J. (2015). Synthesis and caracterización of zinc oxide-neem oil-chitosan bionanocomposite for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 76-84.
- Savocchia, S., Steel, C. C., Stodart, B. J., and Somers, A. (2007). Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis* 46:27-32.
- Scanlon, A.K., Tiwar, U., Cagney, C., Walsh, D., McDowell, D.A and Duffy, G. (2015) Modelling the thermal inactivation of five *Campylobacteraceae* species. *Food Control* 47, 135-140.

- Schloss, P.D., Hay, A.G., Wilson, D.B., Walker, L.P. 2003. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 46(1), 1-9.
- Silva, S.M., Braga, C.R., Fook, M.V., Raposo, C.M., Carvalho, L.H., Canedo, E.L. (2012) Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites, in: T. Theophanides (Ed.) *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, InTech, pp. 43-62.
- Sivakami, M., Gomathi, T., Venkatesan, J., Jeong, H., Kim, S., Sudha, P. (2013). Preparation and characterization of nano chitosan for treatment wastewaters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 204-212.
- Spagnolo A., Marchi.G., Peduto F., Phillips A & Surico G. 2010 Detection of Botryosphaeriaceae species within grapevine woody tissues by nested PCR with particular emphasis on the *Neofusicocum parvum*/N. ribis complex. *Eur. J. Plant Pathol.*
- Stoffella, P.J., Kahn, B.A. (2005) Utilización de compost en los sistemas de cultivo hortícolas. Ed. Mundiprensa España, 397 p.
- Stroescu, M., Stoica-Guzun A., Isopencu G., Jinga, S. I., Parvulescu, O., Dobre, T., Vasilescu, M. (2015). Chitosan-vanillin composites with antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 48, 62-71.
- Sun T., Zhou D., Xie J., Mao F. 2007. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *Eu. Food. Res. Technol.* 225:451-456.
- Taskin, P., Canisag, H., Sen. M. (2104). The effect of degree of deacetylation on the radiation induced degradation of chitosan. *Radiation Physics and Chemistry*, 94, 236–239.
- Thuiller, W., Lavorel, S., Araújo, M.B., Sykes, M.T. and Prentice, I.C. (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *PNAS* vol. 102 no. 23 8245– 8250.
- Torlaka, E., Sertb. D. (2013) Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules* 60 52– 55.
- Turner, C. (2002) The thermal inactivation of *E. coli* in straw and pig manure. *Bioresource Technology* 84, 57–61.

- UNE-EN 13650:2001 (idéntica UNE-EN 13650:2001) Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Extracción de elementos solubles en agua regia. Fecha Edición 2002-03-21; ICS 65.080 / Fertilizantes; Comité AEN/CTN 142 - Fertilizantes, enmiendas y medios de cultivo.
- Uranga Belanzategui, J. (1995) El compostaje. Asociación Bio Lur Navarra.
- Urbano Terrón, P. (2002) Fitotecnia: ingeniería de la producción vegetal. Mundi Prensa.
- Úrbez-Torres, J. R., and Gubler, W. D. (2009). Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Dis.* 93:584-592.
- van Boekel, M. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.*, 74(1-2), 139-159.
- van Niekerk, J.M., Fourie, P.H., Halleen, F., Crous, P.W. (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 43-54.
- Waite, H., May, P. 2005. The Effects of Hot Water Treatment, Hydration and Order of Nursery Operations on Cuttings of *Vitis vinifera* Cultivars. in: *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 44, University of Florence. Florence, Italy, pp. 144-152.
- Waite, H., Morton, L. 2007. Hot Water Treatment, Trunk Diseases and Other Critical Factors in the Production of High-Quality Grapevine Planting Material. in: *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 46, University of Florence. Florence, Italy, pp. 5-17.
- Wang, S., Tang, J., Johnson, J., Hansen, J., (2002b) Thermal-death kinetics of fifthinstar *Amyelois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored Prod. Res.* 38, 427-440
- Wei, D., Sun, W., Qian, W., Ye, Y., Mac, X. (2009). The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, 344, 2375–2382.
- Wei, F., Zhang, J., Zhou, S., He, R., Schaeffer, M., Collura, K., Kudrna, D., Faga, B.P., Wissotski, M., Golser, W., Rock, S.M., Graves, T.A., Fulton, R.S., Coe, Ed., Schnable, P.S., Schwartz, D.C., Ware, D., Clifton, S.W., Wilson, R.K., Wing, R.A. (2009) The Physical and Genetic Framework of the Maize B73 Genome. *PLoS Genetics*, Volume 5, doi:10.1371/journal.pgen.1000715.
- Woisky, R.G., Salatino, A. (1998) Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control, *J. Apic. Res.*, 37 99-105.

- Xia, D., Li, Y., Huang, G., Fonga, Ch.C., Anc, T., Li, G., Yipa, H.Y., Zhaod, H., Lub,A. and Wonga, P.K. (2015) Visible-light-driven inactivation of Escherichia coli K-12 over thermal treated natural pyrrhotite. *Applied Catalysis B: Environmental* 176–177, 749–756
- Yan, R., Huang, Z., Zhu, H., Johnson, J.A., Wang, S. 2014. Thermal death kinetics of adult *Sitophilus oryzae* and effects of heating rate on thermotolerance. *J. Stored Prod. Res.*, 59, 231-236.
- Yang, Y., Shu, R., Shao, J., Xu, G., Gu, X. (2005) Radical scavenging activity of chitooligosaccharide with different molecular weights, *Eur. Food Res. Technol.*, 222 36-40.
- Yang, Y., Shu, R., Shao, J., Xu, G., Gu, X. (2006). Radical scavenging activity of chitooligosaccharide with different molecular weights. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 36–40.
- Yu S.J., Yin Y.G. and Liu J.F. (2013) Silver nanoparticles in the environment, *Environmental Science: Processes & Impacts* 15: 78–92.
- Yuan W., Fu J., Su K., Ji J. (2010). Self-assembled chitosan/heparin multilayer film as a novel template for in situ synthesis of silver nanoparticles, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 76: 549–555.
- Zhao, Z.M., Wang, L., Chen, H.Z. (2015) A novel steam explosion sterilization improving solid-state fermentation performance. *Bioresource Technology* 192, 547–555.
- Zhu, N. (2006) Composting of high moisture content swine manure with corncob in a pilot-scale aerated static bin system. *Bioresour. Technol.*, 97(15), 1870-1875.
- Zhu, X., Wu, H., Yang, J., Tong, J., Yi, J., Hu, Z., Hu, J., Wang, T., Fan, L. (2105). Antibacterial activity of chitosan grafting nisin: Preparation and characterization. *Reactive & Functional Polymers*, 91-92, 71-76.
- Ziani, K., Fernández-Pan, I., Royo, M., Maté, J. I. (2009). Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. *Food Hydrocolloids*, 23, 2309-2314.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., de Bertoldi, M., (1981) Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle* 22, 54-57.

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems



3 Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

3. Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

Petruta M. Matei^a, Mercedes Sánchez-Báscones^a, Carmen T. Bravo-Sánchez^a, Pablo Martín-Ramos^{*b}, M. Teresa Martín-Villullasa^c, M. Cruz García-González^c, Salvador Hernández-Navarro^d, Luis M. Navas-Gracia^d and Jesús Martín-Gil^d

^a Agriculture and Forestry Science Department, ETSIIAA, Universidad de Valladolid, Avenida de Madrid 57, 34004 Palencia, Spain

^b Department of Agricultural and Environmental Sciences, Higher Polytechnic School of Huesca, University of Zaragoza, Carretera de Cuarte, s/n, 22071 Huesca, Spain. E-mail: pmr@unizar.es; Tel: +34 (974) 292668; Fax: +34 (974) 239302.

^c ITACYL, Finca Zamadueñas, Ctra. de Burgos, km. 119, 47071 Valladolid, Spain

^d Agriculture and Forestry Engineering Department, ETSIIAA, Universidad de Valladolid, Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, Spain

3.1 Abstract

After the ban on sodium arsenite, waste management alternatives to the prevalent burning method are required for the pruned material from grapevines affected by various fungi, such as the sanitization and biodegradation in solid phase by composting. In this work the dynamics of a fungus associated with vine decay (*Diplodia seriata*) during the composting process of a mixture of laying hen manure and vine pruning waste (2:1 w/w) have been investigated in open piles and batch closed biodigesters. Through the optimization of the various physical–chemical parameters, simultaneous re-valorization and hygienization of the infected waste materials was attained, yielding class-A organo-mineral fertilizers. Nevertheless, dramatic differences in the efficiency of each system were observed: whereas in open piles it took 10 days to control *D. seriata* and 35 additional composting days to achieve full inhibition, in the closed biodigesters the fungus entirely disappeared within the first 3-4 days. Finally, the impact of seasonal

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

variability has been assessed, observing greater significance in the summer for the open pile.

Keywords: biodigester; composting; grapevine disease; laying hen manure; vine pruning waste.

3.2 Introduction

Fighting grapevine decline diseases, both in young and adult plants, is of crucial importance due to their direct impact on the production volume and on the quality of grapes, making their eradication a priority for the wine sector. In particular, the increase in diseases in young plants is a matter of great concern for nursery operators and viticulturists. Petri disease or Eutipiosis is increasingly spreading in young plants and there are already several publications that claim that plants from nurseries are also affected (Aroca et al., 2009; Edwards et al., 2007).

The esca is undoubtedly one of the best known vine diseases which appears in the adult plant. Diseases of the vine wood are caused by pathogenic xylophagous fungi, such as *Diplodia seriata*, *Phaemoniella chlamidospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Cylindrocarpon* spp., whose symptoms are multiple, complex and often confusing. *Diplodia seriata* is a fungus associated with vine wood decay in Europe, USA, Australia and South Africa, which belongs to the family of *Botryosphaeriaceae*, that has been associated with Black Dead Arm and Diplodia Cane Dieback (Savocchia et al., 2015) and which is particularly virulent. Surico et al. (2006) argued that there should be concurrent abiotic and biotic factors to eventually produce external symptoms of the disease. Prophylactic measures with hot water and fungicides for the treatment of plants in the nursery multiplication process, targeted at controlling *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* and *Cilindrocarpon* spp., are available (Waite & Morton, 2007).

Rsearch conducted at different laboratories has also been aimed at evaluating the effectiveness of different biological products "in vitro" based on *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Gliocladium roseum*, *Cephalosporium verticillium* and *Fusarium lateritium* to protect injured areas, but aforementioned treatments have not

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

been effective in the control of esca in the vineyard. After the ban on sodium arsenite, there have also been studies on the effectiveness of chitosan oligomers combined with *Trichoderma harzianum* (Chittenden & Singh, 2009) and chitosan- nanometals composites against *Diplodia seriata* (Matei et al., 2015). However, the best form of control is still the adoption of preventive measures such as the elimination of prunings of affected stocks, the protection of pruning wounds with fungicides and performing the pruning late so as to reduce the susceptibility of wounds (Larignon et al., 2009).

A way to achieve a simultaneous removal of the reservoir of pathogenic fungi in vine pruning waste that cause grapevine decline (illustrated with *Diplodia seriata* fungus) and of those of other microorganisms present in manure is the use of composting processes. These processes, in addition, lead to a valorization of the resulting product as an organo-mineral fertilizer.

An important aspect when composting manure is the addition of a bulking agent to optimize substrate properties (such as air space, moisture content, C/N ratio, particle density, pH and mechanical structure), thus positively affecting the decomposition rate (Bernal et al., 2009; Hao et al., 2004). In this sense, lignocellulosic agricultural and forestry by-products are commonly used as bulking agents in co-composting of nitrogen-rich wastes, such as animal manures (Guerra-Rodríguez et al., 2001; Huang et al., 2006). Consequently, and in order to conduct the composting process, laying hen manure - instead of cattle slurry (Bustamante et al., 2012) has been incorporated as a livestock waste rich in nitrogen and the best poultry manure/grapevine pruning waste ratio has been determined so as to achieve the hygienization of the fungus in the vine pruning waste without renouncing to a good-quality compost. This pruning waste management approach is a suitable alternative to their burning or to their abandonment in the vineyard, which would contribute to the propagation of the disease.

The aim of this work has been to compare the fungus removal efficiency in pruned vine shoots attained in an open compost pile against that of a batch closed digester in different seasons. It is worth noting that in an open pile it is essential to achieve a high temperature all throughout the mass by making the necessary turnovers, while a closed digester facilitates the establishment of the thermophilic temperatures and the aeration needed to achieve the hygienization of vine pruning waste, thus taking the temperature

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

reached inside the mass as the process control parameter. Vine shoots prunings are lignocellulosic residues, whose structure is not altered in the composting process at temperatures below 50 °C, so mixing with laying hen manure greatly contributes in order to reach temperatures up to 70 °C. So as to attain the fungus hygienization, operating at high temperatures is a requirement according to US Environmental Protection Agency regulations (EPA, 2002), which considers sufficient to maintain a minimum temperature of the composting mass of 55 °C for 3 days (aerated static pile or in-vessel) or 15 days with 5 turns (windrow) to meet the regulatory requirements of class A fertilizers, and a minimum of 40°C for 5 days -during which temperature should exceed 55°C for at least 4 hours- to meet class B fertilizer requirements.

Finally, so as to ensure the compost quality according to the European Regulation (EC) No. 2003/2003 for fertilizers, the evolution of nutrients and heavy metals contents at the beginning and at the end of the composting process have been monitored, both for the open pile and the closed batch biodigester.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Raw materials

The pruned vine shoots came from Tempranillo variety vines from vineyards located in Cubillas de Santa Marta (Valladolid, Spain). The shoots were crushed into chips of a size not exceeding 2-4 cm and were stacked/piled until they were used in the Centro de Formación Agraria in Viñalta (Palencia, Spain) owned by Junta de Castilla y León.

Diplodia seriata, a fungus associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain), was supplied by ITACYL (Valladolid, Spain) laboratories, after its isolation in MEA (malt extract agar) and PDA (potato dextrose agar) culture media (Martin & Cobos, 2007).

Laying hen manure (consisting of a mixture of the original bed (sawdust) and the poultry solid and liquid waste) was used for the composting of the vine pruning waste to ensure a final compost rich in nitrogen.

3.3.2 Inoculation experiment

In order to analyze aspects such as the disinfection capacity or the percentage of disappearance of the fungus, it is necessary to have infected branches -in a controlled way- both in piles and biodigesters.

For this purpose we prepared 800 inoculated vine shoots using *Diplodia seriata* (Martín & Martín, 2013). The inoculation of the pruned shoots of Tempranillo grapevines was conducted on pieces of vine shoots 15-20 cm long, in which 2 or 3 leaf buds had been kept, and that had previously been washed with soap and water, dried and sterilized under ultraviolet light for 30 min (using a Kowell UV sterilizer cabinet). Then one of the ends of the vine shoots was cut and the mycelia grown on potato dextrose agar (PDA) were applied, placing the vine shoots in tubes in sufficient racks to carry 400 of them to the pile and the remaining 400 to the biodigester.

3.3.3 Composting procedures

Composting tests were performed at the Center for Agricultural Training “Viñalta” in Palencia (Spain), and took place from 3rd May to 19th July for the composters corresponding to the spring period, from 26th July to 12th October for those corresponding to the summer season, and from 12th November to 2nd February for the winter ones.

A prerequisite for the optimization of the composting process in both the open (pile) and the closed (discontinuous biodigester) systems is the determination of the most appropriate laying hen manure: vine pruning waste ratio (the C/N ratio of the starting mixture needs to be ca. 30). The C/N ratios of the starting materials were measured (after drying at 100 °C for 48 hours and grounding on a Retsch ZM-100 ultracentrifugal mill to a particle size <0.08 mm) with a LECO CHN2000 apparatus. Experimental C/N for laying hen manure (A) and grapevine prunings (B) were 10.11 and 54.71, respectively (Table 3.1), so the mixture ratios for 100 kg were readily determined by using equation [1]:

$$A \cdot (C/N)_A + B \cdot (C/N)_B = 100 \cdot (C/N)_{mixture} \quad [1]$$

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

These calculations indicate that the theoretical manure to vinegrape prunings ratio should be 55/45, i.e., 1.22. Nevertheless, in order to attain a good hygienization and quality of the compost, it is also necessary to operate with a mixture that can reach high composting temperatures. Preliminary tests with laying hen manure/vine pruning waste ratios of 1.22:1, 1.5:1 and 2:1 were conducted, concluding that the best results for the final hygienization and quality of compost were achieved with a 2:1 w/w manure:grapevine pruning waste ratio (Matei et al., 2014).

Tabla 3.1 Composition of the starting materials

Starting material	C (%)	H (%)	N (%)	C/N ratio	pH
Hen manure	31.8	4.27	3.14	10.11	7.35
Vinegrape prunings	41.03	5.48	0.75	54.71	6.30

For the preparation of the pyramidal pile, an initial layer of straw was placed, so as to absorb leachates, followed by a first 300 kg layer of laying hen manure, a second 150 kg layer of grapevine pruning waste, a third 300 kg layer of manure, a fourth 150 kg grapevine prunings layer, and finally a covering layer of manure.

In the closed batch digester, 33 layers were prepared, with a bottom layer of straw to adsorb leachates and alternate layers of manure (30-35 kg) and crushed pruning waste (15-17.5 kg), covered by a final layer of manure.

The inoculated pruning waste was then placed in layers 2 and 4 in the open pile (400 inoculated pruned vine shoots) and in layers 15, 17, 19 and 23 in the discontinuous digester (the remaining 400 inoculated pruned vine shoots), marking them with green paint and white bridles to enable subsequent extraction and analysis.

Water was added to each layer of crushed vine shoots to provide a humidity value of 50%, and humidity and temperature were monitored with the probes indicated below. Aeration of the pile was assured with the turnover process (after 28 days).

Regarding the discontinuous closed digester, it consisted of a Box-Compost container and a Compostronic device. Dimensions of the Box-Compost container were 2370×1080×1420 mm, and it was constructed with panels of polyester and polyurethane foam, with an external stainless steel structure. Inside the Box-Compost container, temperature, moisture and oxygen contents of the composting mass were conditioned

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

with a 7.5 KW air heater, water sprinklers and a 3 HP high pressure centrifugal ventilator, which were automatically controlled with a Compostronic Siemens device equipped with a HOBO U12 data logger with 4 external channels (Sánchez et al., 2008).

3.3.4 Microorganisms analysis

Hygienization analysis was conducting by extracting five of the pruned vine shoots inoculated with *D. seriata* at a time from aforementioned layers of the two systems under study (piles and closed discontinuous biodigesters), firstly on a daily basis (during the first week) and then on days 10, 20, 30, 40, 50 and 60 of the experiment. Each vine shoot was cut into 6 chips with 5 replicates (i.e., 30 chips/sample), which were used to seed Petri dishes containing malt extract agar (MEA) to which 0.5 g/l of chloramphenicol had been added beforehand. Subsequently, they were incubated in an oven at 25°C for 15 days to morphologically determine the growth of *Diplodia seriata* and other fungi (*Aspergillus*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Fusarium*) and bacteria (*Actinomycetes*, *Bacillus*, *Thiobacillus* and *Enterobacter* spp) which grew from each chip. For the replication of the resulting fungal colonies, they were isolated in potato dextrose agar (PDA) to induce sporulation and were grown at 25°C in alternating cycles of 12 hours of darkness and 12 hours of near ultraviolet light (Martín & Martín, 2013). Reading of the Petri plates containing chips started after 10 days and was repeated every two weeks for two months. The disappearance percentage for *Diplodia seriata* fungus was determined by counting the number of affected chips per Petri dish of the composted samples of inoculated vine pruning waste in comparison to the control (inoculated pruned vine shoots before composting), and resorting to PCR (Thermo Scientific™ SureTect™) for confirmation when necessary.

3.3.5 Chemical, physical and phytotoxicity germination analyses

Samples were analyzed for carbon, hydrogen and nitrogen concentrations with a LECO CHN2000 elementary analyzer; temperature and humidity were tracked (3 repetitions) with a Crison 638 Pt portable thermometer and a Theta Meter HH1 humidity probe, respectively; electrical conductivity (EC) and pH were measured with a Crison conductivity meter micro CM 2200 and a Crison Basic 20 pH meter, respectively.

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

In addition, a Medilow J.P. Selecta incubator, a Thermo Scientific Heraeus T 6030 heating and drying oven, a Mediclave J.P. Selecta autoclave, a Milestone ETHOS 900 microwave and a Varian AA240 FS atomic absorption spectrophotometer with flame and graphite furnace for metals (UNE-EN 13650:2001 compliant) were also used to process the samples and further characterize them.

For the phytotoxicity germination test, ten *Lepidium sativa* seeds were incubated with 1 mL of compost extract at two different concentrations, either 1.7 g or 5 g of compost/100 mL of distilled water, at 25°C in the dark for 72 hours on sterilized cellulose filter paper (Whatman No. 1), according to Zucconi et al. (1981). Four repetitions were prepared and incubated at 26°C in the dark for 48 hours.

The germination index (GI%) of the samples was calculated using the following formula [2]:

$$GI\% = \frac{\text{seed germination} \times \text{root length of treatment} \times 100}{\text{seed germination} \times \text{root length of control}} \quad [2]$$

3.3.6 Statistical analysis

The statistical analysis of the data has been conducted using OriginPro® ANOVA tools. Unless specifically stated otherwise, all statistical differences represent $p < 0.05$.

3.4 Results and discussion

In this section the results of the time evolution of the *Diplodia seriata* fungus hygienization process in open and closed composters and of the effect of the seasonal variability (for spring, summer and winter experiments) are presented. Physicochemical monitoring parameters (i.e., temperature, humidity, aeration and pH) and those parameters related to the nature of the substrate (C/N ratio and electrical conductivity) in the different seasons are discussed first; followed by biological parameters (germination rate, % of fungi and bacteria) and a compost quality (nutrients and heavy metals content) assessment.

3.4.1 Physicochemical parameters

3.4.1.1 Temperature, humidity and time

When operating on a pile system (Figure 3.1 *a* and Figure 3.1 *b*) or in a closed digester (Figure 3.1 *c* and Figure 3.1 *d*), there is not a clear delimitation between the mesophilic (10-40 °C) and the thermophilic (40-75 °C) phases, since they occur in a sequential manner (Niu et al., 2015; Schloss et al., 2003), but whereas the pile required ten days to reach the thermophilic phase with a continuous moisture loss, the closed digester did it in five days with a temperature of 75°C and a humidity of ca. 40-50%. To reactivate the composting process in the pile, a turnover and water addition were required after 28 days, which appeared in the time evolution as a temperature increase and a gradual decrease in humidity. On the other hand, in the closed digester it was the aeration the one which favored the hygienization of the vine prunings, due to the high temperature that was reached inside it (75 °C).

With regard to self-heating period, it was long enough (60 days) in order to ensure efficient hygienization of the input materials used (Franke-Whittle et al., 2014).

With regard to the impact of the seasonal variability, it is worth noting that for the pile in the spring and summer seasons the thermophilic phase lasted up to 50 days with a humidity of 41-42%, while in winter the humidity was 47% (see Figure 3.1 *b*). These fluctuations can be ascribed to the influence of ambient temperature, according to Zhu (2006). Out of the three seasons under consideration, correlation between humidity and temperature and an appreciable significance were only observed for the summer season, both for the pile ($p=0.004$, $R^2=0.767$) and the digester ($p=0.016$; $R^2=0.643$). The fact that the significance was higher for the pile ($p<0.01$) than for the digester ($p <0.05$) was probably due to the higher moisture content in the former in comparison to the later (47% vs. 41%).

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

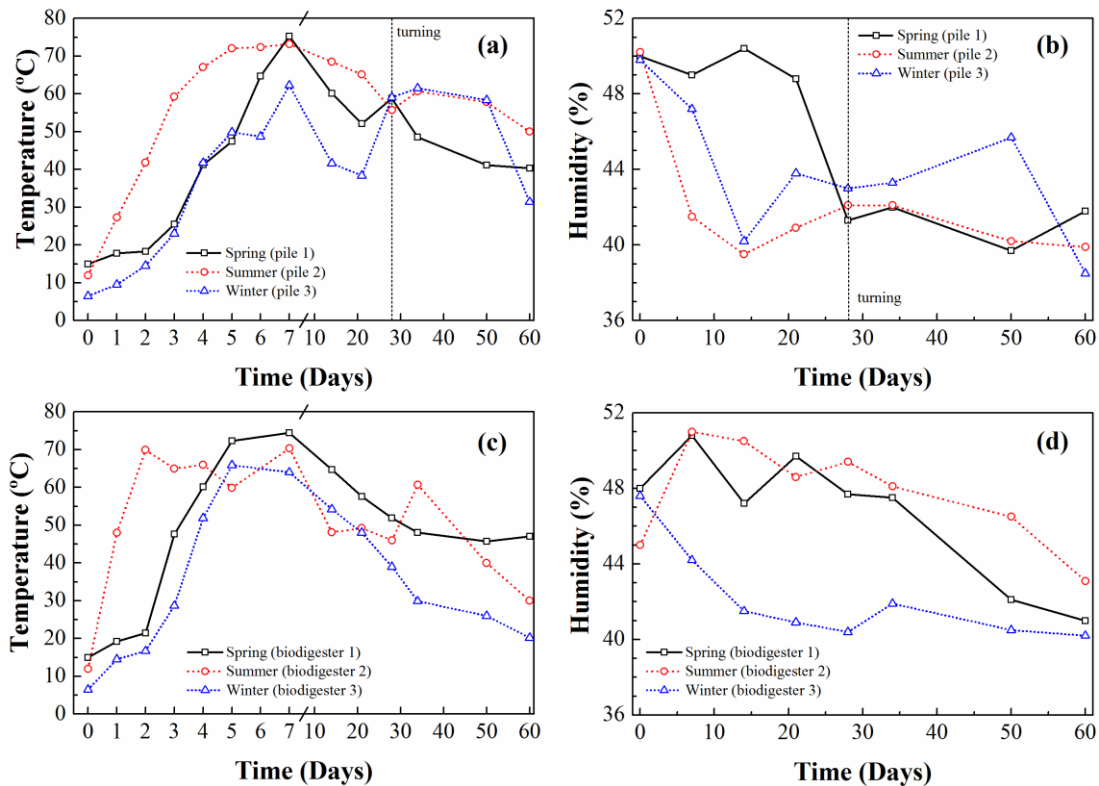


Figure 3.1 Evolution of temperature (°C) and humidity (%) of the samples collected on a daily basis for piles (top) and closed batch biodigesters (bottom). All measurements were conducted in triplicate: the reported values correspond to the average and the e.s.d. was <4.20% in all cases.

The significant differences in the summer, also reported by Benito et al. (2006) when operating with pruned vine shoots mixed with foliage in open compost piles in different seasons, could be attributed to differential leaching of soluble salts as a result of seasonal precipitations.

In comparison to the work by Bustamante et al. (2012), it is also worth noting that, whereas temperatures higher than 50°C could not be attained when cattle slurry was mixed with vine shoot prunings as bulking agent in a pile, laying hen manure allows to reach temperatures of ca. 70°C, which leads to a much more effective composting (and better hygienization), both for the piles and the biodigesters.

3.4.1.2 pH and electrical conductivity

According to Sánchez-Monedero et al. (2001), the pH increases during the composting process both for open and closed systems due to the decomposition of the organic acids and the formation and release of ammonia by volatilization. In Figure 3.2 it can be observed that pH values for the open and closed composters in this study ranged from 7 to 9.5 and that the EC was in the 1-3.5 dS/m range. The highest pH values were attained for piles and biodigesters operating in winter (pH 9.2), with a very high EC/pH significance ($p < 0.001$) for that period.

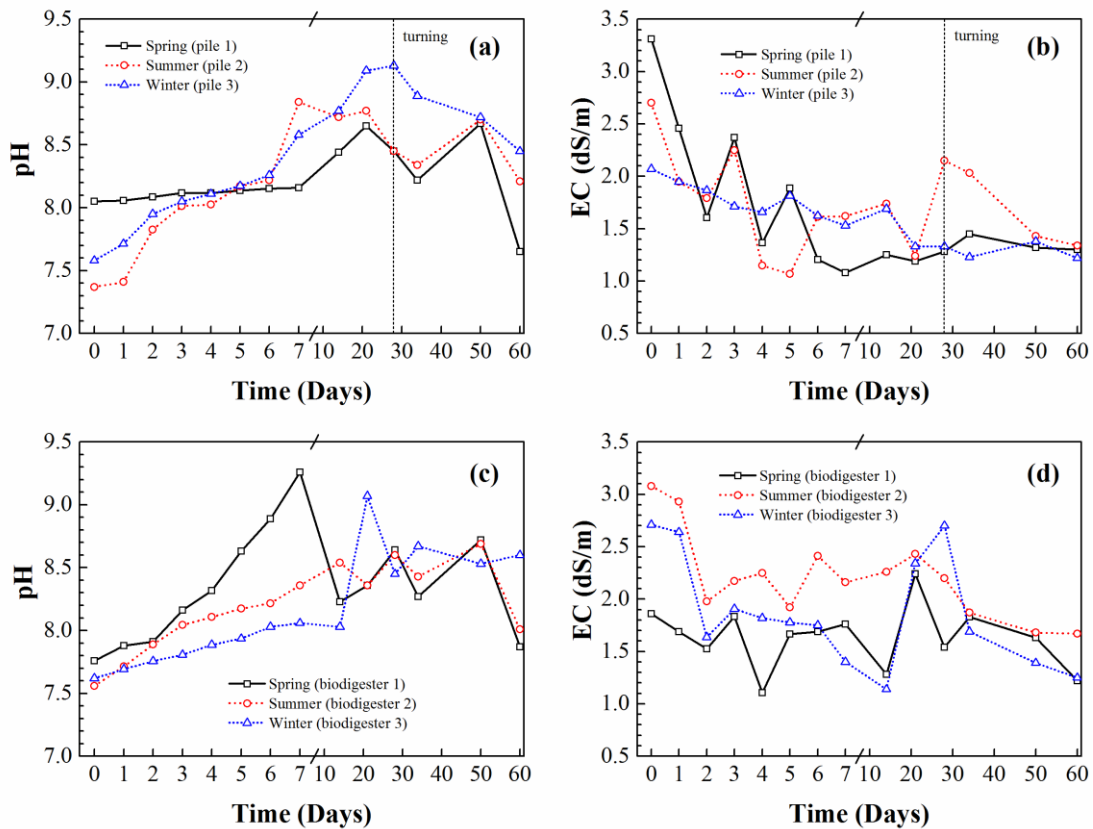


Figure 3.2 pH and electrical conductivity variation in the samples taken from open piles (top) and closed batch digesters (bottom). The reported values are the average of three measurements, and the e.s.d. was $< 1\%$ in all cases.

The final values of pH and EC barely fluctuated in the different seasons: pH values (8-8.5) and CE values (1.8-1.3 dS/m) were typical of mature compost and could be regarded as indicative of good quality products. A high significance was also found between temperature and electrical conductivity for open piles, regardless of the actual

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

season (spring: $R^2 = 0.607$, $p=0.001$; summer: $R^2=0.414$, $p=0.012$; winter: $R^2=0.481$, $p=0.005$).

3.4.1.3 C/N ratio

When operating with pruning wastes, a compost can be considered stable or mature if the C/N ratio is around 15-20, while for values above 25 nitrogen would be very bonded to organic matter and would not be used by plants (Huang et al., 2004). In view of Figure 3.3, it can be observed that for a (dry) laying hen manure/branches 2:1 w/w ratio the operating ranges in terms of C/N ratios for the open pile (14-22) and for the closed digester (12-20) were within aforementioned interval for optimal ready-to-use compost, according to Rosen et al. (1993).

The seasonal analysis of the compost for the open pile showed that the highest values of the C/N ratio occurred in spring, ten days after the start of the process (C/N ratio=22), while the lowest ratio corresponded to the summer pile after 20 days (C/N ratio=14). The subsequent turnover allowed an increase in the C/N ratio and promoted that compost maturation could be achieved at the end of the process (with C/N ratio=20 in spring, C/N ratio=18 in winter and C/N ratio=16 in summer).

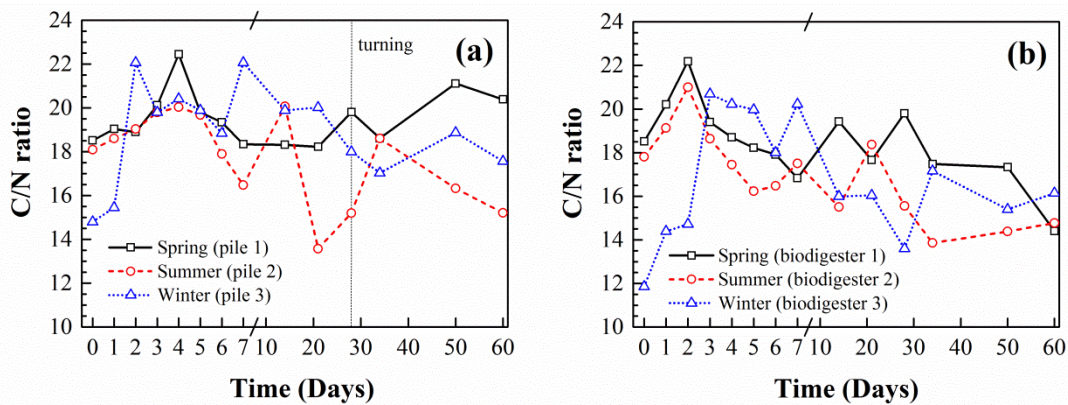


Figure 3.3 C/N ratio variations in the samples taken from (a) open piles and (b) closed batch biodigesters. All reported values correspond to the average of the three repetitions, and e.s.d. was <1.9% in all cases.

3.4.2 Biological parameters and compost quality control

3.4.2.1 *Diplodia seriata* control

The time evolution of the percentage of disappearance of *Diplodia seriata* fungus in open and closed systems is depicted in Figure 3.4. For piles (Figure 3.4 a), 10 days were required for the partial elimination of the fungus and 35 days of composting were needed for its complete inhibition, while in the closed digesters (Figure 3.4 b) the fungus disappeared in the first 3-4 days. Consequently, the compost hygienization was far quicker and more effective in the closed digester than in the open pile, regardless of any seasonal variability.

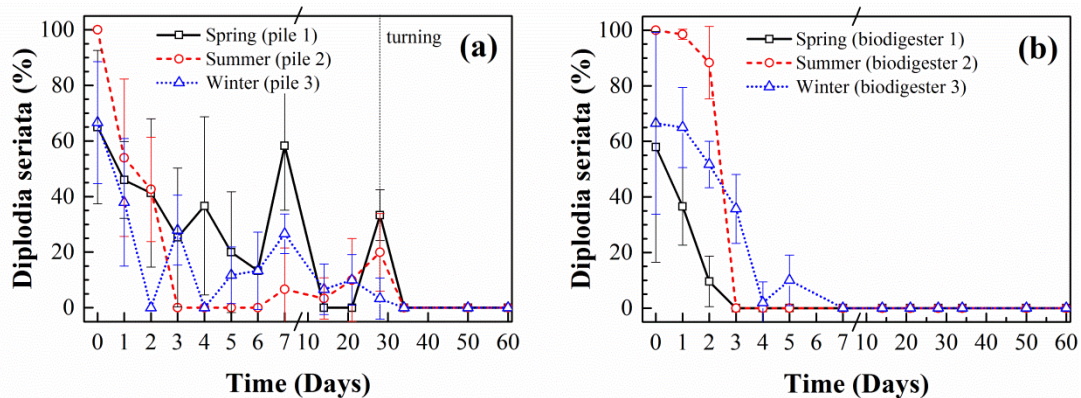


Figura 3.4 *Diplodia seriata* fungus variations in the samples taken from (a) open piles and (b) closed batch biodigesters.

A study of the disappearance of *Diplodia seriata* fungus against different physicochemical parameters and in different seasons (spring, summer and winter) was also conducted. When operating in an open pile, there was an inverse correlation between the percentage of disappearance of *Diplodia seriata* and the temperature increase in all the three seasons. The associated significance was particularly high in the summer, due to the higher temperatures reached in this season ($R^2=0.832$, $p<0.001$), while the significance was lower for the fungus disappearance vs. moisture ($R^2=0.552$, $p=0.034$), vs. pH ($R^2=0.518$, $p=0.003$), vs. electrical conductivity ($R^2=0.428$, $p=0.011$) and vs. the percentage of other fungi ($R^2=0.508$, $p=0.004$). Dunkley et al. (2011) also demonstrated the effectiveness of the open pile composting process during the summer to destroy any pathogenic microorganisms that may be present. Rodríguez et al. (2012)

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

likewise confirmed the effectiveness of a closed digester (a rotary drum reactor) using pruning waste and powdered sawdust as bulking agents, attaining a complete removal of pathogens after 3 days of composting.

3.4.2.2 Other fungi and bacteria

The content of other fungi and bacteria (specified in subsection 3.3.4) are depicted in Figure 3.5, which shows that they were lower in the closed digester than in the open pile, regardless of the season. For example, the content of other fungi and bacteria in the pile in the summer was ca. 85%, while in the discontinuous closed digester that content was less than half of that of the pile (40%). At the end of the composting process, other fungi from the *Penicillium* genus were identified, attributable to environmental pollution.

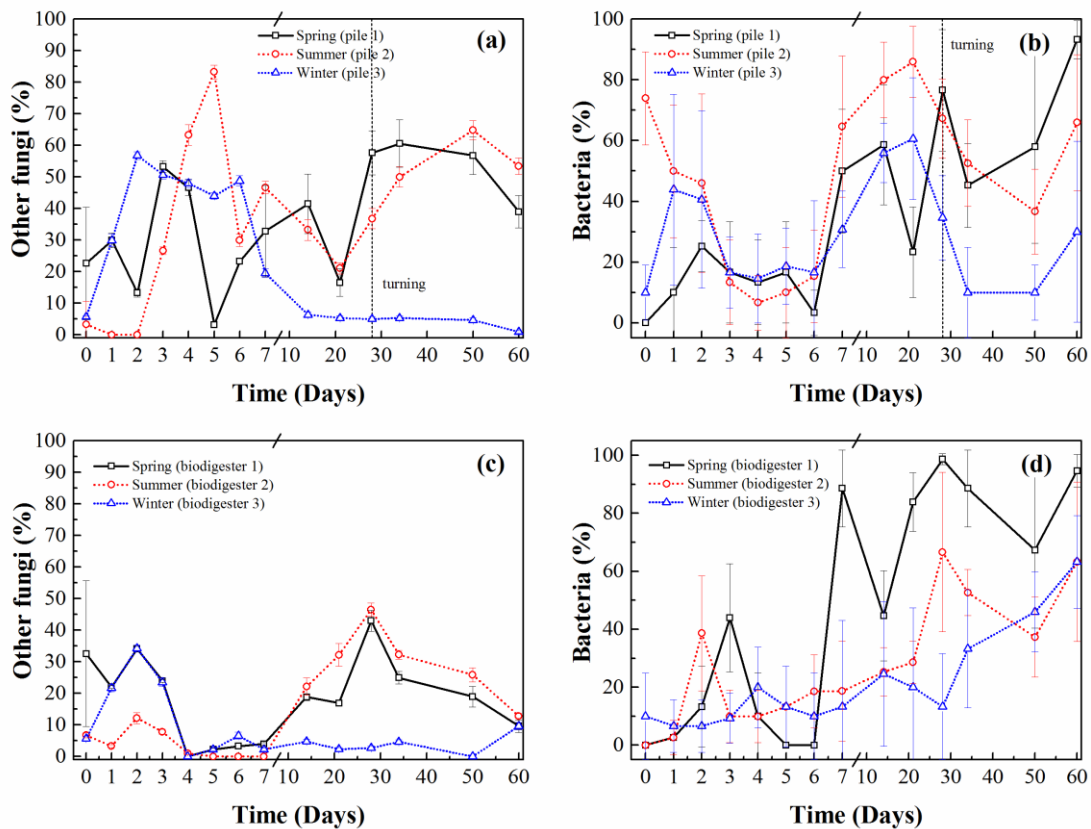


Figure 3.5 Other fungi and bacteria time evolution for open piles (top) and closed biodigesters (bottom).

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

3.4.2.3 Germination index and compost quality

The results of the in vitro germination tests in the aqueous extracts of mixtures of vine pruning waste and laying hen manure at two dilutions (D1: 5 g compost/100 mL water; D2: 1.7 g compost/100 mL water), conducted with cress (*Lepidium sativum*) seeds, are summarized in Table 3.2. The value of the germination rate was higher for the pile than for the discontinuous closed biodigester, and was slightly higher in the summer (D2: 210%). It can also be observed that the average values of germination indices (GI%) at the end of the composting process (D1: 113%; D2: 141%) were higher than at the start of the composting process (D1: 109%; D2: 117%). In both cases the compost would be considered mature since the GI is above 60%, which indicates that it contains no phytotoxic substances that can negatively affect the development of seeds (Zucconi et al., 1981).

Tabla 3.2 Evolution of the germination index (GI) for *Lepidium sativum*, using aqueous extracts of the initial and final compost, for the open pile and the closed biodigester in the different seasons. Reported values are the average of the four repetitions.

Treatment	GI (%)											
	Spring				Summer				Winter			
	Pile	σ	Biodigester	σ	Pile	σ	Biodigester	σ	Pile	σ	Biodigester	σ
D1 (initial)	105	12	63	7	105	6	61	8	162	23	150	16
D2 (initial)	123	13	68	4	114	7	125	19	174	20	147	17
D1 (final)	111	11	60	10	125	13	123	8	133	23	120	14
D2 (final)	126	14	90	10	210	13	135	14	191	22	164	15

* The germination index for the control (distilled water) was 100. D1 and D2 stand for first and second dilution (5 g/100 mL of water and 1.7 g/100 mL of water, respectively).

3.4.2.4 Nutrients and heavy metals contents

The application of the composted waste to the soil involves the provision of substantial quantities of nutrients. However, Table 3.3 shows that during the composting process a relative increase in the concentration of metals takes place, due to organic matter loss and transformation (Canarutto et al., 1991; García et al., 1991). By comparison of the contents of heavy metals in the pile and in the discontinuous closed digester at the beginning vs. at the end of the composting process, slight increases in the

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

contents of Mg (0.64% vs. 0.78%) and Cr (16 ppm vs. 18.3 ppm) were observed for the closed biodigester, while for the pile there were increases in the Ca (4.13% vs. 4.47%), Cr (15.95 ppm vs. 20.80 ppm), Ni (8.26 ppm vs. 12.18 ppm) and Pb (11.10 ppm vs. 11.56 ppm) contents. No changes were observed for Na, K and Fe.

The resulting fertilizing products could be classified as class A according to the Annex V of the Spanish Royal Decree 506/2013 of 28th June (which transposes Regulation (EC) No. 2003/2003 for fertilizers and its subsequent amendments), and the quality of the obtained compost allows its application to agricultural soils since no item exceeded the maximum limits for heavy metals in solids (mg/kg of dry matter). Nonetheless, the contents of Cu and Zn in the compost were close to the upper limit value for class A fertilizer (Cu: 70 ppm and Zn: 200 ppm) due to the manure used as a starting product.

Tabla 3.3 Evolution of the nutrients and heavy metals contents at the beginning (P0 and B0) and at the end (P and B) of the composting process for the open pile (P) and the closed batch biodigester (B).

Sample	%K	%Na	%Ca	%Mg	%Fe	Cr (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Ni (ppm)	Pb (ppm)	Cd (ppb)
<i>P₀, B₀</i> (initial)	1.27	0.24	4.13	0.64	0.27	16.0	96.6	650	448	8.3	11.1	217
<i>P</i> (final)	1.27	0.20	4.47	0.64	0.38	20.8	79.5	449	291	12.2	11.6	147
<i>B</i> (final)	1.30	0.25	3.93	0.78	0.22	18.3	96.1	579	395	8.6	9.9	160

3.5 Conclusions

The closed biodigester was far more efficient than the pile for the hygienization of the grapevine pruning waste inoculated with *Diplodia seriata*. With regard to seasonal variations, a high significance for the percentage of disappearance of *Diplodia seriata* vs. temperature was observed for the open pile in the summer ($R^2=0.832$, $p<0.001$). The chosen 2:1 w/w ratio for the laying hen manure/grapevine prunings mixture allowed not only to reach the required high temperatures, but yielded an excellent fertilizer, free of pathogens, with a C/N ratio lower than 20 -that favors the mineralization of the compost- and a germination rate well above 60%.

Acknowledgements

The authors would like to gratefully acknowledge the Junta de Castilla y León's support through project VA233A12-1. PM-R thanks Santander Universidades for its financial support through "Becas Iberoamérica Jóvenes Profesores e Investigadores, España 2015" postdoctoral scholarship program.

3.6 References

- Aroca, Á., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J., Raposo, R. (2009) Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.*, 126(2), 165-174.
- Benito, M., Masaguer, A., Moliner, A., De Antonio, R. (2006) Chemical and physical properties of pruning waste compost and their seasonal variability. *Bioresour. Technol.*, 97(16), 2071-2076.
- Bernal, M.P., Alburquerque, J.A., Moral, R. (2009) Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.*, 100(22), 5444-5453.
- Bustamante, M.A., Alburquerque, J.A., Restrepo, A.P., de la Fuente, C., Paredes, C., Moral, R., Bernal, M.P. (2012) Co-composting of the solid fraction of anaerobic digestates, to obtain added-value materials for use in agriculture. *Biomass Bioenergy*, 43, 26-35.
- Canarutto, S., Petruzzelli, G., Lubrano, L., Guidi, G.V. (1991) How composting affects heavy metal content. *Biocycle*, 32(6), 48-50.
- Chittenden, C., Singh, T. (2009) In vitro evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. *Biol. Control*, 50(3), 262-266.
- Dunkley, C., Cunningham, D., Ritz, C., Dunkley, K., Hinton, A. (2011) Using mortality compost in vegetable production: A comparison between summer and winter composting and its use in cabbage production. *Agric. Food Anal. Bacteriol.*, 1, 6-14.
- Edwards, J., Constable, F., Wiechel, T., Salib, S. (2007) Comparison of the Molecular Tests - Single PCR, Nested PCR and Quantitative PCR (SYBR Green and TaqMan) - For Detection of *Phaeomoniella Chlamydospora* During Grapevine Nursery Propagation. in: *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 46, University of Florence. Florence, Italy, pp. 58-72.
- EPA (2002) *Biosolids applied to land: Advancing standards and practices*. National Academies Press, Washington DC, USA.
- Franke-Whittle, I.H., Confalonieri, A., Insam, H., Schlegelmilch, M., Körner, I. (2014) Changes in the microbial communities during co-composting of digestates. *Waste Manage. (Oxford)*, 34(3), 632-641.
- García, C., Hernández, T., Costa, F. (1991) Changes in carbon fractions during composting and maturation of organic wastes. *Environ. Manage.*, 15(3), 433-439.
- Guerra-Rodríguez, E., Diaz-Raviña, M., Vázquez, M. (2001) Co-composting of chestnut burr and leaf litter with solid poultry manure. *Bioresour. Technol.*, 78(1), 107-109.
- Hao, X., Chang, C., Larney, F.J. (2004) Carbon, Nitrogen Balances and Greenhouse Gas Emission during Cattle Feedlot Manure Composting. *J. Environ. Qual.*, 33(1), 37-44.
- Huang, G.F., Wong, J.W.C., Wu, Q.T., Nagar, B.B. (2004) Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust. *Waste Manage. (Oxford)*, 24(8), 805-813.

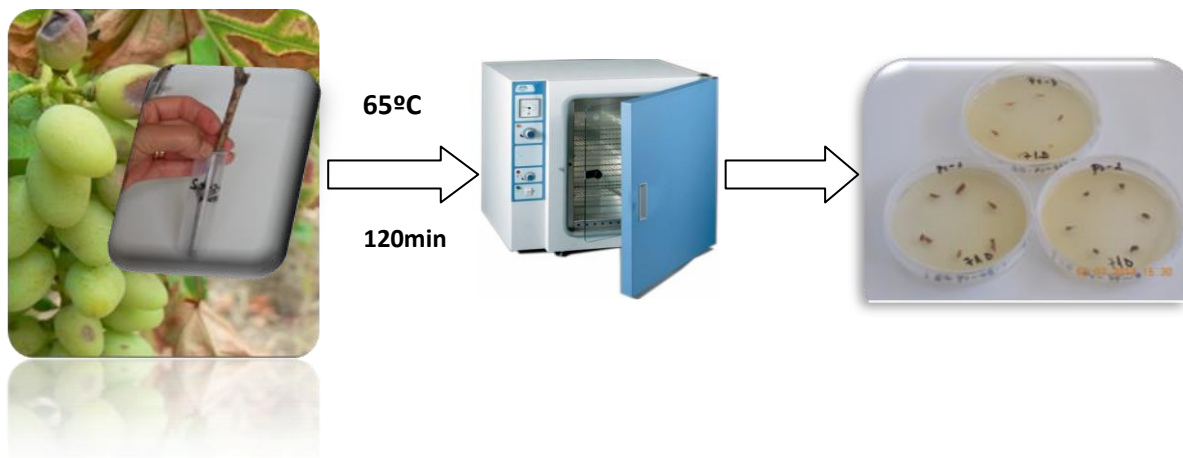
Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

- Huang, G.F., Wu, Q.T., Wong, J.W.C., Nagar, B.B. (2006) Transformation of organic matter during co-composting of pig manure with sawdust. *Bioresour. Technol.*, 97(15), 1834-1842.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C., Bertsch, C. (2009) Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *C. R. Biol.*, 332(9), 765-783.
- Martín, L., Martín, M.T. (2013) Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. *Crop Protect.*, 52, 141-150.
- Martin, M.T., Cobos, R. (2007) Identification of Fungi Associated with Grapevine Decline in Castilla y León (Spain). in: *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 46, University of Florence. Florence, Italy, pp. 18-25.
- Matei, P.M., Martín-Ramos, P., Sánchez-Báscones, M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Navas-Gracia, L.M., Rufino, C.A., Ramos-Sánchez, M.C., Martín-Gil, J. (2015) Synthesis of Chitosan Oligomers/Propolis/Silver Nanoparticles Composite Systems and Study of Their Activity against *Diplodia seriata*. *Int. J. Polym. Sci.* 1-11.
- Matei, P.M., Sánchez Báscones, M., Martín-Villullas, M.T., Diez-Gutiérrez, M.A., García-González, M.C. (2014) Eficiencia del compostaje de sarmientos de vid mediante pilas abiertas como metodode higienización. IV Jornadas de la Red Española de Compostaje. De Residuo a Recurso: Estrategias de gestión tratamiento y valorización en el Horizonte 2020, 12-14 November 2014, Murcia, Spain. Red Española de Compostaje. pp. 156-160.
- Niu, Q., Takemura, Y., Kubota, K., Li, Y.-Y. (2015) Comparing mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of chicken manure: Microbial community dynamics and process resilience. *Waste Manage.* (Oxford).
- Rodríguez, L., Cerrillo, M.I., García-Albiach, V., Villaseñor, J. (2012) Domestic sewage sludge composting in a rotary drum reactor: Optimizing the thermophilic stage. *J. Environ. Manage.*, 112(0), 284-291.
- Rosen, C.J., Halbach, T.R., Swanson, B.T. (1993) Horticultural uses of municipal solid waste composts. *HortTechnology*, 3(2), 167-173.
- Sánchez, M., González, J.L., Gutiérrez, M.A.D., Guimaraes, A.C., Gracia, L.M.N. (2008) Treatment of animal carcasses in poultry farms using sealed ditches. *Bioresour. Technol.*, 99(15), 7369-7376.
- Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Paredes, C., Bernal, M.P. (2001) Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresour. Technol.*, 78(3), 301-308.
- Savocchia, S., Steel, C.C., Stodart, B.J., Somers, A. (2015) Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis*, 46(1), 27-32.
- Schloss, P.D., Hay, A.G., Wilson, D.B., Walker, L.P. (2003) Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 46(1), 1-9.
- Surico, G., Mugnai, L., Marchi, G. (2006) Older and More Recent Observations on Esca: A Critical Overview. in: *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 45, University of Florence. Florence, Italy, pp. 68-86.

Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems

- Waite, H., Morton, L. (2007) Hot Water Treatment, Trunk Diseases and Other Critical Factors in the Production of High-Quality Grapevine Planting Material. in: Phytopathol. Mediterr., Vol. 46, University of Florence. Florence, Italy, pp. 5-17.
- Zhu, N. (2006) Composting of high moisture content swine manure with corncob in a pilot-scale aerated static bin system. *Bioresour. Technol.*, 97(15), 1870-1875.
- Zucconi, F., Monaco, A., Debertoldi, M. (1981) Biological evaluation of compost maturity. *Biocycle*, 22(4), 27-29.

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots



4 Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated *in vitro* in pruned vine shoots

4. Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

Petruta M. Matei^a, Pablo Martín-Ramos^{*b}, Mercedes Sánchez-Báscones^a, M. Cruz García-González^c, M. Teresa Martín-Villullas^{a,c}, Salvador Hernández-Navarro^d, Luis M. Navas-Gracia^d and Jesús Martín-Gil^d

^a Agriculture and Forestry Science Department, ETSIIAA, Universidad de Valladolid, Avenida de Madrid 57, 34004 Palencia, Spain.

^b Department of Agricultural and Environmental Sciences, Higher Polytechnic School of Huesca, University of Zaragoza, Carretera de Cuarte, s/n, 22071 Huesca, Spain. E-mail: pmr@unizar.es; Tel: +34 (974) 292668; Fax: +34 (974) 239302.

^c ITACYL, Finca Zamadueñas, Ctra. de Burgos, km. 119, 47071 Valladolid, Spain.

^d Agriculture and Forestry Engineering Department, ETSIIAA, Universidad de Valladolid, Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, Spain.

4.1 Abstract

The upsurge in fungal diseases that cause grapevine wood rot in young and adult plants remains a major concern for the wine sector. So as to study the effectiveness of heat treatments for the sanitization of pruning waste, the thermal death of two inocula of *Diplodia seriata* fungus -associated to black dead arm disease- was studied *in vitro* at different temperatures in a dry air incubator, confirming that inhibition increased as a function of temperature and exposure time. First-order and Weibull models were compared to describe *D. seriata* fungus survival curve kinetics, with high R^2 values (0.923 and 0.930, respectively) and high significances ($p < 0.001$) for both models. According to the first-order model, the time required to reach 100% mortality at 65 °C was 120 min (or 93 min to 95%), whereas for the Weibull model a 90% reduction was attained after 73 min.

Keywords: activation energy, *Diplodia seriata*, isolated fungus, pruned vine shoots, thermal death kinetics

4.2 Introduction

Diplodia seriata is a phytopathogenic fungus, belonging to the *Botryosphaeriaceae* family, which can be isolated from plants affected from black dead arm disease (BDA) and that causes serious infections to both vineyards and fruit trees (Larignon et al., 2001; Savocchia et al., 2015) (Niekerk et al., 2006). In Spain, *D. seriata* has become one of the most prevalent pathogens associated with grapevine (*Vitis vinifera* L.) diseases. Along with *D. mutila*, it is usual in mature plants (older than five years), while the incidence of *Botryosphaeria spp* infection in young plants is very variable (Martin & Cobos, 2007).

It is well known that pruning wounds are the main route of infection by pathogens of fungal diseases and that their incidence is higher in pruned vines (vs. unpruned vines). It is also known that *D. seriata* fungus is one of the most active pathogens and its infection is observable after the period of bleeding and usually appears in rainy periods with temperatures in the 10-16 °C range (Larignon et al., 2009).

Pathogenic fungi that live in the tissues of the phloem and xylem of vines cannot be controlled with fungicides (Groenewald et al., 2000; Jaspers, 2001), so the best alternative for an adequate sanitization of grapevine plant material is a combination of different control strategies (Agustí-Brisach et al., 2015). Biological-chemical treatments have been used to disinfect pruning waste (Matei et al., 2015) or to eliminate postharvest fungi in fruit (Nunes, 2011). Other suggested approaches include UV illumination directly onto the fruits or foods (Beigi et al., 2015; Syamaladevi et al., 2015); a combination of ozone and pulsed UV light (Bialka et al., 2008); different pressures and temperatures (Da Rocha et al., 2011); soft thermal or ultrasonic methods to reduce the time and processing temperatures (Cheng et al., 2013; Evelyn et al., 2016); microwave, radiofrequency and gamma radiation (Cheng et al., 2013; Mitcham et al., 2004) or photodynamic therapy (Alves et al., 2015).

Another alternative for the control of these pathogenic fungi are thermal methods, such as the application of composting techniques (Matei et al., 2014) or treatments with hot water (Bleach et al., 2009; Gramaje et al., 2010b). In the composting process, the

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

addition of poultry manure to the pruning waste was shown to cause a temperature increase up to 70 °C, favoring the elimination of potential pathogens in the final product (Matei et al., 2014), while in plant nurseries it was feasible to control the fungi that cause Petri disease by applying treatments with hot water at 53 °C for 60 min, without a negative impact on the grapevine tissues (Gramaje et al., 2010b; Waite & Morton, 2007).

For the success of these later methods, studies on thermal death curves of inocula of fungi from the *Botryosphaeriaceae* family can be regarded as a basic prerequisite, provided that insight on how to disinfect the propagation material in nurseries is needed (Fourie & Halleen, 2004; Pascoe et al., 2001). In addition to the work of Gramaje et al. (2010b), who conducted studies of the decline of young vine plants associated with black foot disease (caused by *Cylindrocarpon spp*) and its inhibition by *in vitro* treatments with hot water, Bendek et al. (2007) also evaluated the infection risk assessment index and the effect of temperature and humidity on the germination of conidia of *Erysiphe necator*, but little is known about the actual effects of temperature and heating time on the growth of *D. seriata* fungus.

Consequently, the main goal of this study has been to evaluate *in vitro* the thermal death of two inocula of *D. seriata* fungus in vine pruning waste by comparing four isothermal treatments and different holding times in an incubator stove with hot dry air. The choice of dry air (instead of hot water or damp air) is supported by the fact that water would facilitate the fungal germination processes (Agustí-Brisach et al., 2015; Arauz, 1989). In addition, kinetic models derived from thermal mortality data -which may be useful so as to know the survival rate and predict lethal times- are presented, as a first step towards the design of new treatment protocols that can preclude the spreading of this disease.

4.3 Material and methods

4.3.1 Fungal isolates

The two *D. seriata* fungal isolates (Y84-I-1a and Y207-I-1c) were supplied by ITACYL (Agrarian Technology Institute of Castilla-León, Spain) and had been obtained from *Tempranillo* variety vines older than 5 years, from Toro Designation of Origin

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

(Castilla y León, Spain), affected by fungal diseases (*Eutipiosis* and *Esca*). The fungal isolates, upon assignation of a reference number, were stored at 4 °C, replicated in potato dextrose agar (PDA, prepared from 12 g of Merck PDA in 750 mL of distilled water) and sterilized in an autoclave (Mediclave J.P. Selecta 4047725) at 100°C for 45 min. So as to prevent bacterial growth, 3.75 mL of chloramphenicol (0.25 g/L, Merck) were added.

4.3.2 Inoculation process

On a plot of 16 ha of supposedly healthy vines (variety *Tempranillo*), in a vineyard located in Cubillas de Santa Marta (Valladolid, Spain), it was found –on the basis of external symptoms and during a 5 year period- that 1.5% of the vines suffered from *Eutipiosis* and 1.3% of the vines were affected by *Esca*. For the process of inoculation with *D. seriata* fungus, pruned shoots were collected from the allegedly healthy vines and were cut into 15-20 cm pieces, which had 2 or 3 leaf buds. The pieces were washed with water and soap, disinfected and dried under UV light for 30 min in a laminar flow cabinet. The application of the fungal mycelium was performed under UV light, after having made a basal cut into the selected pieces of pruned shoots. The inoculated branches were placed in test tubes and stored on racks at 25°C in the dark for a period of 3 months. Subsequently, batches of five of these inoculated shoots (provided that five repetitions were carried out for each assay) were selected in order to control their sanitization by isothermal treatment in a bacteriological air convection incubator.

4.3.3 Thermal treatments and mycelium growth studies

The heat treatment of the samples inoculated and infected with fungal isolates of *D. seriata* (*Y84-1-1a* and *Y207-1-1c*) was performed in an Incubat JP Selecta 2000994 hot air bacteriological incubator with natural convection, which allowed to adjust the temperature from 5 °C to 80 °C, with a stability of ± 0.1 °C and a uniformity of ± 0.5 °C at 37 °C. The 15 to 20 cm-long pieces of the inoculated pruned vine shoots were covered in aluminum foil (Albal R) and placed in the incubator. Isothermal studies were performed at 40, 50, 60 and 65 °C for different time periods (20, 40, 60, 80, 120 and 150 min).

Subsequently, for the analysis of the mycelial growth, chips (tissue samples) were obtained from the base of the vine shoots and seeded in Petri dishes at room temperature

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

(25 °C) in a malt extract agar (MEA, Merck) medium, previously prepared and sterilized (17 g of MEA were dissolved in 750 mL of distilled water to which 0.75 mL of Dieldrin acaricide (0.2 g/L, Sigma) were added). In order to induce sporulation and growth of the *D. seriata* fungus, 5 replicates were carried out in Petri dishes in a PDA medium (i.e., 4-mm diameter agar plugs with the mycelia on top were transferred to the center of the PDA plates) and were incubated in the dark at 25 °C for 10 days, in alternating cycles of 12 hours of darkness and 12 hours of near-UV light (Martín & Martín, 2013).

The radial growth rate of each fungal isolate (in cm/day) was measured along two perpendicular axes for each Petri dish and the percentage of mycelium growth *versus* that of the control (without heat treatment) was calculated as $(x/y) \cdot 100$, where x = mean value for the five plates seeded with an isolate (in cm) and y = average value for the five control plates (8.5 cm), determining also the standard deviations.

D. seriata isolates were identified by macroscopic characteristic features, such as the texture of the colonies, the color of the mycelium in the MEA medium, the shape of the margin of the fungus in the Petri dish or spore morphology and conidiogenous cells (Vicent et al., 2001). Data analysis was subsequently conducted in OriginPro 2015 (OriginLab Co.).

4.3.4 *D. seriata* fungus thermal death studies using kinetic models

The analysis to the kinetics of thermal death for *D. seriata* fungus was conducted taking the average mycelial growth percentage values of the two isolates of *D. seriata* fungus for the different treatment temperatures/times, and using either a first-order kinetic model or Weibull model.

(i) *Linear kinetic model*

The general equation used was (Eq. 1):

$$\frac{d\left(\frac{N}{N_0}\right)}{dt} = -k \left(\frac{N}{N_0}\right)^{1-n} \quad [1]$$

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

The integration of Eq. 1 yields the following expressions by taking the logarithm of both sides of the equation:

$$\begin{aligned}\left(\frac{N}{N_0}\right)^{1-n} &= -kt + c \quad n \neq 1 \\ \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) &= -kt + c \quad n = 1\end{aligned}\tag{2}$$

where N and N_0 are the surviving and initial percentages of *D. seriata* fungus; t (min) is the exposure time; k is the thermal death rate constant; and n is the kinetic order of the reaction.

The data were fit for each of the different reaction orders ($n=0, 0.5, 1$ or 1.5). On the basis of the average values of R^2 obtained for the different temperatures, the reaction order that led to the best overall fit was chosen, the constants of k and c were obtained from the regression equation, and the lethal times required to kill 95%, 99%, 99.33% and 99.99% of the fungus (LT_{95} , LT_{99} , and $LT_{99.33}$ and $LT_{99.99}$) were estimated. The thermal death curve was then obtained from the minimum exposure times required to attain 100% mortality of the fungus at each temperature (Wang et al., 2002) and the thermal death activation energy (E_a , J/mol) was determined by using Eq. 3. The activation energy is the minimum energy required to inhibit or prevent the growth of the fungus and reflects the sensitivity of the response of the fungus to temperature changes.

$$E_a = \frac{2.303 \cdot R \cdot T_{min} \cdot T_{max}}{z}\tag{3}$$

where R is the universal gas constant (8.314 J/mol·K), T_{min} and T_{max} are the minimum and maximum absolute temperatures (K) and z is the negative inverse of the slope of the thermal death curve (°C), which is equivalent to the rate constant and to the activation energy in the classical theory of reaction kinetics (Armstrong et al., 2009).

The activation energy can also be determined from the Arrhenius inactivation curve (Hallman et al., 2005) (Eq. 4), plotting $\log k$ versus the inverse of the absolute temperature ($1/T$) and considering that k_0 is the reference thermal death rate constant (min^{-1}):

$$\log k = \log k_0 \cdot \frac{E_a}{2.303 \cdot R \cdot T} \quad [4]$$

(ii) *Weibull kinetic model*

The thermal inactivation of *D. seriata* fungus can also be studied using the nonlinear Weibull kinetic model (Eq. 5), which describes the microbial inactivation by different methods (Bialka et al., 2008; van Boekel, 2002; Wang et al., 2002):

$$\log \left(\frac{N}{N_0} \right) = -\frac{1}{2.303} \cdot \left(\frac{t}{\alpha} \right)^\beta \quad [5]$$

where N and N_0 are again are the surviving and initial percentages of *D. seriata* fungus; t (min) is the holding time; α is the characteristic time or scale parameter (min); and β is the curve shape parameter (dimensionless).

Depending on the value of the shape parameter β , the inactivation curve can be upward concave ($\beta < 1$), if the remaining fungus has the ability to adapt to the applied stress and it is more difficult to inactivate it; linear ($\beta = 1$) or downward concave ($\beta > 1$), when the remaining fungus becomes increasingly more damaged. Moreover, the reliable life (t_R), i.e., the 90% percentile of the failure time distribution, can be determined from α and β using Eq. (6):

$$t_R = \alpha \cdot (2.303)^{\frac{1}{\beta}} \quad [6]$$

(iii) *Data fitting*

The data were fit (according either to Eq. 2 or to Eq. 5) using a Levenberg-Marquardt iteration algorithm with a χ^2 tolerance of $1 \cdot 10^{-15}$ in OriginPro 2015 (OriginLab Co.). The goodness of fit was evaluated by means of the mean square error obtained from the ANOVA tables.

4.4 Results and discussion

4.4.1 Effect of the treatment temperature/holding time on the growth of the *D. seriata* inoculates

The effect of treatment temperature and time on mycelial growth for the two isolates of *D. seriata* (*Y84-1-1a* and *Y207-1-1c*) is summarized in Figure 4.1, which shows the percentage of mycelial growth at four different temperatures (40, 50, 60 and 65 °C) in an atmosphere of dry hot air for different holding times (namely, 20, 40, 60, 90, 120 and 150 min).

It may be concluded that a gradual and significant inhibition of mycelial growth occurs with time and temperature for both isolates, with slightly higher significance levels for the second isolate (*Y207-1-1c*, $p < 0.01$) than for the first one (*Y84-1-1a*, $p < 0.05$) (see Table 4.1).

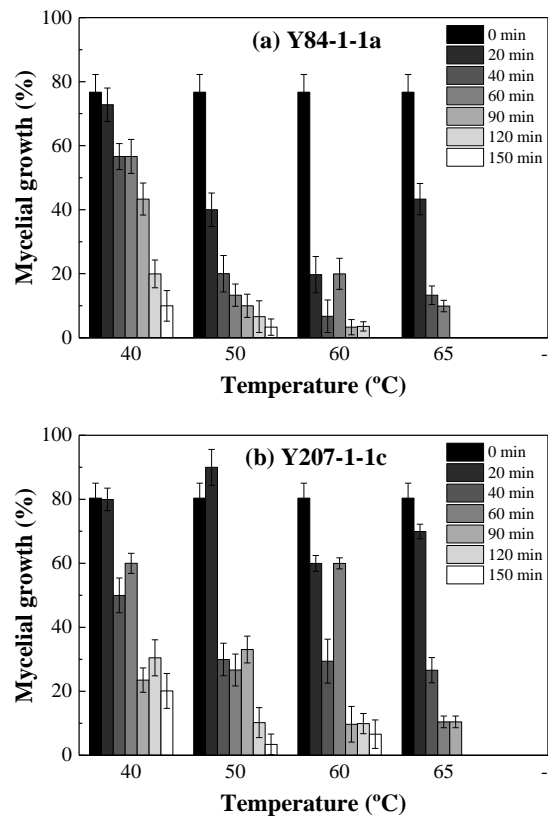


Figure 4.1 Percentage of mycelial growth at different treatment temperatures and for various holding times for the two isolates of *D. seriata*: (a) Y84-1-1a and (b) Y207-1-1c. The same temperature-time combinations were assessed for the two isolates. All values are given in average and standard deviations have been determined from the five repetitions conducted for each assay.

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

Tabla 4.1 Regression analysis of the effect of temperature and holding time on mycelial growth for the two *D. seriata* isolates

Temperature		Y84-1-1a isolate				Y207-1-1c isolate				
		DF	MS	R ²	P>F	DF	MC	R ²	P>F	
40°C	Regression	1	3761.82	0.972	<0.001	Regression	1	3304.90	0.845	0.003
	Residual	5	21.16			Residual	5	120.48		
50°C	Regression	1	2817.86	0.689	0.020	Regression	1	5145.06	0.778	0.008
	Residual	5	253.27			Residual	5	293.01		
60°C	Regression	1	2278.06	0.526	0.060	Regression	1	4086.59	0.765	0.009
	Residual	5	410.55			Residual	5	249.90		
65°C	Regression	1	3462.48	0.679	0.022	Regression	1	5121.60	0.766	0.009
	Residual	5	326.91			Residual	5	312.50		
Average	Regression	1	3080.06	0.717	0.026	Regression	1	4414.54	0.789	0.007
	Residual	5	252.97			Residual	5	243.97		

DF: degrees of freedom; MS: mean square

Previous studies in nurseries on pathogenic fungi (*Cylindrocarpon* spp.) concluded that standard protocols with hot baths at 50°C for 30 min were essential and that treatments at higher temperature would be required to reduce its incidence (Edwards et al., 2004; Fourie & Halleen, 2004; Gramaje et al., 2010a; Halleen et al., 2007; Swart et al., 2001; Waite & May, 2005). Moreover, Bleach et al. (2009) confirmed that higher temperatures are required for the complete elimination of infections that occur when the pathogen affects the wood of one year-old cuttings. According to these observations, it can be inferred that *D. seriata* fungus inocula would have greater thermotolerance than black foot disease (*Cylindrocarpon* spp) and that a temperature of 65 °C for two hours (120 minutes) would be needed so as to achieve total sanitization when we resort to a hot air treatment.

4.4.2 Thermal death kinetic model for *D. seriata* fungus

Table 4.2 summarizes the coefficients of determination (R^2) for different reaction orders (n) at the four treatment temperatures (40, 50, 60 and 65°C) under study, taking the average values of the percentage of mycelial growth of the two *D. seriata* isolates (*Y84-1-1a* and *Y207-1-1c*). The choice of the 1st-order kinetic model is supported by the

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

fact that it has the highest average regression coefficient value (average R^2 value: 0.9228; $p < 0.01$).

Tabla 4.2 Coefficients of determination (R^2) from each of the n -order kinetic models for the thermal mortality of *D. seriata* at four different temperatures.

Temperature (°C)	$n = 0$	$n = 0.5$	$n = 1$	$n = 1.5$	$n = 2$
40	0.94132	0.95716	0.94659	0.90561	0.83871
50	0.75416	0.87772	0.92595	0.83351	0.67951
60	0.64358	0.76593	0.85172	0.87096	0.82193
65	0.68859	0.90463	0.96705	0.96339	0.89095
Average	0.75691	0.87636	0.92282	0.89336	0.80777

The fits for the thermal death curves of *D. seriata* for the selected 1st-order kinetic model are shown in Figure 4.1, and the calculated k and c values at the various temperatures are summarized in Table 4.1. It is worth noting that the thermal death rate constant values increase with increasing temperature (trebling from 0.0112 at 40 °C to 0.0326 at 65 °C).

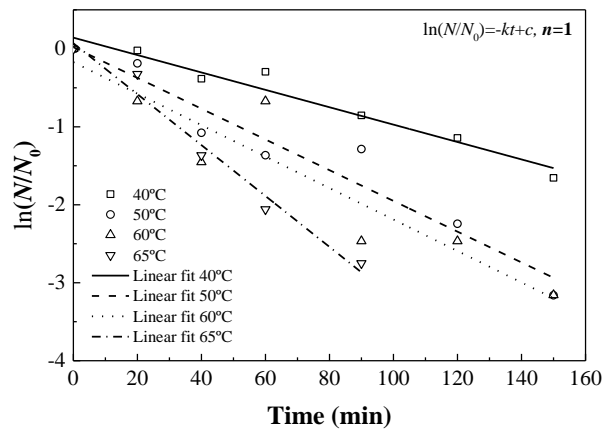


Figure 4.2 Thermal mortality curves of *D. seriata* at different temperatures and holding times with their 1st-order linear fits

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

Tabla 4.3 Thermal death constants for the 1st-order kinetic model for *D. seriata* fungus at different temperatures.

Temperature (°C)	$\ln(N/N_0) = -kt + c$	
	k	c
40	0.0112	0.1432
50	0.0197	0.0209
60	0.0201	0.1714
65	0.0326	0.0706

Table 4.4 presents the observed minimum exposure time required to achieve 100% growth inhibition at 65 °C and the estimated LT₉₅, LT₉₉, LT_{99.33} and LT_{99.99} lethal times, i.e., the time needed to kill 95, 99, 99.33 and 99.99% of the test mycelia, which correspond to 92.7, 114.5, 116.3 and 119.9 min, respectively. The observed minimum time and the predicted LTs are very close and suggest that 2 hours at 65 °C in dry hot air would be required for proper sanitization of the pruned vine shoots inoculated with *Diplodia seriata*.

Tabla 4.4 Comparison of the lethal time obtained experimentally for *D. seriata* at 65 °C with those estimated from the 1st-order kinetic model.

Temperature (°C)	N ₀ (%)	Minimum time for 100% suppression of <i>D. seriata</i>	Predicted treatment time (min) (95% CI)			
			LT ₉₅	LT ₉₉	LT _{99.33}	LT _{99.99}
65	78.3	120	92.7	114.5	116.3	119.9

4.4.2.1 Thermal death curve and activation energy for *D. seriata* fungus

The thermal death time curve for *D. seriata* is plotted in Figure 4.3 (a). The fit was obtained by linear regression and could be described by the equation $\log t = 2.508 - 0.0157T$ ($R^2 = 0.9561$), where t is the exposure time (min) and T is the temperature (K). The z value obtained from the negative inverse of the slope of the curve was 3.9 °C and the activation energy was 508 kJ/mol (Eq. 3).

Figure 4.3 (b) shows the Arrhenius plot for the impact of temperature on the fungus inhibition percentage. The linear fit corresponded to the following equation: $\log k = 3.4518 - 1.6882 \times 1/T \times 1000$ ($R^2 = 0.8834$), where k is the thermal death rate constant and

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

T is the treatment temperature (K). The activation energy -obtained from the slope of the regression equation using Eq. 4- in this case was 513 kJ/mol, very similar to that calculated by previous procedure.

In the literature there are studies on the thermal stability of *Agaricus bisporus* (Labus et al., 2015); of fungi in pizzas (Beigi et al., 2015); of *Byssoschlamys nivea* and *Neosartorya fischeri* ascospores, present in pineapple and apple juices (Da Rocha et al., 2011; Evelyn et al., 2016); and of insects (Gazit et al., 2004; Hallman et al., 2005; Wang et al., 2002; Yan et al., 2014). For instance, Yan et al. (2014) determined the thermal death kinetics of insects under different heating conditions for the development of treatment protocols and postharvest disinfection, and found that they follow a zero-order kinetic model with a minimum activation energy of 505 kJ/mol in order to kill *Sitophilus oryzae*, very similar to the thermal sensitivity of *D. seriata*.

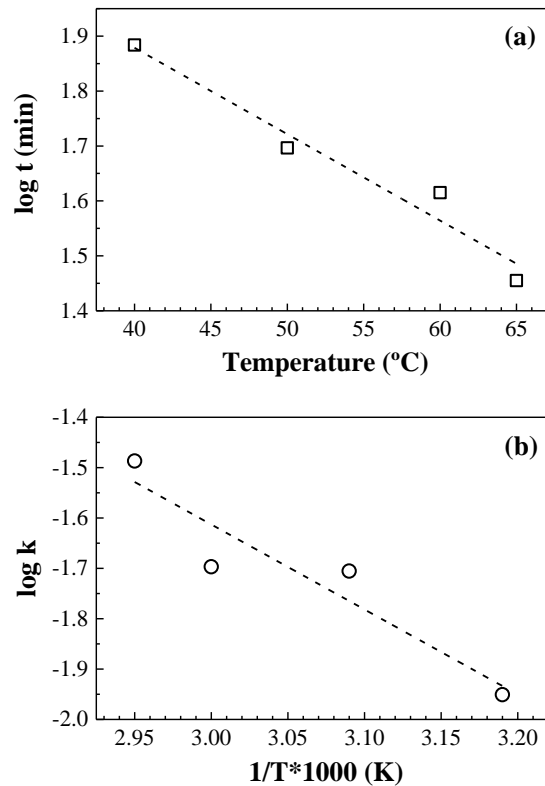


Figura 4.3 (a) Thermal mortality curve for *D. seriata* and (b) Arrhenius plot for temperature effects on thermal death rates of *D. seriata*.

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

4.4.2.2 Weibull model for *D. seriata* thermal death

The mortality curves at four different temperatures for *D. seriata* and their best fits using non-linear Weibull model are depicted in Figure 4.4. The fit results are summarized in Table 4.5. It can be observed that there is a trend in the decrease in the shape parameter β as the temperature is increased, which is also evident for the scale parameter α and the reliable life (t_R) values. Although the most important drawback of Weibull model is the lack of biological significance of its parameters, which limits their application, it is worth noting that for exposure times of the same order of magnitude of the scale parameter α , inactivation increased with decreasing α values, in good agreement with the literature (e.g., (Dao et al., 2010)).

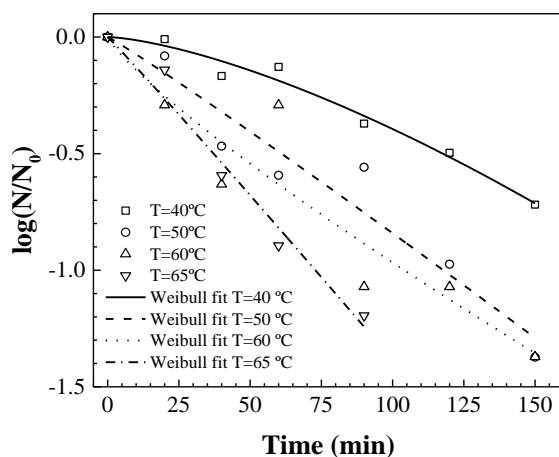


Figura 4.4 Survival curves of *D. seriata* at different temperatures in dry hot air as a function of the exposure time and their corresponding Weibull fits

Tabla 4.5 Inhibition parameters for *D. seriata* mycelia from the fits of the Weibull model to the inactivation curves.

Temperature (°C)	α	β	t_R	MS	R^2	p
40	106.781	1.460	189.078	0.468	0.973	0.00005
50	53.336	1.053	117.782	1.819	0.927	0.0001
60	38.215	0.833	104.030	2.279	0.855	0.0005
65	32.408	1.029	72.901	1.287	0.965	0.0012

According to the linear model, the time required to produce 100% mortality for *D. seriata* at 65 °C was 120 min (or 93 min to 95%), whereas for the Weibull model a 90%

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

reduction would be attained after 73 min, a value that again indicates that this pathogen is more resistant and difficult to eradicate than *Cylindrocarpon* spp (Bleach et al., 2013; Gramaje et al., 2010a). The heating rate may also have a significant effect on mortality (Evans, 1987; Neven, 1998), since the species may undergo acclimatization to a relatively slow warming and thus increase their thermotolerance. Further research so as to evaluate this later aspect.

4.5 Conclusions

The thermal death of a particularly virulent grapevine pathogen associated with black death arm disease, *Diplodia seriata*, has been studied by heat treatment with dry air at temperatures in the 40 to 65 °C range, assessing exposure times ranging from 20 to 150 min. The results confirmed that inhibition increased with increasing treatment temperature and holding times. The thermal death curves from the average values of the two fungal isolates could be fit to a first-order reaction kinetic model ($R^2=0.923$) or to a Weibull model ($R^2=0.930$), with very high significances in both cases ($p < 0.001$). From the linear model parameters, lethal exposure times required to kill 95%, 99%, 99.33% and 99.99% of the pathogen were estimated to be 92.7, 114.5, 116.3 and 119.9 min at 65°C, respectively. Moreover, an activation energy of 508 kJ/mol (very close to the activation energy determined from the Arrhenius plot, 513 kJ/mol) and a z value of 3.9 °C were determined. On the other hand, Weibull model generally showed inhibition curves with downward concavity ($\beta > 1$), indicative of the fact that remaining fungus became increasingly more damaged. According to this model, at 65°C, the time required to kill >90% of the fungus (t_R) would be significantly shorter: 72.9 min (R^2 of 0.965, $p < 0.001$).

4.6 References

- Agustí-Brisach, C., León, M., García-Jiménez, J., Armengol, J. 2015. Detection of Grapevine Fungal Trunk Pathogens on Pruning Shears and Evaluation of Their Potential for Spread of Infection. *Plant Dis.*, **99**(7), 976-981.
- Alves, E., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.P.M.S., Cunha, Â., Nadais, H., Almeida, A. 2015. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **22**, 34-57.
- Arauz, L.F. 1989. Influence of Temperature and Moisture on Germination of Ascospores and Conidia of *Botryosphaeria obtusa*. *Phytopathology*, **79**(6), 667.
- Armstrong, J.W., Tang, J., Wang, S. 2009. Thermal Death Kinetics of Mediterranean, Malaysian, Melon, and Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Eggs and Third Instars. *J. Econ. Entomol.*, **102**(2), 522-532.
- Beigi, T.M., Ngadi, M.O., Holman, D.B., Chénier, M.R. 2015. Analysis of Fungal Diversity in Ready-to-Eat Pizza and Effectiveness of Pulsed Ultraviolet-Light Treatment for Inactivation of Mold on Agar Surface. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, **5**(5), 228.
- Bendek, C.E., Campbell, P.A., Torres, R., Donoso, A., Latorre, B.A. 2007. The risk assessment index in grape powdery mildew control decisions and the effect of temperature and humidity on conidial germination of *Erysiphe necator*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **5**(4), 522-532.
- Bialka, K.L., Demirci, A., Puri, V.M. 2008. Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on raspberries and strawberries resulting from exposure to ozone or pulsed UV-light. *J. Food Eng.*, **85**(3), 444-449.
- Bleach, C., Jones, E., Ridgway, H., Jaspers, M. 2013. Hot water treatment to reduce incidence of black foot pathogens in young grapevines grown in cool climates. *Phytopathol. Mediterr.*, **52**(2), 347-358.
- Bleach, C.M., E.E., J., M.V., J. 2009. Hot water treatment for elimination of *Cylindrocarpus* species from infected grapevines. *6th International Workshop on grapevine trunk diseases*, Florence, Italy. *Phytopath. Mediterranea*. pp. 183.

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

- Cheng, X.f., Zhang, M., Adhikari, B. 2013. The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments. *Ultrason. Sonochem.*, **20**(2), 674-679.
- Da Rocha, E., Rosenthal, A., Calado, V., Saraiva, J., Mendo, S., De Massaguer, P. 2011. Thermal inactivation of *Byssoschlamys nivea* in pineapple juice combined with preliminary high pressure treatments. *11th International Congress on Engineering and Food (ICEF)*, Athens, Greece. NTUA. pp. 1879.
- Dao, T., De Jardin, J., Bensoussan, M., Dantigny, P. 2010. Use of the Weibull model to describe inactivation of dry-harvested conidia of different *Penicillium* species by ethanol vapours. *J. Appl. Microbiol.*, **109**(2), 408-414.
- Edwards, J., Pascoe, I., Salib, S., Laukart, N. 2004. Hot water treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaeomoniella chlamydospora* in young vines. *Phytopathol. Mediterr.*, **43**, 158-159.
- Evans, D.E. 1987. The influence of rate of heating on the mortality of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *J. Stored Prod. Res.*, **23**(1), 73-77.
- Evelyn, Kim, H.J., Silva, F.V.M. 2016. Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. *Food Control*, **59**, 530-537.
- Fourie, P.H., Halleen, F. 2004. Proactive Control of Petri Disease of Grapevine Through Treatment of Propagation Material. *Plant Dis.*, **88**(11), 1241-1245.
- Gazit, Y., Rossler, Y., Wang, S., Tang, J., Lurie, S. 2004. Thermal Death Kinetics of Egg and Third Instar Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, **97**(5), 1540-1546.
- Gramaje, D., Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., Armengol, J. 2010a. Effect of hot-water treatments in vitro on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. *Ann. Appl. Biol.*, **156**(2), 231-241.
- Gramaje, D., Garcia-Jimenez, J., Armengol, J. 2010b. Field Evaluation of Grapevine Rootstocks Inoculated with Fungi Associated with Petri Disease and Esca. *American Journal of Enology and Viticulture*, **61**(4), 512-520.

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

- Groenewald, M., Denman, S., Crous, P.W. 2000. Fungicide sensitivity of *Phaeomoniella chlamydospora*, the causal organism of Petri grapevine decline. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **21**, 59–61.
- Halleen, F., Fourie, P.H., Crous, P.W. 2007. Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathol.*, **56**(4), 637-645.
- Hallman, G.J., Wang, S., Tang, J. 2005. Reaction Orders for Thermal Mortality of Third Instars of Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, **98**(6), 1905-1910.
- Jaspers, M.V. 2001. Sensitivity of *Phaeomoniella chlamydospora* to fungicides *in vitro*. *New Zealand Plant Protection*, **54**, 225-228.
- Labus, K., Bryjak, J., Polakovič, M. 2015. Kinetics of thermal inactivation of immobilized *Agaricus bisporus* tyrosinase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **120**, 136-140.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C., Bertsch, C. 2009. Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *C. R. Biol.*, **332**(9), 765-783.
- Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L., Dubos, B. 2001. Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathol. Mediterr.*, **40**(3), 336-342.
- Martín, L., Martín, M.T. 2013. Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. *Crop Protect.*, **52**, 141-150.
- Martin, M.T., Cobos, R. 2007. Identification of Fungi Associated with Grapevine Decline in Castilla y León (Spain). in: *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 46, University of Florence. Florence, Italy, pp. 18-25.
- Matei, P.M., Martín-Ramos, P., Sánchez-Báscones, M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Navas-Gracia, L.M., Rufino, C.A., Ramos-Sánchez, M.C., Martín-Gil, J. 2015. Synthesis of Chitosan Oligomers/Propolis/Silver Nanoparticles Composite Systems and Study of Their Activity against *Diplodia seriata*. *Int. J. Polym. Sci.*, **2015**, 1-11.

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

- Matei, P.M., Sánchez Báscones, M., Martín-Villullas, M.T., Díez-Gutiérrez, M.A., García-González, M.C. 2014. Eficiencia del compostaje de sarmientos de vid mediante pilas abiertas como método de higienización. *IV Jornadas de la Red Española de Compostaje. De Residuo a Recurso: Estrategias de gestión tratamiento y valorización en el Horizonte 2020*, 12-14 November 2014, Murcia, Spain. Red Española de Compostaje. pp. 156-160.
- Mitcham, E.J., Veltman, R.H., Feng, X., de Castro, E., Johnson, J.A., Simpson, T.L., Biasi, W.V., Wang, S., Tang, J. 2004. Application of radio frequency treatments to control insects in in-shell walnuts. *Postharvest Biol. Technol.*, **33**(1), 93-100.
- Neven, L.G. 1998. Effects of Heating Rate on the Mortality of Fifth-Instar Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.*, **91**(1), 297-301.
- Niekerk, J.M., Fourie, P.H., Hallenn, F., Crous, P. 2006. Botryosphaeria spp. as Grapevine Trunk Disease Pathogens. *Phytopathol. Mediterr.*, **45**, 43-54.
- Nunes, C.A. 2011. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur. J. Plant Pathol.*, **133**(1), 181-196.
- Pascoe, I.G., Edwards, J., Nguyen, N.K., Laukart, N. 2001. Curative Treatments Tried on Young Grapevines Infected with «*Phaeoconiella chlamydospora*». *Phytopathol. Mediterr.*, **40**(3), 459-463.
- Savocchia, S., Steel, C.C., Stodart, B.J., Somers, A. 2015. Pathogenicity of Botryosphaeria species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis*, **46**(1), 27-32.
- Swart, L., Crous, P.W., Coertze, S. 2001. The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy cuttings. *Phytopathol. Mediterr.*, **40**(3), 464-466.
- Syamaladevi, R.M., Adhikari, A., Lupien, S.L., Dugan, F., Bhunia, K., Dhingra, A., Sablani, S.S. 2015. Ultraviolet-C light inactivation of *Penicillium expansum* on fruit surfaces. *Food Control*, **50**, 297-303.
- van Boekel, M. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.*, **74**(1-2), 139-159.
- Vicent, A., García-Figueroles, F., García-Jiménez, J., Armengol, J., Torné, L. 2001. Fungi Associated with Esca and Grapevine Declines in Spain: A Three-Year Survey. in:

Thermal death kinetics of *Diplodia seriata* fungus inoculated in vitro in pruned vine shoots

Phytopathol. Mediterr., Vol. 40, University of Florence. Florence, Italy, pp. 325-329.

Waite, H., May, P. 2005. The Effects of Hot Water Treatment, Hydration and Order of Nursery Operations on Cuttings of *Vitis vinifera* Cultivars. in: *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 44, University of Florence. Florence, Italy, pp. 144-152.

Waite, H., Morton, L. 2007. Hot Water Treatment, Trunk Diseases and Other Critical Factors in the Production of High-Quality Grapevine Planting Material. in: *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 46, University of Florence. Florence, Italy, pp. 5-17.

Wang, S., Tang, J., Johnson, J.A., Hansen, J.D. 2002. Thermal-death kinetics of fifth-instar *Amyelois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored Prod. Res.*, **38**(5), 427-440.

Yan, R., Huang, Z., Zhu, H., Johnson, J.A., Wang, S. 2014. Thermal death kinetics of adult *Sitophilus oryzae* and effects of heating rate on thermotolerance. *J. Stored Prod. Res.*, **59**, 231-236.

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*



5 Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

5. Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

Petruta Mihaela Matei¹, Pablo Martín-Ramos^{1,2*}, Mercedes Sánchez-Báscones¹, Salvador Hernández-Navarro¹, Adriana Correa-Guimaraes¹, Luis M. Navas-Gracia¹, Cassyo Araujo Rufino³, M. Carmen Ramos-Sánchez⁴ and Jesús Martín-Gil¹

¹ Department of Agricultural and Forestry Engineering, Higher Technical School of Agricultural Engineering, University of Valladolid. Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, Spain

² Department of Agricultural and Environmental Sciences, Higher Polytechnic School of Huesca, Universidad de Zaragoza, Carretera de Cuarte s/n, 22071, Huesca, Spain.

³ Ciência e Tecnologia de Sementes Laboratory, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Pelotas, Brazil

⁴ Hospital Universitario Río Hortega, Calle Dulzaina 2, 47012 Valladolid, Spain

5.1 Abstract

The synthesis and characterization of composites of oligomeric chitosan with propolis extract which allow the incorporation of a third component (silver nanoparticles) are reported, together with their application in aqueous or hydroalcoholic solutions with a view to the formation of adhesive substances or nanofilms for the protection of vineyards against harmful xylophagous fungi. The antimicrobial properties of the association of the two biological products or resulting from the incorporation of silver nanoparticles (NPs) are studied and discussed. The efficacy of the chitosan oligomers/propolis/silver NPs ternary system is assessed *in vitro* for *Diplodia* fungi. A preliminary study on the convenience of replacing propolis with gentisic acid is also presented.

5.2 Introduction

With regard to hybrid materials, there is a growing realization of the importance of focusing on low-cost, environmentally-friendly biopolymers. The natural, biodegradable and biocompatible chitosan (glucosamine polymer with β -1,4 bonds), formed by the

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

alkaline N-deacetylation of chitin, is one the most promising candidates, due to its ability to form films, transparency, non-toxicity, excellent adsorption features, etc. [1].

In addition, chitosan has been found to have antimicrobial properties [2,3], in which the size of its oligomers plays a key role [4]. For example, heptamers and higher oligomers induce an increase of pisatin, an antifungal substance from *Pisum sativum* L. [5]. It has also been demonstrated that polymeric chitosan and chitosan oligomers induce phytoalexins or antimicrobial compounds that help limit the spread of pathogens [6]. Chemical synthesis of different sizes of chitosan oligomers with specific biological activity has been described by Kuyama *et al.* [7].

Several possible mechanisms have been proposed to explain the antibacterial properties of chitosan: it is known that positively charged amine groups are capable of interacting with the negatively charged bacterial cell membrane and, in addition, chitosan may also bind to DNA, leading to inhibition of mRNA and proteins synthesis [8].

On the other hand, other substances -such as propolis- are also known to have antimicrobial properties and are extensively used in traditional medicine [9,10]. Propolis is a natural resinous hive product collected by honeybees from various plant sources [11] and which contains over 150 chemical species (such as coumarins, flavonoids, polyphenols, phenolic aldehydes, sesquiterpene quinines, amino acids, and steroids) [12]. Its strong antimicrobial activity may be due to the high content of total phenols and flavonoids [9]. Propolis has also been found to have applications as an antioxidant and in food preservation [13].

Silver nanoparticles have been deemed as one of the most promising antimicrobial species from a nanotechnology-based approach, since their activity is very broad and is well above that of raw silver. For example, silver ions can bind to negatively charged bacterial peptidoglycan walls and can diffuse into bacterial cells and bind to DNA bases, leading to bacterial death and/or inhibiting the replication and transcription processes and preventing further bacterial production [14]. Moreover, the generation of reactive oxygen species, which leads to nanotoxicity processes, is also a well-established antimicrobial mechanism. The main disadvantages that limit the use of nanosilver are its

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

ease of aggregation and the uncontrolled release of silver ions and their cytotoxicity potential [15].

The combination of polymers and nanosilver may synergistically improve their antimicrobial effects, and the use of *in situ* synthesis methods allows its incorporation into the polymer matrix attaining uniform distributions and avoiding aggregation. We herein report a facile synthesis procedure based on a sonochemistry approach for the preparation of a new ternary composite material -which consists of chitosan oligomers, propolis and silver NPs- and study its antimicrobial properties against *Diplodia seriata* fungus.

It is known that the xylophagus fungi present in greater proportion and that irretrievably cause plant death of the vine are, firstly, *Diplodia seriata*, followed by *Phaeoacremonium aleophilum*, *Cylindrocarpon spp.*, *Fomitiporia punctata* Murrill, *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Botryosphaeria dothidea*, *Stereum hirsutum* and *Eutypa lata* [16]. This disease is considered highly virulent because the infection is caused by fungi entry through wounds caused by vine pruning [17-19].

In the literature, Prakongkha *et al.* [20] proposed the use of bare chitosan in vineyards; Matei *et al.* reported that chitosan can inhibit *Esca* (a vine disease that ravaged vineyards from Cognac to Bordeaux, France) mycelia growth by 90% [21]; and Aziz *et al.* [22] successfully demonstrated that octameric chitosan oligomers doped with copper sulfate can induce defense reactions of the vine and resistance to gray mold and mildew. Other authors have assessed the antimicrobial properties for chitosan/nanosilver [23-26]. Nonetheless, to the best of the authors' knowledge, no studies have been conducted on ternary composites. In this paper, we assess how the presence of chitosan oligomers -to which phenolic compounds such as phenolic acids and/or flavonoids have been incorporated- affords the composite with antioxidant and soluble compounds that can interact to form chelates or bridges with inorganic species in aqueous solution, such as silver NPs, leading to novel antimicrobial agents, without posing any danger to the plant or to the substrate wherein the composite material is applied. The association of the three components attempts to further improve the antimicrobial performance of their active principles in comparison to their separate application.

5.3 Materials and methods

5.3.1 Reagents and characterization equipment

Medium molar mass chitosan (CAS No. 9012-76-4) was purchased from Sigma Aldrich Química SL (Madrid, Spain) and from Hangzhou Simit Chemical Technology Co. Ltd (Hangzhou, China). Propolis came from Burgos region (Spain), in the Duero river basin, and has a polyphenols and flavonoids content of ca. 10% wt/v. Silver nitrate (CAS No. 7761-88-8) and malt extract agar (Ref. 105398) were supplied by Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Potassium methoxide solution (25 wt. % in methanol, CAS No. 865-33-8) and ethanol (puriss. p.a., ACS reagent, CAS No. 64-17-5) were also purchased from Sigma Aldrich Química SL. Gentisic acid (CAS No. 490-79-9) was supplied by Shanghai Vincor BioEngineering Co. Ltd (Shanghai, China). The isolated *Diplodia seriata* mycelium (Y207 1-1c) was supplied by ITACYL (Castilla y León, Spain).

An ultrasonic machine, model CSA 20-S500, 20 KHz has been used for solutions sonication.

X-ray powder diffractograms of the samples were obtained using a Bruker D8 Advance Bragg-Brentano diffractometer, in reflection geometry.

Infrared spectra were recorded with a Thermo Nicolet 380 FT-IR apparatus equipped with Smart Orbit Diamond ATR system, in order to identify the chemical functional groups.

Optical absorption spectra of the silver NPs in the UV-VIS region were recorded with a Shimadzu UV-2450 UV-Vis spectrophotometer.

Scanning electron microscopy (SEM) images were collected with a FEI - Quanta 200FEG equipped with a Genesis energy-dispersive X-ray (EDS) spectrometer system. Transmission electron microscope (TEM) micrographs were collected with a JEOL JEM-FS2200 HRP equipped with an Oxford instruments INCA Energy TEM 250 EDS probe.

5.3.2 Culture media and activity assays

The fungicidal action of the products under study was tested *in vitro* using malt extract agar (MEA) as a culture medium. In the study on the fungus, previously isolated

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

Diplodia seriata mycelia (Y207 1-1c) were used, which had been replicated in Petri dishes two weeks in advance at 25 °C. From the periphery of the pure culture, 7 mm diameter disks were cut and then transplanted into Petri dishes prepared with MEA in combination with one of the products under study (namely bare chitosan oligomers, propolis, chitosan oligomers/propolis, chitosan oligomers/silver NPs and chitosan oligomers/propolis/silver NPs). For the preparation of the base medium, 35 g of MEA were dissolved in 750 mL of distilled water, to which 2 mL of antibiotic (chloramphenicol) were added to prevent bacterial contamination, and the flasks with the mixture were then sterilized in an autoclave at 100 °C for 45 min. For the control, the culture medium “as-is” was placed in sterile Petri dishes (20 mL/dish) and allowed to cool before replication of the *Di. seriata* fungal mycelia. To prepare the Petri dishes for the different mixtures or combinations of chitosan oligomers/propolis/silver NPs, the culture medium was cooled to 50 °C and, at this temperature, 1.5 mL of the different solutions (see Table 5.1) were mixed with 18.5 mL of MEA and were poured into each Petri dish.

Tabla 5.1 Composition of each of the solutions mixed with MEA for the antifungal activity tests

Solution	Composition
1. Chitosan	20 mg of chitosan/1 mL of H ₂ O
2. Propolis	50 mg of propolis/1 mL of H ₂ O:ethanol (7:3)
3. Silver NPs	170 µg/1 mL of H ₂ O
4. Chitosan oligomers/propolis	1:1 ratio of solution (1) and solution (2)
5. Chitosan oligomers/silver NPs	8:1 ratio of solution (1) and solution (3)
6. Chitosan oligomers/propolis/silver NPs	8:8:1 ratio of solutions (1), (2) and (3), respectively

The solutions were then allowed to cool down to room temperature (RT) prior to replication of the fungus mycelia. Growth measurements were performed in triplicate. The diameter of fungal growth was measured on a daily basis for 20 days, and the inhibition percentage (IP) was calculated taking the pure MEA culture (control) as a reference according to Eq. 1 [27]:

$$\text{Inhibition percentage (\%)} = \frac{D_{mc} - D_{mp}}{D_{mc}} \times 100 \quad [1]$$

where D_{mc} is the diameter of the mycelium in the control (pure MEA) and D_{mp} is the diameter of the mycelium of the sample mixed with one of the antimicrobial composites.

5.3.3 Synthesis of solutions and films of chitosan oligomers, chitosan oligomers/propolis and chitosan oligomers/propolis/Ag NPs

5.3.3.1 Chitosan oligomers preparation

Chitosan oligomers aqueous solutions were prepared from a solution of commercial medium-molar mass chitosan (with molar masses in the 190000-310000 g/mol range for the Sigma Aldrich product and with molar masses in the 140000-300000 g/mol range for the Hangzhou Simit Chemical Technology Co. product) in AcOH 2% at pH 4-6. The hydrolysis was performed by stirring for 12 hours followed by 3-6 sonication periods (5 minutes each), at temperatures in the 30 to 60 °C range and with H₂O₂ concentrations ranging from 0.3 to 0.6 M, obtaining oligomers with molar masses in the 6000 to 2000 g/mol range, respectively, in agreement with the analogous microwave-based procedure reported by Sun *et al.* [28]. The molar mass of the chitosan samples was determined by measuring the viscosity, in agreement with Yang *et al.* [29], in a solvent of 0.20 mol/L NaCl + 0.1 mol/L CH₃COOH at 25 °C using an Ubbelohde capillary viscometer. Molar masses were determined using the Mark–Houwink equation $[\eta]=1.81 \times 10^{-3} M^{0.93}$ [30].

The solutions were then decanted to remove any water insoluble material, were allowed to rest till cloudiness was observed and were centrifuged to isolate the chitosan oligomers. These were re-dissolved again in AcOH 0.5%, obtaining the solutions for the assays.

5.3.3.2 Propolis extraction

The propolis solution was prepared by grinding raw propolis to fine powder and subsequent extraction of the active ingredients by maceration in a hydro-alcoholic solution 7:3 (v/v) for one week at room temperature. A hydro-alcoholic medium was chosen over absolute ethanol because it results in wax-free tinctures containing higher

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

amounts of polyphenolic substances [31]. The resulting solution was then percolated (1 L/min) and filtrated with a stainless steel 220 mesh to remove any residue, followed by concentration at a temperature below 60 °C with ultrasound equipment to finally obtain a clarified propolis extract.

5.3.3.3 Silver NPs preparation

Silver nanoparticles were prepared by a sonication method, without resorting to UV stabilization (used, for example, in [32]), as follows: an aqueous solution of AgNO₃ (50 mM) was treated with sodium citrate (30 mM) and the resulting solution was cooled and stirred at a temperature between 5 and 10 °C. Subsequently, it was deoxygenated with an inert gas (N₂) for over 30 minutes and the pH was adjusted between 7 and 8. Polyvinylpyrrolidone was added to prevent the silver nanoparticles aggregation. A 10 mM solution of NaBH₄ (reducing agent) was then added dropwise: the first droplet made the solution turn from colorless to yellowish and successive droplets led to an intensification of the yellow color (care had to be taken so as to avoid an excess of reducing agent, which would lead to a brownish color). After vigorous stirring for one hour, the yellowish solution was sonicated for 3-5 minutes and then allowed to rest and stabilize for at least 24 hours in a refrigerator at 5°C.

5.3.3.4 Binary and ternary solutions preparation

Chitosan oligomers/propolis solution was prepared by mixing the two components in a 1:1 w/v ratio (Table 5.1), followed by sonication, obtaining a caramel colored gel or precipitate, similar to that obtained by Mascheroni *et al.* [33] using an alternative membrane-based procedure.

Ternary solutions were prepared by adding a mixture of propolis extract and silver NPs solutions to the solution containing chitosan oligomers (Table 5.1). A few droplets of a solution of potassium methoxide in methanol 25% were added to adjust the pH to 4-6 (the methanol which results by hydrolysis is below 10 ppm, and at this concentration it is innocuous to the fungi). The resulting solutions were stirred for 1 hour and sonicated for 2-3 minutes, and remained clear. These solutions were mixed with MEA for the activity assays.

When a film was required (e.g., for SEM/TEM characterization), glyoxal 0.25% v/v was added to facilitate the interaction and the pH was adjusted to 8-9. Upon stirring and sonication, the solutions were allowed to rest for approximately 1 hour and gels appeared at the bottom of the flasks. These materials were isolated from the solution, were poured in polypropylene substrates [34], and dried under vacuum at 20 °C in dry atmosphere, yielding films with thicknesses in the 0.3 to 0.6 mm range. Details on these procedure have recently been the subject of a patent (Application No. ES P201431591; filing date: 30/10/2014).

5.4 Results and discussion

5.4.1 Vibrational characterization

The ATR-FTIR spectra of commercial chitosan, chitosan oligomers, propolis, chitosan oligomers/propolis binary composite and chitosan oligomers/propolis/silver NPs ternary composite are depicted in Figure 5.1. The assigned characteristic FTIR absorption bands derived from Figure 5.1 are summarized in Table 5.2.

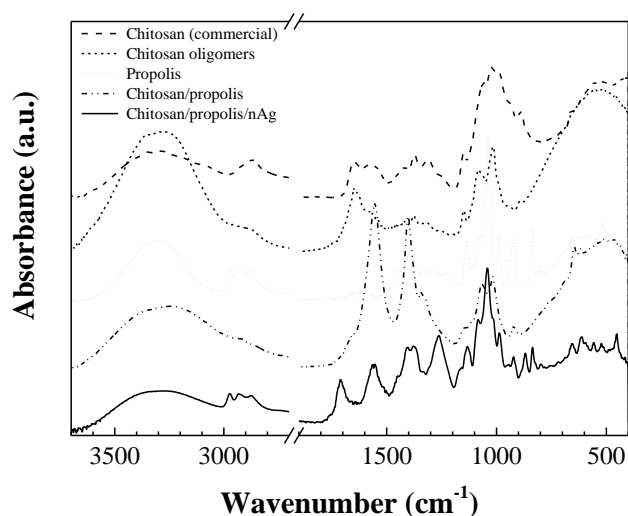


Figure 5.1 ATR-FTIR spectra of the chitosan- and propolis-based materials under study.

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

Tabla 5.2 Assignment of FTIR spectra bands

Chitosan	Chitosan oligomers	Propolis	Chitosan/propolis	Chitosan/propolis/silver NPs	Assignment
3290	3285		3285	3300	$\nu(\text{OH})$ overlapped to $\nu_s(\text{N-H})$ [35,36]
		2970		2972	C-H bands of aromatic compounds
		2930		2929	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ in $-\text{CH}_2$ [35]
2867	-	2873		2873	$\nu_s(\text{C-H})$ in $-\text{CH}_3$ [35]
1646	1649	1640 1598		1707	$\nu(\text{C=O})$ of the amide group CONHR in chitosan [36,38] and $\nu(\text{C=O})$ of flavonoids and lipids, found in propolis [39] / aromatic ring deformations [39]
1568	-		1554	1560	$\nu(\text{C=O})$ protonated amide group [35] $\delta(\text{NH}_3)$ protonated amine group
1417	1419		1404	1409	$\delta(\text{OH})$ [40]
1372	1375	1377		1373	$\delta(-\text{CH}_3)$ [41]
		1334	1341	1333	Typical propolis C-O and C-OH vibrations [39]
1318	1317				$\nu_s(-\text{CH}_3)$ tertiary amide [35] $\omega(-\text{CH}_2) + \text{OH}$ in-plane deformation
		1284 1228		1260	$\nu(\text{C-O-H})$ [35]
1152	1148		1150	1160	$\nu_{\text{as}}(\text{CO})$ in oxygen bridge resulting from deacetylation of chitosan
		1136		1133	Alkenes bands from propolis (coumaroylglycerol) [42]
1060	1081	1078	1066	1084	$\nu(\text{CO})$ of the ring C-O-H, C-O-C and CH_2CO [35,39]
		1038		1042	Bands from propolis
		989		986	
		920	923	922	Bands from propolis
892	892			872	$\omega(\text{C-H})$ of the saccharide structure [35]
		836		835	Band from propolis
			646	656	Typical bands from binary and ternary formulations
			617	615	

Analyses of both the binary chitosan-propolis formulation and the ternary composite showed that the first band in the ATR-FTIR spectra was shifted to higher wavelengths in comparison to the bare chitosan spectrum (from 3285-3290 to 3300 cm^{-1}) [35,36], suggesting that effective hydrogen bonding occurred between chitosan and propolis. This interaction is an indicator of a synergy between the two products.

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

Another significant feature for the ternary composite spectrum was an obvious shift to 1700 cm^{-1} of the band located at around 1650 cm^{-1} , accompanied by an increase in the intensity, proving the responsibility of chitosan amino group for silver envelopment [36-39]. In the same way, the change in the OH band intensity in the ternary composite spectra at 1409 cm^{-1} (assigned to the OH deformation vibrations of the secondary alcohols in the pyranose monomers) revealed that the hydroxyl groups may have also participated in the stabilization of the silver nanoparticles via interaction of Ag^+ with the electron abundant oxygen atoms of the hydroxyl groups of the chitosan. These results are in agreement with those reported by Dusan *et al.* [40]. Moreover, the increase in intensity of the band at 1380 cm^{-1} (attributed to CH_3 bending in NHCOCH_3 group [41]) can also be attributed to interactions with silver NPs.

In the particular case of the band at 1133 cm^{-1} , characteristic of ester groups ($-\text{C}-\text{O}$ stretching) from propolis components [42], a change in the intensity of the band was also observed, attributable to interactions with silver NPs.

Unassigned typical bands from binary and ternary formulations have been found at around 650 and 616 cm^{-1} .

5.4.2 X-ray characterization

The X-ray diffraction study of the chitosan oligomers exhibits the expected broad peaks at $2\theta=10^\circ$ and $2\theta=20^\circ$, in good agreement with Kumar *et al.* [43] (Figure 5.2). However, the peak observed for chitosan at $2\theta=20^\circ$ disappeared and the very broad peak at $2\theta=10^\circ$ became weak in the chitosan-propolis sample. These results suggest that chitosan has good compatibility, which leads to the formation of a composite with an amorphous form, suitable for bio-applications [44].

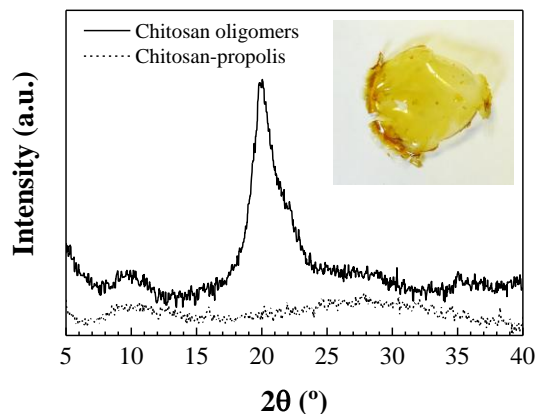


Figure 5.2 X-ray powder diffraction pattern for chitosan oligomers (*solid line*) and chitosan oligomers/propolis composite (*dashed line*). The inset shows a photograph of the chitosan oligomers/propolis film.

5.4.3 Silver NPs characterization

Silver nanoparticles were characterized by UV-Vis absorption, XRD and TEM analysis, revealing the formation of highly pure, crystalline silver nanoparticles of ca. 30 nm (see subsection 5.4.4). The UV-Vis spectrum (Figure 5.3, *left*) showed the expected intense surface plasmon resonance (SPR) band at around 420 nm [45]. The X-ray powder diffraction pattern (Figure 5.3, *right*) matched well with the standard patterns of silver (JCPDS No. 04-0783). All the peaks of the pattern can be readily indexed to face-centered-cubic silver, where the diffraction peaks at 38.2, 44.5, 64.5 and 77.5° can be ascribed to the reflection of (1,1,1), (2,0,0), (2,2,0), (3,1,1) planes, respectively.

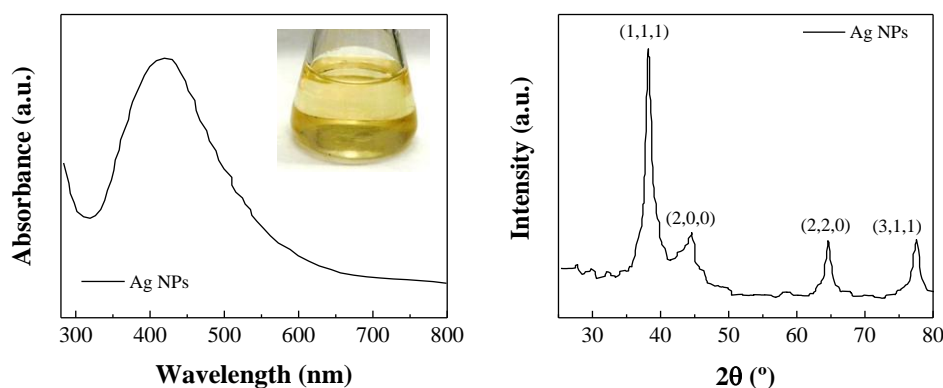


Figure 5.3 UV-Vis spectrum (*left*) and X-ray powder diffraction pattern, smoothed with a Savitzky–Golay 10 pt. window filter (*right*).

5.4.4 Textural properties

The texture of the ternary composite films has been studied by SEM and TEM. The SEM micrographs (Figure 5.4, *left*) –similar to those reported by Moharram *et al.* [26]– show the good homogeneity of the materials under study, while the TEM micrograph (Figure 5.4, *right*) allows to estimate the size of the silver NPs, in the 24 to 35 nm range.

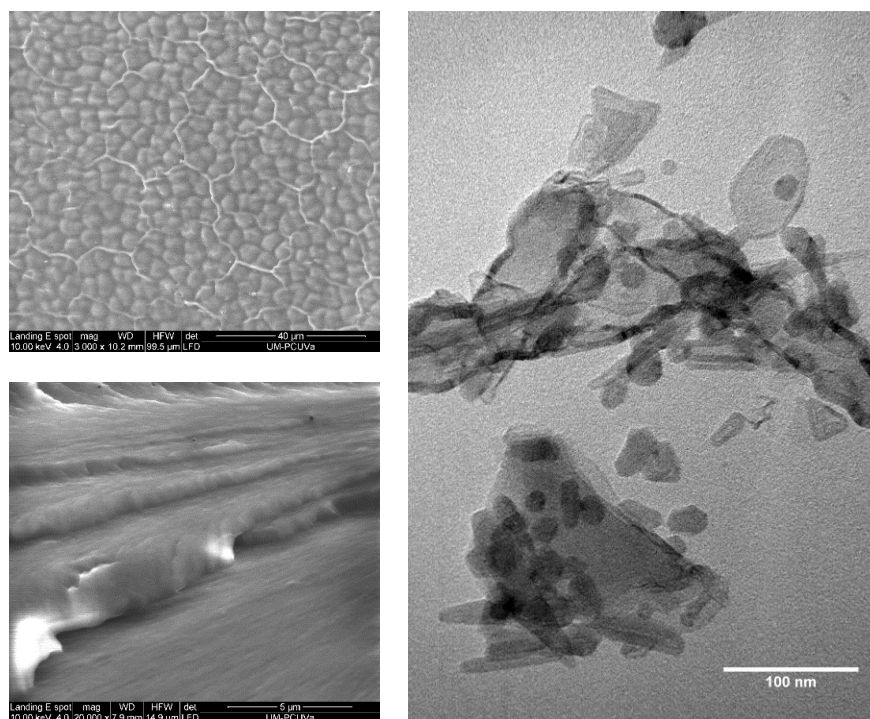


Figure 5.4 SEM micrographs (*left*) and TEM micrograph (*right*) of the ternary chitosan oligomers/propolis/silver NPs composite.

5.4.5 Antifungal activity of chitosan

As noted above, the size of the chitosan chains has a significant impact on its antimicrobial activity [4]. Consequently, prior to evaluating the different composites, a first study was conducted only for chitosan. Two commercial medium molar mass chitosan solutions were compared against the chitosan oligomers prepared according to the procedure described in subsection 5.3.3.1. Whereas the chitosan oligomers led to mycelia death, the fungus was able to grow in the culture media with medium molar

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

mass chitosan (see Figure 5.5). Consequently, only chitosan oligomers have been used in the studies described below.

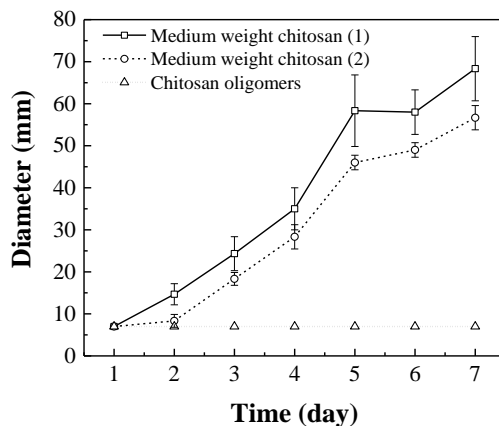


Figure 5.5 Antifungal action of medium molar mass chitosan (from Sigma Aldrich (1) and from Hangzhou Simit Chemical Technology Co. Ltd (2)) compared to that of chitosan oligomers.

5.4.6 Antifungal activity of the propolis, chitosan oligomers/propolis and chitosan oligomers/propolis/silver NPs colloidal solutions against *Diplodia seriata* fungus

The antifungal activity has been studied for the aqueous and hydro-alcoholic mixtures of bare propolis, chitosan oligomers/propolis and chitosan oligomers/propolis/silver NPs, assessing the influence of low alcohol concentrations (ca. 5%) on the mixtures and analyzing the growth diameter of the *Diplodia seriata* mycelia. As indicated above, the assays have been conducted in triplicate biological repetitions, and all the results are in average.

For bare propolis (see Figure 5.6 (a)), in presence of alcohol, the mycelium diameter increased exponentially in an initial stage, with a slope change on the 7th day and reaching its maximum diameter (77-78 mm) on the 13th/14th day. When alcohol was removed from the propolis extract by sonication, the activity of the fungus decreased, showing a slower and progressive growth and reaching a maximum diameter of 22 mm.

When the chitosan oligomers/propolis composite (see Figure 5.6 (b)) was tested in the presence of alcohol, exponential growth took place up to the 7th day, in which there

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

was also a slope change and the growth started to be less pronounced. In comparison to bare propolis, the antifungal activity was significantly enhanced, since the maximum mycelium diameter in this case was 27 mm. Further, when alcohol was completely removed, no fungal growth took place (and the diameter remained constant at 7 mm).

A similar behavior was observed for the chitosan oligomers/propolis/silver NPs composites (Figure 5.6 (c)): in the presence of alcohol, there was an almost linear increase in the mycelia diameter, reaching 41 mm, whereas in the absence of alcohol no fungal growth occurred. It can thus be inferred that the antifungal activity of the material with silver NPs was better than that of bare propolis, but worse than that of the binary composite. Nevertheless, it is worth noting that the presence of silver NPs reduced the standard deviation values and made the growth more linear (i.e., less logarithmic) in comparison to the assays conducted for bare propolis or chitosan oligomers/propolis composite in hydro-alcoholic medium.

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

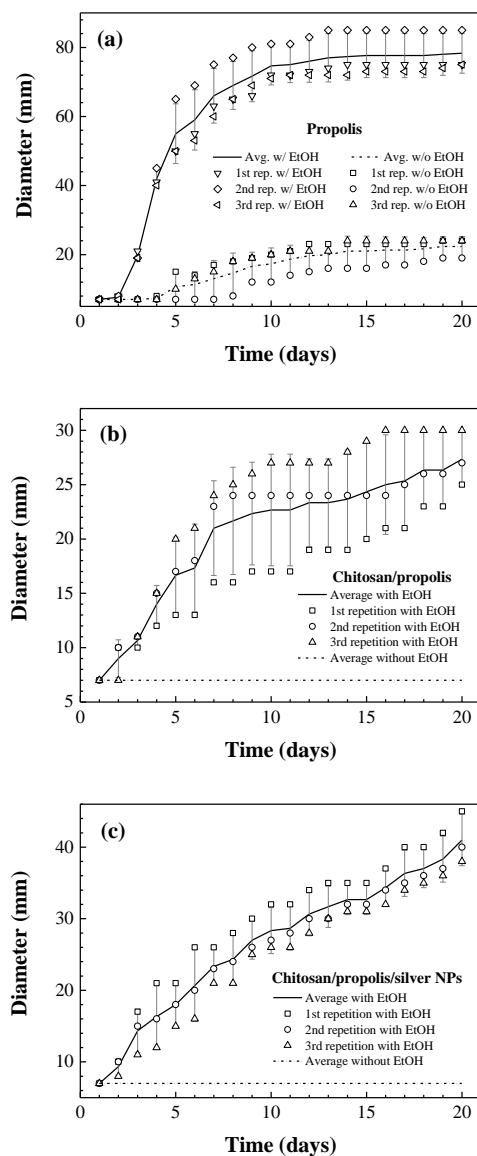


Figura 5.6 Antifungal action of the aqueous and hydroalcoholic media for bare propolis (a), chitosan oligomers/propolis (b) and chitosan oligomers/propolis/silver NPs (c) composites.

A wider comparison (summarized in Figure 5.7), which also includes bare chitosan (A) and chitosan oligomers/silver NPs mixture (D), further confirms previous results: the presence of alcohol significantly favored the growth of the fungus. On the contrary, when the alcohol was removed by sonication at a temperature lower than 60 °C, the fungus hardly grew for bare propolis (P) –which showed an inhibition percentage of 75%– or did not grow when chitosan oligomers/propolis (B) or chitosan oligomers/propolis/silver NPs (C) composites were used. Consequently, alcohol removal

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

from the binary or ternary mixtures is essential so as to improve the antifungal activity of these materials. This is in agreement with the findings of Zhao *et al.* [46], who reported that a concentration of 0.5–2% ethanol stimulated the growth of fungi, since it was partially used as a carbon source during fermentation.

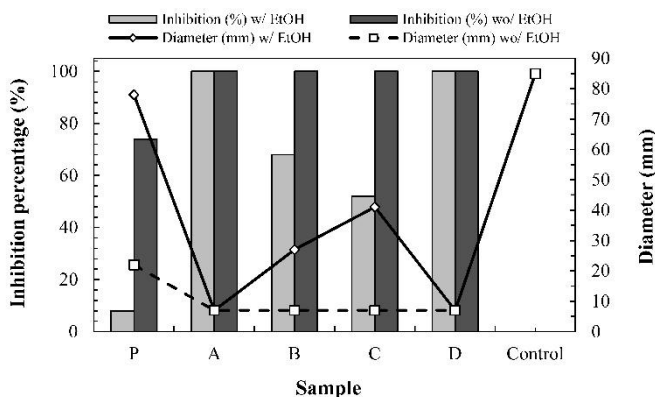


Figure 5.7 Inhibition percentage and growth diameter of the *Diplodia seriata* fungus mycelia for propolis (P), chitosan oligomers (A), chitosan oligomers/propolis (B), chitosan oligomers/propolis/silver NPs (C), chitosan oligomers/silver NPs (D) and control, in aqueous solutions (wo/ EtOH) and in hydroalcoholic solutions (w/ EtOH).

5.4.7 Future lines of research: replacement of propolis with gentisic acid

Propolis polyphenols, such as gentisic acid (2,5-dihydroxybenzoic acid) or homogentisic acid (2,5-dihydroxyphenylacetic acid), are known to have antifungal activity [47] and have been shown to increase the fungicidal activity of other chemicals (e.g. fludioxonil, a phenylpyrrole fungicide) [48]. Further, they have a widespread occurrence, being found in citrus fruits (*Citrus* spp.), grapes (*Vitis vinifera*), sesame (*Sesamum indicum*), gentians (*Gentiana* spp.), etc., which are amongst the probable floral origins of the Mediterranean propolis used in our study, in agreement to Gülçin *et al.* [49]. Consequently, a preliminary assessment of the suitability of the former as a replacement of propolis extract has been conducted.

As it is shown in Figure 5.8, pure propolis, pure gentisic acid and propolis: gentisic acid (1:1) solutions (with concentrations of 30 mg/mL for the propolis solution; 30 mg/mL for the gentisic acid solution; 1:1 ratio of the two solutions for the propolis:gentisic acid mixture, respectively) have been evaluated, and an improved performance of gentisic acid over propolis has been evidenced. Thus, an identification of

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

the propolis components and their separate antifungal activity study need to be conducted in future research.

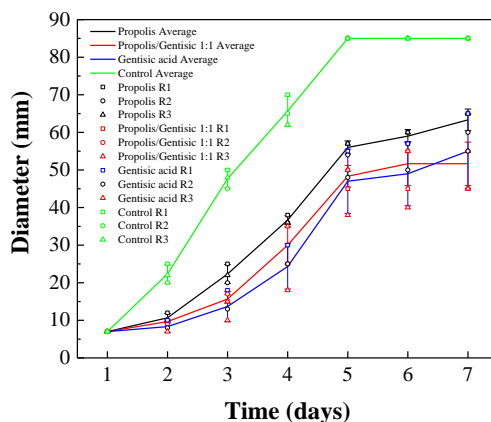


Figura 5.8 Comparison of the antifungal activity of pure propolis, a propolis:genticic acid mixture (1:1) and pure genticic acid. R1, R2 and R3 stand for 1st, 2nd and 3rd repetition.

5.5 Conclusions

The present work reports the synthesis by a facile chemical method of a composite system consisting of a colloidal suspension of silver nanoparticles in a chitosan-propolis biopolymer matrix. The materials have been characterized by X-ray powder diffraction studies, FTIR vibrational spectroscopy, UV-Vis absorption spectroscopy and SEM and TEM microscopies. With a view to the application of these solutions to the formation of adhesive substances or nanofilms for the protection of vineyards against harmful xylophagous fungi, the influence of low alcohol concentrations (ca. 5%) on the growth diameter of the *Diplodia seriata* mycelia has been determined. The results are conclusive on the need of alcohol removal to improve the antifungal activity of these materials. Moreover, it is essential to use low molar mass chitosan oligomers, given that their inhibitory activity is significantly higher than that of medium molar mass chitosan. Finally, it is worth noting that further research is still required so as to evaluate the separate activity of the different components of propolis, as evinced by the enhanced antifungal behavior of genticic acid in comparison to propolis, and on the synergistic effect of the three components of the composite.

Acknowledgments

This work was supported by funds from Junta de Castilla y León under project VA233A12-1. The authors gratefully acknowledge the support of Dr. M. Avella (Microscopy Unit, Parque Científico, Universidad de Valladolid) and of Dr. J.A. Paixão (CEMDRX, Universidade de Coimbra) with the SEM and TEM analysis and the XRD measurements, respectively. Special thanks are due to Dr. M. T. Martín-Villullas (ITACYL) for supplying the fungus mycelium.

5.6 References

- [1] M.N.V. Ravi Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.*, 46 (2000) 1-27.
- [2] J. Rhoades, S. Roller, Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (2000) 80-86.
- [3] L.Y. Chung, R.J. Schmidt, P.F. Hamlyn, B.F. Sagar, A.M. Andrew, T.D. Turner, Biocompatibility of potential wound management products: fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblasts in culture, *Journal of biomedical materials research*, 28 (1994) 463-469.
- [4] L.A. Hadwiger, T. Ogawa, H. Kuyama, Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers, *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 7 (1994) 531-533.
- [5] D.F. Kendra, L.A. Hadwiger, Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*, *Experimental Mycology*, 8 (1984) 276-281.
- [6] D.F. Kendra, D. Christian, L.A. Hadwiger, Chitosan oligomers from *Fusarium solani*/pea interactions, chitinase/ β -glucanase digestion of sporelings and from fungal wall chitin actively inhibit fungal growth and enhance disease resistance, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 35 (1989) 215-230.
- [7] H. Kuyama, Y. Nakahara, T. Nukada, Y. Ito, Y. Nakahara, T. Ogawa, Stereocontrolled synthesis of chitosan dodecamer, *Carbohydr. Res.*, 243 (1993) C1-C7.
- [8] P.K. Dutta, S. Tripathi, G.K. Mehrotra, J. Dutta, Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, *Food Chem.*, 114 (2009) 1173-1182.
- [9] N. Nedji, W. Loucif-Ayad, Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4 (2014) 433-437.

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

- [10] V. Bankova, Recent trends and important developments in propolis research, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2 (2005) 29-32.
- [11] E. Ghisalberti, Propolis: a review, *Bee World*, 60 (1979) 59-84.
- [12] M.C. Marcucci, Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, 26 (1995) 83-99.
- [13] N. Kalogeropoulos, S.J. Konteles, E. Troullidou, I. Mourtzinou, V.T. Karathanos, Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus, *Food Chem.*, 116 (2009) 452-461.
- [14] S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash, Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 18 (2007) 225103.
- [15] A.R. Silva, G. Unali, Controlled silver delivery by silver-cellulose nanocomposites prepared by a one-pot green synthesis assisted by microwaves, *Nanotechnology*, 22 (2011) 315605.
- [16] J. Grosman, Observatoire national et régional des maladies du bois: bilan et perspectives de 4 années d'observations, in: Eurovity, Institut Français de la Vigne et du Vin, Angers, France, 2008, pp. 8-17.
- [17] P. Larignon, J. Dupont, B. Dubos, L'esca de la vigne: Quelques éléments sur la biologie de deux des agents associés: *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phytoma-La Défense des végétaux*, (2000) 30-35.
- [18] P. Larignon, B. Dubos, Le Black Dead Arm: maladie nouvelle à ne pas confondre avec l'esca, *Phytoma-La Défense des Végétaux*, (2001) 26-29.
- [19] B. Dubos, L. Cere, P. Larignon, R. Fulchic, Observation on black dead arm in French vineyards, *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (2001) 336-342.
- [20] I. Prakongkha, M. Sompong, S. Wongkaew, D. Athinuwat, N. Buensanteai, Changes in salicylic acid in grapevine treated with chitosan and BTH against *Sphaceloma ampelinum*, the causal agent of grapevine anthracnose, *African Journal of Microbiology Research*, 7 (2013) 557-563.

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

- [21] P. Matei, B. Iacomi, G. Dragan, Fungi associated with esca decline and their in vitro control by chitosan, *Scientific Papers, UASVM Bucharest, Series A*, 53 (2010) 448-453.
- [22] A. Aziz, P. Trotel-Aziz, L. Dhuicq, P. Jeandet, M. Couderchet, G. Vernet, Chitosan Oligomers and Copper Sulfate Induce Grapevine Defense Reactions and Resistance to Gray Mold and Downy Mildew, *Phytopathology*, 96 (2006) 1188-1194.
- [23] C. Gu, H. Zhang, M. Lang, Preparation of mono-dispersed silver nanoparticles assisted by chitosan-g-poly(ϵ -caprolactone) micelles and their antimicrobial application, *Appl. Surf. Sci.*, 301 (2014) 273-279.
- [24] P.T.S. Kumar, S. Abhilash, K. Manzoor, S.V. Nair, H. Tamura, R. Jayakumar, Preparation and characterization of novel β -chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications, *Carbohydr. Polym.*, 80 (2010) 761-767.
- [25] L. Guo, W. Yuan, Z. Lu, C.M. Li, Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*, 439 (2013) 69-83.
- [26] M.A. Moharram, S.K.H. Khalil, H.H.A. Sherif, W.A. Khalil, Spectroscopic study of the experimental parameters controlling the structural properties of chitosan–Ag nanoparticles composite, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 126 (2014) 1-6.
- [27] T. Acosta, A. Avellaneda, J. Cuervo, L. Sánchez, Evaluacion de microbiota de tomillo (*thymus Vulgaris*), como aporte al manejo agroecologico de aromaticas en invernaderos de la Universidad Nacional, in: *Perspectivas del agronegocio de hierbas aromáticas culinarias y medicinales*, U. Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 2007, pp. 135-138.
- [28] T. Sun, D. Zhou, J. Xie, F. Mao, Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity, *Eur. Food Res. Technol.*, 225 (2007) 451-456.
- [29] Y. Yang, R. Shu, J. Shao, G. Xu, X. Gu, Radical scavenging activity of chitooligosaccharide with different molecular weights, *Eur. Food Res. Technol.*, 222 (2005) 36-40.

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

- [30] G.G. Maghami, G.A.F. Roberts, Evaluation of the viscometric constants for chitosan, *Die Makromolekulare Chemie*, 189 (1988) 195-200.
- [31] R.G. Woisky, A. Salatino, Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control, *J. Apic. Res.*, 37 (1998) 99-105.
- [32] M. Montazer, A. Shamei, F. Alimohammadi, Synthesizing and stabilizing silver nanoparticles on polyamide fabric using silver-ammonia/PVP/UVC, *Prog. Org. Coat.*, 75 (2012) 379-385.
- [33] E. Mascheroni, A. Figoli, A. Musatti, S. Limbo, E. Drioli, R. Suevo, S. Talarico, M. Rollini, An alternative encapsulation approach for production of active chitosan-propolis beads, *Int. J. Food Sci. Tech.*, 49 (2014) 1401-1407.
- [34] E. Torlak, D. Sert, Antibacterial effectiveness of chitosan-propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens, *Int. J. Biol. Macromol.*, 60 (2013) 52-55.
- [35] S.M. Silva, C.R. Braga, M.V. Fook, C.M. Raposo, L.H. Carvalho, E.L. Canedo, Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites, in: T. Theophanides (Ed.) *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, InTech, 2012, pp. 43-62.
- [36] M. Venkatesham, D. Ayodhya, A. Madhusudhan, N. Veera Babu, G. Veerabhadram, A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies, *Applied Nanoscience*, 4 (2012) 113-119.
- [37] W.I. Abdel-Fattah, A. Sattar M Sallam, N. Attawa, E. Salama, A.M. Maghraby, G.W. Ali, Functionality, antibacterial efficiency and biocompatibility of nanosilver/chitosan/silk/phosphate scaffolds 1. Synthesis and optimization of nanosilver/chitosan matrices through gamma rays irradiation and their antibacterial activity, *Materials Research Express*, 1 (2014) 035024.
- [38] K. Vimala, Y.M. Mohan, K.S. Sivudu, K. Varaprasad, S. Ravindra, N.N. Reddy, Y. Padma, B. Sreedhar, K. MohanaRaju, Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 76 (2010) 248-258.

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

- [39] J.R. Franca, M.P. De Luca, T.G. Ribeiro, R.O. Castilho, A.N. Moreira, V.R. Santos, A.A.G. Faraco, Propolis - based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14 (2014) 478.
- [40] D.K. Božanić, L.V. Trandafilović, A.S. Luyt, V. Djoković, 'Green' synthesis and optical properties of silver–chitosan complexes and nanocomposites, *React. Funct. Polym.*, 70 (2010) 869-873.
- [41] D. Zvezdova, Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in Black Sea, *Annual Proceedings, "Angel Kanchev" University of Ruse*, 49 (2010) 65-69.
- [42] M.V. Butnariu, C.V. Giuchici, The use of some nanoemulsions based on aqueous propolis and lycopene extract in the skin's protective mechanisms against UVA radiation, *Journal of Nanobiotechnology*, 9 (2011) 3.
- [43] S. Kumar, P. Dutta, J. Koh, A physico-chemical and biological study of novel chitosan–chloroquinoline derivative for biomedical applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, 49 (2011) 356-361.
- [44] S. Kumar, J. Koh, Physiochemical, Optical and Biological Activity of Chitosan-Chromone Derivative for Biomedical Applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (2012) 6102-6116.
- [45] V. Vilas, D. Philip, J. Mathew, Catalytically and biologically active silver nanoparticles synthesized using essential oil, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 132 (2014) 743-750.
- [46] X.-M. Zhao, Z.-Q. Wang, S.-H. Shu, W.-J. Wang, H.-J. Xu, Y.-J. Ahn, M. Wang, X. Hu, Ethanol and Methanol Can Improve Huperzine A Production from Endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* ES026, *PLoS ONE*, 8 (2013) e61777.
- [47] B. Ren, B. Xia, W. Li, J. Wu, H. Zhang, Two novel phenolic compounds from *Stenoloma chusanum* and their antifungal activity, *Chem. Nat. Compd.*, 45 (2009) 182-186.
- [48] M.P. Kabra, S.S. Bhandari, A. Sharma, M.K. Vaishnav, A review on gentisic acid, *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 3 (2013) 29-36.

Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*

[49] İ. Gülçin, E. Bursal, M.H. Şchitoğlu, M. Bilsel, A.C. Gören, Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey, *Food Chem. Toxicol.*, 48 (2010) 2227-2238.



6 RESUMEN DE RESULTADOS

6.1 Resumen de resultados

En esta Tesis Doctoral se han evaluado métodos de control para resolver el problema de una planta enferma, métodos preventivos para la higienización de los residuos vitícolas de la poda de la vid mediante proceso de compostaje y métodos de control curativo por termoterapia. Aparte y de modo complementario, se ha abordado la síntesis y caracterización de nuevos materiales o bioproductos (quitosano/propoleo/nanoplata) que pueden ser utilizados como antifúngicos para las enfermedades de la madera de la vid. Estos estudios nos han reportado unos resultados prometedores tanto en la higienización de los nuevos preparados a base de nanopartículas como en el control de hongos patógenos.

En el presente capítulo se expone un resumen de los resultados recogidos en las publicaciones en curso, presentados de modo organizado a fin de hacer visible el hilo conductor de los mismos en relación con el marco de referencia y los objetivos programados.

Los resultados de la primera parte de la Tesis Doctoral, recogidos en el artículo científico 1 (“*Hygienization and control of Diplodia seriata fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems*” - “*Higienización y control del hongo Diplodia seriata en restos de la poda de la vid y su variabilidad estacional en compostaje abierto y cerrado*”) son relativos a los dos primeros objetivos señalados en la hipótesis de investigación.

Los resultados correspondientes al objetivo 1.1, conciernen el estudio en el tiempo (días) del proceso de higienización del hongo *Diplodia seriata* en compostador abierto y cerrado y muestran que aquel es función de una serie de parámetros físicos-químicos del proceso de compostaje (temperatura, humedad, aireación, pH) y de la variación estacional (primavera, verano e invierno). Para ambos reactores encontramos correlaciones significativas apreciables entre la temperatura y la humedad solo para la estación de verano pudiendo referir las fluctuaciones observadas, de acuerdo con Zhu (2006) (DOI: 10.1016/j.biortech.2005.08.011), a la temperatura ambiental. Las correlaciones resultan más significativas para la pila ($p < 0,01$) que para el biodigestor cerrado ($p < 0,05$) probablemente debido al mayor contenido en humedad al principio del

proceso (47% vs. 41%). Benito et al 2006 (DOI: 10.1016/j.biortech.2005.09.011), operando con sarmientos de poda de vid compostados en pila abierta junto con follaje, encuentran también diferencias significativas cuando se opera en verano y probablemente debido a la diferencia de lixiviación de sales solubles como resultado de las precipitaciones.

El abordaje del objetivo 1.2 ha proporcionado como resultado evidenciar la eficiencia del proceso de compostaje en función del nivel de temperatura alcanzado en la fase termofílica. Se ha observado que tanto en la pila como en el biodigestor cerrado no existe una clara delimitación entre las fases mesofílicas (10-40°C) y termofílica (40-75°C) ya que las dos fases ocurren secuencialmente (Schloss et al., 2003), pero mientras la pila precisa de diez días para alcanzar la fase termofílica y con pérdida continua de humedad, el biodigestor cerrado lo hace en cinco días y con una temperatura de 75°C y humedad (40-50 %). El mejor rendimiento del biodigestor cerrado se logra por la aireación forzada en comparación con la pila abierta donde es necesario un volteo para reactivar el proceso de compostaje.

Las investigaciones dirigidas a los objetivos 1.3 y 1.4 han permitido determinar cuantitativamente la influencia de los parámetros relativos al sustrato utilizado en el compostaje, con especial referencia a la relación C/N, pH y conductividad eléctrica (CE). Partiendo del hecho conocido de que para un buen proceso de compostaje se precisa una relación C/N es de ca. 30 (Jhorar et al., 1991) en la mezcla inicial de materias orgánicas, hemos utilizado los residuos lignocelulósicos como agente estructurante y el estiércol de gallina como material orgánico nitrogenado, consiguiendo como resultado una mezcla con relación C/N = 45). Según Jeris y Regan (1973), en la práctica, el valor de la relación C/N puede ser un poco más elevado que el sugerido debido a la existencia de carbono en formas resistentes como celulosas y ligninas no utilizadas por los microorganismos, válido para nuestro caso. Se observa que en la mezcla gallinaza/sarmientos con una relación 2:1 en seco, el intervalo de trabajo para la pila abierta (C/N 14-22) y para el biodigestor cerrado (C/N 12-20) se encuentran dentro de los intervalos de un compost ideal (de acuerdo con Rosen et al., 1993). En nuestro diseño de la mezcla de compostaje hemos contado con el precedente exitoso de Bustamante et al. (2012, 2015) quienes, al utilizar mezclas de estiércol de vacuno y

purinas de cerdo con los sarmientos de la poda de la vid, observaron la higienización del material por inactivación de *Fusarium oxysporum* debido a las altas temperaturas alcanzadas. Otros parámetros como el pH y la conductividad eléctrica apenas fluctúan en las diversas estaciones (pH, entre 8 y 8.5; y CE , entre 1.3 y 1.8 dS/m), típicos de compost maduros e indicativos de productos de calidad (Moreno and Moral, 2008).

De especial interés son los resultados concernientes al objetivo 1.5 de la hipótesis investigadora, relativo al estudio de los parámetros biológicos (índice de germinación, % de hongos y bacterias) y la calidad del compost (contenidos en nutrientes y metales pesados). En relación al valor del índice de germinación (IG%), hemos obtenido valores mayores en la pila abierta que en el biodigestor cerrado, y algo superior en verano (D2: 209,51 %). Los valores medios de este índice al final de proceso de compostaje (D1: 113.23% y D2:141.45%) resultan más elevados que para el inicio del proceso (D1: 108.78% y D2: 116.62%), considerado un compost maduro y sin la presencia de sustancias fitotóxicas, para valores del IG% superior a 60% conforme con Zucconi et al. (1981). Comparando la pila abierta con el biodigestor cerrado sobre el contenido en nutrientes del producto fertilizante elaborado se observa que en ambos casos pueden ser clasificados como clase A, según el Anexo V de Real Decreto español 506/2013, del 28 de junio (que transpone Reglamento (CE) N° 2003/2003 de fertilizantes y sus modificaciones posteriores) ya que ningún elemento supera los límites máximos establecidos en metales pesados en sólidos (mg/kg) de materia seca (Canarutto et al., 1991; Garcia et al., 1991). No obstante, los contenidos de Cu y de Zn en el compost se encuentran en el valor límite superior para fertilizantes de la clase A (Cu: 70 ppm y Zn: 200 ppm) debido a que proceden de la gallinaza utilizada como sustrato.

La investigación sobre el objetivo 1.6, relativo a la determinación de la velocidad de desaparición del hongo *Diplodia seriata* con el tipo de compostaje, en diferentes estaciones y para los parámetros físico-químicos más arriba mencionados, ha dado lugar a resultados con especial aplicación práctica. La higienización del compost del biodigestor cerrado se consigue en menos tiempo y resulta un proceso más efectivo que el de la pila abierta, independientemente de la variabilidad estacional. Del estudio de las asociaciones entre la desaparición del hongo patógeno *D. seriata* frente a diferentes parámetros físico-químicos del proceso de compostaje se obtiene una correlación inversa

entre el porcentaje de desaparición y el incremento de la temperatura, en las tres estaciones del año. El mejor resultado ($R^2=0,082$, $p<0,001$) se obtiene cuando se opera en pila de verano, debido a la mayor temperatura de la estación ($R^2= 0.832$, $p<0.001$). Aunque con menor significatividad, también se obtienen buenos resultados para las correlaciones entre desaparición del hongo y humedad ($R^2= 0, 552$, $p=0,034$), pH ($R^2= 0, 518$, $p=0,003$), CE ($R^2= 0,428$, $p=0,011$) y otros hongos ($R^2= 0, 508$, $p=0,004$). Nuestros resultados han sido comparados con los de Dunkley (2011) sobre la efectividad del proceso de compostaje, en pila abierta y durante el periodo de verano, a efectos de inhibición de los microorganismos patógenos presentes.

En relación con otros microorganismos que interviene en el proceso de compostaje, se observa que en el biodigestor cerrado hay un menor contenido de hongos y bacterias que en la pila abierta e independientemente de la estación del año: el contenido de hongos y bacterias en pila en verano es del 85% mientras que en un biodigestor cerrado discontinuo su contenido se reduce a la mitad (40%). Es preciso tener en consideración que al ser el biodigestor un dispositivo totalmente cerrado, no existe la posibilidad de contaminación externa (Sánchez et al., 2008).

Los resultados correspondientes a la segunda parte de las investigaciones realizadas (recogidos y glosados en el artículo científico 2 titulado “*Thermal death kinetics of Diplodia seriata fungus inoculated in vitro in vine shoots pruning*”- “*Cinética de muerte térmica in vitro de hongos inoculados de Diplodia seriata en sarmientos de la poda de la vid*” también son expuestos en relación con los objetivos específicos establecidos:

En relación con el objetivo 2.1 y una vez investigada la idoneidad de la aplicación del tratamiento térmico con aire caliente sobre la inhibición de dos inóculos del hongo *Diplodia seriata*, asociado a la enfermedad del brazo muerto en viñedo (black dead arm – BDA) hemos hallado que: cuando se trabaja con temperaturas entre 40 y 65°C, en una atmosfera de aire caliente por convección y a diferentes tiempos de permanencia entre 20 y 150 min, se consigue una inhibición gradual y significativa del crecimiento miceliano, siendo los niveles de significatividad algo mayores ($p<0,01$) para el aislado Y207-1-1c que para el Y84-1-1a ($p<0,05$). Estudios anteriores sobre *Cylindrocarpon*

spp. en baños de agua caliente de 50°C durante 30 min habían concluido la necesidad de efectuar tratamientos a mayores temperaturas para reducir la incidencia del patógeno (Crous *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2004; Fourie & Halleen, 2004; Gramaje *et al.* 2009, Waite & May, 2005; Halleen *et al.*, 2007a). También Bleach *et al.* (2009) sugirieron la conveniencia de utilizar temperaturas más altas para eliminar totalmente las infecciones que se producen cuando el patógeno se introduce en la madera de esquejes de 1 año. En la línea de las anteriores observaciones podemos precisar que el hongo *D. seriata* tiene una mayor termotolerancia que la enfermedad del pie negro (*Cylindrocarpon* spp) y que se debe operar a 65°C durante dos horas (120 min) para una total higienización con tratamientos con aire caliente.

Los resultados sobre los objetivos 2.2 y 2.3, fruto de las investigaciones sobre modelos cinéticos de muerte térmica para el hongo *D. seriata* se concretan en los relativos a un modelo lineal y al modelo de Weibull. Los resultados de las curvas de muerte térmica de los valores medios de los dos aislados de *D. seriata* siguen un modelo de cinética de reacción de orden-1, con valores altos de R^2 tanto para el modelo lineal (0.923) como para el modelo de Weibull (0.930) y significatividades también altas ($p < 0.001$) en ambos casos. Asimismo, la determinación de la constante de velocidad de muerte térmica k a diferentes temperaturas y los valores de la pendiente c permiten advertir como el valor de k crece con el incremento de la temperatura y el de c decrece.

De especial importancia, dentro del estudio de la cinética de muerte térmica, son los resultados sobre estimación de los tiempos letales para matar el 95%, 99%, 99.33% y 99.99% de los microorganismos a 65°C: 92.7, 114.5, 116.3 y 119.9 min, respectivamente. Otros datos obtenidos han sido el valor de la energía de activación (508 kJ/mol) y el valor z (3.9°C). A título comparativo, con el modelo de Arrhenius la energía de activación que resulta es muy similar, 513 kJ/mol.

El tratamiento según el modelo Weibull muestra curvas de inhibición con concavidad hacia abajo ($\beta > 1$) y para 65°C, el parámetro de escala α es de 32.4 min. En la bibliografía se dispone de estudios de estabilidad térmica de *Agaricus bisporus* (Labusa *et al.* 2015), hongos en pizzas (Beigi *et al.*, 2015), ascosporas *Byssochlamys nivea* y *Neosartorya fischeri*, de muy alta resistencia térmica, presentes en jugos de piñas y de manzana (Ferreira *et al.* 2010 y Evelyn *et al.* 2016); e insectos (Gazit *et al.*,

2004; Hallman et al., 2005, Wang et al., 2002, Yan et al., 2014). Por ejemplo, Yan (2014) determinó la cinética de muerte térmica de insectos bajo diferentes condiciones de calentamiento para el desarrollo de protocolos de tratamiento de desinfección post-cosecha y encontró que seguía un modelo de reacción cinética de orden 0 y que la mínima energía de activación necesaria para matar a *Sitophilus oryzae* era 505 kJ / mol (un resultado muy similar a la sensibilidad térmica de *D. seriata*).

Las investigaciones sobre el objetivo 2.4 sobre tratamiento térmico (temperatura-tiempo) han conducido a la observación de que, siguiendo el modelo lineal, el tiempo para producir el 100% de mortalidad de *D. seriata* a una temperatura de 65°C es de 120 min (o de 93 min para el 95%) mientras que con el modelo de Weinbull la reducción al 90% se consigue a los 73 min. Ambos resultados de sensibilidad térmica muestran que *D. seriata* es más resistente y difícil de erradicar que *Cylindrocarpon* spp. (Gramaje et al, 2009 y Bleach et al. 2013). La velocidad del calentamiento también puede tener un efecto importante en la mortalidad (Evans, 1987; Neven, 1998) ya que la especie puede experimentar una aclimatización a una velocidad de calentamiento relativamente lenta y aumentar su termotolerancia.

La mejor alternativa para una correcta higienización del material vegetal de la vid es la combinación de diferentes estrategias de control (Augustí Bisach et al. 2015), y efectuar estudios de curvas de muerte térmica sobre inóculos de hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* para conocer con precisión como desinfectar el material de propagación en viveros (Laukart et al. 2001, Fourie y Halleen, 2004b).

El grupo de resultados asociados a la tercera parte de la presente Memoria, descritos y comentados ampliamente en el artículo científico 3 (“**Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata***” – “*Síntesis del material compuesto ternario oligómeros de quitosano/propoleo/nanoplata y estudio de su actividad contra *Diplodia seriata**”) y que responden a los objetivos específicos 3.1, 3.2 y 3.3, han sido resumidos como sigue:

Se ha obtenido la síntesis de nuevos composites binarios y ternarios de aplicación contra *Diplodia seriata*. Los primeros fueron obtenidos mediante técnicas de dopado con glioxal y sonicación. Utilizando glioxal observamos que el proceso de unión es inmediato (menos de 1 hora), mientras que cuando se usa glicerina se tarda varias horas

(incluso días). Con la sonicación se consigue una activación del proceso de entrecruzamiento en un periodo máximo de 1 minuto (aunque variable dependiendo de factores como temperatura, pH, tiempo de agitación y concentración de las soluciones).

La caracterización de los materiales componentes del composite anterior y de los que resultan de mezclas binarias y ternarias ha sido obtenida utilizando tecnologías de ATR-FTIR, UV-vis, difracción de X-Ray y espectrofotometría SEM y TEM. Así, para la mezcla binaria quitosano/propóleo, el desplazamiento de las bandas ATR-FTIR hacia longitudes de onda más altas en comparación con el espectro para el quitosano solo (desde 3285-3290 hacia 3300 cm^{-1}) (Silva et al., 2012 and Venkatesham et al., 2012) han permitido evidenciar que, aunque el propóleo no reacciona con quitosano para formar un nuevo compuesto, existe suficiente interacción para justificar una sinergia entre los dos productos. Para la combinación ternaria quitosano/propóleo/nanoplatina hubo un cambio obvio a 1700 cm^{-1} de la banda situada en torno a 1650 cm^{-1} , acompañado por un aumento en la intensidad, lo que demuestra la responsabilidad del grupo amino de quitosano en su enlace con plata (Venkatesham et al., 2012 and Franca et al., 2014). Los grupos OH del quitosano también participan en la estabilización de las nanopartículas, de acuerdo con lo señalado por Boanić et al. (2010). En el caso particular de la banda característica de los grupos éster (-C-O) de los componentes de propóleos (Butnariu and Giuchici, 2011) hay un cambio en la intensidad de la banda, atribuible a la interacción con nAg. Bandas típicas no asignadas a fórmulas binarias y ternarias se han encontrado alrededor de 650 y 616 cm^{-1} de intensidad. En la caracterización de las partículas de nanoplatina en el composite, utilizando el espectro UV-vis se ha encontrado el pico característico de aquellas a 420 nm (Vilas et al., 2014); y por comparación del espectro TEM con el patrón de XRD (JCPDS número 04,0783) se ha constatado la cristalinidad y la pureza de las nanopartículas. La textura de la película del grupo ternario muestra una buena homogeneidad de los materiales determinada tanto por la micrografía SEM como por TEM, al igual con Moharram et al (2014).

El último de los resultados, concerniente al efecto de la actividad antimicrobiana de los componentes individuales y en conjunto sobre los inóculos de *Diplodia seriata*, es una observación particular pero de gran importancia sobre la influencia de la remanencia de alcohol en el extracto de propóleo (ca. 5%): el contenido alcohólico residual conlleva

un menor efecto de inhibición para las muestras con propóleo (PI 8%), quitosano/propoleo/plata (PI 52%) y quitosano/propoleo (63%). Las muestras sin trazas de alcohol removido del extracto de propóleo por sonicación exhiben la deseada actividad microbiana (PI 100%) para todos los productos aplicados.

6.2 Referencias

- Agustí-Brisach, C., León, M., García-Jiménez, J., Armengol, J. (2015). Detection of Grapevine Fungal Trunk Pathogens on Pruning Shears and Evaluation of Their Potential for Spread of Infection. *Plant Dis.*, 99(7), 976-981.
- Beigi, T.M., Ngadi, M.O., Holman, D.B., Chénier, M.R. 2015. Analysis of Fungal Diversity in Ready-to-Eat Pizza and Effectiveness of Pulsed Ultraviolet-Light Treatment for Inactivation of Mold on Agar Surface. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(5), 228.
- Benito, M., Masaguer, A., Moliner, A., De Antonio, R. (2006) Chemical and physical properties of pruning waste compost and their seasonal variability. *Bioresour. Technol.*, 97(16), 2071-2076.
- Bleach, C., Jones, E., Ridgway, H. and Jaspers, M (2013) Hot water treatment to reduce incidence of black foot pathogens in young grapevines grown in cool climates. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 2, 347–358.
- Bleach, C.M., Jones, E.E., Jaspers, M.V. (2009) Hot water treatment for elimination of *Cylindrocarpum* species from infected grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 183.
- Boanić, D. K., Trandafilović, L. V., Luyt, A. S. and Djoković, V. (2010) Green' synthesis and optical properties of silver-chitosan complexes and nanocomposites," *Reactive and Functional Polymers*, vol. 70, no. 11, pp. 869–873.
- Bustamante, M.A., Albuquerque, J.A., Restrepo, A.P., de la Fuente, C., Paredes, C., Moral, R., Bernal, M.P. (2012) Co-composting of the solid fraction of anaerobic digestates, to obtain added-value materials for use in agriculture. *Biomass Bioenergy*, 43, 26-35.
- Butnariu, M. V. and Giuchici, C. V. (2011) The use of some nanoemulsions based on aqueous propolis and lycopene extract in the skin's protective mechanisms against UVA radiation. *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 9, article 3.
- Canarutto, S., Petruzzelli, G., Lubrano, L., Guidi, G.V. 1991. How composting affects heavy metal content. *Biocycle*, 32(6), 48-50.
- Crous, P. W., and W. Gams. 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et. comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathol. Mediterr.* 39:112-118.

- Dunkley, C., Cunningham, D., Ritz, C., Dunkley, K., Hinton, A. (2011) Using mortality compost in vegetable production: A comparison between summer and winter composting and its use in cabbage production. *Agric. Food Anal. Bacteriol.*, 1, 6-14.
- Edwards, J., Pascoe, I., Salib, S., Laukart, N. 2004. Hot water treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaeomoniella chlamydospora* in young vines. *Phytopathol. Mediterr.*, 43, 158-159.
- Evans, D.E. 1987. The influence of rate of heating on the mortality of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *J. Stored Prod. Res.*, 23(1), 73-77.
- Evelyn, H.J. Kim, F.V.M. Silva (2016) Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. *Food Control* 59, 530-537.
- Fourie, P.H., Halleen, F. 2004. Proactive Control of Petri Disease of Grapevine Through Treatment of Propagation Material. *Plant Dis.*, 88(11), 1241-1245.
- Franca, J. R, De Luca, M. P. and Ribeiro, T. G. (2014) Propolis—based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 14, article 478.
- García, C., Hernández, T., Costa, F. 1991. Changes in carbon fractions during composting and maturation of organic wastes. *Environ. Manage.*, 15(3), 433-439.
- Gazit, Y., Rossler, Y., Wang, S., Tang, J., Lurie, S. 2004. Thermal Death Kinetics of Egg and Third Instar Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 97(5), 1540-1546.
- Gramaje D., Armengol J., Salazar D., López-Cortés I., García-Jiménez J. (2009) Effect of hot-water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. *Crop Protection*, 28, 280–285.
- Halleen F., Fourie P.H., Crous P.W. (2007a) Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology*, 56, 637–645.
- Hallman, G.J., Wang, S., Tang, J. 2005. Reaction Orders for Thermal Mortality of Third Instars of Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 98(6), 1905-1910.

- Jeris, J.S. and Reban, R.W. (1973) Controlling Environmental Parameters for Optimum Composting. *Compost science*. Citado por Bueno et al. 2008.
- Jhorar, B.S., Phogat, V. and Malik, E. (1991) Kinetic of composting rice straw with glue waste at different C/N ratios in a semiarid environment. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 5:297/306. Citado por Mendoza D.J., 2010.
- Labus, K., Bryjak, J., Polakovič, M. 2015. Kinetics of thermal inactivation of immobilized *Agaricus bisporus* tyrosinase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 120, 136-140.
- Laukart, N., Edwards, J., Pascoe, I.G. and Nguyen, N.K. (2001) Curative treatments trialed on young grapevines infected with *Phaeoconiella chlamydsopora*. *Phytopathologia Mediterranea* 40:459-463.
- Moharram, M. A., H. Khalil, S. K., Sherif, H. H. A. and Khalil, W. A (2014) Spectroscopic study of the experimental parameters controlling the structural properties of chitosan–Ag nanoparticles composite,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 126, pp. 1–6.
- Moreno Casco, J. and Moral Herrero, R. (2008) *Compostaje*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, p 570.
- Neven, L.G. 1998. Effects of Heating Rate on the Mortality of Fifth-Instar Codling Moth (*Lepidoptera: Tortricidae*). *J. Econ. Entomol.*, 91(1), 297-301.
- Rosen, C.J., Halbach, T.R., Swanson, B.T. 1993. Horticultural uses of municipal solid waste composts. *HortTechnology*, 3(2), 167-173.
- Sánchez, B. M., Navas, L.M., Diez, M.A., Correa, A., Hernandez, S. and Martín G. J. (2008) *Compostaje de cadáveres de pollos en sistema cerrado discontinuo*. I Jornadas de la Red Española de Compostaje, Barcelona; p. 272-278.
- Schloss, P.D., Hay, A.G., Wilson, D.B., Walker, L.P. (2003) Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 46(1), 1-9.
- Silva, S.M., Braga, C. R., Fook, M. V., Raposo, C. M., Carvalho, L. H. and Canedo, E. L. (2012) Application of infrared spectroscopy to analysis of chitosan/clay nanocomposites. *Infrared Spectroscopy—Materials Science, Engineering and Technology*, T.Theophanides, Ed., pp. 43–62, InTech.

- Venkatesham, M., Ayodhya, D., Madhusudhan, D., Veera Babu, N. and Veerabhadram, G. (2012) A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, vol. 4, pp. 113–119, 2012.
- Vilas, V., Philip, D. and Mathew, J (2014) Catalytically and biologically active silver nanoparticles synthesized using essential oil. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 132, pp. 743–750.
- Waite, H., May, P. 2005. The Effects of Hot Water Treatment, Hydration and Order of Nursery Operations on Cuttings of *Vitis vinifera* Cultivars. in: *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 44, University of Florence. Florence, Italy, pp. 144-152.
- Wang, S., Ikediala, J.N., Tang, J and Hansen, J.D. (2002) Thermal death kinetics and heatingrate effects for fifth-instar *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) *Journal of Stored Products Research* 38, 441–453.
- Yan, R., Huang, Z., Zhu, H., Johnson, J.A. and Wang, S. (2014). Thermal death kinetics of adult *Sitophilus oryzae* and effects of heating rate on thermotolerance. *Journal of Stored Products Research* 59 231-236.
- Zhu, N. (2006) Composting of high moisture content swine manure with corncob in a pilot-scale aerated static bin system. *Bioresour. Technol.*, 97(15), 1870-1875.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., de Bertoldi, M., (1981) Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle* 22, 54-57.
- Zvezdova, D. (2010) Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in Black Sea,” in *Proceedings of the Annual Conference. Angel Kanchev*”, vol. 49 of Series 9.1—Chemical Technologies, pp. 65–69, TheUniversity of Rouse.



7 CONCLUSIONES

7.1 CONCLUSIONES GENERALES

De los resultados obtenidos del presente estudio sobre “Higienización de sarmientos de la poda de vid mediante métodos térmicos y biofungicida” se han elaborado por capítulos las siguientes conclusiones:

En relación con el artículo científico 1 “*Higienización y control del hongo *Diplodia seriata* en restos de la poda de la vid y su variabilidad estacional en compostaje abierto y cerrado*”.

Primera: se propone un método de biodegradación en fase sólida de residuos de sarmientos y restos de poda de vides afectadas por varios hongos, con fines de higienización y se destaca su efectividad para *Diplodia seriata*. Se trata de un proceso de compostaje de mezclas de estiércol de gallina con los residuos citados (2:1 en peso) en pilas abiertas y biodigestores cerrados.

Segunda: se describen las condiciones operativas que conducen a la optimización del proceso: temperatura, 75°C; humedad inicial, 40-50%; pH, 7-9.5; conductividad eléctrica, 1-3.5 dS/m; y cociente C/N ratio, 14-22.

Tercera: se destacan las diferencias en efectividad de los sistemas de procesado: mientras en pilas abiertas el control de *Diplodia seriata* precisa 10 días y hasta 35 más para conseguir la inhibición total, en biodigestores cerrados el hongo desaparece al cabo de 3-4 días.

Cuarta: ha sido puesto en evidencia el impacto de la estacionalidad sobre la eficacia de los procesos de control e inhibición, observándose que su mayor significatividad para *D. seriata* se produce en el verano y trabajando en pilas abiertas.

En relación con el artículo científico 2 “*Cinética de muerte térmica in vitro de hongos inoculados de *Diplodia seriata* en sarmientos de la poda de la vid*”.

Quinta: se propone, como alternativa o complemento del tratamiento anterior, la sanitización térmica de los sarmientos y residuos de poda colonizados por *D. seriata* y se plantea la utilidad de la realización de estudios de muerte térmica de sus inóculos a diferentes temperaturas en un incubador de aire seco, confirmando que la inhibición aumenta como función de la temperatura y del tiempo de exposición

Sexta: se describen las cinéticas de las curvas de supervivencia de *D. seriata* mediante los modelos de Primer-orden y Weibull, obteniendo valores de R² y significatividad elevados para ambos. De acuerdo con el modelo de Primer orden, el tiempo requerido para alcanzar a 65°C un 100% de mortalidad es de 120 minutos (o de 93 minutos para llegar al 95%) mientras para el modelo de Weibull una reducción del 90% es obtenida después de 73 minutos.

En relación con el artículo científico 3 “*Síntesis de composite de oligómeros de quitosano/propóleo/nanoplatina y el estudio de su actividad contra Diplodia seriata*”.

Séptima: se propone la aplicación de soluciones acuosas e hidroalcohólicas de mezclas ternarias de oligómeros de quitosano/propóleo/nanopartículas de plata con vista a la formación de sustancias adhesivas o nanopelículas que confieran protección a las vides frente a hongos xilófagos. Se destaca su eficacia para el tratamiento de *D. seriata*.

Octava: se determina la influencia que bajas concentraciones de alcohol (ca. 5%) sobre el diámetro de crecimiento del micelio de *D. seriata*. Los resultados son concluyentes sobre la necesidad de eliminar el alcohol para mejorar la actividad antifúngica de estos materiales.

Novena: se destaca el papel de la molecularidad del quitosano utilizado sobre la efectividad fungicida de las mezclas ternarias y se recomienda la conveniencia de utilizar oligómeros de quitosano de bajo peso molecular toda vez que su actividad inhibitoria es significativamente mayor que la de quitosano de masa molecular media.

GENERAL CONCLUSIONS

From the results obtained in this study on the “*Hygienization of pruned grapevine shoots through thermal methods and biofungicides*”, the following conclusions can be drawn from each chapter:

With regard to the first article on the “*Hygienization and control of *Diplodiaseriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems*”:

First: A biodegradation method in solid phase for pruned vine shoots and pruning waste infected by various fungi -aimed at achieving their hygienization-has been proposed, placing emphasis on its effectiveness against *Diplodiaseriata*. It consists of a composting process of poultry manure with aforementioned pruning waste (2:1 ratio in weight) in open piles and closed biodigesters.

Second: The operative conditions that result in the process optimization have been described: temperature (75 °C), initial humidity (40-50%), pH (7-9.5), electrical conductivity (1-3.5 dS/m) and C/N ratio (14-22).

Third: The dramatic differences in terms of efficiency of the different processing systems have been stressed: whereas in open piles it takes 10 days to control *Diplodiaseriata* and 35 additional composting days to achieve full inhibition, in closed biodigesters the fungus entirely disappears within the first 3-4 days.

Fourth: The impact of the seasonal variability on the efficiency of the control and inhibition processes has been evidenced, observing that the highest significance for *D. seriata* occurs in the summer for open piles.

In relation to the second article on “*Thermal death kinetics of *Diplodiaseriata* fungus inoculated *in vitro* in pruned vine shoots*”:

Fifth: As an alternative or supplementary treatment to that discussed above, a thermal sanitization of the pruned vine shoots and pruning waste infected by *D. seriata* has been proposed, discussing the utility of conducting studies on the thermal death kinetics of its inocula at different temperatures in a dry air incubator and confirming that inhibition increases as a function of temperature and exposure time.

Sixth: The thermal death kinetic curves of *D. seriata* have been described using first order and Weibull models, obtaining high R^2 and significance levels in both cases. According to the first-order model, the time required to reach 100% mortality at 65 °C is 120 min (or 93 min to 95%), whereas for the Weibull model a 90% reduction is attained after 73 min.

As regards to the third article on the “Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver-nanoparticles composite systems and study of their activity against *Diplodia seriata*”:

Seventh: The application in aqueous or hydroalcoholic solutions of ternary mixtures of chitosan oligomers/propolis/silver nanoparticles -with a view to the formation of adhesive substances or nanofilms for the protection of vineyards against harmful xylophagous fungi- has been proposed, emphasizing its effectiveness for the treatment of *D. seriata*.

Eighth: the influence of low alcohol concentrations (ca. 5%) on the on the growth diameter of the *Diplodiaseriata* mycelia has been determined. The results are conclusive on the need of alcohol removal to improve the antifungal activity of these materials.

Ninth: The key role of chitosan molecularity on the antifungal effectiveness of the ternary mixtures has been highlighted, recommending the use of low-weight chitosan oligomers, provided that their inhibitory activity is significantly higher than that of medium molar mass chitosan.