



- El presente artículo pretende demostrar la supresividad en los sustratos, o de algunos materiales utilizados en estos sustratos, ante enfermedades de raíz, como las causadas por *Phytophthora* y *Pythium*

Supresividad en sustratos

Estudio de la microbiótica presente en los sustratos Roldo y Ecobosc. Tipos representativos de microorganismos, niveles poblacionales y potencial antagonista frente bacterias y hongos fitopatógenos de interés agrónomico

Es conocida la descripción de sustrato como soporte físico para el anclaje de las raíces. Se conocen las propiedades físicas necesarias de estos sustratos, como la relación aire-agua y porosidad total. También están bien descritas las propiedades químicas exigidas a los sustratos, como la conductividad eléctrica, pH y relaciones iónicas de los nutrientes. Pero queda mucho por conocer en cuanto las propiedades microbiológicas y sus interacciones en el sistema sustrato-raíz-planta.

Los ensayos se plantearon para determinar la actividad y el espectro antagonista *in vitro* de los diferentes aislados obtenidos en las muestras de sustrato procesadas.

Para demostrar la supresividad de cierto tipo de sustratos ante enfermedades de raíz, la empresa Burés Profesional, S.A. firmó un contrato de colaboración científico-técnica con la Universidad de Girona, en junio de 2003. En el marco de esta colaboración se desarrolló el siguiente estudio: Estudio de la microbiótica presente en los sustratos Roldo y Ecobosc. Tipos representativos de microorganismos, niveles poblacionales y potencial antagonista frente bacteria y hongos fitopatógenos de interés agrónomico.

Joan Soler

jsoler@burespro.com

Burés Profesional S.A.



Cuadro 1:

Microorganismos fitopatógenos indicadores

| Microorganismo | | Enfermedad |
|------------------|----------------------------------|---|
| Bacterias | <i>Clavibacter michiganensis</i> | chancro bacteriano en hortalizas |
| | <i>Erwinia carotovora</i> | podredumbre blanda de tallo, tubérculos y rizomas |
| | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | tumores de cuello |
| Hongos | <i>Fusarium oxysporum</i> | marcimiento vascular |
| | <i>Phytophthora cactorum</i> | podredumbre del cuello y raíces |
| | <i>Pythium ultimum</i> | podredumbre del cuello y raíces |

Cuadro 2:

Número y porcentaje de antagonistas contra diferentes hongos fitopatógenos indicadores

| Indicador | Medio | | Total antagonistas | % respecto el total |
|------------------------------|-------|-----|--------------------|---------------------|
| | LB | PDA | | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 7 | 6 | 11 | 3,3 |
| <i>Phytophthora cactorum</i> | - | 57 | 57 | 17,3 |
| <i>Pythium ultimum</i> | - | 91 | 91 | 27,6 |

Material y métodos

Para la cuantificación de los niveles poblacionales, se tomaron muestras de dos pilas o lotes diferentes de los dos sustratos. De cada pila o lote se tomaron tres submuestras en diferentes sitios.

Ensayos *in vitro* de actividad antagonista de la microbiota del sustrato frente bacterias y hongos fitopatógenos de interés agronómico

Estos ensayos se plantearon para determinar la actividad y el espectro antagonista *in vitro* de los diferentes aislados obtenidos en las muestras de sustrato procesadas en el apartado anterior.

Los microorganismos indicadores que se utilizaron son representativos de las bacterias y hongos causantes de enfermedades del sistema radicular (Cuadro 1) que son un problema por las pérdidas económicas que causan en diferentes cultivos agrícolas.

Para la realización de los ensayos se utilizaron diversos medios de cultivo. Para las bacterias se utilizó un medio general como Luria-Bertani (LB), el medio B de

King, medio bajo en hierro, útil para mejorar la producción de sideróforos y el agar Glucosa-Asparagina (GA) que es un medio donde se detectan mayormente más antagonistas. Para los hongos se utilizaron los medios LB y el agar patata-dextrosa (PDA).

El potencial antagonista de los aislados bacterianos se determinó mediante la capacidad de

producción de halos de inhibición cuando se siembran conjuntamente con las bacterias y hongos fitopatógenos indicadores añadidos como a una sobrecapa de agar en diferentes medios de cultivo. Las bacterias y hongos fitopatógenos utilizados se sembraron en sobrecapa de agar (utilizando suspensiones de células en el caso de bacterias o conidios en el caso de los hongos). Las cepas bacterianas aisladas del sustrato que se quieren estudiar se inocularon por picada a la superficie.

La preparación de las suspensiones de los hongos fitopatógenos se hizo a partir de placas de Agar Patata Dextrosa (PDA) sembradas con el hongo indicador. Después de recoger los conidios en condiciones estériles, se resuspendieron en agua destilada estéril con Tween 20[®] (20µL/L). La concentración de conidios se ajustó a 105 conidios/mL cuantificando-

■ **Es conocida la descripción de sustrato como soporte físico para el anclaje de las raíces. Se conocen sus propiedades físicas, como la relación aire-agua y porosidad total. También las propiedades químicas exigidas como la conductividad eléctrica, pH y relaciones iónicas de los nutrientes**

Cuadro 3:
Número y porcentaje de antagonistas contra diferentes bacterias fitopatógenas indicadores

| Indicador | Medio | | | | Total antagonistas | % respecto el total |
|----------------------------------|-------|----|----|----|--------------------|---------------------|
| | LB | KB | GA | MH | | |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 2 | 26 | 4 | 3 | 33 | 10 |
| <i>Clavibacter michiganensis</i> | 6 | 42 | 12 | 11 | 60 | 18,2 |
| <i>Erwinia carotovora</i> | 4 | 67 | 5 | 4 | 72 | 21,9 |

Cuadro 4:
Número de antagonistas contra las bacterias indicadoras en función del tipo de microorganismos, del porcentaje respecto el número total de antagonistas y de aislados

| Microorganismo | Antagonistas | Total aislados | % respecto especie | % respecto total antagonistas | % respecto total aislados |
|----------------|--------------|----------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Bacteria | 98 | 273 | 35,9 | 94,2 | 29,7 |
| Levadura | 6 | 25 | 24 | 5,8 | 1,8 |
| Hongo | - | 31 | - | - | - |
| Total | 104 | 329 | - | - | 31,6 |

Cuadro 5:
Número de antagonistas contra los hongos fitopatógenos en función del tipo de microorganismos, del porcentaje respecto el número total de antagonistas y de aislados

| Microorganismo | Antagonistas | Total aislados | % respecto especie | % respecto total antagonistas | % respecto total aislados |
|----------------|--------------|----------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Bacteria | 120 | 273 | 43,6 | 96,7 | 36,3 |
| Levadura | 2 | 25 | 8 | 1,6 | 0,6 |
| Hongo | 2 | 31 | 8 | 1,6 | 0,6 |
| Total | 124 | 329 | - | - | 37,7 |

lo mediante un recuento en el microscopio con una cámara hemocitométrica tipo Thoma. En el caso de las bacterias fitopatógenas se inició a partir de siembras de 34 h de la bacteria en agar LB incubadas a 25 °C. Se resuspendieron en agua destilada estéril ajustando la concentración a 108 ufc/mL midiendo la absorbancia a 620 nm. La sobrecapa se realizó añadiendo 0.2 mL de la suspensión de bacterias o conidios de los hongos a 4 mL de agar blando del mismo medio.

Las cepas de bacterias antagonistas se sembraron por picada

con la ayuda de palillos estériles encima de la sobrecapa ya solidificada.

El potencial antagonista de los aislados fúngicos se realizó

■ **Los niveles poblacionales de los grupos microbianos y de las especies bacterianas analizadas varían en función del sustrato (Ecobosc y Roldó) y también del período de muestreo**

depositando discos de 0.5 cm de las colonias fúngicas de los aislados del sustrato encima de la sobrecapa de agar que contenía la bacteria o hongo indicador.

Después de un período de incubación (48 h en el caso de las bacterias y 72 h en el caso de los hongos) a 22-25 °C se determinó la capacidad antagonista de cada cepa midiendo el halo de inhibición producido alrededor de la colonia. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Resultados

En el cuadro 3 se muestra el número de aislados antagonistas para cada una de las bacterias fitopatógenas indicadoras. Se observa que la mayoría de aislados inhibieron a los indicadores en medio KB y perdían la actividad antagonista en el resto de medios, indicando que la producción de sideróforos era probablemente la causa de la inhibición. Todo i así, hay un grupo de aislados que inhibieron a los patógenos indicadores en diferentes medios sugiriendo que la inhibición probablemente era debida a la producción de alguna sustancia antimicrobiana. La *A. tumefaciens* fue el indicador bacteriano menos inhibido, con un 10% de antagonistas respecto al total de aislados, mientras que los niveles de antagonistas de *C. michiganensis* y *E. carotovora* son similares, del 18,2% y del 21,9%, respectivamente. En cuanto a la distribución de los antagonistas en función del grupo microbiano (Cuadro 4), se observa que la mayoría de antagonistas correspondían a bacterias, alrededor del 94%, y el resto correspondían a levaduras. No se encontró ningún hongo antagonista contra estas bacterias indicadoras.

En cuanto al antagonismo contra hongos fitopatógenos, en el cuadro 5 se muestra el número de aislados por cada uno de los hongos indicadores. Ni *Phytium ultimum* ni *Phytophthora cactorum* crecieron en el medio LB. Se observa que un 27,6% de los aislados inhibieron *Phytium ultimum*, un 17,3 a *Phytophthora cactorum*,



y sólo un 3,3% a *Fusarium oxysporum*. En cuanto a la distribución de los antagonistas en función del grupo microbiano (Cuadro 5), se observa que el 96,7% de los antagonistas correspondieron a bacterias, y sólo el 3,3% correspondieron a hongos y levaduras.

El porcentaje de aislados que eran antagonistas contra los indicadores fitopatógenos bacterianos y fúngicos fue muy similar, con valores del 31,6 y del 37,7%, respectivamente.

Conclusiones

- Se ha creado una colección de 329 tipos de microorganismos correspondientes a bacterias, hongos y levaduras predominantes en los sustratos Ecobosc y Roldó.

- Los niveles poblacionales de los grupos microbianos y de las especies bacterianas analizadas varían en función del sustrato (Ecobosc y Roldó) y también del período de muestreo, pero en todos los casos las bacterias de las especies que han estado descritas (en diversa bibliografía) como agentes de control biológico o promotores del crecimiento vegetal, son abundantes.

- Los perfiles metabólicos de las poblaciones microbianas también varían en función del período de muestreo y del sustrato. Aún así, se observan diferencias entre los perfiles por cada sustrato, la cual cosa puede indicar que las poblaciones están adaptadas al sustrato al cual pertenecen.

- El porcentaje de antagonistas contra fitopatógenos bacterianos y fúngicos es similar, con valores del 31,6 y del 37,7%, respectivamente. Los antagonistas mayoritariamente correspondieron a bacterias, y por tanto parecen los mejores candidatos para ser utilizados como la complementación de los sustratos para darles un valor añadido de supresividad.



D> Camino Xamussa, s/n . Apto.145;12530 Burriana (Castellón)
T> (+34) 964 514 651 F> (+34) 964 515 068 M> Ininsa@ininsa.es W> www.ininsa.es

Para saber más

■ Artículo completo y bibliografía en www.horticom.com?59388