

TRABAJO FIN DE MÁSTER

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y
AGROALIMENTARIA

UTILIZACIÓN DE TÉS DE COMPOST CON MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS PARA SUPRESIÓN DE ENFERMEDADES DE PLANTAS



Alumno:

Luís Santiago Carrillo

Directores:

Francisco José Marín Andrés – Koppert España

María del Carmen Vargas García – Universidad de Almería

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Luisa y Rafael, por dejarme la mejor de las herencias, la educación; a mi hermano Rafa y a mi novia Ana, por todo lo que significan para mí; a mis familiares y amigos por su apoyo incondicional.

A mis directores del trabajo, Dña. María del Carmen Vargas García y D. Francisco José Marín Andrés, porque sin ellos este trabajo no habría sido posible.

ÍNDICE

1. Resumen	Página 1
2. Introducción	Página 2
2.1. Los té s de compost	Página 2
2.1.1. ¿Por qué usar té s de compost?	Página 2
2.1.2. Definición de té de compost	Página 4
2.1.3. Métodos de preparación del té de compost	Página 5
2.2. Microbiología de los té s de compost	Página 6
2.3. Control de patógenos	Página 9
3. Material y métodos	Página 12
3.1. Análisis microbiano del té de compost	Página 12
3.1.1. Obtención del té de compost	Página 12
3.1.2. Diluciones seriadas	Página 12
3.1.3. Medios de cultivo	Página 13
3.2. Evaluación del efecto supresivo del té de compost sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos	Página 13
3.2.1. Colección de cepas fúngicas	Página 13
3.2.2. Ensayo de supresividad	Página 14
3.3. Análisis estadístico	Página 15
4. Resultados	Página 15
4.1. Análisis microbiano del té de compost	Página 15
4.2. Evaluación del efecto supresivo del té de compost sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos	Página 18
5. Discusión	Página 26
6. Conclusiones	Página 29
7. Bibliografía	Página 30

1. RESUMEN

Los té de compost son extractos acuosos generados a partir de materia orgánica residual biológicamente estabilizada. En su elaboración se extraen y multiplican los microorganismos presentes en la materia de partida, los cuales pueden ejercer cierta acción supresora sobre distintos agentes fitopatógenos. Esta capacidad, junto al aporte nutricional que realiza y la sencillez de su aplicación, favorecen su utilización en agricultura. En el presente trabajo de fin de máster se llevó a cabo el análisis de las poblaciones microbianas presentes en 1 L té de compost aireado (ACT) generado a distintos tiempos (8, 24 y 72 h), y su evaluación como agente de control biológico en relación con la supresión *in vitro* del crecimiento micelial de ocho hongos fitopatógenos responsables de enfermedades típicas de cultivos protegidos del sureste peninsular (*Pythium aphanidermatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*). En este último caso, el estudio se realizó en comparación con un control químico (fungicida). Los resultados obtenidos para el primer ensayo mostraron máximas poblaciones de bacterias, seguidas por hongos y levaduras respectivamente, tras 24 h de aireación, por lo que se seleccionó el producto generado en estas condiciones para la ejecución del segundo de los ensayos. En este caso, se aplicó dicho té de compost al medio PDA a concentraciones de 0,5%, 2,5% y 5% (v/v). Por lo general, los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron para la concentración de té al 5%. En el caso de *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici*, la supresión ejercida por el té de compost fue significativamente superior que con el empleo de fungicidas. También se obtuvieron resultados favorables para *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici* y *Botrytis cinerea*, si bien el efecto de fungicida fue significativamente superior al del té. Por último, en los casos de *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotinia sclerotiorum*, el empleo del té de compost apenas produjo inhibición del patógeno, en contraste con el uso de fungicida, que tuvo un efecto significativamente superior. Por todo lo anterior, la aplicación de los té a los cultivos puede ser considerada como una estrategia favorable, viable y respetuosa con el medio ambiente en el control de enfermedades fúngicas vegetales, aunque para ello se precisa de estudios *in vivo* en semi-campo y, por último, de campo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Los téis de compost

2.1.1. ¿Por qué usar téis de compost?

A lo largo de las últimas décadas el empleo de pesticidas, herbicidas (control químico de plagas) y fertilizantes químicos (nutrición vegetal) en los cultivos ha permitido aumentar su producción de manera muy significativa. No obstante, el uso indiscriminado de estos productos de síntesis entraña a su vez múltiples riesgos (Danielle y Rai, 2006). En el caso de los pesticidas, se ha demostrado que tienen un fuerte impacto sobre los recursos naturales no renovables, contaminan los alimentos debido a trazas de residuos tóxicos que permanecen en ellos, provocan la pérdida y degradación del suelo y de la diversidad de su microbiota, sin olvidar el riesgo que conlleva el manejo de pesticidas para los profesionales que se encargan de su aplicación (Reganold *et al.*, 2001). Además, en el caso particular de los fungicidas, su reiterado uso puede provocar el desarrollo de resistencias por parte del hongo patógeno, y también tiene efectos nocivos en organismos beneficiosos (amplio espectro de acción) (Goldman *et al.*, 1994; Relyea y Hoverman, 2006; Alfano *et al.*, 2011).

La desinfección de suelos y sustratos es actualmente una práctica común en horticultura y/o cultivos de plantas ornamentales, y suele llevarse a cabo antes del cultivo a fin de reducir la presencia de especies patógenas. Sin embargo, según autores como Chellemi *et al.* (1994) la eficacia de estos métodos se encuentra sometida a debate, debido a que sólo eliminan total o parcialmente los patógenos hasta una profundidad de 35 cm y su uso conlleva su repetición todas las campañas. Además, esta práctica provoca que los suelos y sustratos se conviertan en un ambiente idóneo para la proliferación de patógenos, debido a la ausencia de microorganismos competidores por los nutrientes y/o sitios de colonización.

Como consecuencia, cada vez son más las alternativas sostenibles al uso de fitosanitarios, reemplazando totalmente o complementando estas estrategias. Durante los últimos años, el empleo de agentes de control biológico, compost o sus derivados se ha popularizado no sólo para el control de patógenos, sino para fines tales como la

movilización de nutrientes o la biofertilización, siendo introducidos en diferentes sistemas de cultivo.

Tal y como afirman Sivan y Chet (1992), el uso del compost ha sido reconocido como una de las estrategias más prometedoras para el control biológico de patógenos vegetales, pues ofrece una alternativa muy interesante al control químico, sin sus impactos negativos. Asimismo, su uso es altamente compatible con las prácticas de agricultura sostenible, las cuales son totalmente necesarias si se quieren preservar los recursos naturales.

El compostaje consiste en la descomposición y estabilización de la materia orgánica por parte de organismos termófilos, de manera aerobia, produciendo elevadas temperaturas, reduciendo el volumen y la masa de los residuos orgánicos y provocando su humificación y oscurecimiento. El producto final generado, conocido como compost, es un material estable, libre de patógenos y de semillas de malas hierbas, y apto para su uso en cultivos vegetales (Golueke, 1982; Haug, 1993; Nakasaki, 2005). La demanda de información técnica acerca de la elaboración del compost y del té de compost a partir de materiales de desecho locales (de fácil disponibilidad) ha aumentado considerablemente en la última década, debido en gran parte a la generación creciente de residuos agrícolas compostables, los cuales se desechan en vertederos (Acurio *et al.*, 1998). La valorización de los residuos biodegradables en forma de compost y té de compost se abre camino como una opción viable para el tratamiento de residuos orgánicos (San Martín y Brathwaite, 2012).

Mediante la aplicación de compost se introducen distintas comunidades microbianas en el suelo y se logra aumentar su biodiversidad, permite además la inoculación de agentes de control biológico (ACB) donde más se necesitan, en la rizosfera. Los ACB tienen la capacidad de establecerse y reproducirse en el ecosistema del suelo, y de colonizar las semillas, la espermosfera, la rizosfera y el rizoplano (Cook y Baker, 1983).

A pesar de las potenciales ventajas que presenta el uso de compost en la agricultura, debido a la alta riqueza y diversidad microbiana que presenta, con microorganismos beneficiosos para la planta, existen sistemas de cultivo, como el cultivo en enarenado o en sustrato, comúnmente utilizados en la agricultura intensiva

bajo plástico del Sureste peninsular, que hacen difícil su aplicación, ya que conllevaría retirar la arena, aplicar el compost, incorporarlo al suelo y volver a extender la arena, con los altos costes de mano de obra derivados. Debido a ello, los suelos de estos sistemas de cultivo, son sometidos a un uso intensivo y la materia orgánica no es repuesta a los niveles adecuados, por lo que suelen tener problemas de compactación, salinización y, como consecuencia, bajos niveles de vida microbiana, lo que hace que los patógenos causen graves problemas en los cultivos. Los té de compost permiten extraer estos microorganismos beneficiosos del compost, junto con parte de los nutrientes y sustancias presentes en el mismo, y aplicarlos vía riego, con el objeto de aumentar la diversidad microbiológica de estos suelos y sustratos, y hacerlos más aptos para el cultivo. El sistema de utilización de té de compost comercializado por Koppert España, S.L., consiste en aplicar los té de compost, procedentes de una fuente de compost fiable, estable y de calidad, a modo de inoculante microbiano al suelo. Por ello, es importante conocer las características de la comunidad microbiana presente en estos té y su efecto supresor frente a los principales agentes patógenos causantes de enfermedades en nuestros cultivos.

2.1.2. Definición de té de compost

Los té de compost son extractos acuosos producto de la mezcla del compost con un determinado solvente, normalmente el agua (Litterick *et al.*, 2004), que permiten extraer y reproducir los microorganismos beneficiosos del compost, para su posterior aplicación a los cultivos. Existen dos clases de té de compost, los té de compost aireados o ACT (“*Aerated Compost Teas*”) y los té de compost no aireados o NCT (“*Non-aerated Compost Teas*”), los cuales difieren en cuanto al método de producción empleado durante el proceso de elaboración. En los ACT, el té se airea de forma activa a lo largo del proceso de generación (Litterick y Wood, 2009), mientras que en los NCT no existe tal suministro de aire, o el té sólo recibe un suministro (mínimo) de aire aplicado durante la etapa inicial de mezclado del proceso productivo (Litterick y Wood, 2009).

Los té de compost tienen aplicación en el área del control biológico de plagas vegetales asociadas a los cultivos protegidos de interés agronómico, así como en el área de la nutrición vegetal en cultivos de interés.

2.1.3. Métodos de preparación del té de compost

La necesidad de aireación durante el proceso de elaboración del té de compost ha estado siempre sometida a debate (Brinton *et al.*, 1996; Ingham, 1999 y 2000; Ingham y Alms 2003). Generalmente, los ACT se han asociado con menores tiempos de elaboración (Scheuerell y Mahaffee, 2002), mayor concentración y diversidad microbiana, poca o ninguna fitotoxicidad, además de ser un ambiente poco idóneo para la proliferación de patógenos humanos (Ingham y Alms, 2003). Por su parte, los NCT se han relacionado con bajos inputs energéticos, de manera que el coste derivado de su elaboración es menor (Weltzien, 1991). Por el contrario, distintos estudios han señalado a los NCT como agentes causantes de fitotoxicidad, además de proporcionar un ambiente favorable para la aparición de patógenos humanos (Litterick y Wood, 2009; Scheuerell y Mahaffee, 2002). Sin embargo, la mayoría de trabajos publicados reflejan la ausencia de efecto fitotóxico cuando los NCT son aplicados, bien foliarmente mediante pulverización o *spraying*, o bien mediante irrigación (Scheuerell y Mahaffee, 2002). Adicionalmente, como expone Murray (1999), no existe justificación biológica para afirmar que un ambiente pobre en oxígeno es favorable para el desarrollo de patógenos humanos. Como se cita en el estudio realizado por Ingram y Millner (2007), la reactivación de los patógenos humanos *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* y bacterias coliformes fecales, no es dependiente del método específico de producción empleado para la elaboración del té de compost (ACT o NCT), pero si es fuertemente dependiente de la adición de suplementos nutricionales al inicio del proceso de elaboración. De hecho, en el estudio se cita que los ACT mantienen mayores concentraciones de estos microorganismos que los NCT cuando se añaden los suplementos nutritivos. Scheuerell y Mahaffee (2002) y Litterick y Wood (2009) refieren que hay poca evidencia que sustenten las afirmaciones de que los NCT pueden causar fitotoxicidad.

En cualquier caso, ambos métodos de elaboración de los tés de compost (tanto los ACT como los NCT) implican un proceso de extracción en agua y crecimiento microbiano durante un periodo de tiempo específico, y requieren el uso de un tanque de fermentación, inóculo (compost), agua, e incubación y filtración previas a la utilización del té (Scheuerell y Mahaffee, 2002; Litterick y Wood, 2009; St. Martin y Braithwaite, 2012). Los nutrientes pueden ser adicionados antes o después del proceso de

fermentación y los aditivos o coadyuvantes pueden añadirse previos a la aplicación del té.

Cabe destacar que cada vez son más las compañías encargadas de diseñar y comercializar sistemas para la elaboración de los ACT. Tal y como afirman St. Martin y Braithwaite (2012), el diseño general de estos aparatos destinados a la elaboración de los ACT incluyen un tanque con un recipiente poroso que contiene el compost, un sistema de recirculación de agua a través de dicho recipiente y un suministro constante de aire a través de un sistema de insuflado.

En general, para la elaboración de los NCT se mezcla una parte de compost con 4 a 10 partes de agua en un recipiente abierto. Al comienzo del proceso, la mezcla se agita. A continuación se deja reposar a una temperatura que puede oscilar entre 15-20 °C durante, al menos, 3 días (Weltzien, 1991), con mínima o nula agitación. Brinton *et al.* (1996) sugieren agitar los NCT cada 2 o 3 días para favorecer la liberación de los microorganismos presentes en el compost. El tamaño del recipiente empleado en la elaboración de los NTC puede variar desde pequeñas cubetas hasta recipientes que pueden albergar varios miles de litros (St. Martin y Braithwaite, 2012).

Aunque el empleo de los té de compost es cada vez mayor, tal y como afirman St. Martin y Braithwaite (2012), la investigación en el campo del compost y del té de compost se encuentra aún en una etapa temprana. Por ello, son necesarios más estudios acerca de los parámetros físico-químicos clave durante el proceso de elaboración de ambos productos, con el fin de optimizar dichos procesos bajo una amplia variedad de condiciones ambientales, así como para mejorar las cualidades del producto final.

2.2. Microbiología de los té de compost

Al igual que en el compost, la microbiota del té de compost es la principal responsable de su capacidad de supresión de patógenos. La acción supresora del té de compost se encuentra íntimamente asociada al conjunto de poblaciones o subpoblaciones microbianas presentes en él (Scheuerell y Mahaffee, 2002). De acuerdo con Scheuerell y Mahaffee (2002), si todas las especies microbianas del té de compost tuvieran acción supresora para una enfermedad, mayores cantidades totales de

microorganismos o biomasa se correlacionarían con un control más efectivo de la enfermedad, o permitirían utilizar tasas de dilución efectivas más elevadas.

La concentración total de bacterias cultivables encontradas en los té de compost supresivos varía considerablemente, en un intervalo de 10^7 a 10^{10} ufc/mL. Este dato podría sugerir que una concentración de 10^7 ufc/mL de bacterias totales en el té de compost es el umbral poblacional mínimo necesario para la supresión de enfermedades foliares. Sin embargo, Scheuerell y Mahaffee (2002) observaron una supresión foliar variable en plantas de geranio infectadas con *Botrytis cinerea*, tanto al aplicar ACT como NCT, cuya cantidad total de bacterias oscilaba entre 10^7 y 10^{10} ufc/mL. Basándose en estos resultados, además de los altos niveles microbianos, parece ser necesaria la presencia de especies concretas para propiciar el control de enfermedades. No obstante, es cierto que, en contra, existen estudios en los que se afirma la ausencia de relaciones significativas entre la supresividad efectiva de los ACT (St. Martin *et al.*, 2012; Scheuerell y Mahaffee, 2006; Palmer *et al.*, 2010) o los NCT (Koné *et al.*, 2010) y las poblaciones bacterianas que albergan, consideradas en cuanto a su tamaño. Estos resultados contradicen lo expuesto por Ingham y Alms (2003), según los cuales un aumento en las poblaciones bacterianas totales suele incrementar el nivel de eficacia de los ACT contra las enfermedades y los organismos fitopatógenos. La falta de relación significativa entre la inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos y las distintas poblaciones bacterianas en el té de compost puede ser explicada por la metodología aplicada, que sólo considera especies cultivables. Las bacterias no cultivables podrían tener un papel fundamental en la inhibición del crecimiento del patógeno (St. Martin *et al.*, 2012). Scheuerell y Mahaffee (2002) sugieren que la variabilidad en las poblaciones de determinadas especies bacterianas, con capacidad inhibitoria para un patógeno dado, también puede explicar la falta de relaciones significativas entre las poblaciones bacterianas y la capacidad de supresión del té de compost. Es decir, postulan la existencia de una influencia no sólo cuantitativa, sino también cualitativa, marcada por la especificidad de los agentes supresores hacia los microorganismos fitopatógenos.

Se ha demostrado que las levaduras y hongos presentes en el té de compost también desempeñan un papel muy importante en la inhibición de patógenos. En el estudio llevado a cabo por St. Martin *et al.* (2012) se halló una relación significativa

entre la inhibición del crecimiento micelial de *Pythium ultimum* y las poblaciones de levaduras y hongos en ACT. A pesar de que la inhibición del crecimiento micelial ocurre cuando la población de levaduras se encuentra en un intervalo comprendido entre $10^{3.5}$ y $10^{7.5}$ ufc/mL, los datos que obtuvieron sugieren que 10^6 ufc/mL es el umbral mínimo necesario para conseguir una supresión del crecimiento del patógeno a niveles del 50% o mayores. Entre los distintos tipos de compost estudiados, los microorganismos cuya acción era más influyente en cuanto al efecto inhibitor de patógenos del té en los ACT ensayados fueron las levaduras. A pesar de que los hongos y levaduras no han sido estudiados tan en profundidad como las bacterias en cuanto a su aplicación como agentes de control biológico, se sabe que poseen actividad supresora contra organismos fitopatógenos y enfermedades vegetales (Punja, 1997; El-Tarabily, 2004; El-Mehalawy *et al.*, 2007) y poseen mecanismos de acción muy similares, como sugieren Hoitink y Fahy (1986).

Por otra parte, cuando St. Martin *et al.* (2012) analizaron los NCT procedentes de las mismas fuentes que los ACT mencionados anteriormente, los resultados obtenidos señalaban que existía una correlación significativa y positiva entre las poblaciones bacterianas y fúngicas y el grado de inhibición del crecimiento micelial del patógeno. En este sentido, observaron que existía una correlación positiva pero débil entre las poblaciones bacterianas y la inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno, no ocurriendo lo mismo para las poblaciones fúngicas, pues se vio que existía una relación inversa entre estas y el grado de inhibición del crecimiento micelial. Esto podría sugerir que la presencia de los hongos en el té de compost anulaba o disminuía el efecto inhibitor ocasionado por las poblaciones bacterianas del té de compost.

Para finalizar, es importante destacar que los microorganismos responsables del efecto supresor de patógenos de los té de compost difieren en función del té de compost empleado (St. Martin *et al.*, 2012). No obstante, se requieren más estudios sobre la relación cuantitativa entre población microbiana del té de compost y capacidad supresiva de éste (Scheuerell y Mahaffee, 2006), así como sobre los mecanismos implicados en la inhibición del patógeno, para poder crear pautas destinadas a la elaboración de formulaciones acuosas supresivas (Scheuerell y Mahaffee, 2006).

2.3. Control de patógenos

La aplicación de té de compost, bien vía aérea o bien vía radicular, proporciona una cubierta de microorganismos en el filoplano y en el rizoplano, respectivamente, además de otorgar los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos beneficiosos (Al-Mughrabi, 2007), los cuales protegen a la planta contra patógenos responsables de la aparición de enfermedades del suelo, radicales y/o foliares (Quarles, 2001). Sin embargo, en agricultura convencional, el nivel de supresión para determinadas enfermedades se podría considerar inadecuado, mientras que en agricultura ecológica el desarrollo de métodos como el té de compost ha supuesto una importante mejora en lo que a supresión de enfermedades y nutrición de plantas respecta (Scheurell y Mahaffee, 2002). El conocimiento, cada vez mayor, de la microbiología de los té de compost y de las relaciones entre sus microorganismos, permitirá modificar sus procesos de producción y sus tecnologías de aplicación, de manera que se logre optimizar el desarrollo de una microbiota con múltiples mecanismos de supresión de patógenos (Scheurell y Mahaffee, 2002).

A lo largo del proceso de elaboración de los té de compost se produce una gran cantidad de transformaciones biológicas, que se traducen en cambios en sus capacidades supresoras con respecto al compost “puro” del que proceden, particularmente si el proceso de elaboración comprende periodos prolongados de producción. El proceso de obtención del té conlleva, al parecer, un incremento en la cantidad de poblaciones microbianas y ATP (adenosíntrifosfato), de cerca de un orden de magnitud (Alfano *et al.*, 2011). La actividad enzimática de los té de compost también parece ser mayor que la del compost puro del que proceden, aunque, en este caso la adición de agua y el tiempo de elaboración del té podrían conducir a un aumento de la razón microorganismos/actividad metabólica (Alfano *et al.*, 2011).

Tanto la madurez como la fuente de procedencia del compost empleado para elaborar el té afectan a la supresividad de éste (Trankner, 1992; Siddiqui *et al.*, 2009;). Se ha comprobado como diversos factores tales como aireación, tiempo de elaboración y adición de nutrientes afectan directamente a las propiedades biológicas de los té (Litterick y Wood, 2009). Ingham y Alms (2003) afirman que los ACT suelen ser más efectivos que los NCT, debido a que tienden a tener más poblaciones microbianas y diversidad. Por el contrario, un porcentaje importante de la literatura científica apoya la

supresión de patógenos vegetales por los NCT de forma más eficaz. Estudios comparativos de la eficacia de los ACT y los NCT muestran que el hecho de “airear” los té no tiene efecto significativo en el control de enfermedades (Scheurell y Mahaffee, 2006). Esto podría implicar que el mecanismo por el cual se lleva a cabo el control de enfermedades vegetales es químico más que biológico, o que tales mecanismos presentan una distribución universal entre poblaciones asociadas tanto a ambientes aeróbicos como anaeróbicos. Experimentos llevados a cabo por St. Martin *et al.* (2012) en diferentes tipos de compost, demostraron que los ACT no eran consistentemente más efectivos que los NCT. Es más, el efecto de la aireación del té en relación con la supresividad de este era específico del tipo de compost a partir del cual se generaba el té de compost.

La capacidad supresora de enfermedades vegetales que se atribuye a los NCT y ACT tiende a incrementar conforme lo hace el tiempo de elaboración, hasta un máximo, tras el cual, decrecen las capacidades supresoras (Ketterer, 1990; Ketterer y Schwager, 1992). Según Ingham y Alms (2003), el tiempo de producción óptimo suele rondar entre las 18 h y las 36 h, a partir del punto en el cual la biomasa microbiana activa se encuentra en su máximo. Por otro lado, investigaciones similares han concluido que en la elaboración de té de compost con capacidades supresivas óptimas, se requieren tiempos de generación de 7 a 14 días (Weltzien, 1990). Sin embargo, a pesar de que no existen datos que la sustenten, existe la creencia de que el tiempo óptimo de producción al cual se consigue un nivel máximo de inhibición del crecimiento de patógenos depende principalmente de la fuente de la que procede el compost y del método de elaboración elegido (Litterick y Wood, 2009).

El efecto supresor del crecimiento de patógenos ejercido por los té de compost puede verse influenciado positivamente (Scheurell y Mahaffee, 2006), negativamente (Scheurell y Mahaffee, 2002) o no verse influenciado de forma significativa (Elad y Shtienberg, 1994) por la adición de nutrientes. Estos son añadidos principalmente para aumentar las poblaciones de aquellos microorganismos que se consideran beneficiosos en el té de compost. Determinadas características relacionadas con el uso de los té de compost, como pueden ser la tasa de dilución, frecuencia de aplicación y el uso de adyuvantes, han demostrado afectar a la supresividad de los té (Litterick y Wood, 2009). Esto es realmente importante en el caso de enfermedades vegetales de origen

radical. Los estudios han proporcionado datos que avalan una disminución o un mantenimiento de los efectos supresivos del té tras diluirlo (Elad y Shtienberg, 1994; Scheuerell y Mahaffee, 2004).

Existen dos mecanismos principales por los cuales los microorganismos con capacidad para actuar en control biológico ejercen su efecto supresor de enfermedades, una inhibición general y otra específica (Cook y Baker, 1983). La general hace referencia a aquella que puede ser atribuida a más de un grupo de microorganismos, mientras que la específica es atribuida únicamente a un grupo microbiano o a unos pocos. Este último tipo de supresión es transferible, es decir, puede inocularse un microorganismo de control conocido en el té de compost, para hacer frente a un determinado patógeno o enfermedad (Hoitink, 1993).

Por otra parte, se ha demostrado que la esterilización de los té de compost, bien por calor o microfiltración, hace desaparecer la capacidad supresora del crecimiento micelial de patógenos (Lima *et al.*, 2008; Malandraki *et al.*, 2008), eliminando directamente a los microorganismos y/o degradando los compuestos metabólicos activos que puedan estar encargados de inhibir el desarrollo de los patógenos. Como contrapunto, existen otros autores que han demostrado que la actividad supresora del crecimiento micelial persiste incluso después de esterilizar los té (Achim y Schlösser, 1991; Elad y Shtienberg, 1994; Cronin *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998).

Alfano *et al.* (2011) hallaron resultados en su estudio muy valiosos, pues vieron que tras esterilizar por filtración té de compost, estos aún preservaban actividad supresora, debido a que conservaban los compuestos metabólicos activos producidos por los microorganismos beneficiosos contra los patógenos *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*.

En función de lo expuesto hasta ahora, el presente Trabajo Fin de Máster se plantea con el objetivo de caracterizar en cuanto a la presencia de comunidades microbianas un compost de té generado mediante la aplicación de pautas de aireación y la incorporación de nutrientes, así como su capacidad supresora frente a un grupo de fitopatógenos fúngicos de reconocida importancia en la agricultura bajo plástico típica de la provincia de Almería.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Análisis microbiano del té de compost

3.1.1. Obtención del té de compost

Se preparó té de compost a partir de ProSatus-C (compost) y ProSatus-F (mezcla de nutrientes), productos comercializados por Koppert España, S.L. La elaboración del té de compost se llevó a cabo mediante la utilización de un tanque aireador diseñado para tal fin (Compost Tea System 10TM, Growing Solutions, Leyland, Reino Unido) (Figura 1). Para ello, primeramente se llenó el tanque con un volumen de 40 L de agua. Se utilizó agua corriente, la cual se aireó durante un intervalo comprendido entre 30 y 60 minutos antes de comenzar el proceso, con la finalidad de eliminar el cloro. Seguidamente, se añadieron 125 mL de ProSatus-F al agua del tanque y 250 g de ProStatus-C en la cesta de malla metálica dispuesta en el interior del agua. Se tomaron muestras del té una vez transcurridas 24 h, 48 h y 72 h desde el comienzo del proceso, las cuales se conservaron en refrigeración a 5 °C hasta su posterior uso.



Figura 1. Tanque aireador empleado en la elaboración del té de compost.

3.1.2. Diluciones seriadas

Para realizar el análisis microbiano del té de compost se aplicó la técnica de las diluciones seriadas (Wakelin *et al.*, 1998), modificada por Koné *et al.* (2010). Se

obtuvieron diluciones sucesivas (de 10^{-2} a la 10^{-7}) de cada muestra y se sembraron 100 μL de cada dilución en placas con cada uno de los de medios de cultivo empleados en función del grupo microbiano buscado, los cuales se describen a continuación. Tras un periodo de incubación de 2 a 6 días, dependiendo del tipo microbiano, a 25 °C, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (ufc) por placa, y se calcularon las poblaciones finales por unidad de volumen de té (ufc/mL). Para cada tipo de medio de cultivo y dilución se realizaron 5 repeticiones.

3.1.3. Medios de cultivo

Las poblaciones bacterianas (bacterias totales, bacterias proteolíticas, pseudomonas fluorescentes, actinobacterias, enterobacterias y coliformes totales) y fúngicas (hongos y levaduras) fueron analizadas en diferentes medios de cultivo selectivos y semiselectivos: Agar Rosa de Bengala con Cloranfenicol (Panreac, Barcelona, España) (hongos y levaduras), Agar Soja Tripteina (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU) enriquecido con cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU) (bacterias totales), Agar Gelatina (Panreac, Barcelona, España) (bacterias proteolíticas), medio King B (Panreac, Barcelona, España) enriquecido con glicerol (10 g/L; Sigma-Aldrich, San Luís, EE.UU) (pseudomonas fluorescentes), Agar Agua a pH 11 (actinobacterias), Agar MacConkey (Panreac, Barcelona, España) (enterobacterias), y, por último, Agar Bilis Verde Brillante (Panreac, Barcelona, España) (coliformes totales).

3.2. Evaluación del efecto supresivo del té de compost sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos

3.2.1. Colección de cepas fúngicas

Para comprobar la supresividad ejercida por el té de compost *in vitro*, se utilizaron ocho de los principales hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en los cultivos protegidos de Almería. Estos fueron: *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Verticilium dahliae*. Todas las cepas utilizadas en el ensayo pertenecían a la colección de Koppert Holanda.

3.2.2. Ensayo de supresividad

Se empleó el método “Pouring” (El-Masry *et al.*, 2002), el cual consistió en la adición del té de compost al medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar, Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) previamente esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, a diferentes concentraciones (0,5%, 2,5% y 5%), y cuando éste se encontraba a una temperatura de 35-40 °C aproximadamente. Una vez homogeneizado el medio, se vertieron 15 mL de la mezcla por placa de Petri. El testigo consistió en la sustitución del té de compost por agua destilada estéril.

Una vez solidificado el medio de cultivo las placas fueron sembradas. Para ello se colocó en el centro de cada placa un disco de inóculo del hongo fitopatógeno a estudiar, de 0,5 cm de diámetro, procedente de la zona de crecimiento activa de las colonias. Las placas fueron selladas y mantenidas en cámara de cultivo a 25 °C. La lectura de los resultados se llevó a cabo a los 3 (*Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*), 7 (*Phytophthora capsici*, *P. parasitica* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) y 14 días (*Verticillium dahliae*). Finalmente, se obtuvieron los porcentajes de inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de cada patógeno originados por los té de compost con respecto al testigo de agua. Los resultados obtenidos fueron comparados con los de un control químico consistente en la adición al medio de cultivo PDA de los fungicidas relacionados en la Tabla 1, utilizados para el tratamiento de las enfermedades causadas por los hongos patógenos objeto de estudio.

Tabla 1. Fungicidas y sus dosis utilizadas para el control de los patógenos.

FUNGICIDA	DOSIS	PATÓGENO/S
PREVICUR	0,5 mL L ⁻¹	<i>Pythium aphanidermatum</i> <i>Rhizoctonia solani</i>
		<i>Phytophthora capsici</i>
RIDOMIL	1 L 1000 L ⁻¹	<i>Phytophthora parasitica</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> <i>Verticillium dahlia</i>
SWITCH	1 g L ⁻¹	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

3.3. Análisis estadístico

Los datos (niveles poblacionales de cada microorganismo con respecto al tiempo, y porcentajes de supresión con respecto a la concentración) fueron sometidos a análisis de la varianza (ANOVA unifactorial) mediante el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20 (2008) para Windows. En caso de encontrarse diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$), las medias de los tratamientos fueron analizadas mediante el test de Tukey. Los datos que no se ajustaron a una distribución normal mediante transformaciones matemáticas fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, usando para ello la aproximación de chi-cuadrado ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis microbiano del té de compost

Las poblaciones microbianas presentes en el ACT utilizado, definidas como unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL), se muestran en la Figura 2. Como se puede apreciar, los análisis se llevaron a cabo bajo diferentes tiempos de producción de los extractos, a fin de determinar el momento en el que se alcanzaban los máximos niveles de poblaciones microbianas, lo cual, según la bibliografía, permite obtener té de compost más efectivos, con mayores niveles de supresión frente a enfermedades y un contenido superior en especies beneficiosas para las plantas. El tiempo de generación de 24 h se mostró como el óptimo para alcanzar las poblaciones microbianas más altas en todos los grupos estudiados, excepto en el caso de hongos totales y actinobacterias, comunidades en las cuales éstas decrecen a partir de las 8 h.

Los grupos microbianos que presentaron mayores niveles en el té de compost se correspondieron con bacterias totales ($7,85 \cdot 10^6$ ufc/mL) y bacterias proteolíticas ($8,95 \cdot 10^6$ ufc/mL), seguidos por enterobacterias ($6,33 \cdot 10^5$ ufc/mL), coliformes totales ($4,53 \cdot 10^5$ ufc/mL) y pseudomonas fluorescentes ($3,5 \cdot 10^5$ ufc/mL), en los té de compost de 24 h. Por el contrario, los que presentaron unos niveles más bajos fueron los hongos totales ($6,25 \cdot 10^1$ ufc/mL), levaduras ($5,00 \cdot 10^0$ ufc/mL) y actinobacterias ($3,20 \cdot 10^3$ ufc/mL).

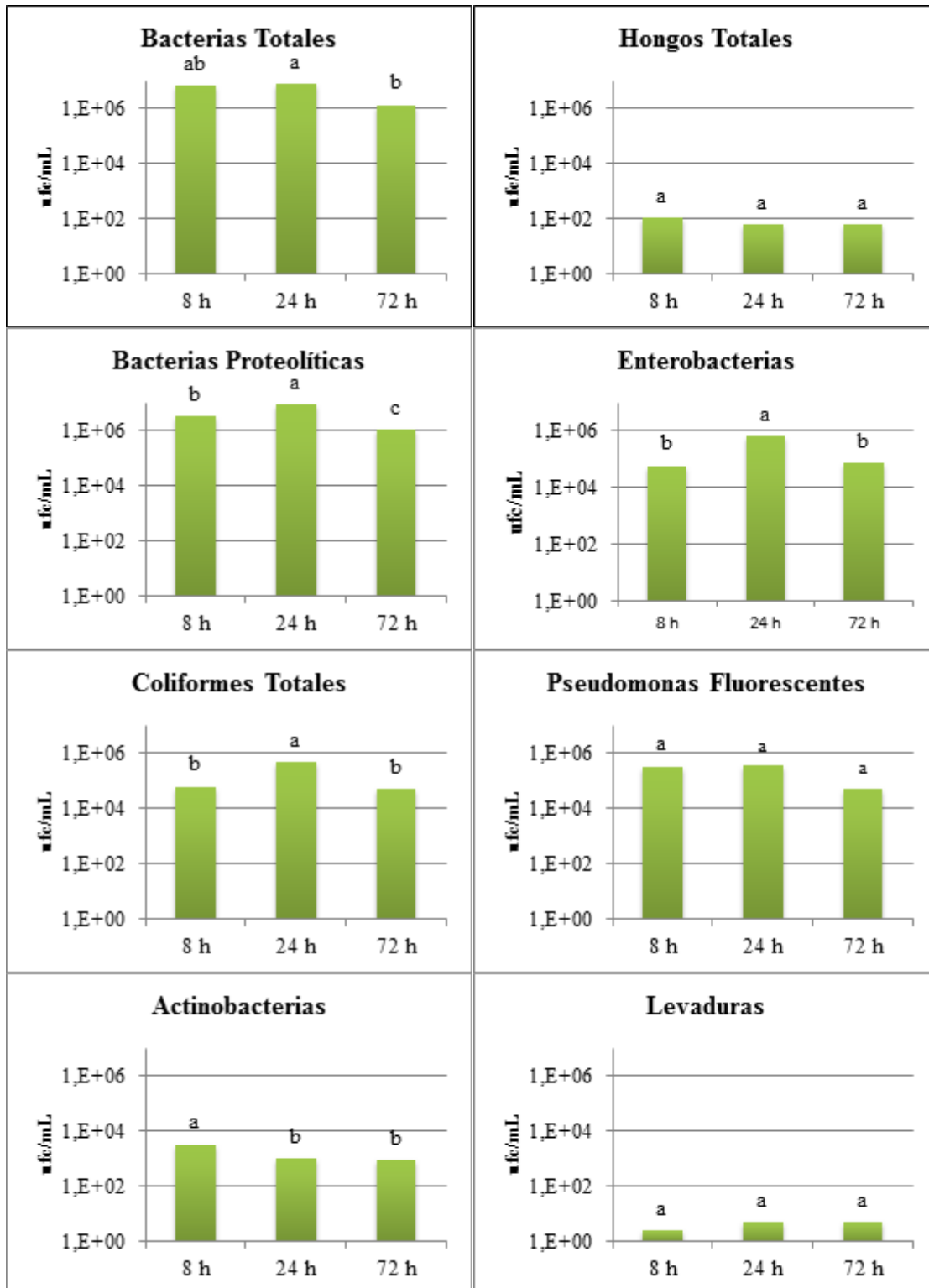


Figura 2. Representación de las poblaciones (ufo/mL) en el té de compost empleado, ProsatusC, de cada grupo microbiano analizado a las 8 h, 24 h y 72 h. Las letras distintas indican la existencia de diferencias significativas en las cantidades poblacionales entre cada tiempo y para cada microorganismo.

A continuación, se describen más detalladamente los resultados obtenidos para cada grupo microbiano:

a) Bacterias totales:

En el recuento microbiano de bacterias totales se obtuvieron diferencias significativas entre las 24 h y las 72 h. El conteo microbiano más elevado se apreció a las 24 h, mientras que se apreció un fuerte descenso poblacional a las 72 h.

b) Bacterias proteolíticas:

En lo que a bacterias proteolíticas se refiere, estas alcanzaron un máximo poblacional a las 24 h, y un mínimo a las 72 h. Se encontraron diferencias significativas entre todos los tiempos de incubación.

c) Enterobacterias:

El análisis de las poblaciones de enterobacterias mostró un pico poblacional a las 24 h, y un mínimo a las 8 h. Existieron diferencias significativas para las poblaciones microbianas a las 8 h, con respecto a las 24 h. Asimismo, no existen diferencias significativas entre las poblaciones de los téis a las 8 h y 72 h.

d) Coliformes totales:

La dinámica poblacional observada en este grupo microbiano fue la misma que en el caso de las enterobacterias. De nuevo se advirtió un aumento desde las 8 h a las 24 h, dándose en este último tiempo un máximo para, posteriormente, disminuir hasta recuentos mínimos a las 72 h. Así pues, se observaron diferencias significativas entre 8 h y el resto de tiempos (24 h y 72 h), mientras que no se apreciaron diferencias entre 24 h y 72 h.

e) Pseudomonas fluorescentes:

La población de este grupo microbiano se mantuvo constante durante todo el ensayo, no existiendo diferencias significativas en cuanto a la cantidad

total de pseudomonas fluorescentes entre los distintos tiempos de muestreo. No obstante, el máximo poblacional se alcanzó a las 24 h.

f) Hongos totales:

En el caso de los hongos totales, sus niveles disminuyeron conforme se incrementó el tiempo de preparación del té de compost, alcanzándose la máxima cantidad a las 8 h y la mínima a las 72 h. Sin embargo, las variaciones fueron tan leves que no se observaron diferencias significativas.

g) Levaduras:

Los niveles de levaduras fueron, en general, bajos, duplicándose desde las 8 h a las 24 h y manteniéndose constantes a las 72 h, al contrario de lo que ocurrió con otros grupos microbianos. No obstante, no se apreciaron diferencias significativas entre los distintos periodos de preparación.

h) Actinobacterias:

Las poblaciones de actinobacterias disminuyeron a medida que se prolongó el tiempo de producción, dándose el máximo a las 8 h y el mínimo a las 72 h. Se apreciaron diferencias significativas a las 8 h con respecto a las 24 h y 72 h.

4.2. Evaluación del efecto supresivo del té de compost sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos

Los resultados obtenidos en el ensayo de supresividad del té de compost (ACT) sobre el crecimiento micelial de los distintos hongos fitopatógenos se muestran en la Figura 3. De forma genérica, puede apreciarse que el efecto supresivo del té de compost aumentó a medida que se incrementó su concentración, excepto en el caso de *Pythium aphanidermatum*, en el cual dicho efecto disminuyó significativamente al aumentar su concentración (Figuras 3 y 4). El efecto supresor del té de compost sobre el crecimiento micelial de los patógenos, en comparación con el efecto supresor de los fungicidas empleados, fue significativamente superior en los ensayos llevados a cabo con *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Verticillium dahliae*

(Figuras 3, 5 y 7). Seguidamente se analizan los resultados obtenidos con más profundidad:

a) *Botrytis cinerea*:

El efecto supresivo de los té de compost no generó diferencias significativas como consecuencia de la aplicación de concentraciones crecientes, si bien si existieron entre los tratamientos en los que se incorporó té de compost y en los que se aplicó el fungicida. Este último dio lugar a una completa inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno en estudio (Figuras 3 y 4).

b) *Pythium aphanidermatum*:

Como se aprecia en la Figura 3, el efecto supresor del té de compost, en este caso, fue muy bajo o nulo, a pesar de lo cual se registraron diferencias significativas entre el tratamiento en el que el té se adicionó al 0,5% (v/v) y el resto. Los niveles de inhibición significativamente mayores se apreciaron en el primer caso. Asimismo, el efecto del fungicida fue significativamente superior al de los té de compost, alcanzando algo más del 80% de inhibición del crecimiento micelial del patógeno (Figura 4).

c) *Sclerotinia sclerotiorum*:

Para este patógeno el tratamiento con fungicida alcanzó un 100% de supresión, al igual que en el caso de *Botrytis cinerea*. Asimismo, se apreciaron diferencias significativas entre el tratamiento con fungicida y los que incorporaron té de compost. En estos últimos el efecto supresor fue prácticamente inexistente, alcanzándose el mayor efecto supresor con una concentración de té del 5%, aunque sin diferencias significativas (Figuras 3 y 5).

d) *Rhizoctonia solani*:

El análisis del efecto supresor del té de compost sobre este fitopatógeno mostró diferencias significativas al ser comparado con el tratamiento que implicó la utilización de fungicida, siendo superior, en este caso, la supresión

desarrollada por el té de compost, especialmente al 2,5%. Los valores encontrados generaron diferencias significativas entre la concentración al 0,5% y las de 2,5% y 5% (Figuras 3 y 5).

e) *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*:

Para los hongos pertenecientes al género *Phytophthora*, el efecto supresor, tanto de los té de compost como del fungicida fue considerable, existiendo diferencias significativas entre todos los tratamientos. En el caso del fungicida, la inhibición alcanzó el 100%, mientras que en presencia del té de compost los valores fueron algo inferiores, pero igualmente elevados y crecientes con la concentración (Figuras 3 y 6).

f) *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*:

El ensayo realizado en este caso logró un mayor efecto inhibitor para los té de compost, los cuales inhibieron de forma significativa al patógeno, en comparación con el fungicida. En los tratamientos con té de compost no existieron diferencias significativas entre las concentraciones 0,5% y 2,5%, pero sí entre éstas y la de 5%, en la cual se alcanza el mayor grado de inhibición (Figuras 3 y 7).

g) *Verticillium dahliae*:

En este último fitopatógeno, el efecto supresor del té de compost al 5% alcanzó casi un 100%, existiendo diferencias significativas entre este tratamiento y los dos restantes. Las concentraciones del 0,5% y 2,5% no se diferenciaron estadísticamente hablando, aunque ambas exhibieron un efecto inhibitor del crecimiento micelial mucho mayor que el tratamiento con fungicida. Así, el producto químico quedó significativamente diferenciado de todos los tratamientos con té de compost (Figuras 3 y 7).

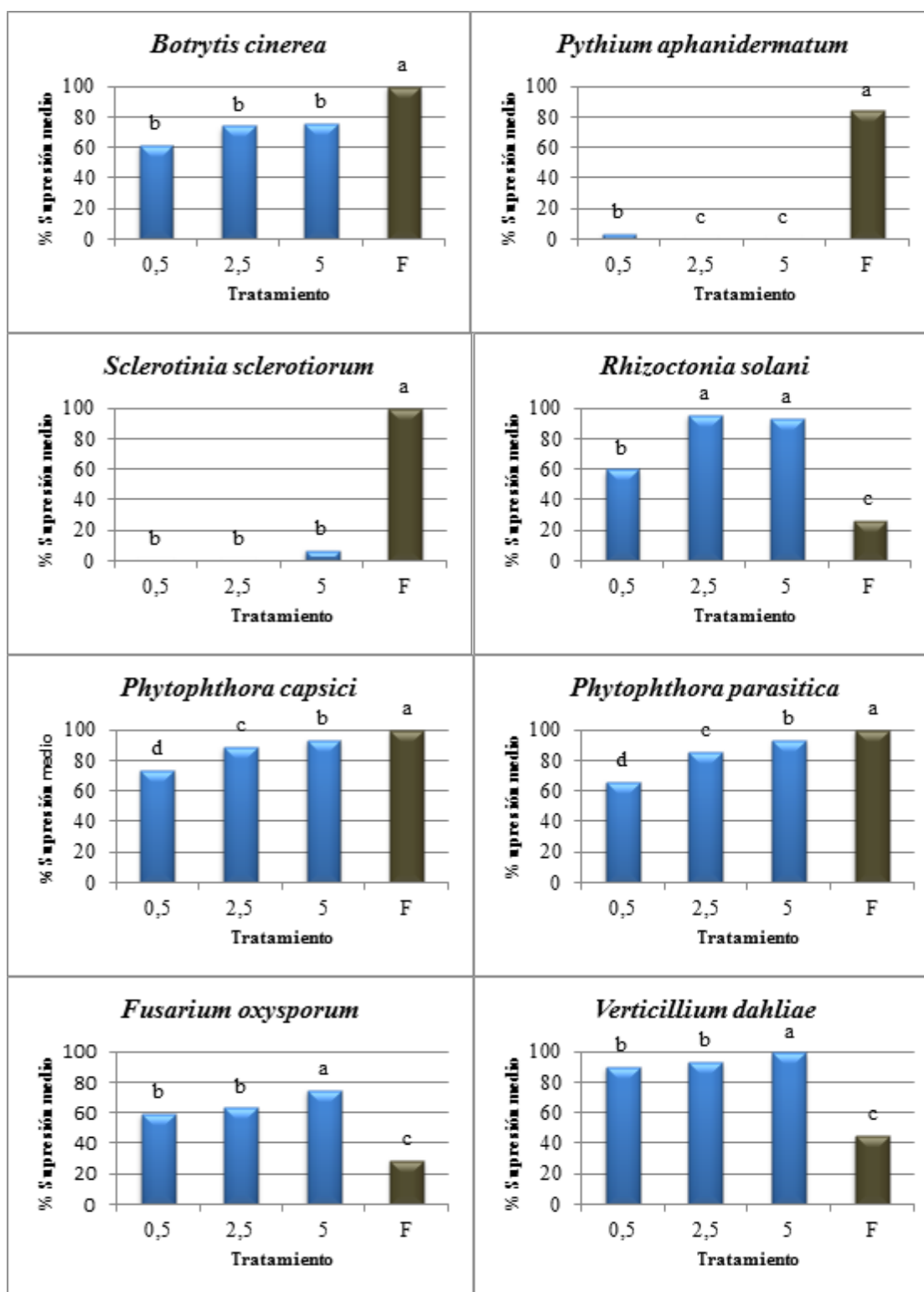


Figura 3. Porcentajes de supresión del té de compost sobre el crecimiento micelial de los diferentes hongos fitopatógenos utilizados. Las letras distintas indican la existencia de diferencias significativas en la supresión del hongo fitopatógeno entre cada tratamiento y para cada patógeno.

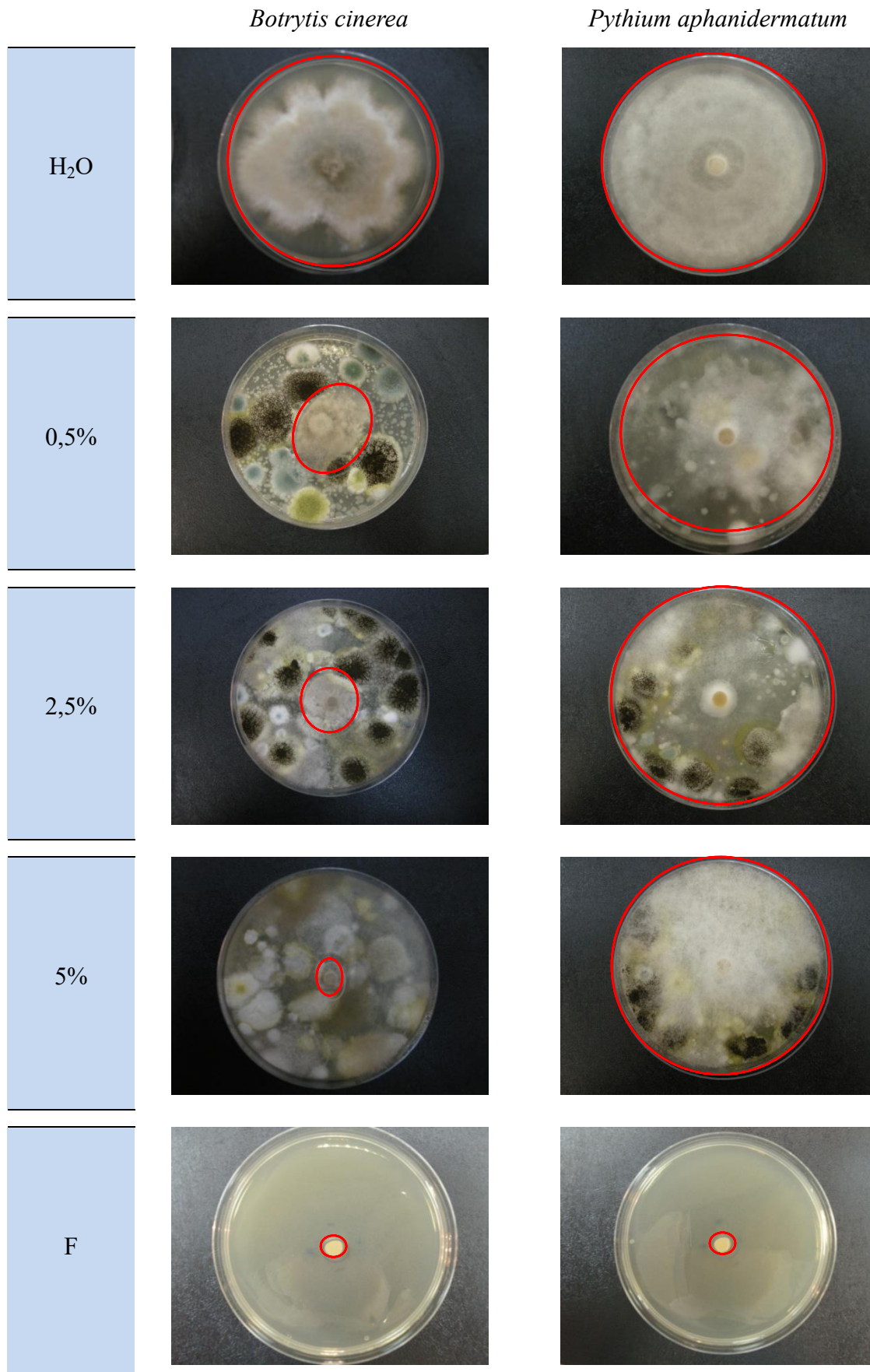


Figura 4. Inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* y *Pithium aphanidermatum* en los distintos tratamientos. La circunferencia roja abarca el área de crecimiento del hongo fitopatógeno. H₂O=testigo con agua; 0,5%= té de compost aplicado al 0,5%; 2,5%= té de compost aplicado al 2,5%; 5%= té de compost aplicado al 5%; F=fungicida.

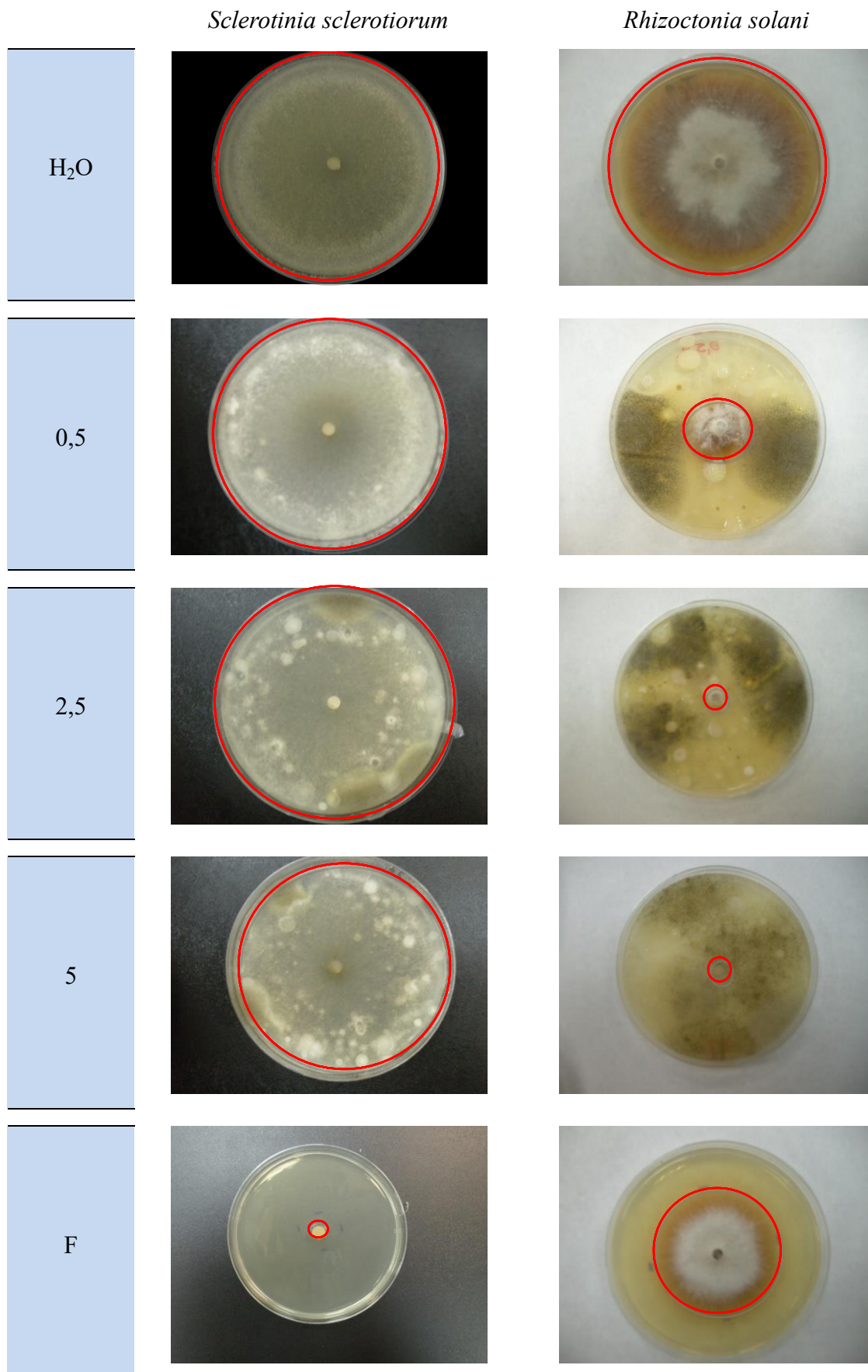


Figura 5. Inhibición *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani* en los distintos tratamientos. La circunferencia roja abarca el área de crecimiento del hongo fitopatógeno. H₂O=testigo con agua; 0,5%= té de compost aplicado al 0,5%; 2,5%= té de compost aplicado al 2,5%; 5%= té de compost aplicado al 5%; F=fungicida.

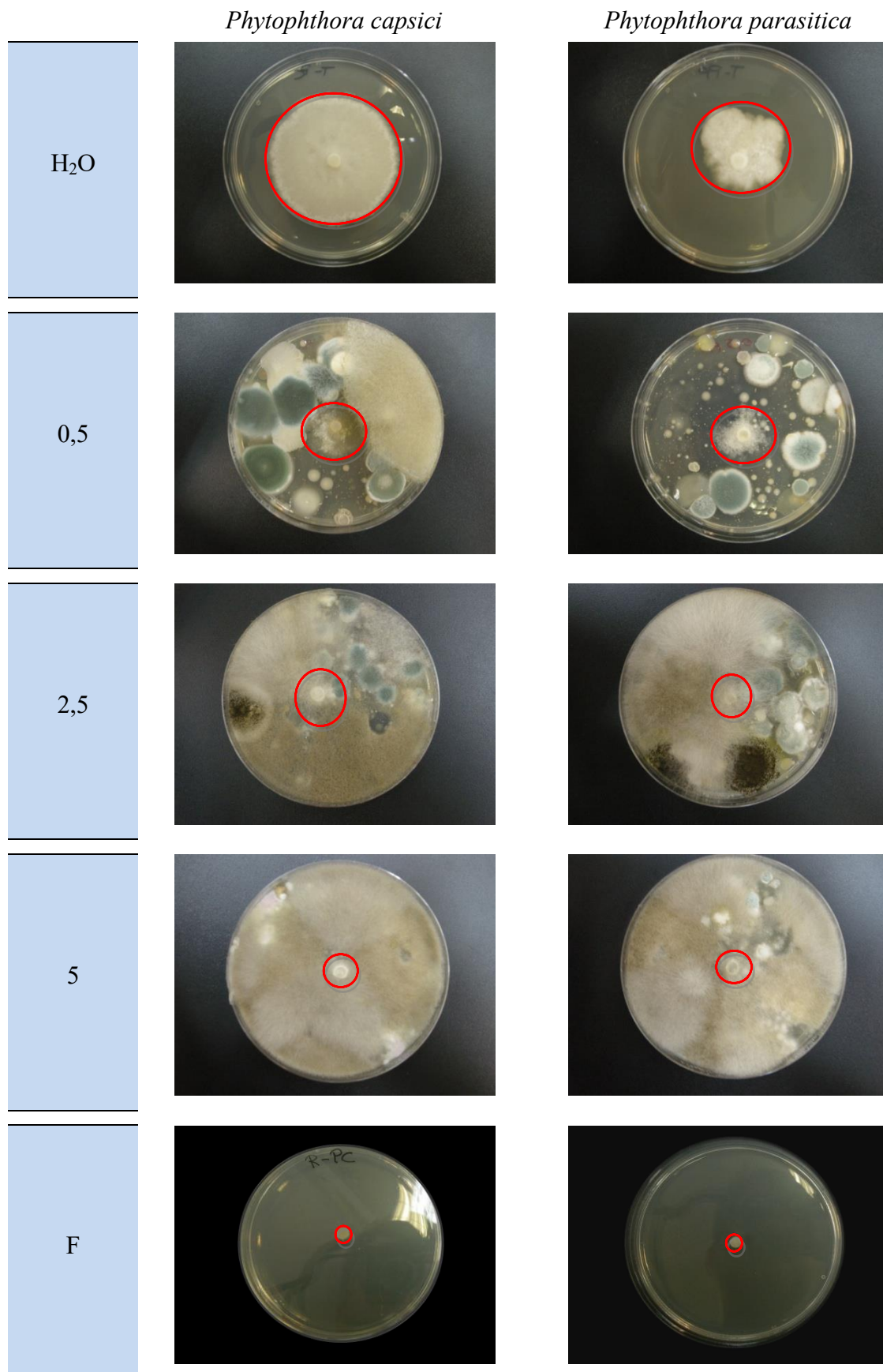


Figura 6. Inhibición in vitro de *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica* en los distintos tratamientos. La circunferencia roja abarca el área de crecimiento del hongo fitopatógeno. H₂O=testigo con agua; 0,5%= té de compost aplicado al 0,5%; 2,5%= té de compost aplicado al 2,5%; 5%= té de compost aplicado al 5%; F=fungicida.

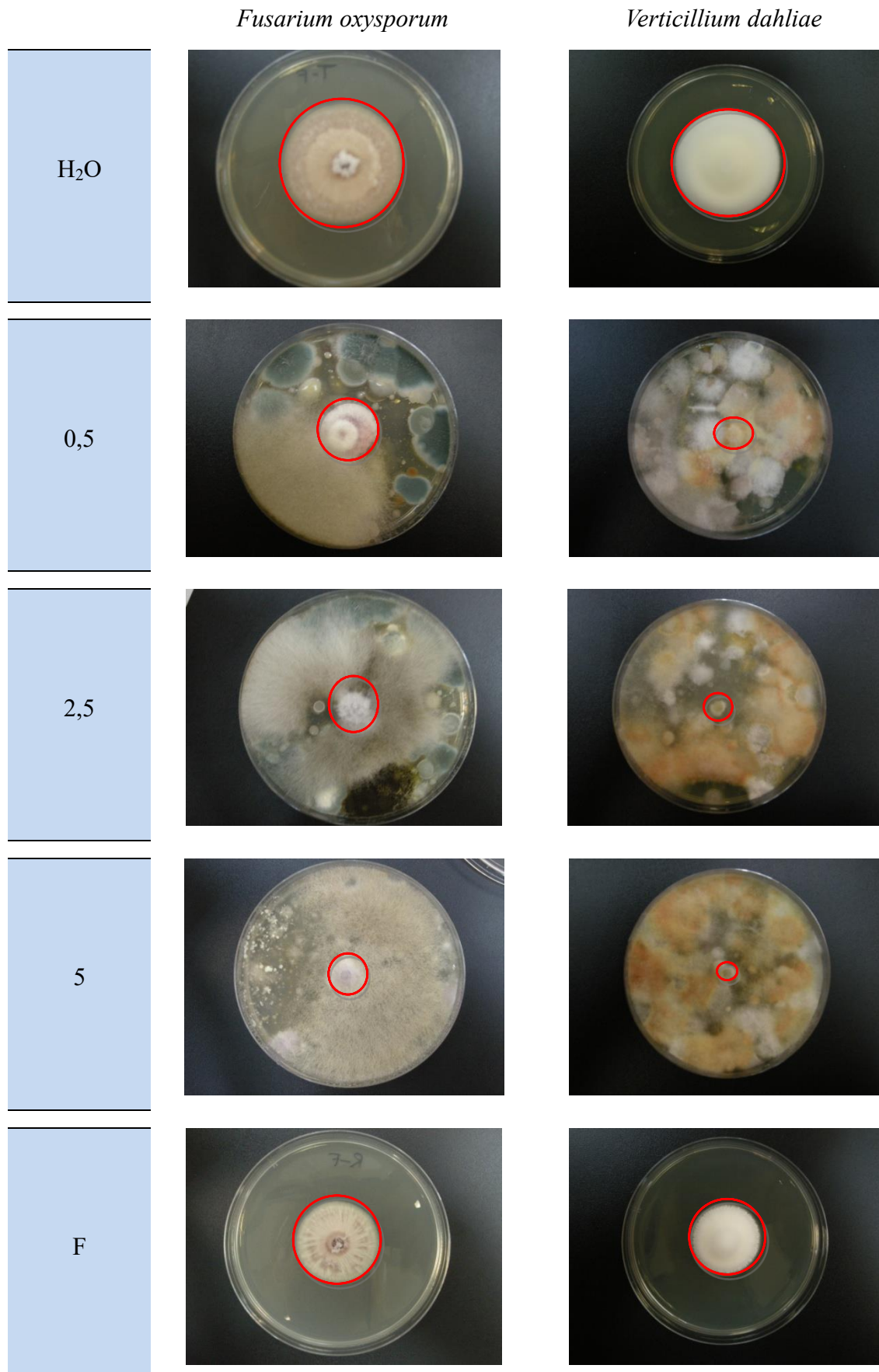


Figura 7. Inhibición in vitro de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Verticillium dahliae* en los distintos tratamientos. La circunferencia roja abarca el área de crecimiento del hongo fitopatógeno. H₂O=testigo con agua; 0,5%= té de compost aplicado al 0,5%; 2,5%= té de compost aplicado al 2,5%; 5%= té de compost aplicado al 5%; F=fungicida.

5. DISCUSIÓN

El compost proporciona un ecosistema ideal para que diferentes microorganismos beneficiosos cohabiten en él. En el proceso de elaboración del té de compost, los microorganismos son transferidos a la fase acuosa, en la que pueden multiplicarse. El producto final es aplicado en los cultivos, para promover el crecimiento vegetal y/o para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos de la parte aérea o productores de enfermedades transmitidas por el suelo.

En el presente estudio se empleó té de compost aireado o ACT, que según Scheuerell y Mahaffe (2002) es más eficiente que los tés de compost no aireados o NCT en cuanto al control de patógenos, presentando mayor grado de supresión. Sin embargo, existen hipótesis contradictorias al respecto, ya que numerosos autores avalan una eficacia similar o incluso superior de los NCT como agentes supresores de patógenos (Haggag *et al.*, 2007; Koné *et al.*, 2010), lo que, en función de la mayor sencillez tecnológica de su obtención, los situaría en una situación preferente.

En el ensayo llevado a cabo para analizar la microbiota del té de compost aireado empleado en el presente trabajo, se observó que los máximos niveles poblacionales se daban a las 24 h, para todos los microorganismos analizados, a excepción de hongos totales y actinobacterias, para los cuales el máximo se obtuvo a las 8 h. Estos datos coinciden con los expuestos por otros autores, los cuales apoyan que la máxima cantidad de poblaciones microbianas se alcanzan en un periodo comprendido entre 18 h y 36 h (Ingham y Alms, 2003). En teoría, si todos los microorganismos del té de compost tuvieran efecto supresor contra patógenos, entonces, máximos niveles poblacionales totales deberían estar directamente relacionados con un control de patógenos más eficiente (Scheurell y Mahaffee, 2002). No obstante, debe tenerse en cuenta que la capacidad de supresión de patógenos del té de compost depende de la naturaleza su microbiota y el grado de especificidad de su potencial acción supresora, de manera que uno o unos pocos microorganismos sean los que provocan el efecto supresor (Hoitink, 1993). Por otra parte, a pesar de que el tamaño de población microbiana necesario para conseguir un té de compost supresivo aún no está del todo claro, Scheurell y Mahaffee (2004) llegaron a la conclusión de que niveles poblacionales de bacterias cultivables iguales o superiores a 10^6 ufc/mL suponían una

transición de té de compost no supresivos a té de compost supresivos. El análisis de bacterias totales del té de compost aireado empleado en el presente estudio alcanzó las 10^6 ufc/mL o las superó, a las 24 h, pues como se ha mencionado antes, es el punto en el que se alcanzaron los máximos niveles poblacionales. Sin embargo, en lo que a bacterias respecta, los recuentos detectados para actinobacterias, pseudomonas fluorescentes, coliformes totales y enterobacterias fueron del orden de 10^5 ufc/mL o menores. Sólo las bacterias proteolíticas superaron el umbral de 10^6 ufc/mL, sin llegar a 10^7 ufc/mL. Estos resultados señalan a las bacterias como grupo microbiano más abundante en el té de compost aireado empleado, lo cual coincide con lo expuesto en el estudio llevado a cabo por Ingham (2005), seguidas por hongos y levaduras. Atendiendo a las consideraciones anteriores, el té de compost aireado obtenido a las 24 h fue el elegido para llevar a cabo la evaluación del efecto supresivo *in vitro* del té sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos en medio PDA.

En este segundo ensayo, los resultados fueron variados, en función del hongo fitopatógeno a inhibir. Por un lado, en la mayoría de casos, el uso del té de compost tuvo como resultado inhibiciones máximas del 80% o más. Se comprobó que a medida que aumentaba la concentración del té de compost, aumentaba la supresividad de este, tal y como exponen diversos autores, los cuales defienden que las propiedades supresivas de los té de compost se mantenían o disminuían a medida que se aumentaba su tasa de dilución (Elad y Shtienberg, 1994; Scheuerell y Mahaffee, 2004). En los casos de *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*, además de los altos porcentajes de supresión logrados (74,66%, 92,66% y 99,10% respectivamente), las diferencias con respecto al empleo de fungicida en cuanto al efecto supresor fueron significativas y muy marcadas (los fungicidas solo lograron porcentajes de supresión del patógeno de 28,77%, 25,90% y 44,62% respectivamente), lo cual contrasta con los tratamientos testados en *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*, en los cuales, a pesar de los altos porcentajes de supresión *in vitro* obtenidos mediante la aplicación del té de compost, no alcanzaron los niveles de inhibición exhibidos por el fungicida, que fueron del 100%. No obstante, y a pesar de lo este resultado, es preferible el uso de té de compost frente al uso de fungicidas, ya que la aplicación de estos últimos debe ser periódica, ya que se degradan, y además ocasiona efectos negativos sobre suelo, especialmente en lo que respecta a presencia de microbiota beneficiosa, o a la generación de residuos tóxicos. Desde otra perspectiva,

puede provocar la aparición de resistencias en los patógenos (Danielle y Rai, 2006; Reganold *et al.*, 2001; Goldman *et al.*, 1994; Relyea y Hoverman, 2006; Alfano *et al.*, 2011).

En el lado opuesto en cuanto a resultados se posicionaron *Sclerotinia sclerotiorum* y *Pythium aphanidermatum*. En ambos casos, el empleo del té de compost solo generó porcentajes de supresión máximos de 6,78% y 3,67%, respectivamente. Obviamente, niveles tan bajos de inhibición difirieron significativamente de los obtenidos mediante el uso de fungicida (100% y 83,80% respectivamente). En el caso de *Pythium aphanidermatum*, el estudio previo llevado a cabo por St. Martin *et al.* (2012) demostró la existencia de relación significativa y positiva entre la inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *Pythium ultimum* y el nivel de poblaciones de hongos y levaduras presentes en el té de compost aireado empleado en su estudio. Según los autores, la inhibición del crecimiento micelial se produce cuando el nivel poblacional de levaduras se encuentra en un rango comprendido entre $10^{3,5}$ ufc/mL y $10^{7,5}$ ufc/mL, definiéndose un límite de 10^6 ufc/mL a partir del cual el porcentaje de inhibición es del 50% o mayor. Estos datos podrían explicar en parte el efecto supresivo del té de compost empleado en el presente estudio, en el cual las poblaciones de levaduras fueron de 5 ufc/ml. Se confirmaría, por tanto, la hipótesis anteriormente expresada, según la cual la calidad del té de compost como agente supresor no sólo se debe estimar en términos cuantitativos absolutos, sino que además hay que considerar la distribución poblacional entre las diversas comunidades microbianas existentes. Adicionalmente, se refuerza el papel que la microbiota puede ejercer en la función supresora, algo que, a pesar del escaso desarrollo que muestra la investigación en este sentido en comparación con la abundancia de estudios existentes en torno a la acción de la microbiota procariota, está perfectamente documentado (Punja, 1997; El-Tarabily, 2004; El-Mehalawy *et al.*, 2007).

Otro aspecto que es necesario considerar a la hora de evaluar con prudencia los resultados obtenidos se encuentra en el hecho de que la inhibición de los té de compost *in vitro* cuando se usa a modo de *screening* para seleccionar agentes de control biológico no es completamente extrapolable a escala *in vivo* (Cook y Baker, 1983). Resultados más fiables se obtienen si, además del testado *in vitro*, se llevan a cabo ensayos en semi-campo, para contrastar los resultados (Scheuerell y Mahaffee, 2002).

En definitiva, y a pesar de constituir un ensayo preliminar, los ensayos recogidos en el presente TFM resultan lo suficientemente alentadores como para estimular estudios posteriores mediante los cuales se pueda profundizar en el conocimiento de la naturaleza exacta del carácter supresivo que ejerce el producto generado y, en consecuencia, optimizar sus prestaciones.

6. CONCLUSIONES

1. La naturaleza del compost empleado, así como de la tecnología aplicada en la producción del té compost, permiten obtener un producto con altos niveles poblacionales, especialmente en lo referente a ciertos grupos microbianos de interés en el control de patógenos, tales como bacterias proteolíticas o especies pertenecientes al grupo de las pseudomonas fluorescentes.
2. El tiempo óptimo para la preparación del té de compost se sitúa en 24 h, lo cual, desde el punto de vista energético, resulta de interés.
3. El té de compost utilizado se muestra especialmente eficaz frente a *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici* y *Verticillum dahliae*, patógenos frente a los que exhibe porcentajes de inhibición superiores al 90%. *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici* disminuyen su crecimiento en presencia del té de compost en un 70%.
4. En determinados casos (*R. solani*, *F. oxysporum* y *V. dahliae*), el té de compost resulta un tratamiento más eficiente que la aplicación de fungicidas de carácter químico.
5. De forma general, el efector supresor es dependiente de la concentración de té compost aplicada.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ACHIMU, P. y SCHLOSSER, E. 1991. Control of *Plasmopara viticola* with compost filtrates. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent*, 56 (2 PART A): 171-178.
- ACURIO, G., ROSSIN, A., TEIXEIRA, F. y ZEPEDA, F. 1998. *Diagnosis of municipal solid waste management in Latin America and the Caribbean*. Washington (DC): Pan American Health Organization (PAHO).
- AL-MUGHRABI, K.I. 2007. Suppression of *Phytophthora infestans* in potatoes by foliar application of food nutrients and compost tea. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1: 785-792.
- ALFANO, G., LUSTRATO, G., LIMA, G., VITULLO, D. y RANALLI, G. 2011. Characterization of composted olive mill wastes to predict potential plant disease suppressiveness. *Biological Control*, 58: 199-207.
- BRINTON, W.F., FRANKER, A. y DROFFNER, M. 1996. Investigation into liquid compost extracts. *Biocycle*, 37: 68-70.
- CHELLEMI, D.O., OLSO, S.M. y MITDHELL, D.J. 1994. Effects of soil solarization and fumigation on survival of soilborne pathogens of tomato in northern Florida. *Plant Disease*, 78: 1167-1172.
- COOK, J.R. y BAKER, K.F. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota.
- CRONIN, M.J., TOHALEM, D.S., HARRIS, R.F. y ANDREWS, J.H. 1996. Putative mechanism and dynamics of inhibition of the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* by compost extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 1241-1249.
- DANIELLE, O.P. y RAI, K.S. 2006. On-farm management practices to minimise off-site movement of pesticides from furrow irrigation. *Pest Management Science*, 62: 899-911.
- EL-MASRY, M.H., KHALIL, A.I., HASSOUNA, M.S. y IBRAHIM, H.A.H. 2002. *In situ* and *in vitro* suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on some phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 551-558.
- EL-MEHALAWY, A.A., HASSANIN, S.M., HASSANIN, N.M. y ZAKI, S.A. 2007. Induction of resistance and biocontrol of *Rhizoctonia* in cotton against damping-off disease by rhizosphere yeasts and fungi. *New Egyptian Journal of Microbiology*, 17: 148-168.
- ELAD, Y. y SHTIENBERG, D. 1994. Effect of compost water extracts on gray mould (*Botrytis cinerea*). *Crop Protection*, 13: 109-114.
- EL-TARABILY, K.A. 2004. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 69-75.
- GOLDMAN, G.H., HAYES, C. y HARMAN, G.E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends in Biotechnology*, 12: 478-482.
- GOLUEKE, C.G. 1982. When is compost "safe"? A review of criteria for assessing the destruction of pathogens in composting. *Biocycle*, 28: 28-38.
- HAGGAG, W.M, SABER, S.M.S. 2007. Suppression of early blight on tomato

- and purple blight on onion by foliar sprays of aerated and non-aerated compost teas. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 5, 302-309.
- HAUG, R.T. 1993. *The practical handbook of compost engineering*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- HOITINK, H.A.J. y FAHY, P.C. 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 93-114.
- HOITINK, H.A.J. 1993. Compost can suppress soil-borne disease in container media. *American Nurseryman*, 178: 91-94.
- INGHAM, E.R. 2005. *The compost tea. Brewing manual; latest methods and research*. 5ª ed. Soil Foodweb Incorporated, Corvallis, Oregon.
- INGHAM, E.R. y ALMS, M. 2003. *The compost tea brewing manual*. 4ª ed. Soil Foodweb, Corvallis, Oregon.
- INGHAM, E.R. y ALMS, M. 1999. *Compost tea manual*. Soil Foodweb, Incorporated, Corvallis, Oregon.
- INGHAM, E.R. 2000. *The Compost Tea Brewing Manual*. Unisum Communications, Corvallis, Oregon.
- INGRAM, D.T. y MILLNER, P.D. 2007. Factors affecting compost tea as a potential source of *Escherichia coli* and *Salmonella* on fresh produce. *Journal of Food Protection*, 70: 828-834.
- KETTERER, N. 1990. Untersuchungen zur Wirkung von Kompost-Extrakten auf den Blattbefall ser Kartoffel und Tomate durch *Phytophthora infestans* sowie auf den Befall der Weinrebe durch *Plasmopara viticola*, *Pseudopeziza tracheiphila* und *Uncinula necator*. Tesis Doctoral, Universidad de Bonn, Alemania.
- KETTERER, N. y SCHWAGER, L. 1992. Effect of compost extracts on the disease incidence and the phyllosphere flora of bush bean and tomato leaves. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent*, 57: 411-421.
- KONÉ, S.B., DIONNE, A., TWEDDELL, R.J., ANTOUN, H. y AVIS, T.J. 2010. Suppressive effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. *Biological Control*, 52: 167-173.
- LITTERICK, A. y WOOD, M. 2009. The use of composts and compost extracts in plant disease control. En: Walters, D. (ed). *Disease control in crops: biological and environmentally friendly approaches*. Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido, pp. 93-121.
- LITTERICK, A.M., HARRIER, L., WALLACE, P., WATSON, C.A. y WOOD, M. 2004. The role of uncomposted materials, composts, manures, and compost extracts in reducing pest and disease incidence and severity in sustainable temperate agricultural and horticultural crop production review. *Critical Reviews in Plant Science*, 23: 453-479.
- MALANDRAKI, I., TJAMOS, S.E., PANTELIDES, I.S. y PAPLOMATAS, E.J. 2008. Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biological Control*, 44: 180-187.
- MURRAY, P.R. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society of Microbiology Press, Washington, D.C.
- NAKASAKI, K., NAG, K. y KARITA, S. 2005. Microbial succession associated with organic matter decomposition during thermophilic composting of organic waste. *Waste Management & Research*, 23: 48-56
- PALMER, A.K., EVANS, K.J. y METCALF, D.A. 2010. Characters of aerated compost tea from immature compost that limit colonization of bean

- leaflets by *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 1619-1631.
- PUNJA, Z.K. 1997. Comparative efficacy of bacteria, fungi, and yeasts as biological control agents for diseases of vegetable crops. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 315-323.
- QUARLES, W. 2001. Compost tea for organic farming and gardening. *The IPM Practitioner*, 23: 1-8.
- REGANOLD, J.P., GLOVER, J.D., ANDREWS, P.K. y HINMAN, H.R. 2001. Sustainability of three apple production systems. *Nature*, 410: 926-929.
- RELYEA, R. y HOVERMAN, J. 2006. Assessing the ecology in the ecotoxicology: A review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters*, 9: 1157-1171.
- SCHEUERELL, S. y MAHAFFEE, W. 2002. Compost tea: Principles and prospects for plant disease control. *Compost Science and Utilization*, 10: 313-338.
- SCHEUERELL, S.J. y MAHAFFEE, W.F. 2006. Variability associated with suppression of gray mold (*Botrytis cinerea*) on geranium by foliar application of non-aerated and aerated compost teas. *Plant Disease*, 90: 1201-1208.
- SIDDIQUI, Y., SARIAH, M., RAZI, I. y MAWARDI, R. 2009. Bio-potential of compost tea from agro-waste to suppress *Choanephora cucurbitarum* L the causal pathogen of wet rot of okra. *Biological Control*, 49: 38-44.
- SIVAN, A. y CHET, I. 1992. Microbial control of plant diseases. En: Mitchell, R. (ed.). *Environmental Microbiology*. Wiley-Liss Inc., Nueva York, pp. 335-354.
- ST. MARTIN, C.G. y BRATHWAITE, R.A.I. 2012. Compost and compost tea: Principles and prospects as substrates and soil-borne disease management strategies in soil-less vegetable production. *Biological Agriculture and Horticulture*, 28: 1-33.
- ST. MARTIN, C.C.G., DORINVIL, W., BRATHWAITE, R.A.I. y RAMSUBHAG, A. 2012. Effects and relationships of compost type, aeration and brewing time on compost tea properties, efficacy against *Pythium ultimum*, phytotoxicity and potential as a nutrient amendment for seedling production. *Biological Agriculture & Horticulture*, 28: 185-205.
- TRANKNER, A. 1992. Use of Agricultural and municipal organic wastes to develop suppressiveness to plant pathogens. En: Tjamos, E.S., Papavizas, G.C. y Cook, R.J. (ed.). *Biological Control of Plant Diseases: Progress and Challenges for the Future*. Plenum Press, Nueva York, pp. 35-42.
- WAKELIN, S.A., MCCARTHY, T., STEWART, A. y WALTER, M. 1998. *In vitro* testing for biological control of *Aphanomyces euteiches* *Proceedings of the NZ Plant Protection Conference 51st*: 90-95.
- WELTZIEN, H.C. 1990. The use of composted materials for leaf disease suppression in field crops. *Monograph - British Crop Protection Council*, 45: 115-120.
- WELTZIEN, H.C. 1991. Biocontrol of foliar fungal disease with compost extracts. En: Andrews, J.H. y Hirano, S.S. (ed.). *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 430-450.
- ZHANG, W., HAN, D.Y., DICK, W.A., DAVIS, K.R. y HOITINK, H.A.J. 1998. Compost and compost water extract-induced systemic acquired resistance in cucumber and *Arabidopsis*. *Phytopathology*, 88: 450-455.