

Título: Ensayo de inhibición de *Ralstonia* con ACTIV Pro

1. Antecedentes

Ralstonia solanacearum, una bacteria de suelo Gram-negativa agente patógeno de la podredumbre parda de la patata y de la marchitez bacteriana de la planta de la patata y del tomate.

Es una bacteria de crecimiento rápido, con una temperatura de desarrollo óptima entre los 28-30° C, por lo que es más frecuente en zonas cálidas. Sobrevive fácilmente ya que tiene varios cultivos y malas hierbas que sirven de hospedador, entre las que destaca *Solanum dulcamara* que suele crecer en las riberas de ríos y arroyos. Esta planta libera bacterias al agua, de donde pasa al cultivo si se riega con aguas contaminadas, pudiendo permanecer activa durante uno o más años, siendo una de las soluciones más eficaces para combatirla la rotación de cultivos.

El mecanismo de infección es a través de las raíces de la planta o entrando por heridas, aunque el patógeno también se puede introducir por el tallo, a través de lesiones producidas por insectos o por aperos.

Dentro de la Unión Europea, este fitopatógeno, es considerado un organismo de cuarentena los graves problemas económicos que generan están relacionados con el hecho de que las Directivas imponen la destrucción de la totalidad de los cultivos infectados , restricción la producción en tierras infestadas , la prohibición de la utilización del medio acuático contaminado, y las medidas de erradicación adicionales cuando sea necesario (DIRECTIVA 98/57/CE DEL CONSEJO de 20 de julio de 1998 sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.)

Es por esto que, dentro de la Unión Europea, la adquisición de esta cepa a una Colección De Cultivos tipo requiere de una solicitud acompañada de una carta de autorización. Para evitar este trámite se propone realizar los ensayos con una cepa de la misma familia y muy cercana genética y fenotípicamente, *Ralstonia pickettii*.

2. Objetivo

Comprobar si el equipo ACTIV Pro es capaz de eliminar o reducir una población de *Ralstonia* en agua para uso agrícola

3. Materiales y metodos.

Procedimiento

Se contamina artificialmente un volumen de agua (50 l) con una cepa no fitopatogena de *Ralstonia pickettii*. Mediante una bomba, se hace pasar el agua por el equipo ACTIV y se recoge en un segundo depósito.



Detalle de la instalación para el ensayo

- 1- Depósito de inoculación
- 2- Bomba (50 Hz, 250 w caudal 1500 l/h)
- 3- Depósito de recogida

Fases:

- 26/10/2017 Revitalización de la cepa de *Ralstonia pickettii* procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 330 (Ralston et al. 1973) Yabuuchi et al. 1996) En medio Nutritivo con la siguiente composición; Extracto de Buey (1g/l), extracto de levadura (2g/l), Peptona (5g/l) y NaCl (5g/l) completado a 1 litro con agua destilada y ajustado a pH

7.2. Para el medio sólido se añade 15 g de agar. Se incuba 48-72h a 30 °C en condiciones aeróbicas.

- 30/10/2017 Preparación de 1 litro de inóculo, por resuspensión de 1 ml de *Ralstonia pickettii* revitalizada en 1 litro de caldo nutritivo. Se incuba 48-72h a 30 °C en condiciones aeróbicas y con agitación.
- 30/10/2017 Limpieza física con cepillo y desinfección de los depósitos mediante enjuague con agua electroperoxidada. Se dejan llenos de agua.
- 2/11/2017 Limpieza de la bomba. La bomba es nueva, para asegurar que no haya contaminación cruzada por posibles microorganismos presentes en la misma, se hizo recircular el agua limpia del depósito 1, pasando por el Activ Pro, durante 1 hora. Al final del proceso el agua del depósito alcanzó los 3 ppm de poder oxidante.
Tras este proceso el depósito se vació y se rellenó hasta 50 l con agua electroperoxidada (0.5 ppm)
- 3/11/2017 Pruebas de comprobación de desinfección.

	Aerobios totales	Mohos y levaduras
Depósito 1	0 UFC/100 ml	0 UFC/100 ml
Depósito 2	0 UFC/100 ml	0 UFC/100 ml
Salida bomba	0 UFC/100 ml	0 UFC/100 ml

- 6/11/2017 Inoculación del depósito 1. Se añaden 250 ml del inóculo (concentración de *Ralstonia* $5,9 \times 10^7$ UFC/ml) a los 50 l del depósito, lo que supone una concentración superior a 10^5 UFC/ml (5 Ulog). Se deja colonizar durante 2 h, periodo tras el cual se efectúan los ensayos.

Se realiza una primera pasada del agua inoculada por el ACTIV Pro (pase 1). Se toma muestra de agua para análisis a la entrada y salida del equipo. Adicionalmente se mide pH, conductividad, turbidez y poder oxidante (DPD) en ambas muestras.

- 7/11/2017 Se realiza una segunda y tercera pasada (de depósito 2 al 1 y viceversa) (pases 2 y 3)

Los ensayos se efectúan a T^o ambiente (20° C)

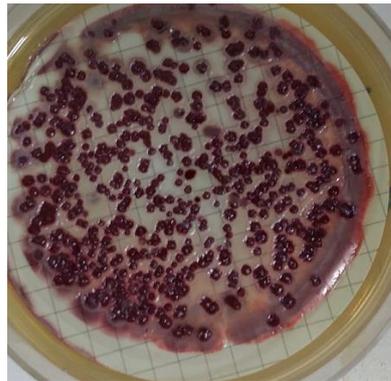
Datos funcionamiento ACTIV durante el ensayo

Flujo 102 m³/h
Corriente 117 A
Voltaje 136 V
Conductancia 860 mS

Para el cultivo en los ensayos se emplea medio de Terazolio de Kelman, siguiendo las recomendaciones de la DIRECTIVA 2006/63/CE DE LA COMISIÓN Europea de 14 de julio de 2006, por la que se modifican los anexos II a VII de la Directiva 98/57/CE del Consejo sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

Composición; Casaminoácidos 1 g/l, Bactopectona 10 g/l, Dextrosa 5 g/l y agar 15 g/l. Se esteriliza y se deja enfriar a 45 °C. Se añade, esterilizada por filtración, Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio hasta una concentración de 50 mg/l.

Las placas, por triplicado, se incuban durante 48 h a 30 °C.



Aspecto colonial de *Ralstonia pickettii* en agar Terazolio de Kelman

Resultados Pase 1

	Entrada	Salida
pH	7,86	7,87
Conductividad (µs/cm)	312	312
Turbidez (N.T.U.)	5,58	2,60
Poder Oxidante (DPD)	< 0,1	< 0,1
Ralstonia Picketii (UFC/ml)	4.5 x 10 ⁶	5.3 x 10 ⁴
Ralstonia Picketii (U_{log})	5,67	4,72
RSD (Desviación Estándar)	0,28	0,21
CV (Coeficiente de Variación)	5,19	6,03
Reducción (U_{log})		1,93

Los resultados mostrados corresponden al valor medio de tres réplicas.

Resultados pase 2 y 3

	UFC/100 ml	Ulog	RSD	CV	Reducción (Ulog)
Entrada (salida pase 1)	$5,4 \times 10^4$	4,73	0,03	11,18	
Salida Pase2	$2,4 \times 10^3$	3,38	0,05	6,63	1,35
Salida Pase 3	$8,6 \times 10^2$	2,93	0,06	8,52	0,45

El pase 2 se efectúa del depósito 3 al depósito 1, en éste quedaban microorganismos en las paredes del mismo, ya que no se efectuó una limpieza previa antes del trasvase, para simular la recirculación real en un mismo depósito. Lo mismo ocurre con el pase 3, trasvase de depósito 1 a 3.

Conclusiones

- El empleo del equipo ACTIV pro consigue reducir la carga microbiana contaminante en el agua tras el paso por el equipo, aunque no se alcanzan los criterios de aceptabilidad preestablecidos de 10^2 UFC/ml para una sola pasada por el equipo.
- Se observa que los ciclos de recirculación reducen la población hasta niveles aceptables. Lo que nos lleva a pensar que un protocolo de recirculación del agua en un mismo depósito puede garantizar la desinfección del mismo.

Criterios de aceptabilidad:

Indicador	Ralstonia
Unidades	UFC/ml
Nivel Objetivo	0
Nivel aceptable	10^2 (Reducción en al menos 3 ULog)

Jueves, 16 de noviembre de 2017
Responsable Calidad (Dir. Téc. Adjunta)
Nathalie Beaucourt




Clean-Biotec
Biotecnología Ambiental
C.I.F. B-26340950