

XIX ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES

ÁREA: Ciencias Biológicas

SUB-ÁREA: Biotecnología

GRUPO: X

TÍTULO: “Desarrollo de una técnica de biocontrol, a base de *Pseudomona fluorescens*, para el tratamiento de enfermedades fúngicas en cultivos de arroz”

AUTOR: Morelli Matias Nicolas

INTRODUCCIÓN:

El arroz (*Oryza sativa* y *Oryza glaberrima*) es un cereal de primordial importancia para la alimentación humana, siendo básico en la dieta de más de la mitad de la población mundial, especialmente en países subdesarrollados o en vías de desarrollo.

El cultivo de arroz puede ser afectado por enfermedades causadas por microorganismos, que pueden aparecer desde la germinación hasta la madurez del mismo y que pueden incidir en el rendimiento y/o calidad de la producción. A nivel mundial el cultivo del arroz es afectado por más de 70 enfermedades. Estudios realizados en las principales provincias arroceras de nuestro país, Corrientes y Entre Ríos, demuestran que las enfermedades con mayores niveles de incidencia son, la pudrición del tallo (PT) causada por *Sclerotium oryzae*, y el Manchado de la Vaina (MV), causada por el “complejo *Rhizoctonia*” (Pedraza M.V, 2005).

En la actualidad se han evaluado gran cantidad de prácticas para erradicar dichas enfermedades, como la quema de rastrojos, la aplicación de fungicidas químicos, uso de variedades resistentes y el desarrollo técnicas de cultivo que disminuyan la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, hasta la fecha, ninguna de estas actividades han podido erradicarla de manera eficaz, duradera y sustentable (Pedraza, M.V y col., 2006, 2007). Una alternativa aun poco explorada es el empleo de herramientas de control biológico, que consiste en la potenciación o utilización de los enemigos naturales de una plaga para reducir su población. Se caracteriza por ser más seguro para humanos, cosechas y medio ambiente.

Estudios realizados en la estación experimental INTA Concepción del Uruguay, demostraron que el empleo de *Pseudomonas Fluorescens* como agentes de control biológico era efectivo contra las enfermedades de la Vaina y el Tallo de arroz, disminuyendo su incidencia en un 40 y 70% respectivamente. (Pedraza, M.V y Asselborn, M.N. ,2006). Ambas enfermedades se caracterizan por producir estructuras de resistencia (esclerocios y micelio). Éstos pueden ser producidos en el interior de los tejidos de las plantas, superficialmente o entre las vainas de las hojas, en etapas avanzadas del cultivo. Al final del ciclo, los esclerocios quedan en el rastrojo o en el suelo, luego con la inundación del cultivo, pueden flotar, germinar e infectar a las vainas de las plantas a la altura de la línea del agua. Ha sido demostrado que los esclerocios son inactivados completamente cuando son tratados con suspensiones bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* por cuatro semanas. (Pande, V. S., y Chaube, H. S. 2003).

Proyecto: CAI+D 50120110100171 LI. Estrategias de nano y microencapsulación de agentes bioactivos 1
relevantes en salud humana. (2013-2015)
Director del proyecto: Mg. Liliana Gabriela Santiago

Director del autor: Dr. Miguel Heinrich
Co director del autor: Mg. Liliana Gabriela Santiago

Resulta entonces de interés desarrollar un bioformulado a base *Pseudomona fluorescens* que sea de utilidad para establecer técnicas de biocontrol contra las enfermedades fúngicas que afectan al arroz.

OBJETIVOS

Se pretende desarrollar un vehículo que sea capaz de concentrar al agente de control biológico a la altura de la línea del agua, a donde se concentran las estructuras de resistencias de manera de evitar que los esclerocios germinen y el patógeno colonice las estructuras superiores de las plantas. En búsqueda de realizar un tratamiento completo de la enfermedad, se desarrollara un medio que sirva para el tratamiento de rastrojos, suelos y semilla.

METODOLOGÍA

Obtención de un biocontrolador para aplicación en suelo, rastrojos y semilla:

Se evaluaron cuatro formulaciones y temperaturas de almacenamiento alternativas, tomando como base el medio formulado por R. Manikandan y col. (Manikandan y col, 2010). Se realizaron recuentos periódicos mediante la técnica de conteo en placa.

Desarrollo de un biocontrolador para aplicación en la interface L-G:

Se formuló una emulsión multicapa con lecitina y quitosan. Se evaluó la estabilidad de las emulsiones monocapa, con lecitina y emulsiones multicapa, con lecitina y quitosan. Se analizó la influencia de la concentración del agente emulsionante, el pH y el % O/W sobre la estabilidad de la emulsión. Se evaluó la estabilidad a la coalescencia a través del método de Graham y la estabilidad a la floculación a través de observación al microscopio óptico.

Con el objetivo de observar como interacciona la lecitina y el quitosan en la interface de la gota realizamos una coloración del polisacárido con un fluoróforo (FITC) y observamos la emulsión al microscopio confocal de fluorescencia. Mientras que mediante medidas de potencial z determinamos la carga superficial de la gota de emulsión.

De acuerdo al análisis de potencial Z, se dedujo que la carga aportada por el quitosan no fue suficiente para neutralizar la carga de la lecitina y aportarle una carga superficial positiva a la gota de emulsión. Por lo que, se optó por mezclar previamente la solución de quitosan con la solución bacteriana para luego introducirlas en el sistema monocapa con lecitina. Posteriormente se analizó viabilidad bacteriana en función del tiempo. Se evaluó la estabilidad a la coalescencia a través del método de Graham y la estabilidad a la floculación a través de observación al microscopio óptico.

Como método para comprobar que la bacteria forma parte de la interface de la emulsión multicapa, realizamos mediciones de potencial z en el sistema multicapa en ausencia y presencia de la bacteria.

RESULTADOS

Tabla Nro. 1: Evaluación de medios de formulación:

A los 163 días de cultivo las formulaciones formadas por medio nutritivo y glicerol fueron las que dieron los mejores resultados en cuanto a viabilidad bacteriana. (Tabla Nro. 1) También podemos decir que al almacenar la formulación bajo refrigeración se obtienen aún mejores resultados.

Medio	Recuento inicial	Día Nro. 15	Día Nro. 42	Día Nro. 84	Día Nro. 163
A	$1,00 \times 10^9$	$3,75 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$	$2,50 \times 10^7$	$3,60 \times 10^5$
B	$1,00 \times 10^9$	$2,30 \times 10^9$	$1,00 \times 10^8$	$2,75 \times 10^7$	$1,57 \times 10^6$
C	$1,00 \times 10^9$	$4,00 \times 10^8$	$2,00 \times 10^8$	$3,20 \times 10^7$	$2,00 \times 10^6$

Tabla Nro. 1. Medio A: medio nutritivo; medio B: medio nutritivo con glicerol (0,01%); medio C: medio nutritivo con glicerol (1,50%). Los valores de los recuentos están expresados en UFC/ml.

Se lograron obtener emulsiones multicapa formadas con lecitina y quitosan, que resultaron estables a los diferentes valores de pH propuestos (3,5 y 7). En las imágenes obtenidas en el microscopio confocal de fluorescencia, observamos que el quitosan se adsorbe en la interface de las gotas de la emulsión monocapa formada por lecitina, dando lugar a una emulsión multicapa. Los resultados obtenidos de las mediciones de potencial z indican que la lecitina le otorga una carga superficial negativa a las gotas de la emulsión, al añadir el quitosan se produce una disminución de las cargas negativas en la superficie de la gota, a pesar de ello, la densidad de carga aportada por el polisacárido no es suficiente para neutralizar la carga de la lecitina. (Tabla Nro. 2)

Tabla Nro. 2: Medidas de potencial Z de las emulsiones multicapa y monocapa:

Tipo de Emulsión		pH del medio		
		pH 3	pH 5	pH 7
Monocapa	con lecitina	$-45,50 \pm 1,84$ mV	$-61,2 \pm 1,56$ mV	$-71,55 \pm 1,06$ mV
Multicapa	con lecitina y quitosan	$-37,85 \pm 0,64$ mV	$-61,00 \pm 1,56$ mV	$-63,90 \pm 0,14$ mV

Se obtuvieron emulsiones estabilizadas formadas por lecitina, quitosan y bacteria. Al día 15 de preparada la emulsión, la viabilidad bacteriana dentro de la formulación resulto ser de $1,8 \times 10^9$ UFC/ml. De las mediciones de potencial Z podemos afirmar que efectivamente la bacteria se ubica en la interface de la gota de la emulsión, dado que al introducirla en la solución se observó una disminución del potencial, producido por la carga negativa aportada por los lipopolisacáridos de la pared celular bacteriana. (Tabla Nro.3) En función de los resultados obtenidos es probable que las bacterias atrapadas en la interface de las gotas puedan conducirse junto a ellas hacia la superficie de la lámina de agua.

Tabla Nro. 3: Mediciones de potencial Z en ausencia y presencia de la bacteria en la emulsión multicapa.

Tipo de emulsión	Potencial Z
Emulsión multicapa sin bacteria	-44,75 ± 0,21
Emulsión multicapa con bacteria	-48,85 ± 1,20

CONCLUSIONES

Se obtuvo una formulación a base de medio nutritivo y glicerol que permitió mantener viables a las bacterias durante un largo periodo de tiempo. Se propone como potencial inoculante para la aplicación de *Pseudomonas fluorescens* en suelos, rastros y semillas. Logramos obtener un potencial vehículo basado en una emulsión multicapa para concentrar a las bacterias en la superficie de la lámina de agua, que tiene por objetivo inactivar a los esclerocios que flotan durante el periodo de inundación del cultivo.

BIBLIOGRAFIA

Manikandan, D. Saravanakumar , L. Rajendran, T. Raguchander, R. Samiyappan (2010) Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. Department of Plant Pathology, Centre for Plant Protection Studies, Tamil Nadu Agricultural University, India.

Pande, V. S., Chaube, H. S. (2003) Efect of *Pseudomonas fluorescens* isolates on sclerotial viability of *Rhizoctonia solani* (Kuhn). *Ann Plant Protection Sci.* 11: 57-60.

Pedraza M.V. (2005) Principales actividades sobre enfermedades del cultivo de arroz en la EEA Concepción del Uruguay del INTA. En: Resultados Experimentales 2004-2005. Argentina: ProarrozINTA. XVI: 117-127.

Pedraza, M.V; Asselborn, M.N. (2006) Evaluación de fungicidas para el control de enfermedades provocadas por *Rhizoctonia* spp y por *Sclerotium oryzae*. En: Resultados Experimentales 2005-2006. Argentina: Fundación ProArroz. INTA. 15: 109-115.

Pedraza, M.V; Asselborn, M.N; Pirchi, J; Arguissain, G, Livore, A.B. (2007) Effect of Genotype, Irrigation and Nitrogen on Diseases Incidence in A Rice Field Crop. (INTA), Argentina. 4 th Temperate Rice Conference Novara Italia. 326-327.