



## VALIDACIÓN DE LA APLICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS EN EL BIOCONTROL DE HONGOS DEL DETERIORO DE FRUTAS Y HORTALIZAS DE PRODUCCIÓN LOCAL

Scapellato Ivana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Procesos Biológicos en Ingeniería Ambiental. Departamento de Medio Ambiente. Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, UNL.

María Teresita Benzzo (directora); Lisandro Gabriel Seluy (co-director)

Área: Ciencias Biológicas.

### INTRODUCCIÓN

La demanda actual de productos hortícolas frescos es cada vez más exigente no sólo en lo que refiere a calidad sanitaria sino que contempla la calidad sensorial y nutricional por lo que resulta imprescindible la aplicación de tecnologías que permitan el mantenimiento de estos productos por más tiempo. Las Guías Alimentarias para la Población Argentina recomiendan frutas y hortalizas en variedad de tipos y colores, por su aporte de fibra, vitaminas y minerales necesarias para el correcto funcionamiento del organismo (GAPA, 2016).

El aumento de las temperaturas y precipitaciones respecto de los promedios históricos en diversas regiones del planeta afectan los ciclos de vida de las plagas y la incidencia y distribución de los hongos del deterioro. Las condiciones mencionadas favorecen la incidencia de éstos, principalmente por contacto con el suelo durante el crecimiento, cosecha y almacenamiento/distribución de frutas y hortalizas. Esto provoca pérdidas en calidad y cantidad, generando mermas económicas para el productor, además del potencial problema sanitario relacionado con la producción de micotoxinas.

Se deduce la importancia de buscar nuevos compuestos fungicidas que ofrezcan una alternativa de origen biológico, que sean inocuos para el ser humano y que tengan la ventaja adicional de ser amigables con el medio ambiente, es decir, que no se acumulen en la cadena alimentaria y sean biodegradables.

Un grupo interesante lo constituyen las bacterias del ácido láctico (BAL) las cuales tienen el estatus de GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Como los vegetales son hábitats naturales para las BAL, su potencial aplicación en la prevención del deterioro de vegetales y hortalizas frescas introduce a una innovadora tecnología de biopreservación. Sathe y col. (2007) encontraron que ciertos aislamientos provenientes del Género *Lactobacillus* presentaban un amplio espectro inhibitorio contra hongos del deterioro, extendiendo el período de conservación de estos alimentos frescos tras su aplicación.

### OBJETIVOS

- Aislar hongos del deterioro en diferentes puntos de la cadena alimentaria de frutas y hortalizas producidas en Santa Fe y su zona de influencia.

Título del proyecto: "Optimización de la proliferación de microorganismos para la generación de un producto con actividad biocontrol frente a hongos del deterioro de frutas y hortalizas".

Instrumento: Tesina: "Obtención de microorganismos con actividad antifúngica para su potencial aplicación en la cadena de producción de frutas y hortalizas de producción local".

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: Consejo Interuniversitario Nacional.

Director del proyecto: Isla, Miguel Ángel.



- Evaluar la actividad biocontrol *in-vitro* de BAL aisladas de diversos sustratos alimenticios (donde se conoce que forman parte de su ecología microbiana) frente a los principales hongos, seleccionados en función del deterioro y/o producción de micotoxinas de interés sanitario.
- Realizar estudios *in-vivo* sobre el desempeño de las BAL de interés (o sus metabolitos) por aplicación directa sobre hortalizas, frutas y verduras, obtenidas en diversos puntos de la cadena de comercialización, para evaluar la actividad antifúngica en condiciones reales.

## METODOLOGÍA

Se partió de hortalizas y frutas con evidencias de lesiones fúngicas a partir de las cuales se realizaron los aislamientos en medios agar YPG, agar HyL y PD, a 30°C y en aerobiosis hasta obtener cultivos axénicos. Se estudiaron las características macroscópicas y microscópicas para su identificación a nivel de Género.

Para los aislamientos de BAL se utilizaron hortalizas sanas (sin lesiones de deterioro fúngico) colocando 1 g finamente picado en caldo MRS a 37 °C en anaerobiosis, 24-48 horas. Luego se realizó el aislamiento en agar MRS hasta la obtención de cultivos axénicos (método de las 5 estrías) bajo las mismas condiciones de incubación, verificando para cada colonia presuntiva la morfología, positividad de la tinción de Gram y la negatividad de la prueba de la Catalasa.

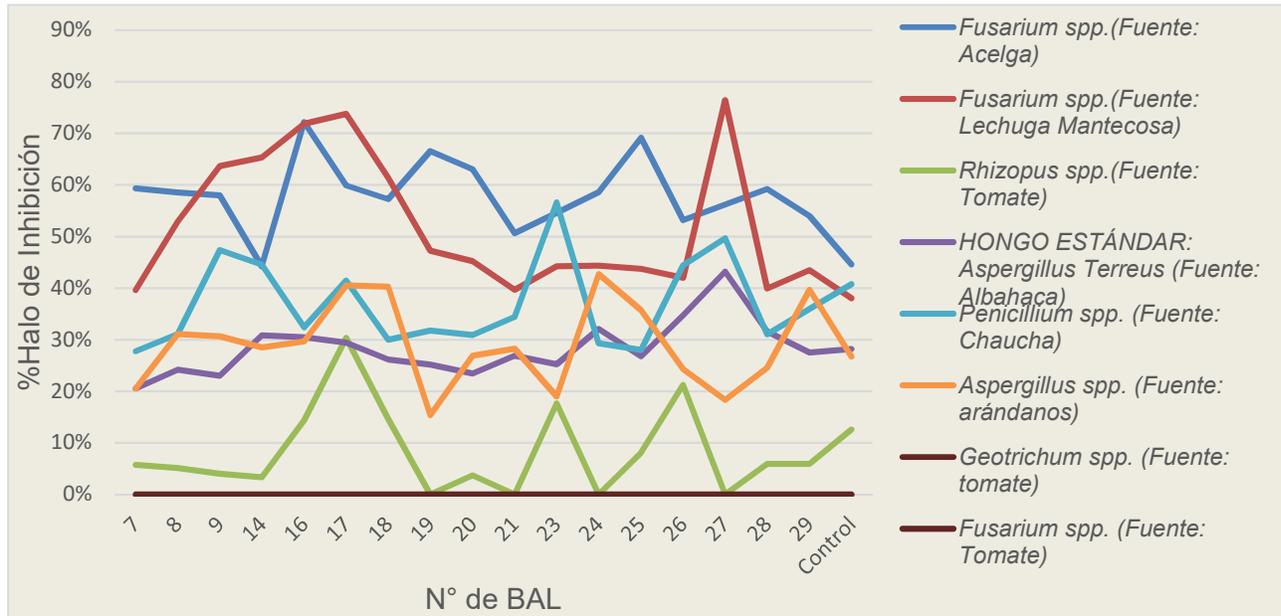
Se realizaron diversas adaptaciones de las técnicas de antagonismo *in-vitro* para visualizar la interacción BAL-hongo del deterioro. Los halos de inhibición se estimaron como porcentaje respecto del área total de la caja de Petri (diámetro interno de la placa: 90 mm; vol. agar MRS: 13 mL; vol. PDA: 8mL; temp. y tiempo incubación BAL: 37°C, 48 Horas; temp. y tiempo incubación hongo: 30°C, hasta observación del crecimiento fúngico y/o coloración del micelio aéreo). Se utilizó para la medición el programa Image-J (1,51n versión 2017).

Las pruebas *in-vivo* se realizaron por duplicado, pre-inoculando hortalizas y frutas sanas, previa desinfección superficial con hipoclorito de sodio (1% m/v) durante 30 segundos, seguido de un lavado por inmersión en agua destilada estéril. Se practicaron pocillos en los que se inocularon diferentes aislamientos de BAL (50 µL y DO: 0,5 -correspondiente a un cultivo en fase de crecimiento exponencial-), su sobrenadante (SN) libre de células (50 µL obtenido tras la centrifugación, 10000 rpm- 10 min., de un cultivo en fase exponencial) y el hongo en estudio ( $10^4$  esporos/mL estandarizado por recuento en cámara NB) ensayando, además, la inmersión previa de la hortaliza/fruta en el SN de la BAL (Guizzard y Pratella, 1996; Sathe y col., 2007; Flores Cordova y col., 2013). Se dispusieron en cámara húmeda a temperatura ambiente, observándose la aparición de lesiones fúngicas durante 12 días.

## RESULTADOS/ CONCLUSIONES

### Ensayos *in-vitro*

En la **Figura 1** se muestra graficado el área porcentual de la caja de Petri correspondiente al halo de inhibición fúngico para cada aislamiento de BAL, tomando como cepa control a *L. Plantarum*. En la **Tabla 1** se indica la verdura de la que se obtuvo cada una de las BAL utilizadas en los ensayos *in-vitro*.



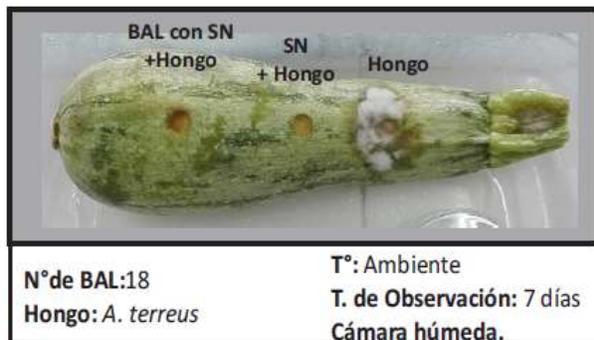
**Figura 1:** Área porcentual de la caja de Petri correspondiente al halo de inhibición fúngico para cada aislamiento de BAL. El control de BAL corresponde a *L. Plantarum*, cepa provista por un grupo colaborador de la Fac. de Ciencias Veterinarias (FCV-UNL).

**Tabla 1:** Verdura fuente de cada una de las BAL ensayadas. Referencias: Chaucha (Ch.), Zanahoria (Za.), Pimiento (Pi.) y Rúcula (Rú.).

N° de BAL	7	8	9	14	16	17	18	19	20	21	23	24	25	26	27	28
Fuente	Ch.	Ch.	Ch.	Za.	Za.	Za.	Pi.	Pi.	Pi.	Pi.	Rú.	Rú.	Rú.	Rú.	Rú.	Rú.

### Ensayos *in-vivo*

Las **Figuras 2 y 3** muestran algunas de las hortalizas utilizadas en los ensayos *in-vivo* donde se observa un mayor crecimiento en el pocillo inoculado sólo con *Asp. terreus* (Control +) respecto de los inoculados conjuntamente con la BAL y/o su SN. Por el contrario, en la **Figura 4** se observa que para zanahoria el desarrollo fúngico es mayor en el pocillo co-inoculado con la BAL en estudio. En cada figura se detallan las condiciones y el tiempo al momento de la observación.



**Figura 2:** Pocillos practicados en zapallito zucchini

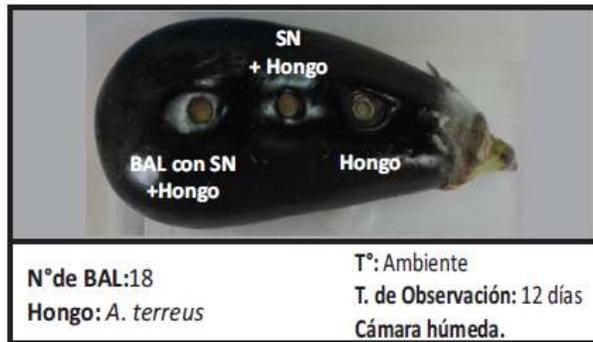


Figura 3: Pocillos practicados en berenjena

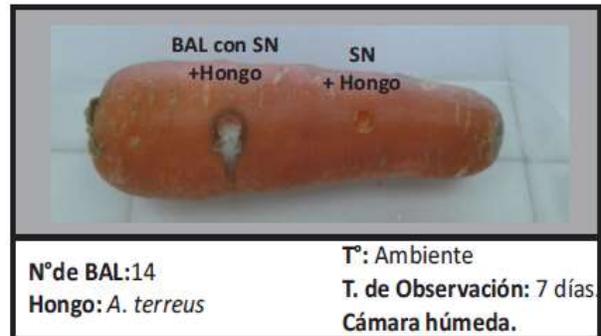


Figura 4: Pocillos practicados en zanahoria.

Las BAL ensayadas evidenciaron un efecto antagónico *in-vitro* frente a diversos hongos del deterioro (*Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.) desarrollando zonas de inhibición con porcentajes que superaron el 60% del área total expuesta en torno al crecimiento de las cepas bacterianas.

La co-inoculación de las BAL (N°14 y 18) y su SN con *Aspergillus* spp., en hortalizas y frutas de producción local, mostraron diferencias en su actividad biocontrol. Teniendo en cuenta que cada uno de estos alimentos se corresponde con una matriz diferente (composición química, pH,  $a_w$ , textura, tipo de piel/cáscara, compuestos antimicrobianos naturalmente presentes), la validación final para su aplicación en etapas pos-cosecha debería considerar la aplicación del SN de las BAL con mejor performance, en combinación con temperaturas de refrigeración (tecnología de barreras), prolongando la vida útil de hortalizas y frutas frescas.

El presente estudio se adapta perfectamente a la visión actual de los Programas de Seguridad Alimentaria (BPA, BPF, HACCP, BRC, ISO 22000:2005, ISO 9001:2015) evitando la pérdida de la inocuidad, a la vez que satisface los requerimientos actuales de los consumidores.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- **Flores Córdova MA.; Martínez Damián MT; Nieto Ángel D y col.**, 2013. Reduction in the *in vitro* Germination of Conidia of *Alternaria alternata* Isolated from *Eruca sativa* with Juice of Broccoli. *Revista mexicana de fitopatología*, 31, 2, 180-190.
- **GAPA:** Guías Alimentarias para la Población Argentina, 2016. Documento técnico metodológico. Ministerio de Salud. Argentina. Disponible en URL: [http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000817cnt-2016-04\\_Guia\\_Alimentaria\\_completa\\_web.pdf](http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000817cnt-2016-04_Guia_Alimentaria_completa_web.pdf)
- **M. Guizzardi MM & Pratella GC**, 1996. Biological Control of Gray Mold in Pears by Antagonistic Bacteria. *Biological Control*, 7, 30-37.
- **SatheSJ; Nawani NN; Dhakephalkar PK & Kapadnis BP.**, 2007. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2622-2628.