

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas.

**“ANÁLISIS, OPTIMIZACIÓN Y PRODUCCIÓN DE UN PRODUCTO
BIODEGRADABLE COMO VEHÍCULO DE BACTERIAS ÚTILES EN EL
BIOCONTROL DE RHIZOCTONIA SOLANI Y SCLEROTIUM ORYZAE EN
CULTIVOS DE ARROZ”.**

Lic. Matías Nicolás Morelli

Director de Tesis: Dr. Miguel Heinrich

Co-directora de Tesis: Ing. Liliana Santiago

Lugar de realización: Instituto de desarrollo para la Industria Química
(INTEC); (CONICET – UNL).

-2022-

Agradecimientos

A mis padres que continúan acompañándome en este largo camino.

A mis directores que me abrieron las puertas, me dieron la oportunidad de crecer como profesional y me brindaron las herramientas necesarias para poder alcanzar cada uno de los objetivos.

A mi compañera de vida que supo levantarme y acompañarme en los momentos más difíciles.

A Rodrigo Leonardi, amigo y colega que siempre ha estado dispuesto a ayudarme en todos los desafíos profesionales que se fueron presentando.

Al Grupo de Innovación en Ingeniería de bioprocesos, a todas las personas que tuvieron la oportunidad de formar parte de este hermoso grupo.

Al CONICET, que me brindo el apoyo económico para que pueda llevar adelante este proyecto.

A la Universidad Nacional del Litoral, y particularmente a la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**, a donde comencé mi carrera y continuo mi formación como profesional.

Aportes Científico-Tecnológicos

Morelli MN, Ibañez M, Leonardi RJ, Santiago LG, Irazoqui H, Heinrich JM. Design of a biodegradable carrier for the application of controller bacteria on air–water interfaces. *Pest Manag Sci.* 2020 76(1):296-303. doi: 10.1002/ps.5514.

Morelli N Matias, Sponton Osvaldo, Leonardi J Rodrigo, Santiago G Liliana, Heinrich M Josue. *Sclerotium oryzae* biocontrol in flooded rice fields with floating microcarrier technology: The effect of chitosan molecular weight. *Pest Manag Sci.* 2021 (11):5228-5235. doi: 10.1002/ps.6564.

ÍNDICE	Paginas
1 ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	9
2 RESUMEN	13
3 INTRODUCCIÓN GENERAL	17
3.1 Importancia del cultivo del arroz	17
3.2 Enfermedades en el cultivo del arroz	20
3.2.1 Enfermedades del Tallo y la Vaina de arroz (ETV)	21
3.2.1.1 Efectos del cambio climático sobre las ETV	23
3.2.1.2 Control biológico de las ETV	23
4 Justificación del tema de tesis	25
5 Objetivo General	25
6 CAPÍTULO I	26
6.1 Introducción	27
6.2 Objetivos específicos	31
6.3 Sistemas dispersos	32
6.3.1 Preparación de emulsiones	32
6.3.1.1 Estabilidad de emulsiones	32
6.3.1.2 Emulsionantes	34
6.3.1.3 Efecto de los polímeros sobre la estabilidad coloidal	35
6.3.2 Interacciones coloidales: Teoría de DLVO	40
6.3.2.1 Interacciones de Van der Waals	43
6.3.2.2 Interacciones electrostáticas -Teoría de la doble capa eléctrica	44
6.3.2.3 Medición del potencial ζ	49
6.4 Materiales y Métodos	51
6.4.1 Materiales	51
6.4.2 Preparación del vehículo de aplicación	51
6.4.2.1 Obtención de una emulsión de aceite-en-agua	51
6.4.2.2 Incorporación del Polímero Quitosano a la emulsión	52

6.4.3	Análisis de la estabilidad de las emulsiones	53
6.4.3.1	Observación microscópica	53
6.4.3.2	Determinación de la estabilidad de coalescencia de emulsiones. Análisis gravimétrico	53
6.4.3.3	Medición del potencial ζ de las emulsiones	54
6.4.3.4	Tinción de las emulsiones con Rojo Nilo y FITC	54
6.4.3.5	Medición de la dispersión de luz múltiple	55
6.4.4	Incorporación de bacterias al vehículo de aplicación	55
6.4.4.1	Cultivo de Bacterias	55
6.4.4.2	Medición del potencial ζ de <i>P. fluorescens</i>	56
6.4.4.3	Análisis de la concentración mínima inhibitoria del quitosano (CS-MIC) de las <i>Pseudomonas fluorescens</i>	56
6.4.5	Análisis de la interacción Quitosano-Bacteria mediante mediciones del Potencial ζ.	
	Efecto del peso Molecular del Quitosano	56
6.4.5.1	Medición del potencial ζ de <i>P. fluorescens</i> M1C y de los quitosanos de diferente peso molecular	57
6.4.5.2	Medición del potencial ζ de los complejos formados por <i>P. fluorescens</i> M1C y los quitosanos de diferente peso molecular	57
6.4.6	Distribución de las bacterias transportadas por el vehículo de aplicación (LQB) sobre diferentes espejos de agua	58
6.4.6.1	Aplicación sobre agua estancada en <i>indoor</i>	59
6.4.6.2	Aplicación sobre agua estancada en exterior. Estanque div. Los andes	59
6.4.6.3	Aplicación sobre agua estancada en exterior.	
	Prueba en laguna de parque Garay	59
6.4.6.4	Aplicación de las bacterias inmersas en el vehículo formulado sobre agua estancada inferior. Efecto del peso Molecular del Quitosano	60

6.5 Resultados y discusión	61
6.5.1 Análisis de la estabilidad de las emulsiones	61
6.5.1.1 Análisis microscópico de la estabilidad de las emulsiones	61
6.5.1.2 Análisis microscópico de la estabilidad de las emulsiones con quitosano	63
6.5.1.3 Determinación de la estabilidad de coalescencia de emulsiones. Análisis gravimétrico	64
6.5.1.4 Medición del potencial ζ de las emulsiones	65
6.5.1.5 Tinción de las emulsiones con Rojo Nilo y FITC	66
6.5.1.6 Medición de la dispersión de luz múltiple	66
6.5.2 Incorporación de bacterias al vehículo de aplicación	68
6.5.2.1 Medición del potencial ζ de <i>P.fluorescens</i>	68
6.5.2.2 Análisis de la concentración mínima inhibitoria del quitosano (CS-MIC) de las <i>Pseudomonas fluorescens</i>	69
6.5.3 Análisis de la interacción Quitosano-Bacteria mediante mediciones del Potencial ζ . Efecto del peso Molecular del Quitosano	70
6.5.3.1 Medición del potencial ζ de <i>P.fluorescens</i> M1C	70
6.5.3.2 Análisis del potencial ζ de los polímeros de quitosano de diferente peso molecular	71
6.5.3.3 Medición del potencial ζ de los complejos formados por <i>P.fluorescens</i> M1C y los quitosanos de diferente peso molecular	72
6.5.3.3.1 Efecto del peso molecular y el pH sobre el CNP	77
6.5.3.3.2 Efecto del peso molecular y el pH en el SP	78
6.5.4 Distribución de las bacterias transportadas por el vehículo de aplicación (LQB) sobre diferentes espejos de agua	79

6.5.4.1	Aplicación de las bacterias inmersas en el vehículo formulado sobre agua estancada en <i>indoor</i>	79
6.5.4.2	Aplicación de las bacterias inmersas en el vehículo formulado sobre agua estancada en exterior-Estanque div. Los andes	80
6.5.4.3	Aplicación de las bacterias inmersas en el vehículo formulado sobre agua estancada en exterior- Prueba en laguna de parque Garay	82
6.5.4.4	Aplicación de las bacterias inmersas en el vehículo formulado sobre agua estancada inferior. Efecto del peso Molecular del Quitosano	82
6.6	Conclusiones	83
7	CAPÍTULO II	86
7.1	Introducción	87
7.2	Objetivos específicos	89
7.3	Cultivo del Arroz y ETV	90
7.3.1	El cultivo del arroz	90
7.3.1.1	Taxonomía del arroz	90
7.3.1.2	Variedades de arroz	91
7.3.1.3	Morfología	91
7.3.1.4	Fisiología	93
7.3.1.5	Etapas para la producción del cultivo	95
7.3.2	Enfermedad del tallo del arroz	98
7.4	Materiales y Métodos	99
7.4.1	Preparación de la formulación LQB	100
7.4.2	Pruebas de cultivos duales (<i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>S. oryzae</i>) en medio sólido	100
7.4.3	Pruebas de cultivos duales (<i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>S. oryzae</i>) en placa de Petri: Efecto de la concentración de bacterias, el medio de cultivo y el peso molecular del quitosano	101
7.4.4	Pruebas de cultivos duales (<i>Pseudomonas fluorescens</i> vs	

<i>S. oryzae</i>) en macetones a campo	101
7.4.4.1 Preparación de macetones	102
7.4.4.2 Preparación de inóculo de <i>S. oryzae</i>	102
7.4.4.3 Aplicación de los tratamientos	102
7.4.4.4 Muestreo y análisis de datos	103
7.4.5 Pruebas de cultivos duales (<i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>S. oryzae</i>) en macetones a en laboratorio – Efecto de la cantidad de inoculaciones	105
7.4.5.1 Pre germinación de semillas	105
7.4.5.2 Preparación de macetas	105
7.4.5.3 Siembra	105
7.4.5.4 Fertilización con Urea	106
7.4.5.5 Inundación del cultivo	106
7.4.5.6 Preparación de inóculo de <i>S.oryzae</i>	106
7.4.5.7 Aplicación de los tratamientos	106
7.5 Resultados y discusión	107
7.5.1 Pruebas de cultivos duales (<i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>S. oryzae</i>) en placa de Petri	107
7.5.2 Pruebas de cultivos duales (<i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>S. oryzae</i>) sobre sustrato solido	109
7.5.2.1 Efecto de la concentración de bacterias	109
7.5.2.2 Efecto del medio de cultivo	110
7.5.2.3 Efecto del Peso Molecular del Quitosano	111
7.5.3 Pruebas de cultivos duales (<i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>S. oryzae</i>) en macetones a campo	112
7.5.4 Pruebas de cultivos duales (<i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>S. oryzae</i>) en macetones a en laboratorio – Efecto de la cantidad de inoculaciones	119
7.6 Conclusiones	122
8 CONCLUSIONES GENERALES	124
9 BIBLIOGRAFÍA	125

1.- ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

μ :	Tensión interfacial.
ε_0 :	Constante dieléctrica en el vacío.
$pH_{1/2\zeta_{\max}}, \alpha, \beta, \zeta_{\max}, k$:	Parámetros de ajuste.
$\frac{d^2\psi}{dx^2}$:	Potencial eléctrico superficial de la particular en función a la distancia de la misma.
ε_R :	Constante dieléctrica relativa del medio
σ :	Relación masa en masa quitosano: bacteria.
$^{\circ}\text{C}$:	Grados Celsius.
μ =	Movilidad electroforética.
A:	Constante de Hamaker.
a1:	Área de las partículas.
a2:	Área de las partículas poliméricas.
C=	Culombio.
cm:	Centímetro.
CNP:	Punto de neutralización
cps:	Centipoisse.
CS-MIC:	Concentración mínima inhibitoria de quitosano.
dA:	Diferencial asociado al cambio en el área interfacial.
DD:	Grado de desacetilación.
dI:	Diferencial asociado al cambio del tamaño de fases.
DLVO:	Derjaguin, Landau, Verveij, Overbeek.
dn^2/dt :	Velocidad de adsorción.
DO:	Densidad Óptica.

e:	Carga elemental de una partícula ($1.602 \times 10^{-19} \text{C}$).
EL:	Emulsión primaria de aceite en agua.
etc:	Etcétera.
ETV:	Enfermedades del tallo y la vaina de arroz.
f:	Fracción del total de polímero adsorbido a la interfase.
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
G:	Esfuerzo de corte.
h:	Distancia inter partícula.
h:	Horas.
ha:	Hectárea.
K.Wallis:	Kruskal Wallis.
k :	Constante de Boltzmann.
κ^{-1} :	Espesor de la doble capa eléctrica
k_{ads} :	Coefficiente de la velocidad de adsorción
Kg:	kilogramos.
kJ / mol:	Kilojulio sobre el número de moles.
L:	Litros.
Log UFC/mL:	Logaritmo en base 10 de las Unidades Formadoras de colonia por mililitro.
LQ:	Emulsión primaria de aceite en agua + Quitosano.
LQB:	Emulsión primaria de aceite en agua + Quitosano + Bacterias.
m/s:	Metros por segundo.
m:	Metro.
M:	Molar (Unidad de concentración).

m1:	Masa de aceite libre después de la centrifugación.
m2:	Masa total de aceite que forma parte de la emulsión.
mg:	Miligramo.
ml:	Mililitros.
mm:	Milímetros.
mM:	Milimolar.
mV:	Milivoltios.
MV:	Manchado de la vaina.
η :	Viscosidad.
n_0 :	Representa la concentración de iones en solución de valencia z.
n1:	Concentración de partículas.
n2:	Concentración de partículas poliméricas.
nm:	Nanómetros.
p / v:	Peso en volumen.
<i>P.fluorescens</i> :	<i>Pseudomonas fluorescens</i> .
PDA:	Papa dextrosa agar.
pH:	Potencial de hidrógeno.
pKa:	Constante de equilibrio.
PM:	Peso molecular.
PT:	Pudrición del tallo.
r:	Distancia doble capa a el centro de la esfera de radio R_S .
rpm:	Revoluciones por minuto.
R_S :	Radio de la esfera.
r_{vdw} :	Radio de las partículas (Van der Walls).

<i>S. oryzae</i> :	<i>Sclerotium oryzae</i> .
SP:	Punto de saturación.
T:	Temperatura absoluta.
t_{ads} :	Tiempo de adsorción de la molécula polimérica a la interfase.
tn:	Tonelada.
UF:	Ultrafreezer.
UFC/cm ² :	Unidades formadoras de colonia por centímetro cuadrado.
UV-VIS:	Ultravioleta-Visible.
U_{WDV} :	Potencial de Van der Waals.
W:	Potencial total de interacción inter partícula.
ζ :	Potencial zeta.
$\zeta_{0, pH}$:	Potencial ζ de las bacterias.
ζ_{Sat} :	Valor de potencial ζ en el punto de saturación.
μL :	Microlitros.
μm :	Micrometros.
σ :	Densidad de carga superficial.
Ψ_0 :	Potencial eléctrico superficial.
Ψ_δ :	Potencial eléctrico en la capa de Stern.
λ :	Longitud de onda.
ϕ :	Relación de fases aceite-agua.

2.- RESUMEN

El cultivo de arroz se diferencia del resto de los cereales, en su capacidad de crecer bajo sumersión y dicha capacidad es explotada por los productores alrededor de todo el mundo con el objetivo de eliminar malezas y potenciales infecciones.

Sin embargo, las enfermedades del tallo y del arroz causadas por los hongos fitopatógenos *Sclerotium oryzae* y *Rhizoctonia Solani*, son favorecidas por este tipo de manejo del cultivo. En ambas enfermedades, los hongos producen estructuras de resistencia (esclerocios), lo cuales cumplen un rol fundamental en el inicio y la propagación de las mismas. Los esclerocios sobreviven en los restos vegetales de un cultivo a otro y sirven como fuente principal de la infección primaria. Durante la inundación del cultivo flotan en la superficie del agua, entran en contacto con las plantas, germinan y las infectan a la altura de la línea del agua. La enfermedad se propaga hacia las estructuras superiores de las plantas e incluso puede afectar a plantas vecinas.

A lo largo de los años, se estudiaron diferentes estrategias de control. El uso de variedades resistentes podría ser una alternativa válida, sin embargo, está limitado por la disponibilidad de las mismas. Mientras que, el control químico requiere de la liberación de sustancias tóxicas, perjudicando la salud de las personas y el medioambiente y, el uso de las mismas es cada vez más limitado debido a las presiones regulatorias. Teniendo en cuenta las características particulares que subyacen al desarrollo de estas enfermedades, una estrategia que está actualmente en crecimiento exponencial, es la aplicación de productos de origen biológico.

Un control biológico efectivo requiere de hacer coincidir en tiempo y espacio al patógeno y al agente de biocontrol. De modo que, resulta necesario lograr que las bacterias floten en el agua y se concentren en el sitio de infección. En línea con esta idea, el objetivo principal de esta tesis es el diseño de un vehículo biodegradable que permita concentrar a las bacterias en la superficie del agua sin afectar la capacidad de biocontrol de la cepa aislada.

En este sentido, se logró formular un vehículo basado en una emulsión aceite-en-agua estable a la floculación y a la coalescencia. Se incorporó con éxito el quitosano y el agente de biocontrol (*P. fluorescens*) y, se comprobó que, a determinadas concentraciones de bacterias se pueden formar complejos quitosano-bacteria con carga positiva que les permite anclarse a las gotas de emulsión de carga negativa.

Se pudo demostrar que el vehículo obtenido (Formulación LQB) permite concentrar y dispersar a las bacterias sobre la superficie del agua, desde un punto de aplicación. Cabe destacar que, las formulaciones formadas por los quitosanos de mayor peso molecular evaluados (250000 g

moL⁻¹; 1250000 g moL⁻¹) lograron mantener en la superficie una mayor cantidad de bacterias viables durante un mayor periodo de tiempo.

La dosis de aplicación de la bacteria cumple un papel significativo en la reducción de la velocidad de propagación de la enfermedad en condiciones *in vitro*. En medio Agar arroz se requieren de 4 Log₁₀UFC/cm² para evitar el crecimiento del hongo patógeno durante al menos 130h.

En los ensayos realizados a campo, se pudo corroborar que las bacterias en estudio pueden controlar la velocidad de propagación de la enfermedad del tallo cuando se realizan aplicaciones periódicas dirigidas sobre los tallos. Utilizando la formulación LQB, hacia el final del cultivo se logró disminuir el índice de enfermedad y el índice de severidad de la enfermedad del tallo un 45 y 65 %, respectivamente. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo desde la última inoculación, la velocidad de propagación de la enfermedad aumenta.

Se espera en un futuro continuar con dicha línea de investigación, poniendo el foco en la reducción del número de aplicaciones sin detrimento de la efectividad en la capacidad biocontroladora. Ello puede ser posible utilizando estrategias que permitan proteger a las bacterias una vez aplicadas en campo.

ABSTRACT

Rice cultivation differs from other cereals in its ability to grow under submergence and this ability is exploited by producers around the world for weeds eradication and to avoid potential infections.

However, stem and rice diseases caused by the phytopathogenic fungi *Sclerotium oryzae* and *Rhizoctonia Solani* are favored by this type of crop management. In both diseases, fungi produce resistance structures (sclerotia), which play a fundamental role in their initiation and spread. Sclerotia survive on plant debris from crop to crop and serve as the main source of primary infection. During the flooding, these sclerotia float on the surface of the water, come into contact with the plants, germinate and infect them at the height of the water line. The disease spreads to the upper structures of plants and can even affect neighboring plants.

Over the years, different control strategies have been studied. The use of resistant varieties could be a valid alternative; however, it is limited by their availability. While chemical control requires the release of toxic substances, harming people's health and the environment, and their use is increasingly limited due to regulatory pressures. Taking into account the particular characteristics

that underlie the development of these diseases, a strategy that is currently growing exponentially is the application of products of biological origin.

An effective biological control requires matching the pathogen and the biocontrol agent in time and space. So, it is necessary to make the bacteria float in the water and concentrate at the site of infection. In line with this idea, the main objective of this thesis is to design of a biodegradable vehicle that allows bacteria to concentrate on the surface of the water without affecting the biocontrol capacity of the isolated strain.

In this sense, the main goal of this thesis was the vehicle development based on an oil-in-water emulsion stable to flocculation and coalescence. The biocontrol agent (*P. fluorescens*) and Chitosan were successfully incorporated into it and it was found that, at certain concentrations of bacteria, positively charged chitosan-bacteria complexes can form that allows them to anchor to the negatively charged emulsion droplets.

It was possible to demonstrate that the obtained vehicle (LQB Formulation) allows bacteria to be concentrated and dispersed on the surface of the water, from an application point. It should be noted that the formulations formed by the chitosans with the highest molecular weight evaluated (250,000 g mol⁻¹; 1,250,000 g mol⁻¹) were able to maintain a greater number of viable bacteria on the surface for a longer period of time.

The application dose of the bacteria plays a significant role in reducing the rate of spread of the disease under *in vitro* conditions. In rice agar medium, 4 Log₁₀UFC/cm² are required to prevent the growth of the pathogenic fungus for at least 130h.

In the field trials, it was possible to corroborate that the bacteria under study can control the speed of propagation of the stem disease when periodic applications are made on the stems. Using the LQB formulation, towards the end of the crop it was possible to reduce the disease index and the severity index of the stem disease by 45 and 65%, respectively. However, as time passes since the last inoculation, the rate of spread of the disease increases.

It is expected that this line of research will continue in the future, focusing on reducing the number of applications without detriment to the effectiveness of the biocontrol capacity. This may be possible using strategies that allow bacteria to be protected once applied in the field.

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

3.- INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1 Importancia del Cultivo de arroz

El arroz es la semilla de la planta *Oryza sativa* (simplemente arroz o arroz asiático) o de *Oryza glaberrima* (arroz africano). Es uno de los tres cultivos más importantes del mundo y es de gran importancia para satisfacer las necesidades alimentarias en planeta. El rol del cultivo de arroz es inevitable en la actual y futura seguridad alimentaria. El arroz es cultivado en Asia, las Américas, Europa y África siguiendo diferentes técnicas de producción.

Dicho cultivo tiene la particularidad de poder crecer bajo condiciones de sumersión, es por ello que, el método tradicional de cultivo del arroz es la inundación de los campos, durante o después de la implantación de las plántulas. El 94% de la producción de arroz en el mundo se realiza bajo esta metodología. Este método sencillo requiere una planificación cuidadosa, pero reduce el crecimiento de malas hierbas y las infestaciones [1].

Aunque sus especies ancestrales son nativas de Asia y ciertas partes de África, siglos de comercio y exportación lo han hecho común en muchas culturas en todo el mundo. Su producción mundial supera los 755 millones de toneladas anuales (Figura 1) [2].



Figura 1 Cantidad de cereales producidos anualmente expresados en millones de toneladas. Fuente: FAOSTAT, 2019.

China e India son los principales productores de arroz a nivel mundial. Brasil es el principal productor de América Latina (7 millones de toneladas), mientras que, Argentina ocupa el puesto 34 a nivel mundial (800 mil toneladas) y el 5to puesto de América Latina, detrás de Brasil, Colombia, Perú y Uruguay (Figura 2). [3]



Figura 2 Cantidades expresadas en millones de toneladas métricas. Figura adaptada de World Rice Production 2020/2021.

El consumo de arroz representa más de la mitad de la ingesta calórica diaria de más de tres mil millones de personas en todo el mundo [4]. Este cereal provee el 21% de la energía humana per cápita y el 15% de la proteína [5]. Los principales consumidores son personas de bajos recursos, tal es así que, durante la crisis de 2008, donde su valor se triplicó, se estima que más de 105 millones de personas cayeron por debajo del nivel de pobreza [6].

Se espera que la población mundial crezca en más de un tercio, o 2.300 millones de personas, entre 2009 y 2050. Estas tendencias significan que la demanda del mercado de alimentos se irá incrementando. En particular, la demanda de cereales se estima que alcance los 3 mil millones de toneladas para 2050, frente a las casi 2.1 mil millones de toneladas producidas durante el año 2009 [7]. En función de la demanda proyectada, para el año 2050, la oferta mundial de arroz deberá incrementarse en un 30% [8, 9].

3.2 Enfermedades en el cultivo del arroz

La producción de arroz puede verse afectada por caídas en sus rendimientos, lo cual puede impedir que se alcance el nivel de producción necesario para afrontar los futuros desafíos. La reducción de los rindes puede ser producidos por fuentes bióticas y abióticas (Ejemplo: Crisis del precio del Arroz 2008). Los eventos bióticos como las enfermedades pueden alterar el suministro global de arroz. Existen diferentes antecedentes que demuestran esta última afirmación: la “Gran Hambruna de Bengala” durante 1942, fue producida por la aparición generalizada de la enfermedad de la mancha marrón que desbastó la cosecha de arroz en el este de India [10,11]. Las epidemias del añublo del arroz hicieron lo suyo en Corea del sur, a donde provocaron una pérdida de rendimiento que oscilaba entre el 10 y el 50%, provocando una importante crisis alimentaria en dicho país en la década de 1970 [12]. A nivel mundial, las pérdidas de rendimiento en el arroz debido a plagas varían del 20 al 30 % de los rendimientos alcanzables [13]. Únicamente en China, 15-20 millones de hectáreas de arroz son afectadas por la enfermedad de la vaina (*Rhizoctonia solani*) anualmente, causando pérdidas mayores a 6 millones de toneladas métricas, lo cual es equivalente al 1% de la producción mundial [14].

Tal y como podemos observar, las enfermedades pueden ser provocadas por hongos, bacterias y virus. El presente trabajo se enfoca en enfermedades de origen fúngico. En este grupo se destacan: el añublo del arroz (*Pyricularia oryzae*), **el añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani*)** y la mancha marrón (*Helminthosporium oryzae*, *Ustilaginoidea virens*). Las enfermedades emergentes como la pudrición del pie y la bakanae (*Fusarium moniliforme*), la pudrición de la vaina (*Sarocladium oryzae*) y **la pudrición del tallo (*Sclerotium oryzae*)** también están causando pérdidas significativas de rendimiento en algunas regiones productoras de arroz [1].

3.2.1. Enfermedades del Tallo y la Vaina de arroz (ETV)

En este trabajo en particular resultan de interés dos enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (*Sclerotium oryzae* y *Rhizoctonia Solani*), las enfermedades del tallo y la vaina de arroz.

El manchado de la vaina (MV) es causado por *Rhizoctonia Solani Khun*. Es una enfermedad fúngica potencialmente desbastadora en regiones templadas y tropicales, particularmente en los sistemas de producción arroz irrigado [1].

Dicha enfermedad tiene importancia económica principalmente en el sur de Estados Unidos y en Asia tropical. Se han informado pérdidas que oscilan entre el 20 y el 50% [15-19]. En condiciones de alta incidencia, las pérdidas pueden alcanzar el 70% [20]. Solo en China, alrededor de 15 a 20 millones de hectáreas se ven afectadas por el manchado de la vaina, lo que ocasiona pérdidas de 6 millones de toneladas de grano [21].

Sclerotium oryzae es el agente patógeno causante de la pudrición del tallo (PT). Dicha enfermedad fue detectada por primera vez en Italia por Cattaneo en 1876 y, actualmente está distribuida por los 5 continentes. Se han informado pérdidas de rendimiento de grano que alcanzan el 50, 75 y 80% en Vietnam, Estados Unidos y Filipinas, respectivamente [18]. En India se han registrado pérdidas de hasta un 80%, mientras que en China dichas pérdidas alcanzaron un máximo del 53% [22, 23].

En Argentina, la prevalencia de ambas enfermedades es muy alta. Según un informe presentado por Pedraza en 2005, el 53% de lotes representativos de la región arrocerá (Entre Ríos, Chaco, Santa Fe y Corrientes) presentaba ETV al momento del estudio, con un 58% de MV y un 16% de PT, el resto correspondió a otras enfermedades [24]. Más específicamente, la PT está presente en todos los lotes de Corrientes y, tiene una incidencia del 35% [25]. Mientras que, en Entre Ríos es la segunda enfermedad de mayor importancia siendo su nivel de incidencia superior al 50%, presentándose en el 60% de los lotes [24]. En estos últimos años, esta enfermedad se ha intensificado además en la provincia de Santa Fe causando severos daños.

Por su parte, el MV se encuentra presente en toda la región arrocerera. Gutiérrez y Cúndom determinaron una prevalencia del 100% con incidencia de hasta 23% en Corrientes [25]. Pedraza determinó que las especies más frecuentes en las arroceras en nuestro país fueron: *Rhizoctonia oryzae* (75%), *R. oryzae-sativae* (20%) y de *R. solani* (5%) [24].

Actualmente, existe un intento creciente de introducir un enfoque integrado para manejar estas enfermedades, mediante la combinación del uso de variedades resistentes, los métodos de cultivo y la aplicación de productos químicos y/o biológicos. En el caso particular del manchado de la vaina, ninguna de las variedades comercialmente populares tiene el nivel deseado de resistencia. Mientras que, se reportaron ciertas sustancias que inducen tolerancia, como el ácido salicílico, el ácido gama-aminobutírico y el quitosano a través del tratamiento de semillas y la aplicación foliar [26-28]. Varios informes han indicado que la aplicación de diferentes bacterias antagonistas como *P. fluorescens*, *P. Putida* y *Bacillus subtilis* pueden reducir sustancialmente la gravedad de la enfermedad [29-31]. Mientras que, entre los agentes químicos más utilizados se destacan carbenzadim, validamicina, propiconazol, tifluzamida y ketoconazol. Por otro lado, entre las buenas prácticas agronómicas se destacan, la baja densidad de siembra y la destrucción de rastrojos y malezas.

Al igual que para el manchado de la vaina, resulta difícil hallar variedades resistentes contra la pudrición del tallo de arroz. Sin embargo, en condiciones naturales de infección, algunos cultivares silvestres han mostrado tolerancia [32-33]. En cuanto al control biológico, se ha reportado que el tratamiento con *Gliocladium virens* ha sido eficaz para inhibir la formación de esclerocios y reducir la viabilidad de los mismos [34-35]. Las buenas prácticas agronómicas también abarcan el enterramiento de los rastrojos, la inundación invernal, la siembra tardía y la rotación de cultivos, todos ellos resultan beneficiosos para el manejo de la enfermedad [34,36]. Aunque se ha descubierto que varios productos químicos son eficaces contra la pudrición del tallo, el control químico no se practica ampliamente para controlar esta enfermedad. Sin embargo, se ha encontrado que la aplicación de sustancias químicas como carbendazim, validamicina A, edifenfos, benomil, tiofanato-metilo, difenoconazol y triciclazol seguida de pulverización foliar con antagonistas como *Penicillium glabrum* y *T. harzianum* son eficaces contra la pudrición del tallo [34,37-38].

3.2.1.1 Efectos del cambio climático sobre las ETV

Diversos estudios científicos han demostrado que el cambio climático está favoreciendo la propagación de este tipo de enfermedades, Kobayashi y col. (2009) demostraron que un aumento

en la concentración de CO₂ aumenta el desarrollo del hongo causante del manchado de la vaina. Además, las condiciones de alta humedad y temperaturas características de los trópicos, favorecen el desarrollo de ambas enfermedades [39]. El cambio climático produce que estas condiciones se repliquen en áreas alejadas de los trópicos, lo que favorece el aumento del grado de incidencia de la enfermedad a nivel mundial. Por otro lado, el uso de compuestos químicos para el control de plagas, no solo resulta tóxico para las personas y el medioambiente, sino que también producen un aumento de las emisiones de CO₂ favoreciendo en largo plazo las condiciones para que aparezcan este tipo de enfermedades. De esta manera, se espera que dichas enfermedades incrementen su grado de incidencia en los próximos años.

3.2.1.2 Control biológico de las ETV

Tal y como se ha expuesto, para el control de estas enfermedades el uso de variedades resistentes está limitada por la disponibilidad de las mismas. Mientras que, el control químico requiere de la liberación de sustancias tóxicas, perjudicando la salud de las personas y el medioambiente y, el uso de las mismas es cada vez más limitado debido a las presiones regulatorias. En base a lo expuesto, el control biológico en los últimos años ha ganado terreno en el área del control de plagas. Tal es así que, las patentes de invención relacionadas a la temática se han incrementado exponencialmente en la última década (Figura 3).

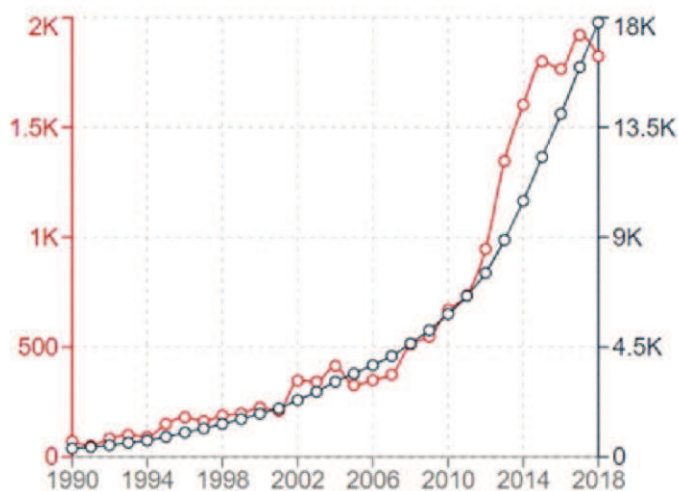


Figura 3 Evolución del número de patentes entre el periodo (1900-2018) que contienen la palabra clave “Biocontrol”. Figura adaptada de Espacenet 2022.

El control biológico es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo [40]. Existen

diversos antecedentes de estrategias de biocontrol aplicado al tratamiento de enfermedades en arroz. Puente y col. (2013) inocularon semillas de la variedad Cambá con cepas de *Azospirillum* y obtuvieron incrementos en la longitud del vástago y raíz en condiciones controladas e, incrementos del rendimiento de 5,8% en ensayos a campo [41]. García de Salomone y col. (2010 y 2011) encontraron que una cepa de *Azospirillum brasilense* incrementó la biomasa y el rendimiento de arroz en condiciones de campo [42-43]. En otro trabajo del mismo autor se evaluó la combinación de *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum sp.* en condiciones de campo, obteniéndose incrementos en la biomasa y el rendimiento con relación al cultivo sin tratar [44]. Nico y col. (2011) encontraron que cepas de *Serratia sp.* y *Pseudomonas sp.*, que solubilizan fósforo, incrementan la longitud de raíces y brotes de arroz [45].

Desde el año 2007, en la Estación experimental del INTA con sede en Concepción del Uruguay (INTA EEA), el grupo liderado por Virginia Pedraza comenzó a investigar sobre la posibilidad de la aplicación del control biológico en enfermedades fúngicas en arroz. Realizaron más de 100 aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* provenientes de la rizosfera de arroz y de suelos de arrozceras de Entre Ríos y Chaco. En base a los estudios realizados seleccionaron una cepa candidata para continuar con el desarrollo de un producto biocontrolador contra las ETV [46-48].

4.- JUSTIFICACIÓN DEL TEMA DE TESIS

En base al trabajo realizado previamente en las Instalaciones del INTA EAA Concepción del Uruguay por Miriam Asselborn y Virginia Pedraza, la cepa bacteriana (M1C) identificada como *Pseudomonas fluorescens* fue seleccionada como candidata para el biocontrol de las ETV.

El presente trabajo es una continuación de dicha línea de investigación y, está enfocado en el desarrollo de un vehículo (*Carrier*) que facilite la aplicación de las bacterias en condiciones de campo.

Como ya se ha expuesto en la introducción, el cultivo de arroz se diferencia del resto de los cereales, en su capacidad de crecer bajo sumersión y dicha capacidad es explotada por los productores alrededor de todo el mundo con el objetivo de eliminar malezas y potenciales infecciones. En el caso particular de las ETV, este método de cultivo favorece la aparición de las mismas. En ambas enfermedades, los hongos producen estructuras de resistencia (esclerocios), los cuales cumplen un rol fundamental en el inicio y la propagación de las enfermedades. Los esclerocios sobreviven en los restos vegetales de un cultivo a otro y sirven como fuente principal de la infección primaria. Durante la inundación del cultivo flotan en la superficie del agua, entran en contacto con las plantas, germinan e infectan a las plantas a la altura de la línea del agua. La

enfermedad se propaga hacia las estructuras superiores e incluso puede afectar a plantas vecinas.

Este hecho particular, requiere de un tratamiento específico y novedoso. Un control biológico efectivo requiere de hacer coincidir en tiempo y espacio al patógeno y al agente de biocontrol. De modo que, resulta necesario lograr que las bacterias floten en el agua y se concentren en el sitio de infección. En línea con esta idea, el objetivo principal de esta tesis es el diseño de un vehículo biodegradable que permita concentrar las bacterias en la superficie del agua sin afectar la capacidad de biocontrol de la cepa aislada.

5.- OBJETIVO GENERAL

En el contexto anteriormente planteado el objetivo general del presente trabajo de Tesis es el siguiente:

Desarrollo, optimización y producción de un producto biodegradable destinado a transportar y mantener viables bacterias en superficies acuosas.

Objetivos específicos

1. Desarrollo de un vehículo portador para transportar a las bacterias sobre diferentes espejos de agua.
2. Evaluación de la actividad antagonista de la cepa *P.fluorescens* M1C sobre el patógeno causante de la enfermedad del tallo del arroz (*S. oryzae*) en condiciones *in vitro* y sobre macetones con plantas de arroz.

Capítulo I

Desarrollo de un vehículo portador para transportar a las bacterias sobre diferentes espejos de agua.

6.1 Introducción

Existen dos tipos de metodologías utilizadas en el cultivo del arroz, arroz de riego y arroz de secano. El 75% de la producción mundial de arroz se hace en tierras bajas utilizando la metodología de irrigación. El arroz se cultiva en sistemas de riego en condiciones climáticas templadas de Australia, Bután, Asia Central (Kazajstán y Uzbekistán), Chile, China, Japón, Corea, Nepal, Rusia, Turquía, Estados Unidos y Uruguay [49]. Los países con las áreas más grandes de arroz de tierras bajas de regadío son China (31 M ha), India (19 M ha), Indonesia (7 M ha) y Vietnam (3 M ha) [50].

El arroz de riego se cultiva en arrozales, que están rodeadas por un pequeño dique que mantiene el suministro de agua. Los agricultores, que tienen pequeñas propiedades de tierra, normalmente mantienen en el campo una capa de agua de 5 a 10 cm durante el período principal del ciclo de cultivo [51]. La productividad media del arroz es alrededor de 5,4 tn / ha [52]. El método más común de siembra es por trasplante, las plántulas se cultivan en viveros durante 20 a 40 días desde su trasplante, manual o mecánico, al campo inundado. Sin embargo, en los últimos años, muchos productores se están volcando a la siembra directa.

El sistema de producción de arroz de secano lo utilizan a menudo para la subsistencia agricultores de Asia, África y América Central. El arroz en este sistema se establece al voleo o mojado en suelo seco durante la temporada de lluvias. Se lo trabaja como si fuera un cultivo común (maíz o sorgo). Esta forma de producir arroz, generalmente se realiza en aquellas regiones en las que llueve mucho (1800 a 2500 milímetros anuales), y se aprovechan esas grandes cantidades de agua que caen para lograr la producción. Solo el 25% de la producción mundial de arroz se realiza mediante esta metodología [52]. La productividad del arroz de secano es baja (alrededor de 1 tn / ha) debido a las limitaciones sociales y el uso de las variedades locales por parte de los agricultores que no logran responder a mejores prácticas de gestión. Las principales limitaciones de este sistema son la sequía, los suelos problemáticos y las plagas (malezas, enfermedades, insectos, nematodos). [51-52].

En sintonía con el resto del mundo, en la Argentina el cultivo de arroz se realiza en su totalidad bajo condiciones de riego por inundación. Es un cultivo totalmente mecanizado, cuya siembra se realiza en secano sobre terreno sistematizado, con construcción de taipas (bordes o melgas en contorno). A los 30-40 días desde la emergencia, se realizan uno o dos riegos denominados “baños”, en aquellas zonas donde no son suficientes las precipitaciones para asegurar una buena

implantación. Esa lámina de agua de 5-10 cm. se mantiene durante aproximadamente 100 días, desde el inicio del macollaje hasta unos días previos a la cosecha [53].

Enfermedades como las que afectan al tallo y la vaina de arroz, producidas por *S. oryzae* y *R. solani* son favorecidas por esta metodología de cultivo. En ambas enfermedades, los hongos producen estructuras de resistencia (esclerocios), lo cuales cumplen un rol fundamental en el inicio y la propagación de las enfermedades. Los esclerocios sobreviven en los restos vegetales de un cultivo a otro y sirven como fuente principal de la infección primaria. Durante la inundación del cultivo, los esclerocios flotan, entran en contacto con las plantas, germinan e infectan a las mismas a la altura de la línea del agua. La enfermedad se propaga hacia las partes aéreas e incluso puede afectar a plantas vecinas (Figura 4).

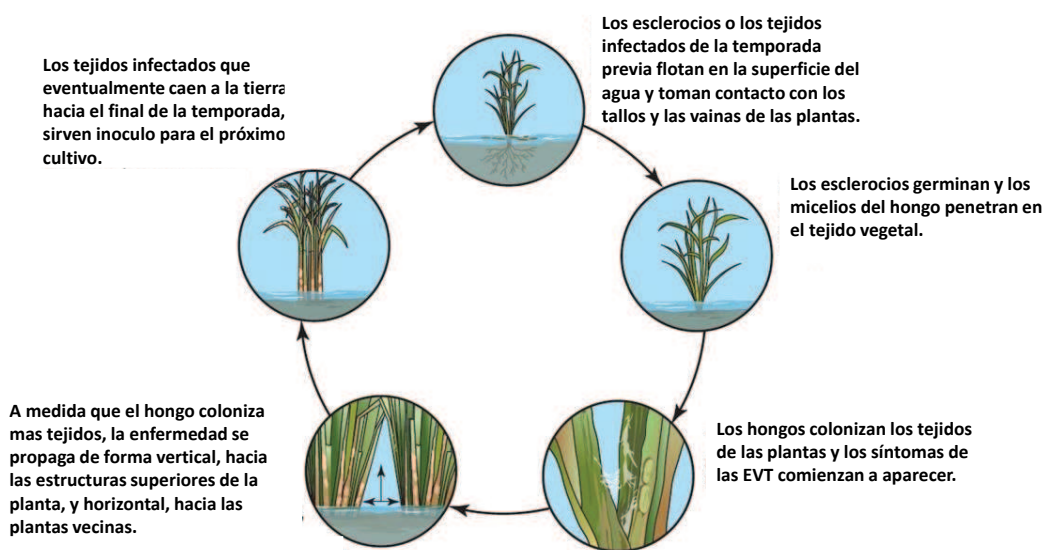


Figura 4 Ciclo de las ETV en cultivos de arroz. Fuente: Adaptado de Rice Sheat Blight (2018) [54].

Los agentes de biocontrol (antagonistas) aplicados contra estas enfermedades, se administran en forma de microcápsulas, suspensiones de células frescas, formulaciones a base de talco, gránulos, etc. [55-59]. Todos ellos tienen en común, que suelen ser aplicados previo a la inoculación del patógeno. Así, los antagonistas se aplican principalmente mediante pulverización sobre la superficie de los tejidos del arroz o, sobre las semillas y/o las plántulas antes de ser trasplantadas al campo. En primera instancia, parece ser la estrategia correcta dado que, la aplicación previa del agente de biocontrol permite que dichos agentes colonicen el nicho antes que los patógenos. Sin embargo, la pulverización cuando las plántulas de arroz son pequeñas expone al antagonista a la irradiación ultravioleta, las altas temperaturas y la sequedad. Por otro

lado, rociar cuando las plántulas están más maduras requiere mucha mano de obra, porque el antagonista debe rociarse en el tallo debajo de las hojas.

El biocontrol exitoso depende, por tanto, de la capacidad de administrar el agente de biocontrol a los sitios donde estarán presentes los patógenos al momento de la infección [60]. Hacer coincidir en tiempo y espacio al patógeno y al agente de biocontrol resulta un gran desafío para el tratamiento de estas enfermedades en particular. El movimiento del agua en los campos de arroz, la deriva de la pulverización y la adsorción del suelo, perjudican la efectividad de tales formulaciones, debido al contacto deficiente que se logra entre las plantas de arroz y el agente de control. Por lo tanto, se requieren múltiples aplicaciones para un mejor resultado.

En la actualidad existe un único antecedente a donde se ha logrado aplicar un agente de control biológico (*Trichoderma asperellum*) directamente sobre la superficie del agua. En dicho estudio, el agente de biocontrol se hizo crecer sobre cascaras de arroz. Las cuales, una vez aplicadas en el agua, facilitaron la flotación del mismo. La preparación demostró una eficacia de biocontrol del 90% y aumentó significativamente ($P > 0,05$) la tasa de formación de semillas y el peso de 1000 granos en comparación con el tratamiento con patógenos [61]. Sin embargo, la fermentación en sustrato sólido suele ser un proceso costoso y que demanda mucho tiempo.

En este trabajo se plantea una alternativa novedosa, donde se propone utilizar una matriz natural menos densa que el agua, en la cual las bacterias puedan adherirse y ascender a la superficie.

El aceite vegetal, por ser biodegradable y menos denso que el agua, es un candidato potencial para ser utilizado como matriz. La superficie de las gotas de aceite, así como la mayoría de las superficies naturales, están cargadas negativamente a los valores de pH del ambiente y, la interacción electrostática con las superficies de las bacterias es, por regla general, repulsiva. Especialmente a baja fuerza iónica, $\leq 0,001$ M, la repulsión electrostática, de acuerdo a la Teoría de DLVO (Derjaguin, Landau, Vervy, Overbeek), domina sobre la atracción de Van der Waals [62].

Esto hace necesario la incorporación de otro material que sirva de anclaje entre las bacterias y las gotas de aceite. Al igual que la matriz, debe ser natural, biodegradable, de baja densidad y además debe poseer carga positiva.

Un polímero que se destaca por poseer estas propiedades y que está siendo estudiado en los últimos años en infinidad de aplicaciones, es el quitosano. El quitosano es un polisacárido lineal de β - (1-4) D-glucosamina y Unidades de N-acetil-D-glucosamina. A pH menores a su pKa (pKa

< 6.5), la mayoría de los grupos amino, en la posición C-2 de la unidad de glucosamina, están protonados [63-64]. Dicha propiedad le confiere la capacidad de interaccionar fuertemente con partículas aniónicas, como lo son las membranas celulares bacterianas [65]. Ello explica por qué el quitosano está siendo utilizado en múltiples aplicaciones que involucran la inmovilización de las mismas [66-68]. Además, la unión del quitosano con las bacterias, ambos de naturaleza hidrofílica, da lugar a un complejo de carácter más bien hidrofóbico, favoreciendo su unión a la interfase de emulsiones tipo aceite-en-agua [65].

Específicamente en el tratamiento de enfermedades en cultivos, el quitosano también juega un papel preponderante, muchos son los estudios que afirman que el mismo posee propiedades como inductor de defensa en plantas y propiedades antimicrobianas. Esta última, representa una ventaja a la hora de combatir al hongo patógeno, pero puede ser también perjudicial para las bacterias antagonistas utilizadas. Se ha reportado que el peso molecular del quitosano, su grado de desacetilación (DD) y las características estructurales microbianas individuales, influyen en la actividad antibacteriana del mismo. En general, la actividad antibacteriana del quitosano aumenta con su DD y carga positiva [69-72]. Las condiciones de pH ácido y una temperatura más alta también son favorables en su poder antibacteriano [73-76]. Específicamente, para las cepas de *Pseudomonas fluorescens*, varios estudios se han centrado en la determinación de la concentración mínima inhibitoria de quitosano (CS-MIC) para diferentes condiciones [77-80]. Por lo tanto, en las formulaciones que tengan una combinación de quitosano y bacterias, la concentración del polímero debe ser un factor a tener cuenta.

Existen algunos antecedentes que combinan bacterias, aceite y quitosano en una única formulación [67-68;81-82]. Por lo general son destinadas para la industria alimenticia, farmacéutica y/o para el tratamiento de contaminantes orgánicos. Sin embargo, ninguno de ellos ha sido desarrollado para el tratamiento de enfermedades en cultivos.

En este trabajo se propone diseñar un vehículo formado por gotas una emulsión aceite-en-agua estabilizada con lecitina. Se espera que el quitosano pueda adsorberse a las membranas celulares de las bacterias, formando un complejo de tipo catiónico que les permita adsorberse a su vez a la superficie de las gotas de aceite y de esta manera puedan ascender a la superficie del agua, gracias a la baja densidad del aceite, y acumularse en dicho punto.

En este capítulo se desarrollan aspectos teóricos relacionados con la estabilidad termodinámica de las emulsiones y las interacciones coloidales. También incluye aspectos prácticos

relacionados a la obtención de un vehículo que permita concentrar las bacterias en la superficie del agua.

6.2 Objetivos específicos

- Analizar la influencia de las variables (pH , ϕ , Concentración de Lecitina) sobre la estabilidad de la emulsión que forma parte del vehículo transportador de las bacterias.
- Estudiar el efecto de la incorporación de quitosano sobre la estabilidad de la emulsión y la viabilidad de las bacterias.
- Analizar la interacción Quitosano-Bacteria mediante mediciones del Potencial zeta (ζ).
- Evaluar la capacidad del vehículo portador para transportar a las bacterias sobre diferentes espejos de agua.

6.3 Sistemas dispersos

6.3.1 Preparación de emulsiones

Las emulsiones son sistemas dispersos que consisten en dos (o más) líquidos insolubles o parcialmente solubles. El líquido que usualmente se encuentra en exceso se denomina fase continua o externa, mientras que el líquido dispersado se denomina fase discontinua o interna.

Si la fase externa consiste en agua y la fase interna en un líquido orgánico, se utiliza el término aceite-en-agua. Por el contrario, si el agua está dispersa en un líquido no acuoso, se utiliza el término agua-en-aceite.

La preparación de la emulsión se denomina emulsificación y los agentes utilizados con dicho propósito se denominan emulsionadores. Además de los emulsificadores, otros agentes, como promotores de emulsión y estabilizadores suelen ser agregados al sistema para aumentar su estabilidad.

El color de la emulsión suele servir de indicador del tamaño de partículas de la fase dispersa. Emulsiones con apariencia turbia o lechosa, tienen tamaño de partículas que oscilan 10^{-4} - 10^{-6} m, mientras que partículas con un tamaño promedio de 10^{-6} - 10^{-8} , tienen la apariencia típica de soluciones coloidales y exhiben el efecto Tyndall. Si las partículas son menores a 10^{-8} , la emulsión está altamente dispersa y se acerca en apariencia a una solución real. Sin embargo, el tamaño de las partículas de la mayoría de las emulsiones no suele ser uniforme y se denominan sistemas polidispersos.

La preparación de emulsiones siempre involucra la ruptura de la fase interna a través del aporte de energía mecánica o química. Cuando se forma una emulsión la interfase aumenta significativamente. El trabajo (dA) que debe ser suministrado es proporcional al incremento de fases (dI) y la constante de proporcionalidad es la tensión interfacial (μ) (Ecuación 6.1).

$$dA = \mu dI \quad (6.1)$$

6.3.1.1 Estabilidad de emulsiones

Debido a que los líquidos siempre tienden a reducir la interfase, las emulsiones naturalmente son sistemas termodinámicamente inestables. La dispersión uniforme de las gotas en la fase externa puede ser destruida reversiblemente por fenómenos de floculación e irreversiblemente por fenómenos de coalescencia. En la floculación, la dispersión uniforme de las gotas es destruida por la agregación de las mismas, lo cual produce la sedimentación o el cremado de la fase interna. Para mantener una emulsión estable, dicha agregación debe ser prevenida, dado que las gotas agregadas sedimentan o creman más rápido que las gotas individuales. En el fenómeno de coalescencia las gotas individuales se fusionan entre sí. Primero, las gotas más pequeñas son adsorbidas por gotas de mayor tamaño, y luego las partículas de mayor tamaño se unen hasta terminar por separar por completo a la emulsión en dos fases continuas. La coalescencia es siempre seguida por una aceleración del cremado y la sedimentación, lo cual destruye a la emulsión por completo. Las emulsiones que llegan a tal nivel de desestabilización, no pueden volver a reconstituirse por mezclado o agitación (Figura 5).

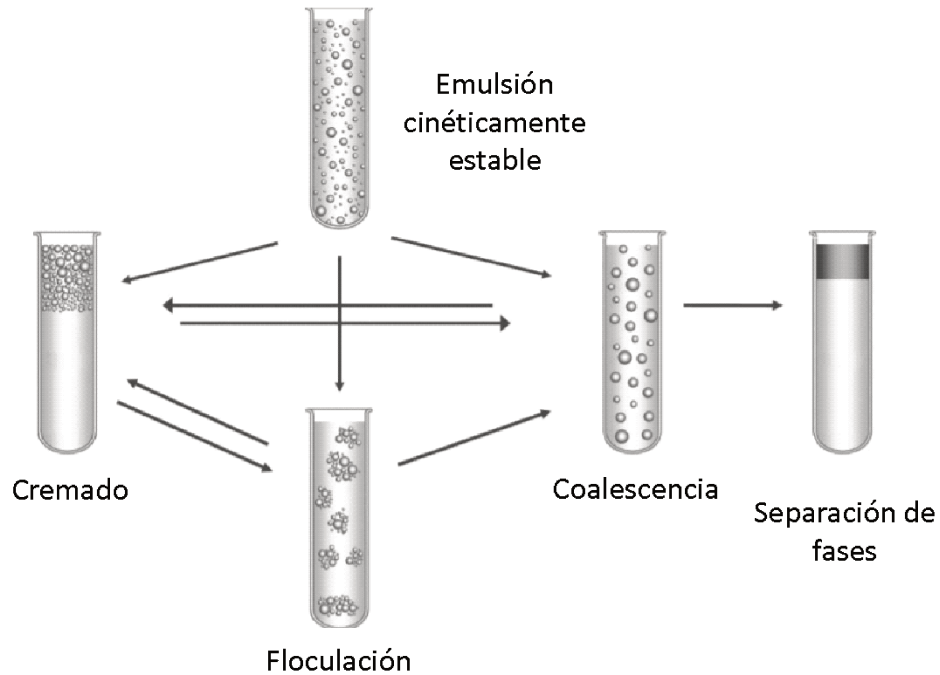


Figura 5: Fenómenos de desestabilización en sistemas dispersos. Fuente: Figura adaptada de Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, 2016 [83].

Existen diferentes condiciones que favorecen la aparición de fenómenos de desestabilización. El incremento en la temperatura, aumenta la energía cinética de las gotas y las colisiones entre las mismas. La adición de electrolitos produce una disminución de la carga neta de las gotas, lo cual favorece el acercamiento entre las mismas y su posterior fusión. El agregado de ácidos y/o bases producen la ruptura de emulsiones formadas por emulsionantes sensibles a la hidrólisis. La adición de compuestos catiónicos a una emulsión estabilizada con un emulsionante aniónico, usualmente produce la rápida ruptura de la emulsión. Estos sistemas también pueden romperse por una pequeña acumulación de precipitados voluminosos en la fase acuosa. Otros tratamientos como la dilución, la evaporación o la congelación también pueden producir la desestabilización del sistema.

6.3.1.2 Emulsionantes

Para prevenir que las gotas se fusionen luego de ser formadas, se deben crear barreras energéticas. Las mismas son creadas a través del agregado de emulsionantes y pueden ser mantenidas, por un periodo prolongado de tiempo, gracias al agregado de los estabilizadores. El

agregado de emulsionantes reduce la tensión interfacial. En un sistema de dos fases, el emulsionante más efectivo es aquel que reduce la tensión superficial en el menor tiempo y a la menor concentración. Para alcanzar esto, se deben dar dos fenómenos, difusión de las moléculas de emulsionante y adsorción a la interfase. Los emulsionantes polares se acumulan en la interfase entre la fase externa y la interna. Su grupo hidrofílico apunta hacia el agua, mientras que su grupo hidrofóbico lo hace hacia la fase orgánica. La disminución de la tensión interfacial es debido a la acumulación de las moléculas de emulsionante en la interfase.

Los emulsionantes muchas veces determinan el tipo de emulsión que se obtiene, aquellos con bajos HLB (Balance Hidrofílico- Lipofílico) son por lo general hidrofóbicos y forman emulsiones del tipo agua-en-aceite, mientras que aquellos con altos HLB (hidrofílicos) forman emulsiones del tipo aceite-en-agua.

- Emulsionantes hidrofóbicos: Por lo general, tienen baja solubilidad en agua y difunden rápidamente si se logran solubilizar en agua. Su alta solubilidad en aceite resulta en una rápida inserción de la parte hidrofóbica en la fase oleosa.
- Emulsionantes hidrofílicos: Si dichos emulsionantes son lo suficientemente solubles en la fase oleosa, pueden ser disueltos en la misma. La solución obtenida es agitada con agua para obtener la emulsión. Su alta solubilidad en agua, facilita la inserción de los grupos hidrofílicos en el agua y la formación de un film interfacial estable.

Si la emulsión es formada mecánicamente, se producen efectos triboeléctricos que dan lugar a una diferencia de potencial medible entre las fases. En la mayoría de las emulsiones aceite-en-agua, las gotas de aceite están cargadas negativamente. La incorporación de moléculas de emulsificante en la interfase resulta en un aporte de carga adicional, así como también puede producir la inversión de cargas. Sumado al tamaño de las gotas, la carga eléctrica de las mismas juega un rol decisivo en la emulsificación y la estabilización del proceso [84].

6.3.1.3 Efecto de los polímeros sobre la estabilidad coloidal

Los polímeros adsorbidos en la superficie de las partículas pueden tener efectos importantes sobre la estabilidad coloidal. Cuando se adsorben en grandes cantidades, ocupando toda la superficie, producen la estabilización estérica del sistema. Dichas interacciones son de carácter repulsivo y a distancias cortas resultan más fuertes que las interacciones atractivas de tipo Van

der Waals. Mientras que, cuando solo una parte de la superficie de las partículas se encuentra cubierta por polímeros, la adsorción de los mismos produce la desestabilización del sistema, conduciendo a la floculación de las gotas.

Los polímeros son usados como floculantes en suspensiones en diferentes aplicaciones industriales, en el tratamiento de aguas, en papeleras y en el área de la biotecnología. Los mismos pueden producir agregados fuertes que pueden separarse fácilmente de la suspensión. Su modo de acción está ampliamente estudiado y es dependiente de la naturaleza del mismo y de las partículas en suspensión. En su mayoría los polímeros utilizados en la industria son sintéticos, sin embargo, algunos polímeros naturales están siendo aplicados especialmente en aquellos lugares a donde se quiere evitar utilizar compuestos químicos debido a su toxicidad. Los polímeros pueden ser clasificados según su carga eléctrica en aniónicos, catiónicos o no iónicos. La estructura de los mismos es, por lo general, de cadenas lineales, pero también pueden presentarse ramificaciones. Las características más importantes a tener en cuenta en un polímero, a la hora de seleccionarlo como floculante es su densidad de carga y su peso molecular.

El efecto de los polímeros en la estabilidad coloidal es debido especialmente a su adsorción en la superficie de las partículas y la estructura que toman una vez adsorbidos. La misma involucra la unión de varios segmentos del polímero a la superficie de la partícula. La afinidad de adsorción por segmento debe ser alta, de manera tal que la energía libre de adsorción compense la pérdida de entropía producida por la transferencia de polímeros desde el seno de la solución. La energía libre de adsorción crítica está en el orden de los $0.3kT$ por segmento, existen muchas interacciones que satisfacen dicha condición y, por lo tanto, la adsorción polimérica puede ser tan fuerte que el sistema se torna irreversible, lo que les permite mantenerse adsorbidos aun cuando se los somete a una dilución. Para polímeros de alto peso molecular, la posibilidad de que todos los segmentos unidos se liberen es muy baja [85].

Un polímero adsorbido en la superficie puede tomar diferentes configuraciones (*colas, bucles y trenes*), las que se describen en la figura 6.

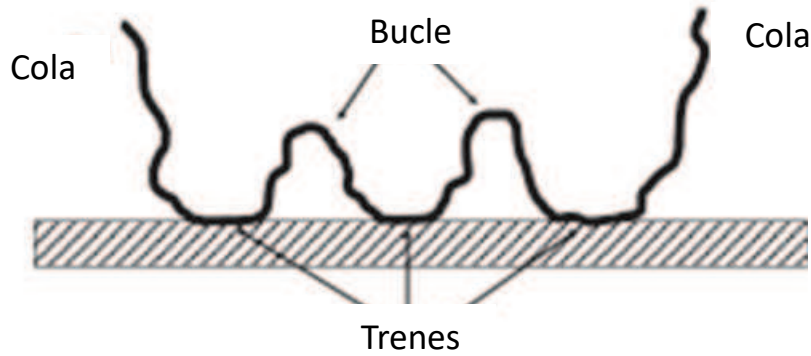


Figura 6: Configuraciones de equilibrio de cadenas poliméricas adsorbidas a la interfase. Fuente: Figura adaptada de Adsorption and flocculation by polymers and polymer mixtures, 2011 [85].

La adsorción polimérica sigue una cinética de segundo orden que depende de la concentración de las partículas dispersas y las moléculas poliméricas. La velocidad de adsorción se puede expresar como la velocidad de pérdida de moléculas poliméricas desde el seno de la solución.

$$-\frac{dn_2}{dt} = k_{ads}n_1n_2 \quad (6.2)$$

Donde n_1 y n_2 son las concentraciones de partículas y moléculas poliméricas, respectivamente y k_{ads} es el coeficiente de la velocidad de adsorción. Como vemos, la velocidad de adsorción depende de las concentraciones de partículas o, lo que es lo mismo, de la probabilidad de colisión entre las mismas. En el caso de la adsorción de polímeros, se asume que cada colisión conduce a la unión de, por lo menos, uno de los segmentos del polímero [85].

Para dispersiones concentradas (1%) la adsorción polimérica es casi instantánea, mientras que para dispersiones diluidas (0.0001 %) la misma puede tomar minutos o incluso horas. Haciendo algunas simplificaciones se puede estimar el tiempo de adsorción a través de la siguiente ecuación:

$$t_{ads} = -\frac{\ln(1-f)}{k_{ads}n_1} \quad (6.3)$$

Donde f es la fracción del total de polímero adsorbido en el tiempo (t_{ads}). Es importante destacar que dicha ecuación no es válida cuando la mayor parte de polímero ya está adsorbida a la superficie.

La magnitud del coeficiente de velocidad de adsorción depende del tamaño hidrodinámico de las partículas y los polímeros, así como también de la velocidad de agitación. Una aproximación al cálculo del mismo se puede realizar utilizando la ecuación de Smoluchowski para la hetero agregación producida por las colisiones entre partículas causadas por el movimiento browniano (Ecuación 6.4) y el esfuerzo de corte (Ecuación 6.5).

$$\text{Difusión: } k_{ads} = \frac{2kT(a_1 + a_2)^2}{3\eta a_1 a_2} \quad (6.4)$$

$$\text{Esfuerzo de corte: } k_{ads} = \frac{4}{3}G(a_1 + a_2)^3 \quad (6.5)$$

Donde a_1 y a_2 son los radios hidrodinámicos de las partículas y las moléculas poliméricas (ambas se asumen esféricas), k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, η es la viscosidad y G es el esfuerzo de corte.

Una vez producida la colisión, los polímeros adsorbidos van cambiando su configuración estructural hasta alcanzar el equilibrio. Los polímeros pasan desde una configuración a donde tienen escasos puntos de unión (Ramdon coil) hasta una configuración (Flat) a donde los puntos de anclaje se maximizan y sus cadenas se extienden por completo sobre la superficie de las partículas (Figura 7).

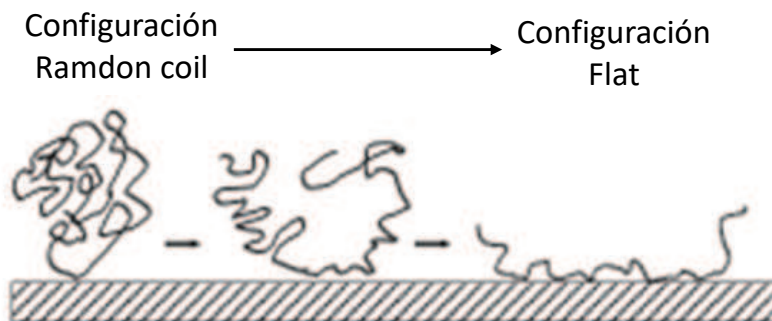


Figura 7: Re- configuración de los polímeros adsorbidos desde el primer contacto con la superficie hasta que alcanza el equilibrio. Figura adaptada de Adsorption and flocculation by polymers and polymer mixtures, 2011 [85].

La velocidad en la que se da dicha relajación influye sobre la adsorción del resto de las partículas y sobre el fenómeno de floculación. La velocidad de reconformación depende fuertemente de la

cantidad de polímero adsorbido. Cuando la partícula está cerca de su saturación las moléculas poliméricas tienen menos espacio para reconfigurarse. Cuando el coeficiente de adsorción es bajo, las cadenas tienen tiempo de relajarse y ocupar más puntos en la superficie antes de que nuevas moléculas sean adsorbidas. Teniendo en cuenta que las partículas poliméricas en su configuración extendida ocupan un mayor porcentaje de la superficie de las partículas en comparación con su estado de no equilibrio, la mayor cantidad de moléculas adsorbidas se logra para soluciones con concentraciones altas de polímeros y/o aumentando la velocidad de agitación de la misma. Consecuentemente, el efecto de los polímeros sobre la estabilidad coloidal de una dispersión depende en gran medida de la dosificación del mismo [85].

Existen diferentes mecanismos de desestabilización: floculación puente, floculación por neutralización o por depleción. Tal y como se mencionó anteriormente, las moléculas de polímero se adsorben en la superficie de las partículas, las cadenas toman configuraciones tipo colas o bucles que se extienden hacia la solución y es posible que dichos segmentos se unan a partículas vecinas. Este fenómeno (floculación puente) solo puede ocurrir si existe espacio suficiente en las superficies de las partículas vecinas. Esto ocurre cuando la dosis de moléculas poliméricas es menor a la necesaria para ocupar toda la superficie y puede darse tanto para polímeros cargados como polímeros no iónicos. Por lo general, se da en mayor medida en polímeros rígidos que tiene baja velocidad de relajación, polímeros de alto peso molecular y en soluciones con altas concentraciones salinas. La rigidez y el largo de la cadena le permiten al polímero alcanzar distancias mayores, lo cual aumenta la probabilidad de unirse a partículas vecinas, mientras que las altas concentraciones salinas, actúan disminuyendo la doble capa eléctrica y por lo tanto los fenómenos de repulsión entre las partículas, permitiendo de esta manera reducir la distancias entre las mismas. Este tipo de mecanismo está favorecido por el uso de altas velocidades de agitación, lo cual disminuye la probabilidad de que el polímero alcance el equilibrio. Se dice que las cadenas poliméricas están activas cuando pueden superar la capa de repulsión que las separa de una partícula vecina, e inactivas cuando su extensión no les permite superar la barrera de repulsión Inter partícula (Figura 8).

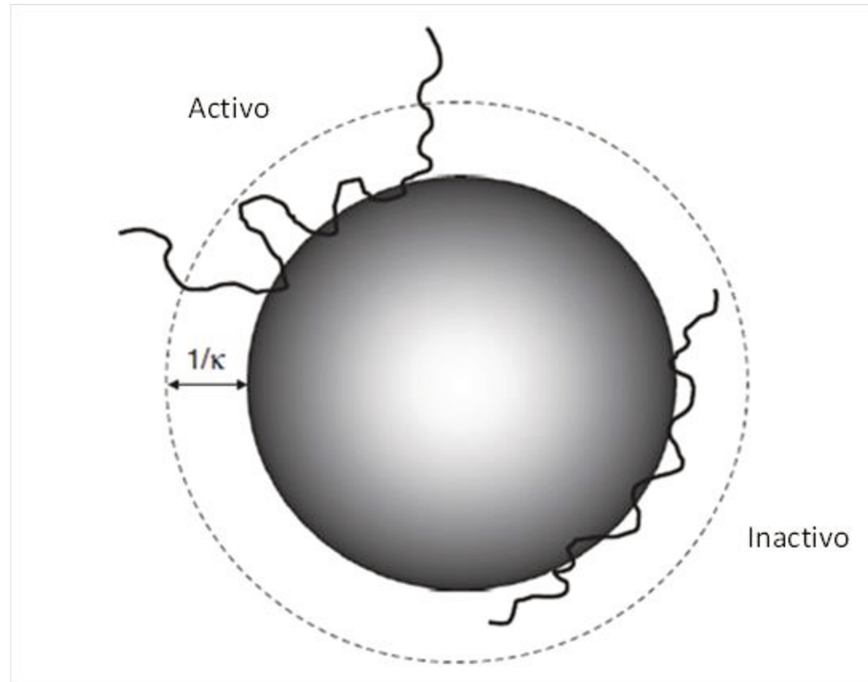


Figura 8: Representación de cadenas poliméricas adsorbidas tomando una configuración activa e inactiva. Fuente: Figura adaptada de Adsorption and flocculation by polymers and polymer mixtures, 2011 [85].

Este tipo de floculación es muy importante dado que produce flóculos más resistentes que los producidos por otros tipos de mecanismos de agregación. Son resistentes a altas agitaciones, sin embargo, una vez que se rompen es muy difícil que se vuelvan a formar. La dosis ideal suele ser 1 mg de polímero por g de partícula.

A diferencia de la floculación puente, la cual es válida para polímeros iónicos y no iónicos. La floculación por neutralización, requiere de la utilización de polímeros cargados. Para polímeros con alta densidad de carga, menos dosis es requerida para producir una floculación por neutralización. A diferencia de la floculación puente, la influencia del peso molecular, no suele ser significativa.

La floculación por neutralización se da por la mezcla de moléculas poliméricas y partículas de carga opuesta. La adsorción de polielectrólitos, se da en forma de parches sobre la superficie de las partículas, de modo que existen zonas con exceso de carga positiva y negativa. De ello se deduce, que puede haber una atracción adicional entre las zonas de carga opuesta de partículas vecinas. Este tipo de floculación puede romperse a altas velocidades, pero puede volver a reagruparse fácilmente, lo que la diferencia de la floculación tipo puente. Este fenómeno está muy influenciado por la presencia de sales. A altas concentraciones de sales, los iones compiten

con los polímeros y la afinidad de adsorción de los mismos se reduce. Sin embargo, las sales no pueden causar la desorción de polímeros cuando intervienen otro tipo de fuerzas de interacción de naturaleza no electrostáticas (Hidrofóbicas, Puentes hidrogeno). El pH también puede afectar a las interacciones electrostáticas puras debido a que puede impactar sobre la densidad de carga de las partículas.

Existe un tercer mecanismo de floculación denominado floculación por depleción, que aparece cuando en la interfase de las gotas existen moléculas poliméricas no adsorbidas. Cuando la separación entre las gotas es más pequeña que su tamaño y aproximadamente igual al radio hidrodinámico de la molécula polimérica, se genera una zona de exclusión en la interfase. La concentración de moléculas poliméricas en dicha zona tiende a cero, mientras que el resto de la fase continua tiene un número finito. Esto crea una diferencia de potencial osmótico que promueve la salida de moléculas de agua de solvatación desde la zona de exclusión hacia el seno de la solución. De esta manera, se reducen las moléculas de solvente en la interfase y las gotas pueden acercarse y formar agregados. Este tipo de floculación se da cuando en la solución existe una alta concentración de moléculas poliméricas. Al igual que la floculación por neutralización, este tipo de mecanismo es reversible por dilución.

6.3.2 Interacciones coloidales: Teoría de DLVO

Muchas de las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones se ven fuertemente afectadas por las interacciones de atracción y repulsión que actúan entre las gotas. Existen diferentes tipos de interacciones coloidales que pueden operar en las emulsiones, incluidas las interacciones de Van der Waals, electrostáticas, estéricas, de agotamiento e hidrofóbicas. Estas interacciones varían en su signo (atractivo o repulsivo), magnitud (fuerte a débil) y rango (largo a corto). Las características generales de las interacciones gota a gota en una emulsión en particular están determinadas por la contribución relativa de los diferentes tipos de interacciones coloidales que operan en ese sistema específico, que depende de la composición de la emulsión, la microestructura y el medio ambiente. Cuando dominan las fuerzas de atracción, las gotas tienden a asociarse entre sí, pero cuando dominan las fuerzas de repulsión, las gotas tienden a permanecer como entidades individuales.

La teoría de DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) describe la relación entre la fuerza de atracción de Van der Waals y la repulsión electrostática. Las que, por lo general, están siempre presentes y dominan la interacción entre las partículas coloidales.

En la figura 9 se muestra la dependencia del potencial total de interacción (w) entre partículas cargadas eléctricamente en función de la distancia (h) entre las mismas. Cuando las dos gotas están separadas por una gran distancia, no existe una interacción efectiva entre ellas. A medida que se acercan, la atracción de Van der Waals domina inicialmente y hay un mínimo superficial en el perfil, que se conoce como mínimo secundario. Cuando la profundidad de este mínimo es grande en comparación con la energía térmica, las gotas tienden a flocularse, pero si es pequeña en comparación con la energía térmica, las gotas tienden a permanecer no agregadas. A distancias inter partículas más cortas, domina la interacción electrostática repulsiva y hay una barrera de energía, que debe superarse antes de que las gotas puedan acercarse. Una vez sobrepasada dicha barrera, nuevamente las fuerzas de Van de Waals atractivas son dominantes, se observa un mínimo primario relativamente profundo. El cual conduce a una fuerte agregación de las partículas. Cuando las gotas se acercan tanto que sus interfaces se superponen, hay una repulsión estérica extremadamente fuerte que domina sobre las otras interacciones. Esta interacción repulsiva de corto alcance debería evitar que las partículas se acerquen lo suficiente como para fusionarse.

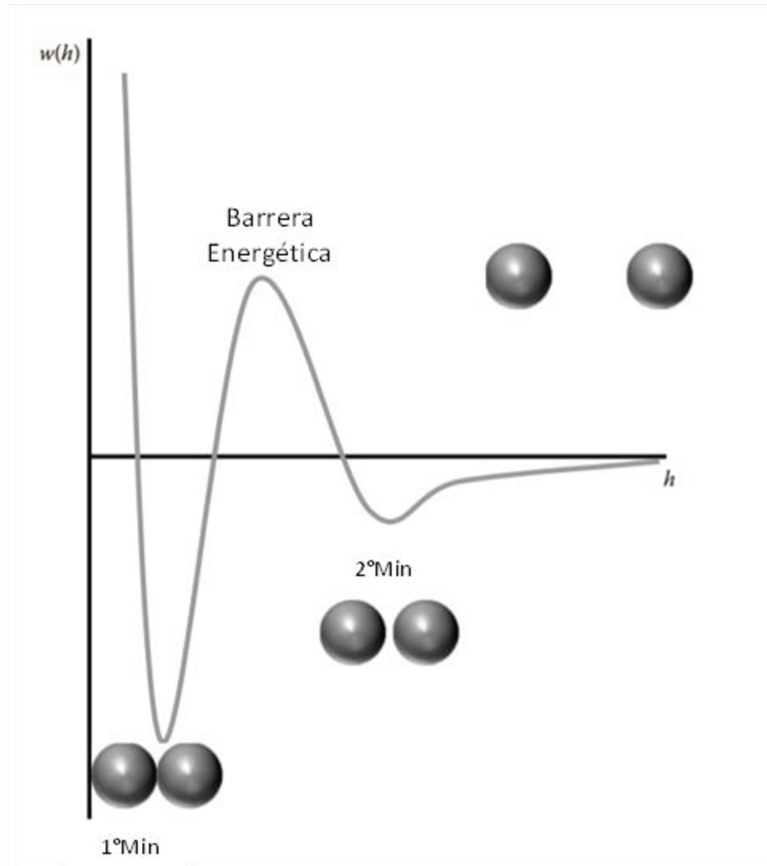


Figura 9: Fenómenos de desestabilización en sistemas dispersos. Fuente: Figura adaptada de Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, 2016 [83].

En otras palabras, el movimiento Browniano de las partículas produce colisión entre las mismas y si las fuerzas de atracción predominan, las partículas se aglomeran después de la colisión. En caso contrario, si las fuerzas de repulsión predominan las partículas permanecen separadas después de la colisión. La fuerza neta de interacción determinará si las partículas se unen irreversiblemente (mínimo primario) o su unión puede ser reversible (mínimo secundario). Por tanto, las interacciones coloidales están determinadas por un balance de energías de atracción y repulsión.

$$w_{TOTAL} = w_{ATRACCIÓN}(h) + w_{REPULSIÓN}(h) \quad (6.6)$$

6.3.2.1 Interacciones de Van der Waals

Las fuerzas intermoleculares atractivas que propuso Van der Waals hace un siglo para explicar el comportamiento de los gases no-ideales, resultan de tres efectos diferentes llamados de orientación (Keesom), de inducción (Debye) y de dispersión (London). La base de la teoría DLVO es la demostración que, por ser aditivas las fuerzas de interacción molecular de Van der Waals, su rango de acción puede extenderse al tamaño coloidal.

El potencial de Van der Waals (U_{VDW}) entre dos gotas de emulsión de igual radio r_{vdw} , separadas por una distancia de superficie a superficie h viene dada por la siguiente expresión:

$$w_{VDW}(h) = -\frac{A}{6} \left[\frac{2r_{vdw}^2}{h^2 + 4r_{vdw}h} + \frac{2r_{vdw}^2}{h^2 + 4r_{vdw}h + 4r_{vdw}^2} + \ln \frac{h^2 + 4r_{vdw}h}{h^2 + 4r_{vdw}h + 4r_{vdw}^2} \right] \quad (6.7)$$

Donde A es la constante de Hamaker [80]. Asumiendo que las gotas están separadas por distancias cortas ($h < r_{vdw}$), entonces la ecuación anterior se simplifica a:

$$w_{VDW}(h) = -\frac{Ar_{vdw}}{12h} \quad (6.8)$$

El potencial de Van der Waals siempre es atractivo y promueve la agregación de las gotas. Su fuerza varía típicamente desde 0,4 hasta 4 kJ / mol y resulta significativo a distancias de menos de 0,6 nm. Mientras que, a distancias menores a 0,4nm, Born es la interacción dominante. A dicha distancia los orbitales electrónicos empiezan a solaparse, resultando en una fuerza de repulsión extremadamente fuerte y en un rango muy reducido. Este efecto se conoce también como pared dura [86].

A distancias cortas, las fuerzas de Van der Waals son las dominantes, mientras que mayores distancias prevalecen las fuerzas de repulsión electrostáticas [80]. En las distancias a donde coexisten las fuerzas de Van der Waals y las fuerzas electrostáticas, por lo general estas últimas son las dominantes.

6.3.2.2 Interacciones electrostáticas - Teoría de la doble capa eléctrica

Las fuerzas repulsivas de tipo electrostáticas pueden ser explicadas a partir de la teoría de la doble capa eléctrica. Cuando las partículas se dispersan en el agua, los iones de carga opuesta a la de su superficie se adhieren fuertemente para conseguir su electroneutralidad. Por el contrario, esta acumulación de iones se opone a la tendencia de estos a difundir en la dirección en que la concentración es menor (Ley de Fick). Estas dos fuerzas opuestas, electrostática y de difusión, originan una nube iónica alrededor de la partícula que puede alcanzar hasta 300 nm de espesor en la solución, nube que conforma la doble capa eléctrica.

La doble capa iónica está formada por dos regiones principales. En el interior, dónde se encuentran las moléculas adsorbidas en la superficie de las partículas, se adsorbe una capa de iones de carga opuesta (contra iones) que proporciona la electroneutralidad. Esta capa se denomina capa de Stern y tiene aproximadamente 5 nm de espesor, correspondientes al tamaño de un catión hidratado o al de un anión sin hidratar. La otra capa denominada difusa o capa de Gouy-Chapman, consta de dos regiones una fija y otra móvil, definiéndose entre ambas un plano de cizallamiento o rozamiento (Shear plane) que las delimita. A diferencia de la capa de Stern, esta capa contiene una mezcla de contra-iones y co-iones (iones que tienen la misma carga que la partícula). La capa fija también se compone de dipolos de agua que, junto con los iones, se desplazan conjuntamente con las partículas al ser sometidas a un campo eléctrico. Por el contrario, los iones que forman parte de la fase móvil no se desplazan junto con las partículas. En la figura 10 se puede observar una representación simplificada de la doble capa eléctrica.

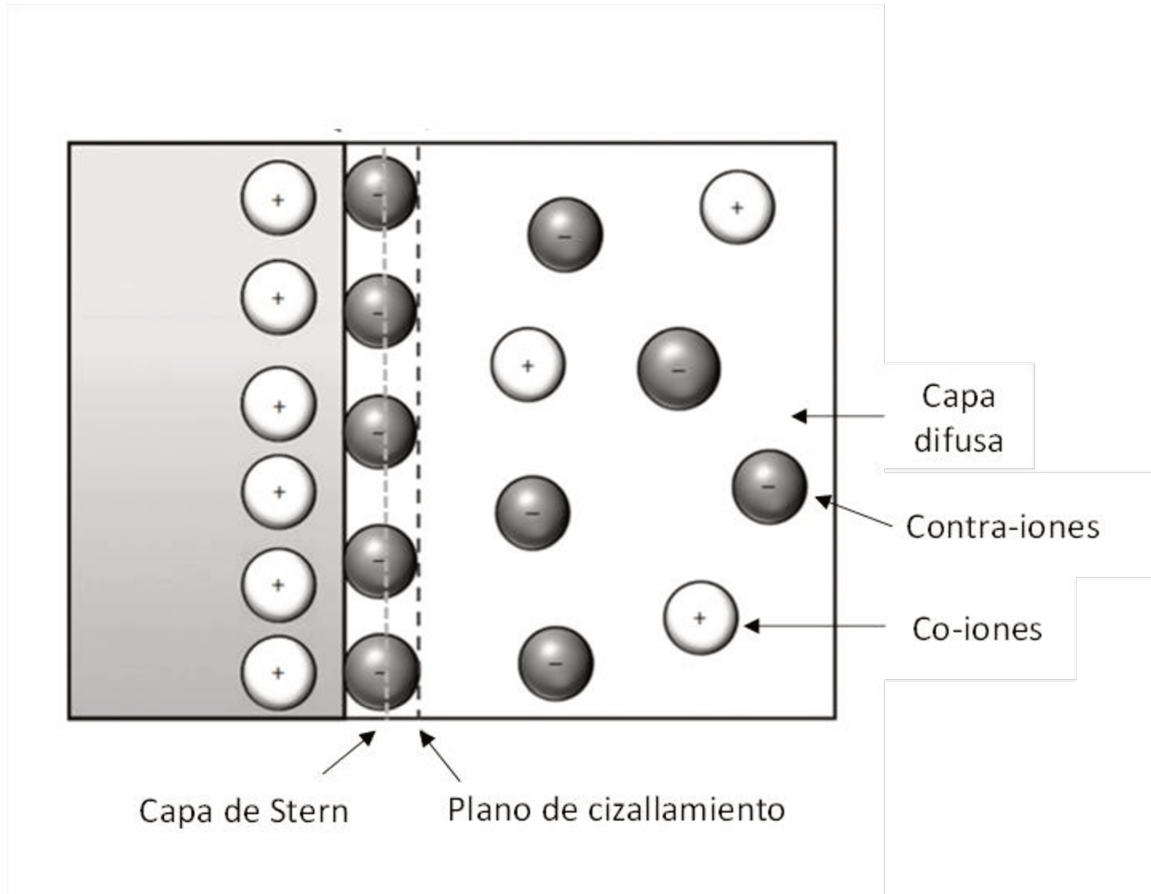


Figura 10: Esquema representativo de la doble capa eléctrica. Figura adaptada de Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, 2016 [83].

El espesor efectivo de la capa difusa está determinado principalmente por la composición iónica del líquido, disminuye con el aumento de la valencia y la concentración de contraiones. El espesor de la doble capa eléctrica (κ^{-1}) matemáticamente se define como:

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_R kT}{e^2 \sum n_0 z_i^2}} \quad (6.9)$$

Donde ϵ_0 es la constante dieléctrica en el vacío, ϵ_R es la constante dieléctrica relativa del medio, k es la constante de Boltzmann, T temperatura, n_0 representa la concentración de iones en solución de valencia z , e representa la carga elemental (1.602×10^{-19} C).

Las propiedades eléctricas de la superficie de las partículas generalmente se caracterizan en términos de densidad de carga superficial (σ) y potencial eléctrico superficial (Ψ_0), mientras que las propiedades de la solución generalmente se caracterizan en términos de concentración de iones, tipo de iones y constante dieléctrica. Se ha derivado una relación matemática, conocida como ecuación de Poisson-Boltzmann, para relacionar el potencial eléctrico en función de la distancia (x) a la superficie de la misma, con la concentración y el tipo de iones presentes en la solución de electrolito adyacente:

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = \frac{e}{\epsilon_0\epsilon_R} \sum_i z_i n_{0i} \exp\left(\frac{-z_i e\psi(x)}{kT}\right) \quad (6.10)$$

La ecuación 6.10 no tiene solución analítica explícita, por lo tanto, resulta conveniente hacer una serie de consideraciones. Si se supone que la atracción electrostática entre la superficie cargada y los contraiones es relativamente débil en comparación con la energía térmica, es decir, $z_i e\psi_0 < kT$ (lo que significa que $|\psi_0|$ debe ser menor de aproximadamente 25 mV en agua a temperatura ambiente), se puede utilizar la Aproximación de Debye–Huckel (Ecuación 6.11), para calcular la dependencia del potencial eléctrico en función de la distancia desde la superficie:

$$\psi = \psi_0 \exp(-\kappa x) \quad (6.11)$$

Resolver la ecuación de Poisson-Boltzmann para geometrías curvas, tales como las partículas coloidales, no es una cuestión sencilla y, a menudo, se necesitan métodos numéricos elaborados. Sin embargo, de la ecuación 6.10, utilizada para superficies planas, puede derivarse una ecuación sencilla útil para analizar el potencial en superficies curvas (ecuación 6.12).

$$\psi = \psi_0 \left[\frac{R_s}{r} \right] \exp[-\kappa(r - R_s)] \quad (6.12)$$

Donde R_s es el radio de la esfera y r es la distancia de algún punto en la doble capa desde el centro de la partícula.

Relacionando la ecuación 6.12 con la densidad de carga (σ) de las partículas, se puede obtener una relación del potencial de superficie con la carga superficial de las partículas (Ecuación 6.14)

$$\sigma = -\varepsilon \left(\frac{d\psi}{dr} \right)_{R_s} \quad (6.13)$$

$$\Psi = \frac{q}{4\pi\varepsilon r} \exp(-\kappa r) \quad \Psi \rightarrow \Psi_0; r \rightarrow R_s \quad (6.14)$$

El potencial Ψ_0 en la superficie de las partículas no se puede determinar a través de los métodos de medición que están disponibles. Sin embargo, en ciertas condiciones resulta posible determinar el potencial en el plano de cizallamiento, también denominado potencial ζ .

El potencial eléctrico en la capa de cizallamiento (ζ) es diferente al de la capa de Stern (Ψ_δ) y este a su vez es diferente al de la superficie (Ψ_0). Esto es debido a la presencia de contra iones contenidos en la capa de Stern. En la figura 11 se esquematizan las magnitudes relativas de los potenciales de interés.

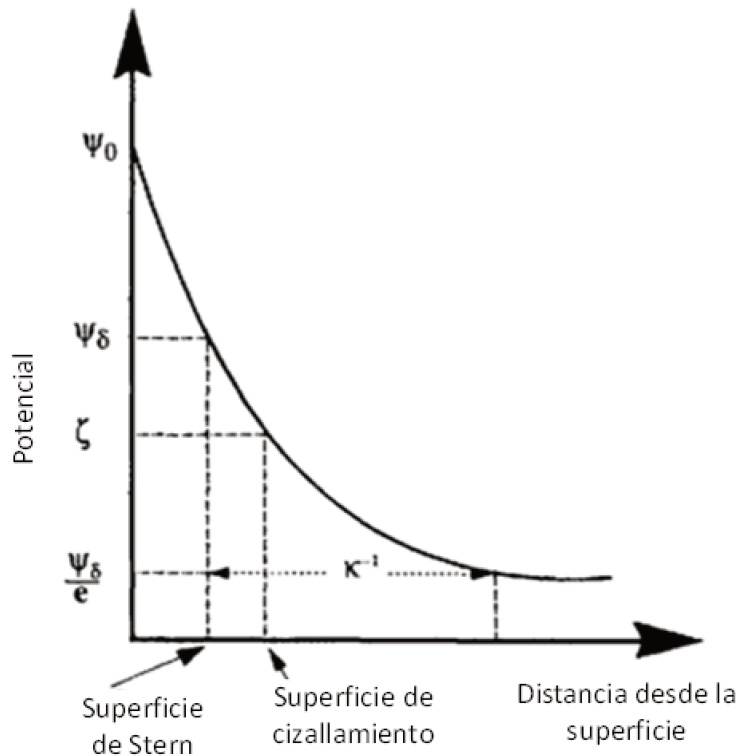


Figura 11: Magnitudes relativas de varios potenciales de interés de doble capa. Fuente: Figura adaptada de *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 3ed, 2016 [87].

El espesor de la doble capa determina la diferencia entre los potenciales de superficie, de la capa de Stern y el potencial ζ . El espesor de la doble capa de Debye es una característica extremadamente importante de una solución de electrolitos, porque determina como disminuye el potencial eléctrico con la distancia desde la superficie. En soluciones diluidas de electrolitos (baja fuerza iónica), el potencial prácticamente se mantiene constante con la distancia y, el potencial de la superficie de la partícula puede acercarse al valor del potencial ζ

$$\Psi_0 = \frac{q}{4\pi\epsilon r} \exp(-\kappa R_s) \quad \kappa \rightarrow 0; \Psi_0 \rightarrow \zeta \quad (6.15)$$

Dado que este resultado se aplica solo cuando κ es pequeño, la exponencial se puede expandir, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\zeta = \frac{q}{4\pi R_s} - \frac{q}{4\pi(R_s + \kappa^{-1})} \quad (6.16)$$

La energía de interacción electrostática entre dos partículas depende de las características de las partículas y del medio que las rodea. La misma se relaciona al potencial ζ a través de la siguiente ecuación.

$$w(h)_{ELECTROSTATICA} : 2\pi\epsilon_0\epsilon_R r\zeta^2 \ln(1 + \exp[-\kappa h]) \quad (6.17)$$

Como podemos ver, tanto la carga superficial de las partículas como la energía de interacción están directamente relacionadas al valor del potencial ζ .

6.3.2.3 Medición del potencial ζ

El potencial ζ puede ser determinado experimentalmente a través de técnicas electroforéticas. Se aplica un campo eléctrico controlado por medio de electrodos inmersos en una muestra en suspensión; esto provoca que las partículas cargadas se muevan a través del electrodo de polaridad opuesta. Las fuerzas viscosas que actúan en la partícula en movimiento tienden a oponerse a este movimiento, estableciéndose un equilibrio entre ambas fuerzas de atracción electrostática y la resistencia de viscosidad.

Dependiendo del tamaño de las partículas y el espesor de la doble capa eléctrica, la dinámica de las partículas sometidas a un campo eléctrico seguirá un modelo matemático en particular. Por lo general, partículas con R_s de entre 0.1-10 μm son mejor descritas por los modelos de Helmholtz-Smoluchowsky y Huckel (Ecuación 6.18).

$$\mu = C \frac{\epsilon\zeta}{\eta} \quad (6.18)$$

Donde η representa la viscosidad del medio donde están inmersas las partículas, μ representa la relación entre la velocidad electroforética y la magnitud del campo eléctrico. Para $\kappa R_s < 0.1$, C es igual a 2/3 (Huckel) mientras que cuando $\kappa R_s > 100$, el valor de C es igual 1 (Helmholtz-Smoluchowsky). Para obtener ambos modelos se aplica la ecuación de Poisson, sin la necesidad de la aproximación de Debye-Huckel y por lo tanto es válido para valores de potenciales $\zeta > 25$ mV.

Cabe destacar que, el modelo de Helmholtz-Smoluchowsky no es válido para dispersiones que tengan un 5% de sólidos y deben hacerse una serie de consideraciones, dado que en dichas ocasiones el movimiento de las partículas esta reducido y por lo tanto se obtienen bajos potenciales ζ .

Para κR_s intermedias entre los límites de los modelos de Helmholtz-Smoluchowsky y Huckel, la relación entre la movilidad electroforética y la potencial ζ puede ser descrito mediante el modelo de Henry.

$$\mu = \frac{2}{3} \frac{\zeta \epsilon}{\eta} f(\alpha) \quad (6.19)$$

Donde α es un parámetro relacionado al tamaño de la partícula y el espesor de la doble capa. En este caso, se requiere la aproximación de Debye Huckel para llegar a la expresión final, por lo tanto, este modelo no es válido para valores de potenciales $\zeta > 25$ mV.

Finalmente, se puede decir que la elección de un modelo matemático u otro estará supeditada al radio de la partícula, el espesor de la doble capa eléctrica y el valor del potencial ζ de la misma.

Cualquiera sea el modelo utilizado, es importante destacar que el valor del potencial ζ es un parámetro fundamental para describir el comportamiento de las partículas coloidales. Conocer el potencial ζ de una emulsión es importante a la hora de determinar la estabilidad de las mismas.

6.4 Materiales y Métodos

6.4.1 Materiales

Se prepararon diferentes emulsiones tipo aceite-en-agua formadas por aceite de girasol y lecitina. La lecitina fue suministrada por SAPORITTI S.A.C.I.F.I.A. La misma fue utilizada como emulsionante.

Al igual que la lecitina, el Quitosano (PM: 36999 g mol⁻¹; cps: 95; desacetilación (DD)> 95%) fue suministrado por SAPORITTI S.A.C.I.F.I.A.

Los quitosanos de diferente peso molecular se compraron en Glentham Life Sciences (Glentham Ciencias de la vida, Unidad 5 Leafield Way, Corsham SN13 9SW, Reino Unido, REINO UNIDO). La hoja de datos proporcionada por Glentham Life Sciences mostró la siguiente información: pesos moleculares promedio de quitosano (120000, 250000 y 20000 g mol⁻¹), quitosano DD (90.21%; 90.95% y 90.27%) y viscosidades (742 cps; 42, 23 cps y 4.84 cps).

Se utilizaron dos cepas de *Pseudomonas fluorescens*. La primera, provista por el departamento de Microbiología General de la Universidad Nacional del Litoral, fue utilizada en los ensayos de estabilidad y los ensayos de dispersión de bacterias en la superficie del agua. La otra cepa fue *Pseudomonas fluorescens* M1C, fue aislada desde campos de arroz en Entre Ríos y, fue amablemente suministrada por la Estación Experimental INTA Concepción del Uruguay. La misma fue utilizada para los ensayos de obtención del complejo quitosano-bacteria con quitosanos de diferente peso molecular. Ambas cepas fueron conservadas en Ultrafreezer (-80°C).

6.4.2 Preparación del vehículo de aplicación

6.4.2.1 Obtención de una emulsión de aceite-en-agua

La emulsión primaria de aceite-en-agua (EL) se preparó usando lecitina de soja como tensioactivo. La fase dispersa se compone de aceite de girasol y la fase continua de agua. La mezcla se homogeneizó durante 1 minuto a la velocidad máxima del mezclador (Waring Commercial. Orlando, FL, EE. UU.).

Se realizó un diseño experimental, a donde se evaluaron concentraciones de lecitina, relaciones aceite-agua (ϕ) a diferentes valores de pH. El diseño experimental se resume en la Tabla 1. Se

analizó la estabilidad de las emulsiones obtenidas microscópicamente y a través de pruebas gravimétricas. Los métodos analíticos se describen en los párrafos 6.4.3.1-5 de esta sección.

Tabla 1 Diseño experimental: Preparación de la emulsión aceite-en-agua.

Muestra	% Lecitina	ϕ	pH
EL1	1	0.5	7
EL2	5	0.5	7
EL3	10	0.5	7
EL4	10	0.5	5
EL5	10	0.5	3
EL6	10	0.33	7
EL7	10	0.17	7

6.4.2.1 Incorporación del Polímero Quitosano a la emulsión

El quitosano se disolvió en HCl (0,005 M). La solución resultante se mezcló con tampón de fosfato (0.1 M) en una relación de volumen de 1:3, respectivamente. Luego se añadió la mezcla goteándola sobre la emulsión primaria, en constante agitación, de esta manera se obtiene la solución LQ.

La interacción electrostática entre el quitosano y las gotas de aceite de la emulsión primaria se evaluó cuantitativamente mediante la determinación del potencial ζ y cualitativamente, a través de microscopia confocal. La aparición de fenómenos de desestabilización como la floculación fueron analizados mediante microscopía óptica y el análisis de los perfiles de transmitancia / retrodispersión con un analizador de estabilidad de sistemas coloidales. La estabilidad de la coalescencia se evaluó mediante un método gravimétrico. Los métodos analíticos mencionados se describen en los párrafos 6.4.3.1-5 de esta sección.

Se realizó un diseño experimental factorial completo, donde se evaluó el impacto de los factores: concentraciones de quitosano y pH sobre la estabilidad del sistema. El diseño experimental se resume en la Tabla 2.

Tabla 2: Diseño experimental: Incorporación del polímero quitosano.

Muestra	% Quitosano	pH
LQ1	0.03	3
LQ2	0.03	5
LQ3	0.03	7
LQ4	0.05	3
LQ5	0.05	5
LQ6	0.05	7
LQ7	0.1	3
LQ8	0.1	5
LQ9	0.1	7

6.4.3 Análisis de la estabilidad de las emulsiones.

6.4.3.1 Observación microscópica

Se siguió la estabilidad de la emulsión frente a la floculación mediante la observación bajo un microscopio óptico (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con un objetivo de 10x. Cada muestra fue previamente homogenizada, una gota de la misma fue colocada entre la porta y el cubre objetos, para su posterior análisis [88].

6.4.3.2 Determinación de la estabilidad de coalescencia de emulsiones. Análisis gravimétrico

La estabilidad de la emulsión a la coalescencia se evaluó a través de una técnica gravimétrica [88]. Primero, la emulsión se centrifugó a 15100 g durante 10, 20 y 30 minutos en una centrífuga (Dragón Lab D3024). Posteriormente, el aceite liberado fue retirado del sobrenadante. El porcentaje de aceite libre se calcula según la ecuación (6.20), donde m_1 es la masa de aceite libre después de la centrifugación, m_2 representa la masa total de aceite que forma parte de la emulsión.

$$\% \text{ Aceite libre} = \left(\frac{m_1}{m_2} \right) \times 100 \quad (6.20)$$

6.4.3.3 Medición del potencial zeta (ζ) de las emulsiones

Se utilizó un analizador ζ sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) para medir el potencial ζ , el que se determina a partir de la movilidad electroforética (μ) según la fórmula de Smoluchowski (Ecuación 19) [88]. Esta aproximación es válida para partículas mayores de aproximadamente 0.2 μm dispersas en electrolitos que contienen más de 10^{-3} M de sal. Se depositó un mililitro de cada muestra en una celda en forma de U de poliestireno Malvern. La celda se introdujo en el equipo y se realizó la medición [89].

La viscosidad y la constante dieléctrica de la suspensión en el cálculo, fueron aproximadas por valores del agua. Las mediciones se realizaron a 25 ° C. Se realizaron tres análisis repetidos y los resultados se expresaron en mV como valores medios. La desviación estándar de la media generalmente no excedió los 5 mV.

Previo a realizar el análisis, la muestra fue diluida para evitar efectos de dispersión múltiple. El pH se ajustó añadiendo HCl o NaOH (1 M). La fuerza iónica (0.03 M) fue ajustada con sales de fosfato (0.1M).

6.4.3.4 Tinción de las emulsiones con Rojo Nilo y FITC

Se utilizó una técnica de tinción para estudiar la microestructura de la emulsión. La fase oleosa y el quitosano se colorearon con Rojo Nilo y FITC (Isocianato de Fluoresceína), respectivamente. El tinte fluorescente, rojo del Nilo, fue disuelto en una solución de cetona para dar una concentración de 4 mg mL^{-1} . Luego, 60 μL de la solución resultante fueron añadidos a la fase oleosa de forma de obtener una concentración final de 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Con la fase oleosa obtenida se preparó una emulsión (EL) [90].

Para teñir el quitosano, primero fue diluido en una solución de ácido acético (0.1 M), obteniendo una concentración del 1% p / v. Paralelamente, el colorante fluorescente FITC se diluyó en metanol deshidratado, alcanzando una concentración de 0.1% p / v. Luego, ambas soluciones se mezclaron y se dejaron reaccionar durante 3 h en la oscuridad. Posteriormente, se añadieron gotas de NaOH (0.5 M) hasta que se produjo la reacción de precipitación. La solución fue centrifugada a 10000 g durante 5 min, lavada y re-suspendida en una solución de ácido acético (0.1 M). La solución final obtenida se dializó durante 3 días. Finalmente, se utilizó la solución de quitosano previamente coloreada para preparar la emulsión (LQ) [91].

Las emulsiones coloreadas fueron observadas con un microscopio confocal de fluorescencia (Leica TCP SP8) a través de lentes de inmersión (63x). Las muestras fueron excitadas a 488 nm (Rojo Nilo) y 552 nm (FITC).

6.4.3.5 Medición de la dispersión de luz múltiple

La estabilidad de las emulsiones fue también analizada mediante un analizador óptico, Turbiscan TMA 2000 (Formulacion, Toulouse, Francia). Este equipo arroja información cinética sobre el proceso que conduce a la separación de fases. La muestra se coloca en tubo de vidrio cilíndrico y se introduce en el equipo. La muestra es escaneada de abajo hacia arriba con una fuente de luz ($\lambda = 850$ nm). Simultáneamente, dos detectores sincronizados registran la luz transmitida a través la muestra (180° de la luz incidente), y la luz retrodispersada por la muestra (45° de la radiación incidente). Estos datos se representan en (%) curvas de transmitancia y / o retrodispersión como función de la altura de la muestra (mm). Los escaneos se repiten a intervalos periódicos de tiempo, proporcionando cada vez una sola curva. Al final del experimento, todas las curvas se superponen en el mismo gráfico para mostrar la desestabilización general del sistema [88].

6.4.4 Incorporación de bacterias al vehículo de aplicación

6.4.4.1 Preparación del vehículo de aplicación

Un crio tubo, conservado en Ultra Freezer, conteniendo 1 mL de una suspensión de células de *Pseudomonas fluorescens*, fue inoculado en 20 mL de medio King Broth contenidos en un Erlenmeyer de 100 mL y se dejó crecer bajo orbital agitando durante 10 h en una cámara de cultivo (28°C ; 150 rpm). El volumen total del Erlenmeyer fue descargado sobre 230mL de King broth contenido en un matraz Erlenmeyer de 1 L. Una vez más, el cultivo se dejó crecer hasta alcanzar su fase estacionaria. Luego, el cultivo fue centrifugado, el sobrenadante fue descartado y el pellet, conteniendo a las células, fue resuspendido en tampón fosfato (0.1M). Se midió la densidad óptica del cultivo por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 600 nm (S-20 Espectrofotómetro Boeco, Alemania). Utilizando una curva de calibrado DO vs. UFC/mL la concentración de bacterias fue ajustada a la concentración deseada. Por último, la suspensión de bacterias fue mezclada con una solución de quitosano en una proporción de volumen de 3: 1. La concentración de quitosano fue seleccionada en función de los resultados previos.

Posteriormente, la mezcla resultante se añadió a la emulsión (EL) seleccionada en una proporción de volumen de 1: 1. La formulación obtenida se denominó formulación LQB.

6.4.4.2 Medición del potencial zeta (ζ) de *P. fluorescens*

La medición del potencial zeta (ζ) de *P. fluorescens* fue realizada siguiendo el método analítico descrito en la sección 6.4.3.3.

6.4.4.3 Análisis de la concentración mínima inhibitoria del quitosano (CS-MIC) de las *Pseudomonas fluorescens*

Para el análisis de la concentración mínima inhibitoria de quitosano se utilizó una técnica de dilución en agar [92]. Se utilizaron placas de Petri, con una mezcla de Agar Muller Hinton y diferentes concentraciones de quitosano (0,10%; 0,08%; 0,05% y 0,03% p / v). Se diluyó un cultivo de *Pseudomonas fluorescens* (DO660 0,10-0,20) en agua estéril en una proporción de volumen de 1:10, respectivamente. Se inocularon treinta y seis spots para cada placa de Petri correspondientes a diferentes concentraciones de quitosano. Los spots se tomaron con asas estériles de plástico calibradas (1 μ L). Las placas de Petri se incubaron durante 24 h en una cámara de cultivo a 28 ° C. Se utilizó agar Muller Hinton sin quitosano como control negativo. El pH se ajustó a 6. Los resultados se compararon mediante una prueba de K. Wallis no paramétrica.

6.4.5 Análisis de la interacción Quitosano-Bacteria mediante mediciones del Potencial ζ . Efecto del peso Molecular del Quitosano.

Se analizó el impacto del peso molecular del quitosano y el pH sobre la cantidad de bacterias que pueden adsorberse al quitosano, manteniendo la carga positiva del complejo formado. Se midió el potencial ζ de las bacterias y los quitosanos por separado y luego formando parte del complejo. También se analizó la influencia del peso molecular sobre la dispersión de las bacterias sobre la superficie del agua a escala de laboratorio.

La cepa de *P. fluorescens M1C* se aisló de suelo de arroz en Entre Ríos, Argentina. Se conservó en un ultracongelador a -80 ° C. Para obtener el cultivo de *P. fluorescens*, se dejó crecer en King Broth (20 mL) en un matraz Erlenmeyer por 10 horas en una cámara de cultivo (28 ° C, 150 rpm). Luego se utilizó un inóculo (20 mL) para inocular King Broth (230 mL) en un matraz Erlenmeyer

(1 L). Este inóculo se volvió a hacer crecer con agitación en la cámara de cultivo hasta que se alcanzó la fase estacionaria (28 ° C, 150 rpm).

6.4.5.1 Medición del potencial ζ de *P. fluorescens* M1C y de los quitosanos de diferente peso molecular por separado

Se utilizó un analizador de partículas ζ sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) para medir el potencial ζ . En primer lugar, se analizaron las células (*P. fluorescens* M1C) y los quitosanos por separado. Para ello, previamente se suspendieron en una solución de NaCl (10 mM) para lograr la concentración deseada (0,20% p / v y 0,50 %, respectivamente). La baja molaridad se utilizó para evitar la interferencia entre el campo eléctrico y la presencia de iones. Esto nos ayudó a obtener datos más fiables. El valor de pH se ajustó con NaOH (1 M) y HCl (1 M).

Utilizando los valores obtenidos del análisis del potencial ζ de las bacterias se determinó el valor un valor de pKa promedio de *P. fluorescens* M1C a través de la ecuación 6.21:

$$pK_a = pH_{1/2\zeta_{\max}} + 0.4343 \left[\frac{F\zeta_{\max}}{2RT} \right] \quad (6.21)$$

Donde $pH_{1/2\zeta_{\max}}$ y ζ_{\max} son los parámetros de la ecuación 6.21. La ecuación 6.21 se puede aplicar a potenciales ζ inferiores a 25 mV [93- 94].

Para calcular los parámetros ($pH_{1/2\zeta_{\max}}$; ζ_{\max}) se utilizó la ecuación 6.22. Se empleó la función incorporada de MATLAB Isqcurvefit para el ajuste de los resultados experimentales.

$$\zeta = \frac{\zeta_{\max} pH^{\beta}}{pH^{\beta} + pH_{1/2\zeta_{\max}}^{\beta}} \quad (6.22)$$

6.4.5.2 Medición del potencial ζ de los complejos formados por *P. fluorescens* M1C y los quitosanos de diferente peso molecular

Para la determinación del potencial ζ del complejo quitosano-bacteria. Primero, el quitosano se disolvió en una solución de NaCl (10 mM) a diferentes concentraciones (0,0005%, 0,001%, 0,01% y 0,05% p / v). Las soluciones de quitosano se ajustaron con HCl / NOH 1 M a pH 4, 6 y

7. Luego se centrifugó una alícuota de cultivo de *P. fluorescens* y las células se suspendieron en NaCl (10 mM) para lograr la concentración deseada (0,20%, 0,15%, 0,07% p / v). La solución de quitosano se transfirió a un tubo Falcon (50 mL) y se añadió un volumen igual de células de cultivo. De nuevo, el pH se ajustó con NaOH (1 M) y HCl (1 M) a pH 4, 6 y 7. La solución resultante se agitó en un agitador orbital (300 rpm, 10 min). Las ecuaciones (6.23 y 6.24) se utilizaron para ajustar los datos experimentales recopilados del análisis de muestras del complejo quitosano-bacteria.

$$\zeta = \left[\frac{\zeta_{\max} \sigma^{\alpha}}{\sigma^{\alpha} + k^{\alpha}} \right] + \zeta_{0,pH} \quad (6.23)$$

$$\zeta_{Sat} = \zeta_{\max} + \zeta_{0,pH} \quad (6.24)$$

Donde ζ es el potencial ζ neto, σ es la relación quitosano: bacteria (g quitosano / g bacteria). Los parámetros de ajuste son ζ_{\max} [directamente relacionado con el punto de saturación (SP) o el potencial ζ en la parte superior de la curva], k (el punto de inflexión de la curva) y α (una medida del ancho y la pendiente de la curva sigmoidea). ζ_{Sat} es el valor de potencial ζ en el SP y $\zeta_{0,pH}$ es el potencial ζ en el punto de inicio cuando la concentración de quitosano es igual a cero. La función incorporada de MATLAB `lsqcurvefit` se utilizó para calcular los parámetros y hacer predicciones sobre el punto de saturación (SP) y punto de neutralización de carga (CNP). El comando `nlparci` fue utilizado para calcular los intervalos asociados a los parámetros con un 95% de confianza.

6.4.6 Distribución de las bacterias transportadas por el vehículo de aplicación (LQB) sobre diferentes espejos de agua

Se realizaron experiencias en espejos de agua, con diferentes relaciones Área superficial / volumen, con el objetivo de determinar la capacidad del vehículo desarrollado para concentrar a las bacterias en la superficie del agua.

6.4.6.1 Aplicación sobre agua estancada en *indoor*

Se utilizó un recipiente de vidrio de 2025 cm² de área y 10 L de volumen. Se realizaron dos tratamientos, uno con las *Pseudomonas fluorescens* inmersas en el vehículo formulado y el otro con las mismas bacterias, pero contenidas en su caldo de crecimiento. Como control negativo, se recolectaron muestras, previo a ambas inoculaciones. Se aplicaron 300 uL (6x10⁴ UFC/cm²) de cada uno de los tratamientos sobre la superficie del agua. La aplicación se realizó con una micropipeta P-1000. Pasada 1h desde la inoculación, se tomaron 200 muestras a diferentes distancias del punto de inoculación (0; 10; 14; 20; 22 y 28 cm) utilizando asas plásticas estériles calibradas (10 µL). Las muestras fueron depositadas sobre placas de Petri conteniendo agar cetrimida (Medio selectivo para *Pseudomonas spp.*).

Después de 24 h en la cámara de cultivo a 28 ° C, se cuantificaron las colonias desarrolladas sobre las placas de agar cetrimida. Los resultados fueron comparados estadísticamente utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

6.4.6.2 Aplicación sobre agua estancada en exterior. Estanque div. Los andes

Se realizó una prueba de dispersabilidad en agua estancada en un área de 16.52 m² y un volumen de 13 m³. El agua fue inoculada con diferentes dosis del producto 250µL; 1.25mL, y 5.25 mL; equivalentes a 6x10² UFC/cm², 3x10³ UFC/cm² y 1.3x10⁴ UFC/cm², respectivamente. Antes de la primera dosis y luego de cada dosificación se realizó una recuperación de bacterias sobre la superficie. La aplicación se realizó con una micropipeta P-1000 y una pipeta de 10 mL sobre el centro del estanque.

La toma de muestras se realizó 1h después de la aplicación utilizando un ansa calibrada (10uL), distinguiéndose dos zonas, bordes (12 muestras) y zona central (12 muestras). Una vez recolectadas las muestras se depositaron en placas de Petri que contienen agar cetrimida. Posteriormente, las placas fueron almacenadas en estufa a 28°C. Se realizaron observaciones sobre las placas pasadas 24h desde su almacenamiento. Se consideraron como muestras positivas a aquellas donde observaron colonias fluorescentes.

6.4.6.3 Aplicación sobre agua estancada en exterior. Prueba en laguna de parque Garay

En este caso la experiencia se llevó a cabo sobre un estanque Circular que tiene aproximadamente 56 m de diámetro y una isla en el centro de 18 m de diámetro.

Aproximadamente la superficie total abarca uso 2200 m². Se utilizó una única dosis de 500 mL, los que equivalen aprox. a 9x10³ UFC/cm². Antes y después de la dosificación se realizó una recuperación de bacterias sobre la superficie. La aplicación se realizó sobre la zona 2 según se indica en la figura 12 y usando un rociador. La recuperación se realizó sobre las zonas 1, 2, 3 y 4. El muestreo se hizo pasada 1h de la aplicación. En cada análisis se tomaron 5 a 7 muestras de cada zona.

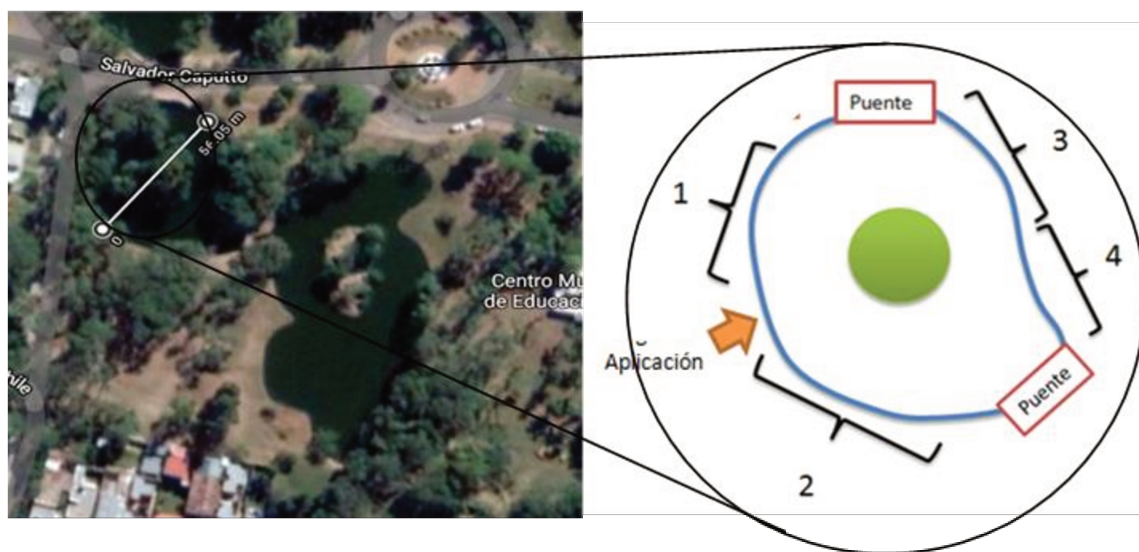


Figura 12 Fotografía satelital de la zona de aplicación del producto y esquema representativo del mismo.

6.4.6.4 Efecto del peso molecular del quitosano: Aplicación sobre agua estancada en *indoor*

Se prepararon tres formulaciones LQB formadas por quitosanos de diferente peso molecular (1250000, 250000 y 20000 g mol⁻¹), la preparación de los complejos quitosano-bacteria se realizaron siguiendo el procedimiento descrito previamente. La cantidad de bacterias y la concentración de quitosano fueron seleccionadas en función de los resultados previos, luego los mismos fueron mezclados 1:1 con la emulsión (EL) seleccionada. Se tomaron alícuotas de 500ul por cada tratamiento y se inocularon con micropipeta (P-1000) sobre la superficie de un recipiente de área (0.06 m²) conteniendo 11 L de agua. Luego de 1 hora desde la inoculación, se tomaron muestras con ansa calibrada (10uL) estéril a diferentes distancias desde el punto de inoculación. Se tomaron un total de 3 muestras por tratamiento, a las cuales se le hicieron diluciones seriadas

en agua destilada estéril para lograr obtener la concentración de bacterias existentes. Por último, se tomaron alícuotas de 10uL de cada una de las diluciones y se inocularon sobre placas con agar cetrimida. Se contabilizaron aquellas que tienen entre 5 y 50 colonias. La toma de muestra se repitió a las 24, 48, 120, 168 y 216 horas para analizar como varía en el tiempo la concentración de bacterias en la superficie para cada uno de los tratamientos.

6.5 Resultados y discusión

Para aumentar el número de bacterias en la interfaz aire-agua, se utilizó una emulsión aceite-en-agua. En una formulación estable, las bacterias que se adsorben en la superficie de las gotas de aceite son transportadas con ellas y fluyen hacia la interfaz aire-agua, debido a las fuerzas de flotación.

Una emulsión puede considerarse estable si la fusión de las gotas puede evitarse mediante una barrera de energía lo suficientemente alta. Generalmente, esta barrera de energía está formada por la película formada por uno o más emulsionantes en la superficie de la gota. La acumulación de un emulsionante o un promotor de la emulsión en la interfaz entre la fase interna y externa da como resultado una disminución de la tensión interfacial entre las dos fases [84].

6.5.1 Análisis de la estabilidad de las emulsiones

6.5.1.1 Análisis microscópico de la estabilidad de las emulsiones

En este trabajo se evaluó a la lecitina como emulsionante aniónico de emulsiones tipo aceite-en-agua. Se variaron diferentes condiciones (pH, concentración de emulsionante, cantidad de aceite-en-agua (ϕ)). Las imágenes microscópicas de la Fig. 13 (a) correspondientes a las emulsiones primarias estabilizadas con 1% p / v de lecitina muestran claramente que las gotas de aceite están floculadas. Cuando la concentración de lecitina se eleva al 5% p / v, las gotas floculan menos, como se muestra en la Fig. 13 (b). Este resultado podría sugerir que no hay suficiente lecitina en el medio o que la carga neta de las gotas no es suficiente para promover la repulsión electrostática. Por el contrario, al aumentar la concentración de lecitina al 10% p/v (Fig. 13 (c)), la emulsión es estable frente a la floculación.

Un parámetro importante para caracterizar las emulsiones es la relación de volumen de la fase oleosa en agua (ϕ). En la Fig. 14 se muestra el efecto de esta relación (ϕ) sobre la característica

microscópica de las emulsiones. Finalmente, se estudió el impacto del pH sobre la estabilidad de la emulsión primaria. En este caso, el cambio de pH no influye en las características microscópicas de las emulsiones (datos no mostrados).

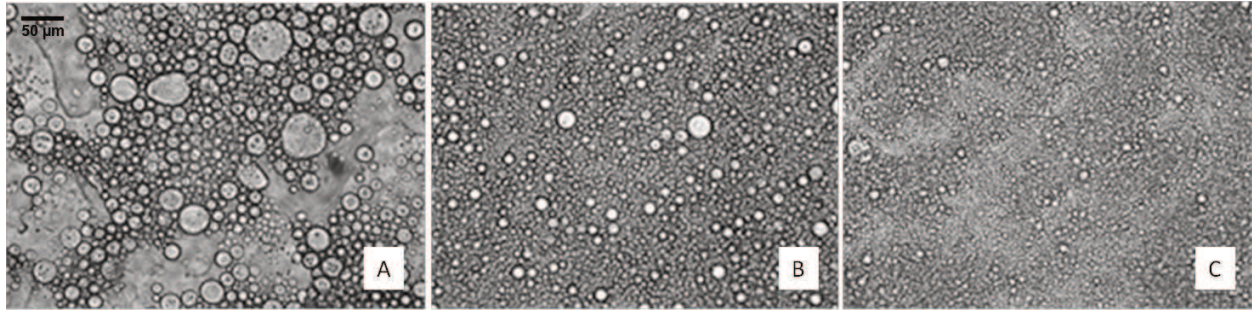


Figura 13 Imágenes microscópicas tomadas con objetivo 10×; de muestras con diferentes concentraciones del agente emulsionante Lecitina (% p/v) (a) L1: 1%; (B) L2: 5% y (c) L3: 10%.

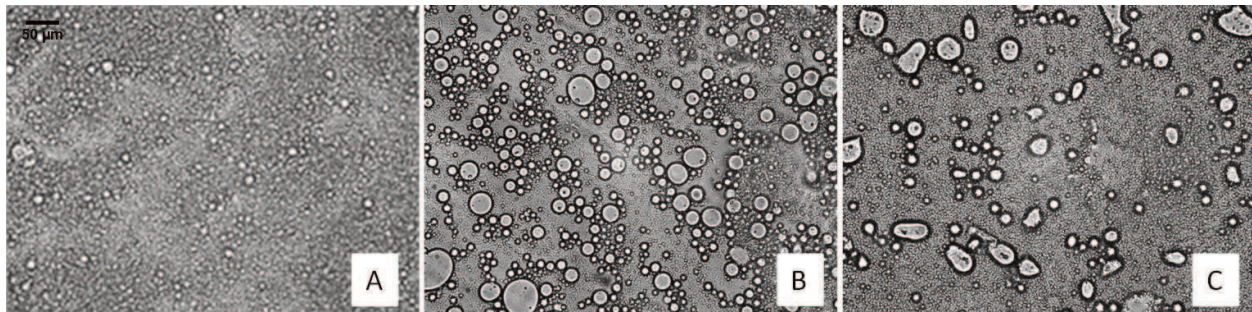


Figura 14 Imágenes microscópicas tomadas con objetivo 10×; de las muestras con diferentes porcentajes de fase oleosa (ϕ) (a) L3: 0,50; (b) L8: 0,33 y (c) L9: 0,17.

Las imágenes de microscopio sugieren que las mejores condiciones de estabilidad son logradas con 10% p/v de lecitina, a ϕ : 0,5 y pH 3-7.

6.5.1.2 Análisis microscópico de la estabilidad de las emulsiones con quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal de unidades de β - (1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. El quitosano es el derivado N-desacetilado de la quitina, que se encuentra naturalmente en los exoesqueletos de los caparzones de insectos, de los crustáceos y en las paredes celulares de los hongos. Dado que el quitosano es un polisacárido lineal cargado positivamente a $\text{pH} < 6.5$, se usa como polielectrolito en numerosas aplicaciones [68; 90; 95-96]. En este caso, el quitosano tiene un propósito, producir una interacción atractiva con bacterias cargadas negativamente, promoviendo el anclaje de las bacterias a la superficie de las gotas de aceite, también cargadas negativamente.

Las partículas poliméricas pueden inducir la floculación al neutralizar la carga superficial de las gotas o al formar puentes entre las gotas individuales [97]. Independientemente del mecanismo de floculación, es importante encontrar la concentración de quitosano crítica, a partir de la cual estos fenómenos son significativos.

El efecto de la concentración de quitosano y el valor del pH sobre el fenómeno de floculación se analizaron mediante imágenes de microscopía óptica (Fig. 15). A bajos valores de pH, el tamaño de los flóculos aumenta con dosis crecientes de quitosano. En este sentido, las gotas que conforman las emulsiones preparadas con 0,10% y 0,05% p/v de concentraciones finales de quitosano a pH 3 y 5, están más floculadas (Figura 15 (d), (e), (g) y (h)).

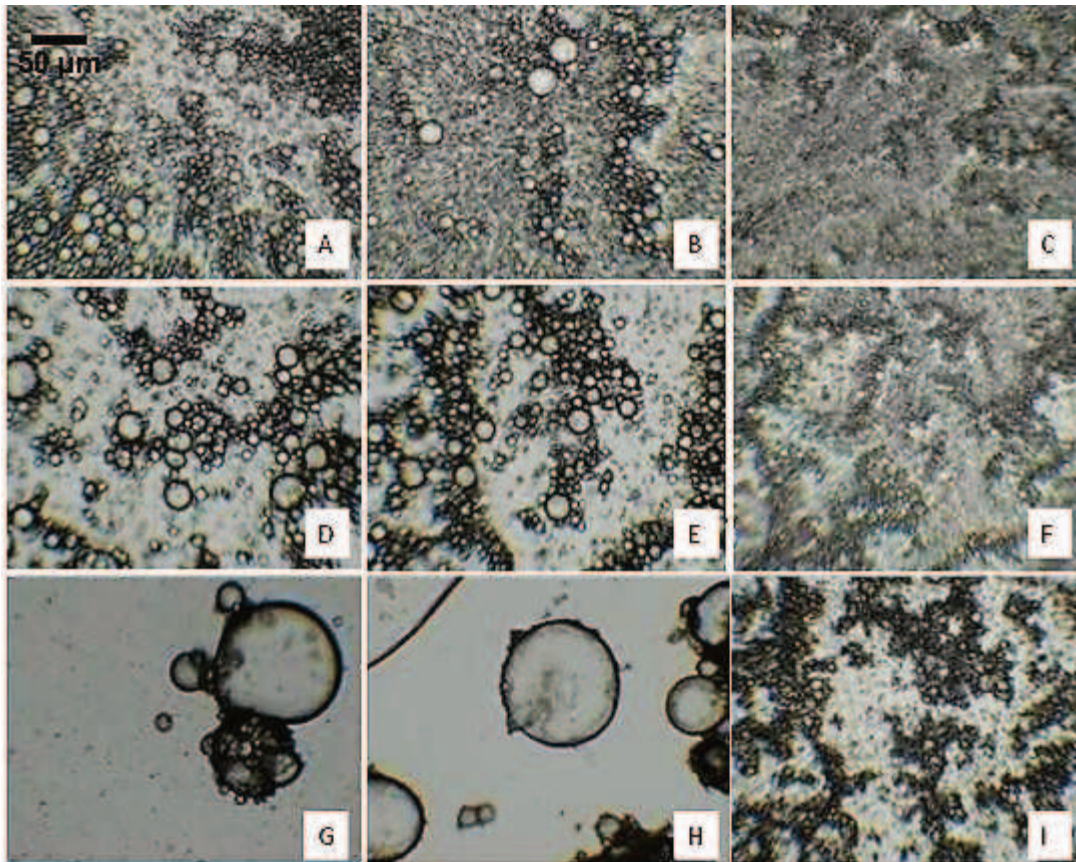


Figura 15: Imágenes microscópicas tomadas con objetivo 10x; de las muestras de emulsiones primarias con diferentes concentraciones de quitosano (% p/v) en diferentes pH. (a) LQ1: 0,03%; pH 3; (b) LQ2: 0,03%; pH 5; (c) LQ3: 0,03%; pH 7. (d) LQ4: 0,05%; pH 3; (e) LQ5: 0,05%; pH 5; f) LQ6: 0,05 %; pH 7. (g) LQ7: 0,10%; pH 3; h) LQ8: 0,10 %; pH 5; (i) LQ9: 0,10%; pH 7.

6.5.1.3 Determinación de la estabilidad de coalescencia de emulsiones. Análisis gravimétrico

Se calculó el porcentaje de aceite separado después de la centrifugación. Los resultados se resumen en la Tabla 3. Las emulsiones LQ4 (quitosano al 0,05%, pH 3), LQ7 (quitosano al 0,10%, pH 3) y LQ8 (quitosano al 0,10%, pH 5) liberan aceite después de 10 min de centrifugación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis microscópico del fenómeno de floculación, lo que muestra la relación directa que existe entre los dos mecanismos de desestabilización.

6.5.1.4 Medición del potencial ζ de las emulsiones

El potencial ζ es una propiedad medible de las partículas cargadas electrostáticamente [98]. Las mediciones del potencial ζ se realizaron para evaluar la deposición electrostática del polímero en la película interfacial que rodea las gotas. Se observó que, en ausencia de quitosano, la carga superficial de la emulsión (EL) es -53 y -78 mV a pH 3 y 7, respectivamente (Tabla 3). La carga negativa se atribuye a la presencia de lecitina. Por su parte, la incorporación del quitosano al sistema en una concentración final igual a 0.025% p / v, produce una disminución del potencial ζ , hasta alcanzar los -14 y -66 mV, respectivamente. Este cambio en el valor potencial de ζ se puede atribuir a la neutralización de las cargas negativas de la lecitina debido a la interacción del quitosano-lecitina en la interface.

Tabla 3: Análisis de la estabilidad de la emulsión en función del pH y la concentración de Quitosano.

Muestra	% p / v Quitosano	pH	Potencial ζ	% Aceite Liberado		
				10 min.	20 min.	30 min.
L1	0	3	-53,26 ± 1,23	0	0	0
L2	0	5	-74,78 ± 0,07	0	0	0
L3	0	7	-78,10 ± 2,17	0	0	0
LQ1	0,025	3	-14,44 ± 1,69	0	0	10,95 ± 1,58
LQ2	0,025	5	-56,40 ± 0,42	0	0	0
LQ3	0,025	7	-66,28 ± 5,34	0	0	0
LQ4	0,05	3	-8,79 ± 1,17	51,48 ± 2,93	-	-
LQ5	0,05	5	-49,20 ± 1,91	0	6,68 ± 3,06	-
LQ6	0,05	7	-63,89 ± 0,19	0	0	0
LQ7	0,1	3	20,28 ± 2,02	90,48 ± 3,48	-	-
LQ8	0,1	5	-29,10 ± 2,84	79,65 ± 7,50	-	-
LQ9	0,1	7	-56,65 ± 0,12	0	0	0

Según la literatura, cuando las emulsiones arrojan valores de Potencial ζ entre -30 mV y + 30 mV, es más probable que las mismas se desestabilicen por floculación [99]. LQ1, LQ4, LQ7 y LQ8 se encuentran dentro de dicho rango, y son aquellas que presentaron los peores resultados en los análisis microscópicos y gravimétricos realizados.

6.5.1.5 Tinción de las emulsiones con Rojo Nilo y FITC

La Figura 16 muestra imágenes de microscopía confocal de las emulsiones. La Figura 16 (a), confirma que el sistema corresponde a una emulsión de aceite-en-agua. La Figura 16 (b) confirma la adsorción del quitosano en la superficie de la gota. Estas observaciones reafirman los resultados obtenidos en los análisis de potencial ζ .

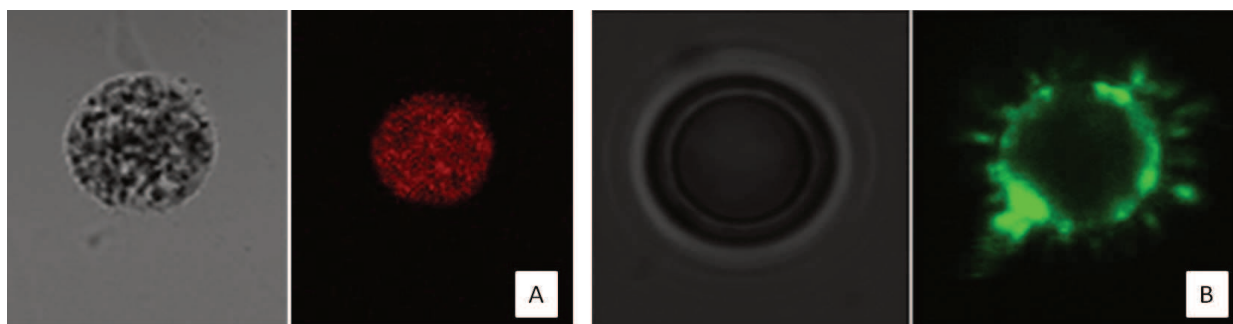


Figura 16: Imágenes obtenidas a partir de observaciones realizadas al microscopio de fluorescencia confocal; (a) fase de aceite (rojo); (b) Quitosano (Verde) Las tinciones fueron elaboradas utilizando la formulación que proporcionó los mejores resultados de estabilidad (LQ3).

6.5.1.6 Medición de la dispersión de luz múltiple

Se utilizó una técnica de dispersión de luz múltiple para seguir la floculación/coalescencia y la estabilidad frente a la formación de crema [100]. Los datos se representan en (%) curvas de transmitancia y / o retrodispersión en función de la altura de la muestra (mm). La estabilidad de la emulsión frente a la floculación/coalescencia se evaluó analizando la zona media de los perfiles de retrodispersión ($\Delta\%$ BS) obtenidos en el Turbiscan. La intensidad de la luz retrodispersada está relacionada con el número de gotas ubicadas a una altura específica de la emulsión. En nuestro caso, una reducción de $\Delta\%$ BS representa una disminución en el número de gotitas, provocada por un incremento del tamaño de partícula, ya sea por floculación o coalescencia. Aunque las mediciones pueden mostrar un aumento en el tamaño de las gotas debido a la coalescencia o floculación, el instrumento no puede discriminar entre estos dos mecanismos. Como se muestra en la Figura 17, la formulación LQ7 (0,10% de quitosano, pH 3) exhibe una marcada disminución de $\Delta\%$ BS en la zona media, lo que indica un aumento en el tamaño de las

gotas. Dicha muestra es también aquella que presenta mayor liberación de aceite en el análisis gravimétrico. El resto de las emulsiones evaluadas permanecen casi constantes, lo que sugiere que el tamaño de las gotas no ha cambiado durante el proceso de medición.

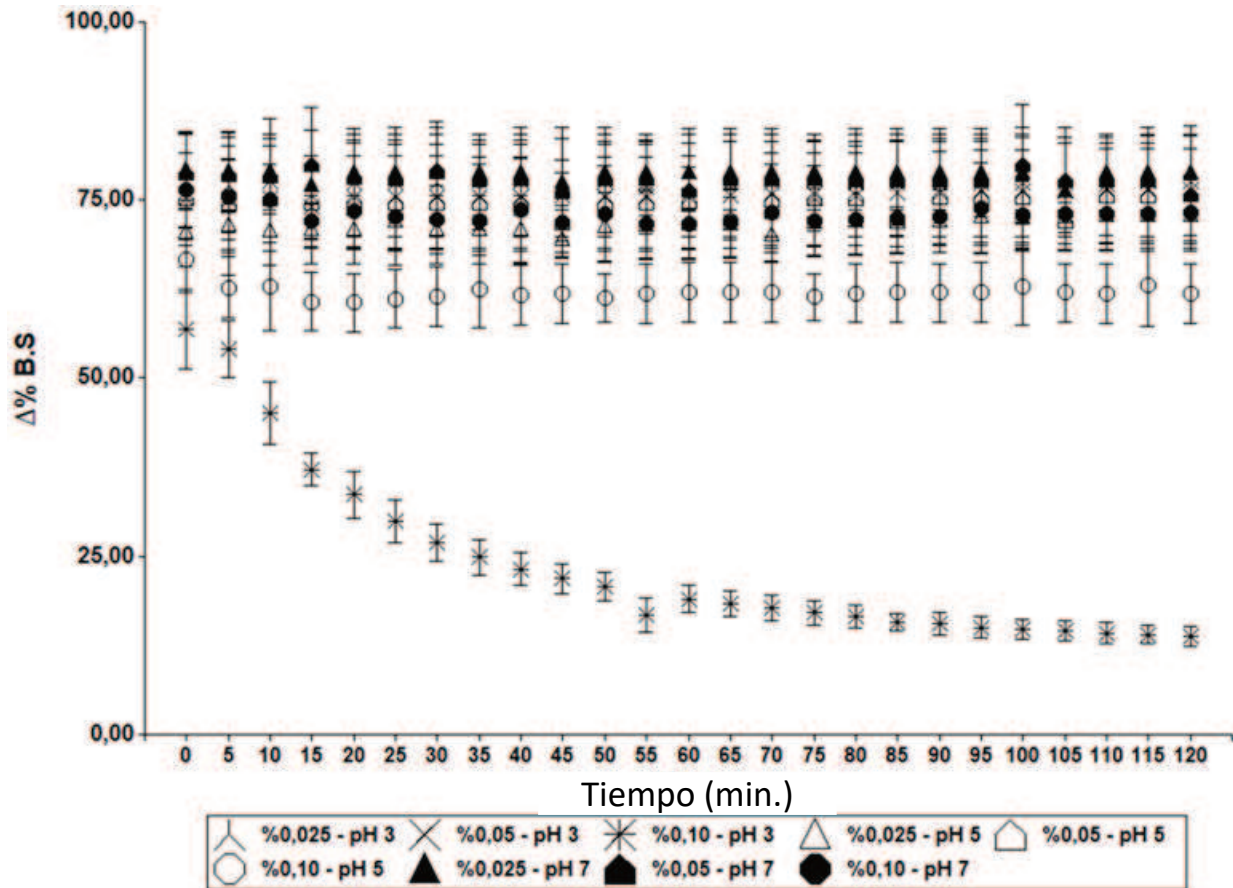


Figura 17: Efecto de la concentración de quitosano y el pH en los perfiles de retrodispersión Δ como medida de la variación del tamaño de las gotas. Los valores medios para cada sistema se determinaron a partir de la zona media del tubo (25-35 mm de altura).

La estabilidad de la emulsión frente a la formación de crema se evaluó analizando los datos de los perfiles de retrodispersión ($\Delta\%$ BS) en la parte inferior del tubo. A partir de estos datos se encontró la velocidad de migración de la crema (Tabla 4).

Tabla 4: Velocidad de migración de la fase crema de las emulsiones

% p / v Quitosano	pH	Velocidad mm.min ⁻¹	R ²
0,1	7	0,04	0,89
0,1	5	0,26	0,96
0,1	3	0,55	0,84
0,05	7	0	0
0,05	5	0,09	0,94
0,05	3	0,18	0,99
0,025	7	0	0
0,025	5	0,09	0,94
0,025	3	0,08	0,93

Los resultados muestran que existe un incremento en la velocidad de cambio del perfil de retrodispersión a medida que se aumenta la concentración de quitosano en solución. Lo mismo ocurre a medida que se disminuye el pH. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los resultados del resto de los análisis.

6.5.2 Incorporación de bacterias al vehículo de aplicación

6.5.2.1 Medición del potencial ζ de *P.fluorescens*

Se midió el potencial ζ de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* suministrada por la cátedra de Microbiología General (Fig. 18). El potencial ζ para esta cepa de *Pseudomonas fluorescens* es negativo y aumenta con el valor de pH de -15 a -22 mV. Estos resultados se pueden atribuir a las cargas negativas de los fosfolípidos que forman parte de la membrana celular [101]. Además, este resultado confirma que las interacciones entre las bacterias y el quitosano son posibles. Si la concentración de quitosano es suficiente para cubrir la superficie de la bacteria, es posible formar un complejo donde la superficie de la bacteria sea positiva. De esta manera, el complejo se puede anclar en la superficie de la gota negativa.

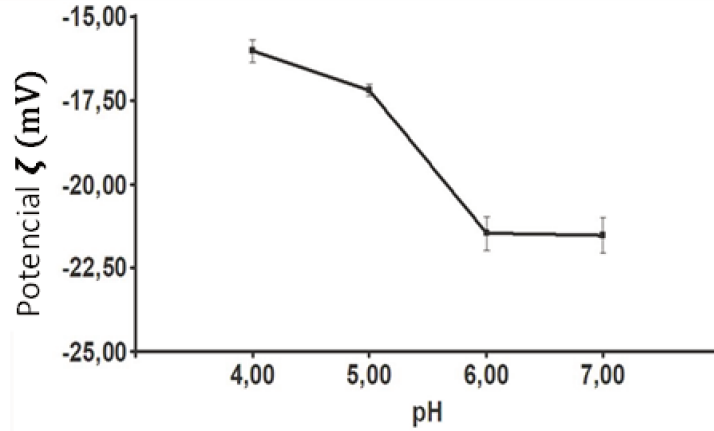


Figura 18: Medida del potencial ζ de *P. fluorescens* en función del pH.

6.5.2.2 Análisis de la concentración mínima inhibitoria del quitosano (CS-MIC) de las *Pseudomonas fluorescens*

Se evaluó el efecto antibacteriano del quitosano (36999 g/mol) sobre la cepa de *P. fluorescens* en estudio. Para ello las bacterias fueron expuestas a diferentes concentraciones (0,10%; 0,08%; 0,05% y 0,03% p / v) del polímero. El ensayo se realizó a pH 6, por ser un pH compatible con la vida de las células y que está por debajo del pKa del quitosano.

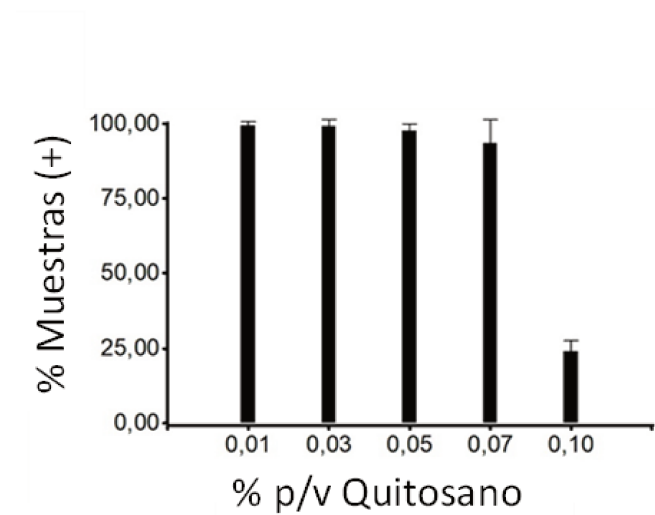


Figura 19: Determinación de la concentración inhibitoria mínima de quitosano vs *P. fluorescens*. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes (Test de K.wallis ($p > 0,05$)).

El % de muestras positivas, se determinó dividiendo el número de spots inoculados que evidenciaron crecimiento sobre agar cetrimida, sobre la totalidad de spots inoculados. Tal y como se puede observar, el quitosano produjo una reducción significativa de la viabilidad en aquellas bacterias incubadas con concentraciones iguales a 0.1% (P. Kruskal Wallis $p = 0,0079$). Este resultado es comparable a los resultados reportados en la bibliografía [77-80].

6.5.3 Análisis de la interacción Quitosano-Bacteria mediante mediciones del Potencial ζ . Efecto del peso Molecular del Quitosano

Una vez demostrada la capacidad del vehículo formulado para concentrar a las bacterias en la superficie del agua, se profundizó el análisis sobre el mismo, prestando especial atención al complejo formado por bacterias y quitosano, su peso molecular y el pH del medio.

Tal y como se mencionó anteriormente, para ascender a la superficie las bacterias necesitan anclarse a las gotas de aceite que forman la emulsión. El quitosano, gracias a su carga positiva facilita la interacción de las bacterias de carga negativa a las gotas de aceite, las cuales también tienen carga negativa. Entonces, para favorecer dicho anclaje el complejo formado por bacterias y quitosano debe poseer una densidad de carga positiva lo más alta posible.

Se analizó el impacto del peso molecular del quitosano y el pH sobre la cantidad de bacterias que pueden adsorberse al polímero, manteniendo la carga positiva del complejo formado. Se midió el potencial ζ de las bacterias y los quitosanos por separado y, luego formando parte del complejo. También se analizó la influencia del peso molecular en la dispersión de las bacterias sobre la superficie del agua a escala de laboratorio.

6.5.3 1 Análisis del Potencial ζ de *P. fluorescens* M1C

La Figura 20 muestra el potencial ζ de *P. fluorescens* M1C frente al valor de pH. Como se puede observar, el potencial ζ es negativo para todos los pH evaluados. A pH 2, el potencial ζ arrojó un valor igual a -0.884 mV. Como puede verse, la carga negativa aumenta al aumentar el valor de pH. A pH 7, el potencial ζ se eleva a -21.40 mV. El valor de potencial ζ a valores cercanos a la neutralidad está de acuerdo con mediciones realizadas sobre otras cepas de *P. fluorescens*, $-19,8$ mV a pH 6 (*P. fluorescens* ATCC 700830) y -23.5 mV a pH 7 (*P. fluorescens* P6a) [69;102].

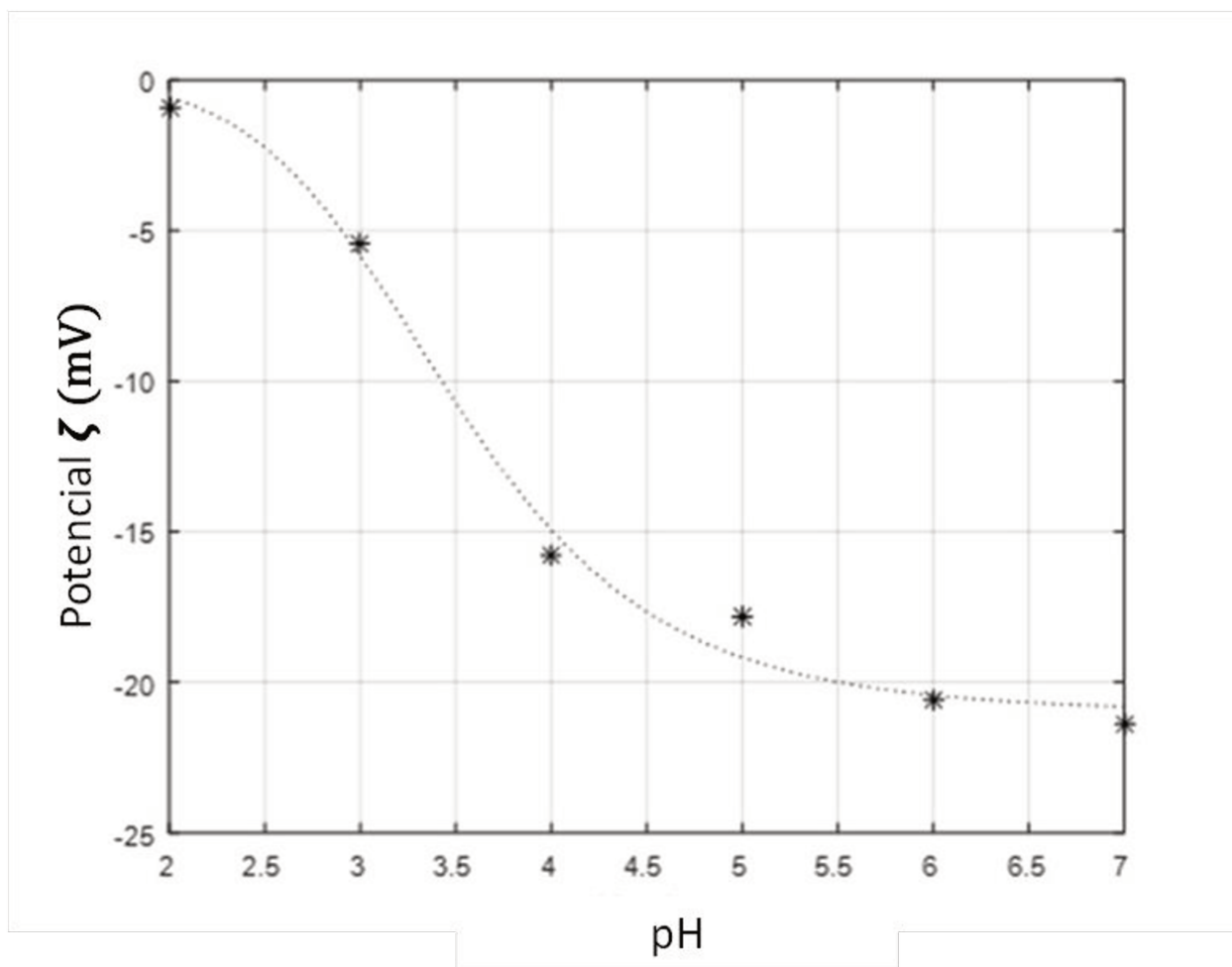


Figura 20: Variación del Potencial ζ de *Pseudomonas fluorescens* M1C en función del cambio de pH.

A partir de la medida de potencial ζ y la ecuación (4.23), se obtuvieron los parámetros ζ_{\max} y $\text{pH}_{(1/2\zeta_{\max})}$. Luego, a través de la ecuación (4.21), se encontró que el pKa de *P. fluorescens* M1C es igual $3,30 \pm 0,18$. Se han informado valores similares para otras cepas de *P. fluorescens* [103].

6.5.3.2 Análisis del potencial ζ de los polímeros de quitosano de diferente peso molecular

La Figura 21 muestra la variación del potencial ζ del quitosano (0,05% p / v) como una función del valor de pH para diferentes PM de quitosano. Como puede verse, cuando el pH se vuelve más ácido, se obtuvo un potencial ζ más alto. Esto puede estar relacionado a que se dispone de más residuos de $-\text{NH}_3^+$ protonados. El quitosano mostró buena solubilidad en condiciones ácidas.

A pH 7, las cadenas poliméricas se comenzaron a agregar (observación visual) probablemente, debido a los fenómenos de deprotonación producidos por el aumento de pH, la formación de enlaces de hidrógeno inter / intramoleculares y las interacciones hidrófobas. El polímero se tornó más insoluble y el valor del potencial ζ bajo significativamente.

La variación potencial ζ con el pH es similar para todos los PM de quitosano evaluados. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por Wang y col; donde las constantes de protonación (pKa) del quitosano con diferentes PM se determinaron mediante valoraciones potenciométricas y se concluyó que los valores de pKa para diferentes PM de quitosano no tienen diferencias obvias [104]. Es importante resaltar que el valor más alto del potencial ζ se alcanzó con el quitosano de mayor peso molecular (1250000 g mol⁻¹).

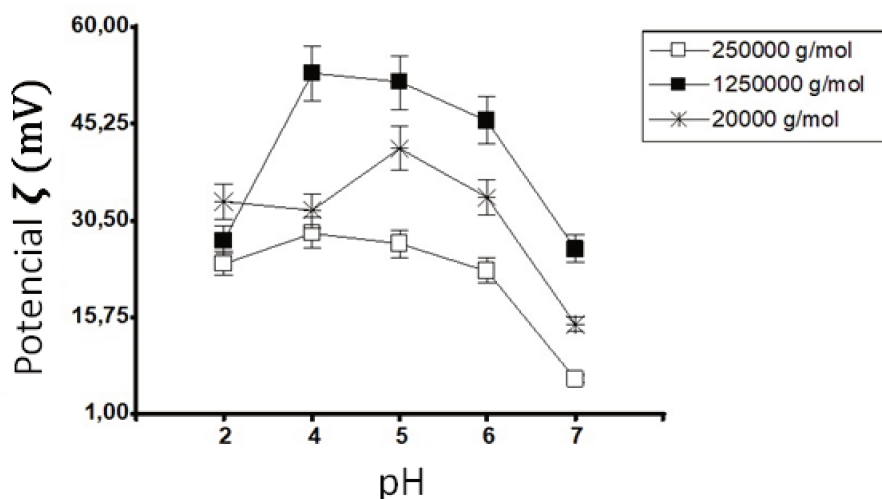


Figura 21: Variación del Potencial ζ de quitosanos con diferente peso molecular en función del cambio de pH.

6.5.3.3 Medición del potencial ζ de los complejos formados por *P. fluorescens* M1C y los quitosanos de diferente peso molecular

A partir de los resultados experimentales, los parámetros K , α y ζ_{\max} se determinaron mediante la ecuación (6.23). Los parámetros calculados a diferentes PM de quitosano y valores de pH se muestran en la Tabla 5. El parámetro K está directamente asociado con el CNP. Un aumento en este parámetro indica un aumento en la cantidad de quitosano por gramo de bacterias que se necesita para lograr alcanzar el punto de neutralización del complejo, a partir del cual la carga

del complejo bacteria-quitosano pasa de negativa a positiva. Por otro lado, ζ_{\max} y α están indirectamente asociados con el CNP, por lo tanto, un incremento en estos parámetros indica una disminución en la cantidad necesaria de quitosano.

Tabla 5: Parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales obtenidos de las mediciones del potencial ζ del complejo quitosano-bacteria.

Peso Molecular (g/mol)	pH	ζ_{\max}	K	α
20000	4	51,29 ± 0,62	0,008 ± 0,000	8,07 ± 2,51
20000	6	41,55 ± 1,58	0,050 ± 0,006	1,63 ± 0,23
20000	7	28,91 ± 2,47	0,013 ± 0,004	1,63 ± 0,69
1250000	4	62,79 ± 5,37	0,007 ± 0,001	2,91 ± 2,02
1250000	6	50,37 ± 6,08	0,050 ± 0,017	1,23 ± 0,36
1250000	7	33,04 ± 1,82	0,033 ± 0,007	1,70 ± 0,34
250000	4	57,08 ± 1,92	0,006 ± 0,000	12,10 ± 3,21
250000	6	43,86 ± 2,98	0,040 ± 0,010	1,33 ± 0,29
250000	7	31,31 ± 1,06	0,054 ± 0,003	5,61 ± 1,84

Los datos experimentales se ajustaron utilizando la ecuación 6 con el algoritmo lsqcurvefit del programa Matlab. Los intervalos asociados a los parámetros tienen un 95% de confianza.

Las Figuras 22, 23 y 24 muestran la variación del potencial ζ con α (g de quitosano / g de bacterias) para los diferentes PM de quitosano, 20000, 250000 y 1 250000 g mol⁻¹, respectivamente. En general, a pH 4, se puede observar un aumento brusco en el potencial de ζ con α , y el punto de saturación se alcanza más rápidamente, mientras que a pH 6 y 7 se requiere de más quitosano por gramo de bacterias para lograr este punto.

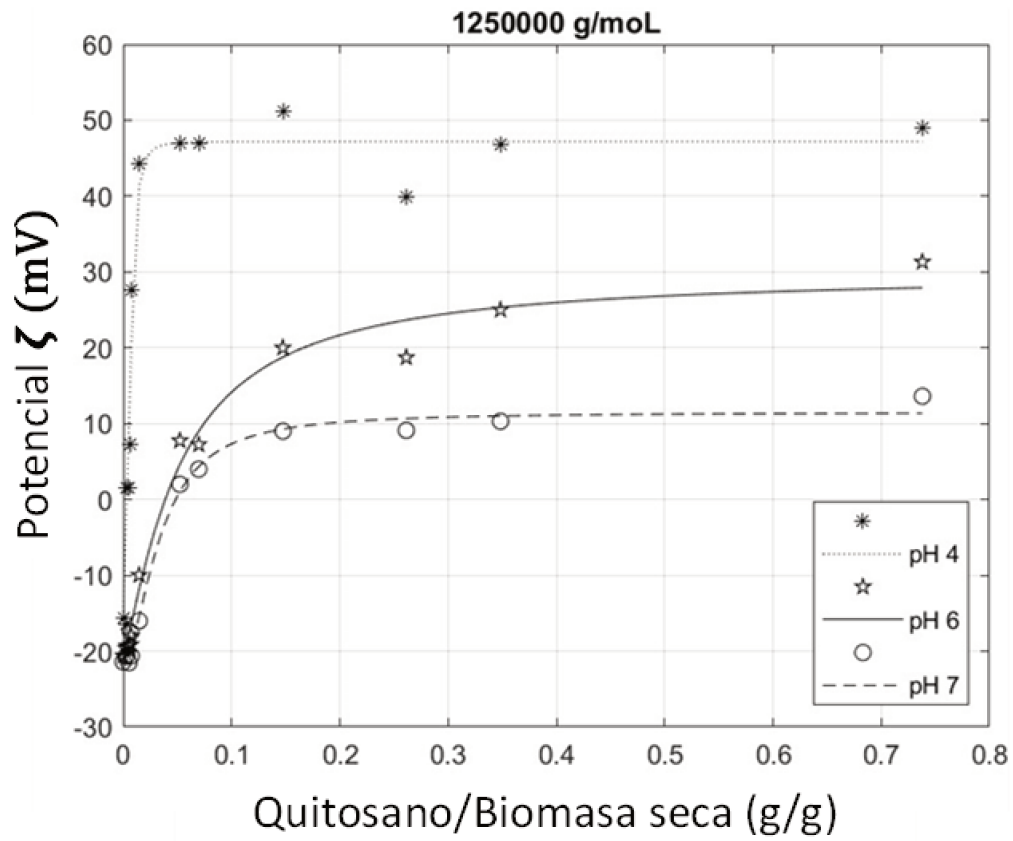


Figura 22: Variación del potencial ζ del complejo bacteria-quitosano ($1\ 250\ 000\ \text{g mol}^{-1}$) en función del cambio de pH. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas representan los valores de predicción.

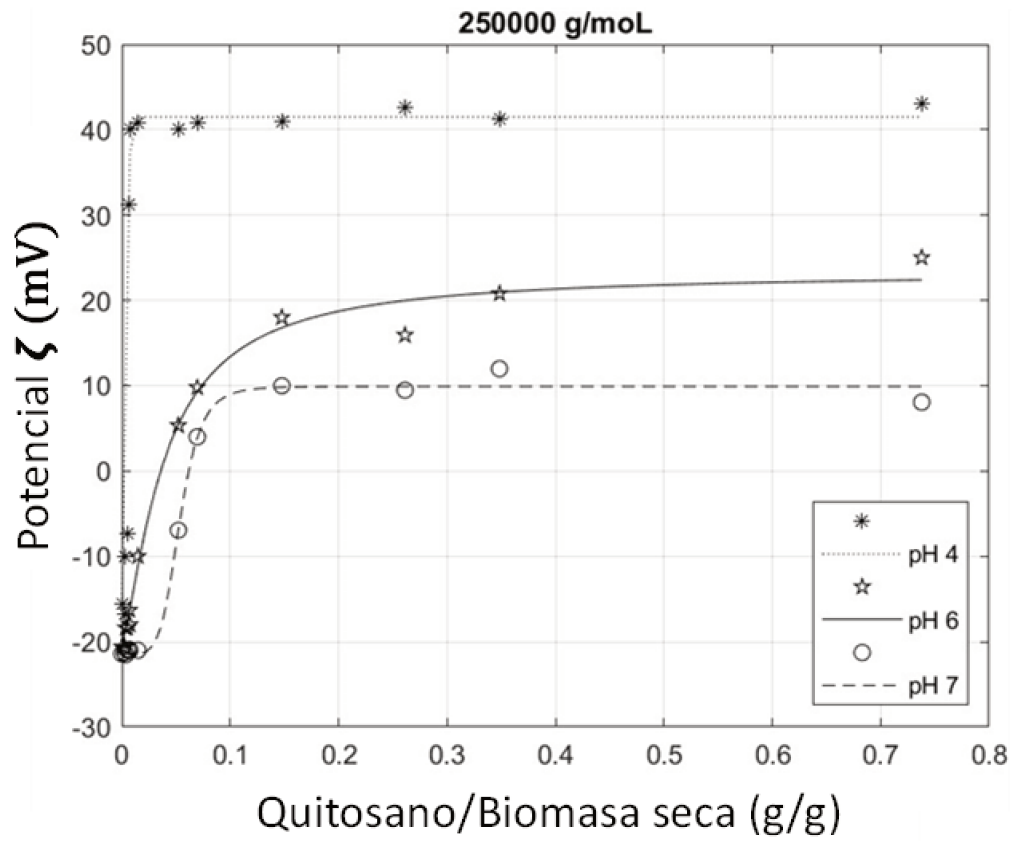


Figura 23: Variación del potencial ζ del complejo bacteria-quitosano ($250\ 000\ \text{g mol}^{-1}$) en función del cambio de pH. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas representan los valores de predicción.

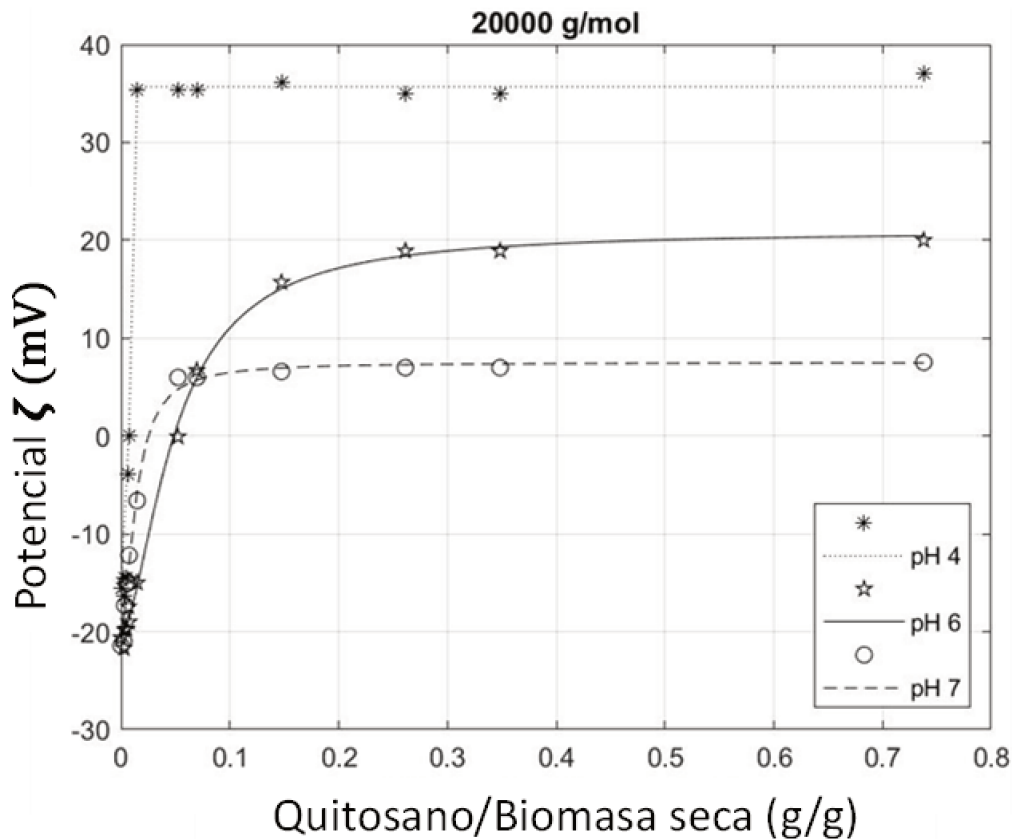


Figura 24: Variación del potencial ζ del complejo bacteria-quitosano ($20\ 000\ \text{g mol}^{-1}$) en función del cambio de pH. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas representan los valores de predicción.

La Figura 25 muestra las variaciones de los parámetros con los valores de pH para los diferentes PM de quitosano. Tal y como puede verse, cuando el valor de pH se incrementa de 4 a 6, k aumenta significativamente (Fig. 25 (A)). Por el contrario, α disminuye significativamente cuando el pH aumenta de 4 a 6 (Fig. 25 (B)). A diferencia de los otros parámetros, se puede observar que ζ_{max} disminuye de manera homogénea con el pH para todos los casos evaluados. El parámetro ζ_{max} del complejo con quitosano ($1250000\ \text{g mol}^{-1}$) arrojó un valor significativamente mayor que para los otros PM de quitosano evaluados (Fig. 25 (C)).

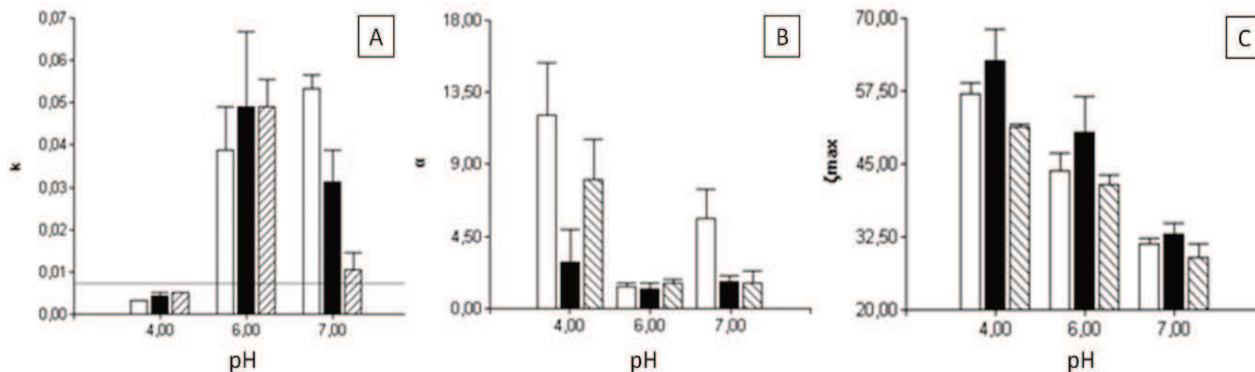


Figura 25: Variación de los parámetros (A) k , (B) α y (C) ζ_{max} frente al valor de pH. Se muestran los resultados para los a diferentes pesos moleculares de quitosano: 250000 \square 125000 \blacksquare y 20000 \square g mol⁻¹. Las barras representan los intervalos asociados a los parámetros con un 95% de confianza.

6.5.3.3.1 Efecto del peso molecular y el pH sobre el CNP

La Tabla 6 resume la intersección de las curvas de predicción con el eje x (CNP) para diferentes PM a pH 4, 6 y 7.

Tabla 6: Intersección del eje X para las curvas de predicción para diferentes pesos moleculares a pH 4, 6 y 7

α (g de quitosano / g de bacterias)	pH 4	pH 6	pH 7
1 250 000 g mol ⁻¹	0,007 ± 0,000	0,050 ± 0,004	0,025 ± 0,001
250 000 g mol ⁻¹	0,006 ± 0,000	0,037 ± 0,007	0,062 ± 0,000
20000 g mol ⁻¹	0,005 ± 0,002	0,037 ± 0,010	0,047 ± 0,003

El potencial ζ del complejo bacterias-quitosano se torna positivo a pH 4 cuando la relación quitosano: bacteria es alrededor de 0,007 g de quitosano por gramo de bacterias. Mientras que, para los otros valores de pH evaluados (pH 6 y pH 7), el potencial ζ se vuelve positivo cuando la relación quitosano: bacteria alcanza 0,05 g de quitosano por gramo de bacteria. Entonces, para neutralizar la carga que representan 0,003 g mL⁻¹ (1×10^9 UFC mL⁻¹) de *P. fluorescens*, la solución de quitosano debe ser 0,002% a pH 4 y 0,015% p / v a pH 6-7.

La concentración de quitosano a pH 6 y 7 es menor que la CS-MIC reportada por muchos investigadores, incluso para el estudio realizado en el marco de la presente tesis [77-80]. Esto

último indica que se puede desarrollar un complejo de bacterias-quitosano cargado positivamente trabajando entre pH 6 y 7 para los tres PM de quitosano evaluado.

6.5.3.3.2 Efecto del peso molecular y el pH en el SP

Otro aspecto que requiere un análisis especial es el punto de saturación, el que representa el valor del potencial ζ en la parte superior de las curvas (ζ_{sat}). Está directamente asociado con el parámetro ζ_{max} .

A pH 4, se necesitaron 0,05 g de quitosano / g de bacteria para alcanzar el SP con quitosano de PM 1 250000 g mol⁻¹. El valor potencial de ζ fue superior a 45 mV. Sin embargo, cuando se utilizaron los quitosanos de otros PM de (250000 y 20000 g mol⁻¹), la cantidad de polímero por gramo de bacteria requerida disminuyó a 0,015 g y se alcanzaron potenciales ζ superiores a 40 y 36 mV, respectivamente. A pH 7, se necesitaron 0,35 g de quitosano / g de bacterias para lograr el SP con quitosano de PM 1250000 g mol⁻¹, mientras que la formación del complejo con quitosano PM 250 000 g mol⁻¹ necesitó 0.15 g de quitosano / g de bacteria para lograr este punto. Finalmente, el PM de quitosano más bajo evaluado necesitó 0.05 g de quitosano / g de bacteria. Independientemente del peso molecular del quitosano, el valor del potencial ζ fue de alrededor de 10 mV en el SP. El potencial ζ más grande que se logró con el quitosano (1250000 g mol⁻¹) fue de 30 mV a pH 6. El potencial ζ para los otros quitosanos (20000 y 250000 g mol⁻¹) fue de 20 mV a pH 6.

En el SP, el quitosano de mayor peso molecular logro alcanzar el potencial ζ más alto. Esto es incompatible con los resultados obtenidos del estudio de la adsorción de quitosano-bacterias en otras investigaciones [108]. Sin embargo, de acuerdo a la teoría, un polímero de peso molecular más alto necesitaría más tiempo para lograr la configuración de equilibrio, lo cual incrementaría el lapso de tiempo para que otras cadenas puedan incorporarse a la superficie, en este sentido, existe la posibilidad de que se alcance un mayor potencial ζ . Lo cual concuerda con los resultados obtenidos de evaluaciones sobre otros tipos de polielectrolitos [104;106-108].

Los resultados obtenidos sugieren que es recomendable trabajar con pesos moleculares altos de quitosano cuando se pretende obtener partículas saturadas con el polímero y de carga positiva.

Se sabe que en el rango del potencial ζ (-30 a 30 mV), se incrementan los fenómenos de floculación. El fenómeno de floculación aumenta el tamaño del complejo bacteria-quitosano y la

actividad antifúngica bacteriana podría verse perjudicada. En condiciones ácidas (pH 4), el potencial ζ del complejo bacteria-quitosano es superior a 30 mV. Sin embargo, las condiciones ácidas podrían ser perjudiciales para la viabilidad de las bacterias. A pH 6, se necesitaron 0,8 g de quitosano / g de bacteria para obtener un potencial ζ superior a 30 mV con quitosano de PM 1250000 g mol⁻¹. Se requiere más del 0,25% p / v de quitosano para 1×10^9 UFC mL⁻¹ *P. fluorescens*. Esta concentración final de quitosano está por encima de la CS-MIC informada. Mientras que, el resto de los PM de quitosano evaluados no pueden alcanzar este valor potencial ζ en las diferentes proporciones de quitosano: bacterias estudiadas.

Se demostró entonces que no es posible formar complejos estables a la floculación entre bacterias y quitosano, a un pH aceptable para la viabilidad celular. Sin embargo, los resultados obtenidos permitieron aumentar la cantidad de bacterias que podemos añadir al soporte, en un principio la formulación LQB se diseñó con 0,025% de quitosano y una concentración de bacterias equivalente a 4×10^8 UFC/mL. En función de los resultados obtenidos, este número de bacterias puede aumentarse hasta 1.5×10^9 UFC/mL lo que equivale a 0,06 g de quitosano/ g de bacteria. Entonces en el rango de PM de quitosano desde 20000 a 1 250 000 g mol⁻¹, se puede alcanzar la mencionada concentración final de células manteniendo la densidad de carga neta positiva del complejo.

6.5.4 Distribución de las bacterias transportadas por el vehículo de aplicación (LQB) sobre diferentes espejos de agua

6.5.4.1 Aplicación de las bacterias inmersas en el vehículo formulado sobre agua estancada en *indoor*

Este trabajo propone el uso de una emulsión de aceite-en-agua como vehículo portador de bacterias en la superficie del agua. La diferencia de densidad entre el agua y el aceite, hace que las gotas puedan ascender hasta la interfaz agua-aire y transportando a los complejos adsorbidos en su superficie. Entonces para probar dicha hipótesis, se preparó una emulsión aceite-en-agua y se mezcló con el complejo quitosano- bacteria. De acuerdo a los resultados obtenidos previamente, se utilizó la concentración de lecitina (10%) que dio lugar a las emulsiones (EL) mejor estabilizadas, una concentración final de quitosano (0.025 % p/v) que este por debajo de la concentración crítica, y un pH (6) aceptable para las bacterias y que este por debajo del pKa

del quitosano. Paralelamente, se preparó una formulación de bacterias suspendidas en el caldo de crecimiento. Como control negativo se utilizó agua destilada.

Se tomaron alícuotas de cada una de los tratamientos y se depositaron sobre la superficie del agua. Luego se tomaron muestras a distintas distancias desde el punto de inoculación y se calculó la concentración de bacterias.

Todas las muestras que fueron recolectadas posterior a la aplicación de la formulación LQB arrojaron resultado positivo (presencia de *Pseudomonas fluorescens*), además su concentración resultó incontable, lo que quiere decir que existen al menos 30 colonias/10 μ L. Por otro lado, las muestras tomadas luego de la inoculación de bacterias suspendidas en una formulación acuosa tienen un máximo de 14 colonias por cada 10 μ L y un promedio de 2 colonias por cada 10 μ L (Tabla 7). No se detectó crecimiento bacteriano en las muestras tomadas del control negativo.

Tabla 7: Determinación de la cantidad de *P. fluorescens* en la interfaz (aire-agua) sobre agua estancada en *indoor*

Tratamiento	N	Media
Formulación LQB	200	>30 ^a
Bacterias en Caldo	200	2 ^b

^{a, b} Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos (K. Wallis $p < 0.0001$).

En función de los resultados obtenidos, se puede asegurar que se logró aumentar significativamente la concentración de bacterias en la superficie del agua utilizando el vehículo propuesto.

6.5.4.2 Aplicación de las bacterias inmersas en el vehículo formulado sobre agua estancada en exterior- Div, los andes

Los resultados obtenidos en *indoor* fueron prometedores y dieron lugar a que se pruebe la capacidad del vehículo para dispersar a las bacterias en espejos de agua de mayor tamaño. Una vez más, las mismas fueron mezcladas con el vehículo portador e inoculadas en la superficie del agua. En primer lugar, se aplicaron diferentes dosis para estimar una dosis mínima que les

permita a las bacterias cubrir toda la superficie. Tal y como se puede observar, a medida que se aumentó la dosis, aumento la cantidad de bacterias recuperadas desde la superficie del agua (Figura 26).

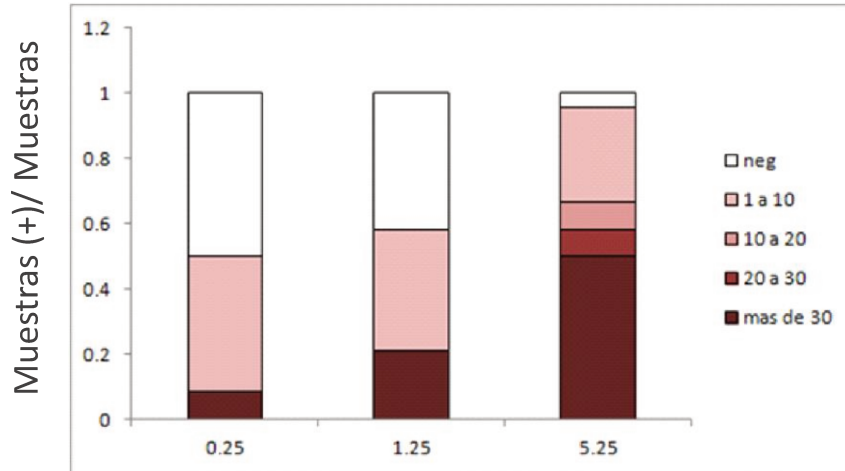


Figura 26: Determinación de la cantidad de *P. fluorescens* (expresadas en colonias recuperadas/10uL) en la interfaz (aire-agua) sobre agua estancada en exterior.

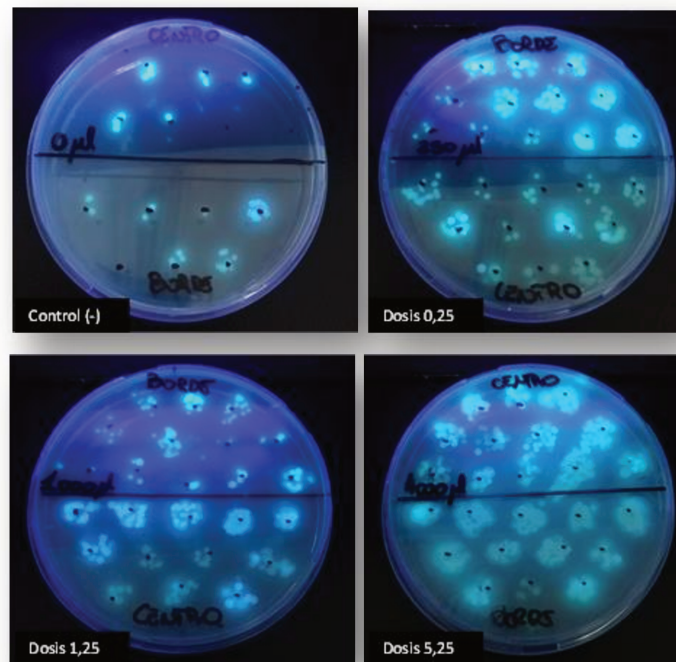


Figura 27: Imágenes de las placas de agar cetrimida, a donde se inocularon las muestras de bacterias recolectadas en cada uno de los tratamientos.

6.5.4.3 Aplicación de las bacterias transportadas por el vehículo formulado sobre agua estancada en exterior- Div. Parque Garay

Se realizó una nueva prueba, esta vez sobre una superficie aun mayor (Aprox. 2200 m²). Se utilizó una única dosis de 9×10^3 UFC/cm² y la inoculación se realizó con un rociador. Nuevamente se obtuvieron excelentes resultados, el 80% de las muestras recolectadas resultaron positivas y con un recuento superior a 30 colonias por gota. Cabe destacar, que el 20% restante, que arrojó resultado negativo, estaba localizado en la zona 1 (En dicha zona se podía ver material vegetal y suciedad acumulada la cual dificultaba el paso del agua). Es probable que este material y la estanqueidad de la zona evitaron que el producto llegara a la misma. Entonces si tenemos en cuenta únicamente la zona limpia, podemos decir que se obtuvieron mejores resultados que en la experiencia realizada en Div. Los andes, ello puede deberse a que, el uso de un rociador favorece la formación de microgotas que caen en diferentes puntos de la superficie generando diferentes centros de dispersión, mientras que la aplicación con la pipeta genera una única gota de mayor tamaño que se dispersa en un único punto en la superficie.

6.5.4.4 Aplicación de las bacterias transportadas por el vehículo formulado sobre agua estancada *indoor*. Efecto del peso Molecular del Quitosano

Teniendo en cuenta que el peso molecular es un factor que puede influir en la cantidad de puntos de anclaje a las bacterias y a las gotas de emulsión, se realizaron pruebas utilizando diferentes formulaciones LQB cada una conteniendo un peso molecular distinto.

En el siguiente gráfico se muestra la evolución de la cantidad de bacterias recuperadas desde la superficie en función del tiempo en las pruebas realizadas sobre bandejas en condiciones de laboratorio.

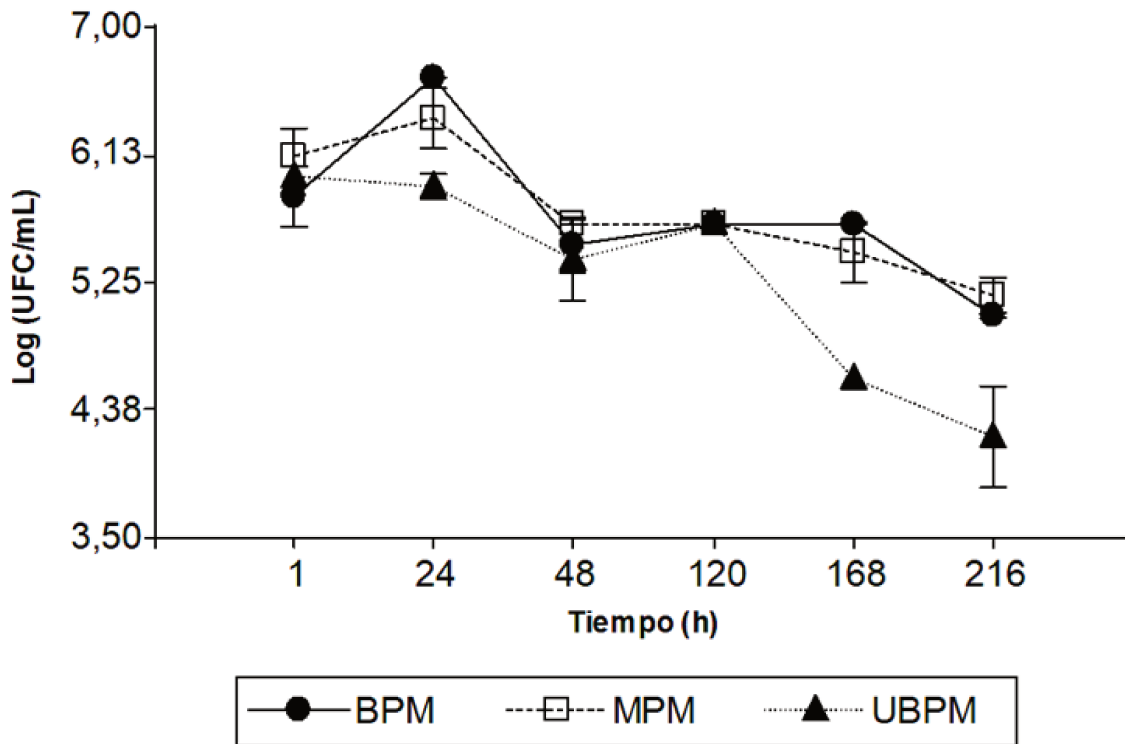


Figura 28: Variación de la cantidad de bacterias recuperadas desde la superficie en función del tiempo en las pruebas realizadas sobre bandejas en condiciones de laboratorio. Las barras indican la desviación estándar. BPM: Quitosano de Ultra Bajo Peso Molecular (20000 g/mol); Bajo Peso Molecular (250000 g/mol); Medio Peso Molecular (1.250.000).

En este caso, se inoculó una única dosis alta de formulación LQB, con el objetivo de lograr un 100% de cobertura de la superficie. Tal y como se observa, a medida que transcurre el tiempo, la cantidad de bacterias sobre la superficie comienza a disminuir. En las formulaciones que contienen quitosano de 20000g/mol (Ultra-Bajo PM) el número de bacterias cae significativamente a las 120 horas, a los 10 días cae 1.5 unidades logarítmicas. Mientras que con el resto de las formulaciones la disminución del número de bacterias en la superficie se reduce pasadas 168 horas desde la inoculación, a las 216 horas cae aproximadamente una unidad logarítmica.

6.6 Conclusiones

Se logró desarrollar un vehículo formado por una emulsión aceite-en-agua, estabilizada con lecitina. Las bacterias forman inicialmente un complejo con el quitosano, el que favorece su adsorción a la interfase de la emulsión.

En primer lugar, se logró obtener una emulsión aceite-en-agua estable a la floculación y a la coalescencia. La formulación óptima es la siguiente: 10% p / v de lecitina, una proporción de aceite igual ϕ : 0,5 y es estable en el rango de pH desde 3 a 7.

Al combinar a la emulsión con quitosano, se logró obtener una formulación estable para concentraciones de quitosano menores a 0.05% p / v en el rango de pH desde 5 a 7. A pH ácido (pH: 3) la mezcla de ambos compuestos en el rango de concentración evaluado arroja en todos los casos formulaciones inestables.

Las emulsiones estabilizadas con lecitina presentan densidad de carga negativa en todo el rango de pH evaluado, la misma se incrementa a medida que se incrementa el pH. Las dos cepas de bacterias antagonistas evaluadas arrojaron valores de potencial ζ cercanos a los -20 mV para el rango de pH entre 6-7. Todos los quitosanos evaluados presentan valores de potencial ζ positivos en el rango de pH de trabajo y, en todos los casos disminuye a medida que nos acercamos y superamos el valor del pKa del mismo. De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el quitosano puede servir de anclaje entre las bacterias y las gotas de emulsión. El quitosano de mayor peso molecular (1 250 000) resultó ser el de mayor densidad de carga positiva.

Se comprobó visualmente mediante microscopía confocal que la emulsión obtenida es de tipo aceite-en-agua y que el quitosano efectivamente se puede adsorber a la interfase de las gotas de emulsión.

En base a la prueba de CS-MIC realizada de modo de evitar perjudicar a la viabilidad de las bacterias antagonistas, la concentración de quitosano no debe superar nunca el valor de 0.075% p/v cuando se encuentra en combinación con las mismas formando parte de una solución a pH 6.

De los datos obtenidos, se obtuvo una formulación que contiene a los siguientes compuestos expresados en concentraciones finales: aceite de girasol ϕ : 0,25; Lecitina 2.5 %; Quitosano 0.025 % y *Pseudomonas fluorescens* 4×10^8 UFC/mL a pH 6.

Se realizó un análisis exhaustivo del complejo formado por bacterias y quitosano, haciendo hincapié sobre la influencia del peso molecular de este polímero.

El potencial ζ del complejo de bacterias quitosano es mayor en condiciones ácidas. Sin embargo, en condiciones de fuerte acidez (pH 4), la viabilidad de las bacterias podría verse afectada. Por tanto, es recomendable trabajar a pH 6, el cual es compatible con la viabilidad celular y permite formar complejos quitosano-bacteria a donde la cantidad de quitosano necesaria para alcanzar un potencial ζ neto positivo es menor a los CS-MIC reportados para todos los PM evaluados en el rango de pH 6-7.

Las bacterias mezcladas con el quitosano de mayor PM ($1\ 250\ 000\ \text{g mol}^{-1}$) lograron cubrirse con una mayor cantidad de polímero que aquellas que fueron mezcladas con quitosanos de menor peso molecular, así como también, alcanzaron el mayor valor de potencial ζ en el punto de saturación (SP). Sin embargo, las concentraciones de quitosano necesarias para alcanzar el dicho punto son mayor a la CS-MIC de quitosano.

Al valor de pH recomendado (pH 6), la cantidad de quitosano necesaria para evitar problemas de floculación (ζ potencial $> 30\ \text{mV}$), podría ser perjudicial para la viabilidad de las bacterias.

Se pudo calcular exactamente la cantidad de bacterias que pueden formar parte del complejo manteniendo una densidad de carga netamente positiva. De esta manera, la cantidad de células inmersas la formulación LQB se puede aumentar desde 4×10^8 UFC/mL hasta 1.5×10^9 UFC/mL lo que equivale a 0,06 g de quitosano/ g de bacteria.

En ensayos en *indoor* realizados en bandejas de $2025\ \text{cm}^2$, se demostró que es posible recuperar al menos 15 veces más bacterias de la interfaz aire-agua utilizando el vehículo desarrollado en comparación con la formulación acuosa de *Pseudomonas fluorescens*.

En el ensayo realizado en piletones de $16,52\ \text{m}^2$ en exterior (Div. Los andes) también se obtuvieron buenos resultados. La cantidad de bacterias recuperadas desde la superficie se incrementó a medida que se aumentó la dosis de aplicación desde 6×10^2 UFC/ cm^2 hasta 1.3×10^4 UFC/ cm^2 . En la prueba realizada en el Parque Garay (Aprox. $2200\ \text{m}^2$), a donde aplicó una dosis igual a 9×10^3 UFC/ cm^2 , se logró cubrir toda la superficie de la “zona limpia” con bacterias desde un único punto de aplicación. Si se comparan ambas pruebas en exterior, se obtuvieron mejores resultados en la prueba realizada en el parque, ello puede estar relacionado a que la aplicación en Div. Los andes fue realizada con una pipeta, mientras que, en el parque fue realizada con un aspersor.

Por último, se realizaron en bandejas ensayos de dispersabilidad de bacterias inmersas en vehículos formados por quitosano de diferente PM. Las formulaciones formadas por los quitosanos de mayor peso molecular evaluados ($250000\ \text{g mol}^{-1}$; $1250000\ \text{g mol}^{-1}$) lograron mantener en la superficie una mayor cantidad de bacterias viables durante un mayor periodo de tiempo.

Capítulo II

Evaluación de la actividad antagonista de la cepa *P.fluorescens* M1C sobre el patógeno causante de la enfermedad del tallo del arroz (*S. oryzae*) en condiciones *in vitro* y sobre macetones con plantas de arroz.

7.1 Introducción

El control biológico o biocontrol utilizando microorganismos se ha convertido en una alternativa en el tratamiento de patógenos de plantas, siendo considerado como una de las prácticas más eficientes y ecológicas en el desarrollo de una agricultura sostenible. Por tal motivo, algunas especies bacterianas son consideradas excelentes candidatos, tal como *Pseudomonas fluorescens*. Esta especie bacteriana habita la rizósfera, promueve el crecimiento vegetal y exhibe una gran capacidad de adaptación y colonización a diferentes tipos de suelos, por lo que se asocia a una gran variedad de especies vegetales. *P. fluorescens* ofrece efectos directos e indirectos en la interacción con plantas, entre los efectos directos se encuentran la síntesis de fitohormonas, producción de sideróforos, solubilizadoras de minerales y síntesis de una gran cantidad de compuestos volátiles. Los efectos indirectos incluyen la inhibición de hongos fitopatógenos que estén interactuando en el mismo ambiente rizosférico.

Pseudomonas fluorescens es una especie bacteriana, Gram-negativa, con forma de bacilo, que tiene dimensiones que están entre 0.5-1.0 x 1.5-5 μm , presentan movilidad debido a que poseen varios flagelos polares, tienen un metabolismo energético estrictamente aerobio y una nutrición quimiorganótrofa que no requiere factores de crecimiento. Sintetizan gránulos de polihidroxialcanatos que sirven de reserva de material celular. Una de las características de esta especie es la producción de compuestos fluorescentes, de ahí el origen de su nombre. Por ejemplo, producen pioverdina, que es un pigmento soluble en agua, presenta fluorescencia bajo luz ultravioleta y su producción es estimulada cuando el hierro es limitante en el medio. Por lo general, las condiciones para su crecimiento óptimo son temperaturas entre 25 y 30°C a un pH neutro [109].

Desde el año 2007, en el INTA EEA Concepción del Uruguay, se comenzó a investigar sobre la posibilidad de la aplicación del control biológico en enfermedades fúngicas de arroz. Se realizaron más de 100 aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* provenientes de la rizosfera de arroz y de suelos de arrozceras de Entre Ríos y Chaco. Estos aislamientos fueron evaluados in vitro frente a patógenos causantes de ETV. Del total de estos aislamientos, catorce mostraron la mayor capacidad antagónica en cultivos duales bacteria-hongo. Los aislamientos fueron pre-seleccionados para ser evaluados en microparcelas en el campo. Como resultado de este ensayo, 6 aislamientos combinados de *Pseudomonas* de Entre Ríos, lograron reducir la incidencia de la pudrición del tallo entre un 57-75% y un 30% a los 76 y 94 días después de la siembra, respectivamente. Durante el periodo 2008/2009 este grupo combinado de seis cepas, fue aplicado en suspensiones acuosas en macroparcelas en el campo, lográndose una reducción

del 40 y 70% de las enfermedades del tallo y la vaina de arroz, respectivamente [46-47]. Posteriormente, con el objetivo de seleccionar una cepa candidata para desarrollar un producto de biocontrol contra las ETV, realizaron un análisis exhaustivo *in vitro* de las capacidades de biocontrol que presentan cada una de las cepas evaluadas a campo. En este trabajo, se encontró que los seis aislamientos bacterianos con antecedentes de biocontrol sobre ETV, poseen más de un mecanismo potencial de acción que podrían intervenir en el control de los patógenos evaluados. Estas características de presentar varios mecanismos son consideradas como una ventaja al momento de seleccionar un agente de control biológico para la formulación comercial. En particular se evaluó la capacidad de producir compuestos difusibles, Acido cianhídrico (HCN), sideróforos, pioverdina y enzimas líticas.

El efecto de los compuestos difusibles de los aislamientos nativos sobre los patógenos se corroboró por diferencia de crecimiento en placas de Petri. En una evaluación temprana, todos los aislamientos produjeron efecto de inhibición sobre *R. oryzae* y *S. oryzae*, mientras que solamente la cepa M1C retardó el crecimiento de *R. solani*. En cambio, en evaluaciones más tardías, la cepa M1C mantuvo el efecto sobre *R. oryzae* y *S. oryzae*, pero lo perdió para *R. solani*.

El HCN es un inhibidor potencial de enzimas que participan en procesos metabólicos importantes, incluyendo la respiración. En diversas cepas de *P. fluorescens* se ha detectado este compuesto y se lo ha relacionado con su actividad biocontroladora [110]. Los resultados que fueron obtenidos demostraron que los seis aislamientos nativos produjeron este compuesto, aunque variaron cualitativamente en las cantidades detectadas. Esto se observó en el cambio de la intensidad de color de los discos impregnados con picrato/ Na_2CO_3 , para cada uno de los aislamientos. Nuevamente, se destacó por coloraciones más intensas el aislamiento M1C.

Los sideróforos son metabolitos secundarios producidos durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, que ciertas bacterias producen para atraer a micronutrientes esenciales faltantes, como el caso del hierro. En medio agarizado CAS (Cromo. Azurol S) fue detectado un mayor cambio de color desde el azul al naranja en el aislamiento M1C, en relación a los demás aislamientos nativos, ratificando su potencial biocontrolador.

El medio KB es un medio diferencial que permite diferenciar a las especies de *Pseudomonas* del grupo fluorescentes, por ejemplo *P. fluorescens*, de otras especies que no producen el pigmento pioverdina. Este compuesto es secretado como metabolito secundario durante la fase estacionaria de crecimiento [111]. Todos los aislamientos nativos manifestaron la producción de dichos pigmentos verde amarillentos en medio líquido, fluorescentes bajo luz UV.

Las enzimas líticas (proteasas, quitinasas, celulasas) actúan degradando la pared celular del patógeno. La presencia de este mecanismo es importante en los agentes de control biológico ya que mediante la inhibición/muerte de los patógenos, los biocontroladores colonizan rápidamente la raíz [102]. A través de la siembra en medio LDA (Leche descremada agarizada) fue determinada cualitativamente la capacidad proteolítica de los aislamientos nativos. Aplicando esta metodología, todos produjeron proteasas, aunque se detectaron diferencias entre ellos en el tamaño de la zona de hidrólisis. Una vez más, M1C mostro los mejores resultados.

La cepa M1C produjo enzimas, sideróforos y HCN con una aparente mayor actividad y en menor tiempo que las otras y también, demostró que los metabolitos secundarios producidos tienen la capacidad de afectar a los tres patógenos de las ETV [48]. Es por ello que la misma fue seleccionada para continuar con el desarrollo de un producto de biocontrol. En este sentido, en el capítulo previo se describió el desarrollo de un vehículo que permite dispersar y concentrar a dichas bacterias (M1C) en la superficie del agua, favoreciendo de esta manera el contacto con los hongos patógenos, responsables de las ETV, en el sitio de infección. Sin embargo, la inclusión de un agente externo (Vehículo) puede influir sobre la actividad biocontroladora de la bacteria. Es por ello que, resulta necesario evaluar la actividad antifúngica de las bacterias inmersas en el vehículo de aplicación en condiciones *in vitro* e *in vivo*. En esta sección se va a hacer especial hincapié en el estudio de la actividad del antagonista contra *S.oryzae*.

En este capítulo se estudian aspectos teóricos relacionados con el manejo agronómico del cultivo del arroz y la enfermedad del tallo del arroz. También se incluyen los resultados obtenidos de los análisis realizados sobre la capacidad antagónica de la cepa M1C inmersa en el vehículo de aplicación contra *S. oryzae*.

Se plantean los siguientes objetivos específicos.

7.2 Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antagonista en condiciones *in vitro* de la cepa *P.fluorescens* M1C , transportadas por el vehículo de aplicación, sobre el patógeno causante de la enfermedad del tallo del arroz (*S. oryzae*). También se analizará el efecto de la cantidad de bacterias, medio de cultivo y peso molecular del quitosano.
- Analizar la actividad antagonista en macetones en campo de la cepa *P.fluorescens* M1C, transportadas por el vehículo de aplicación, sobre el patógeno causante de la enfermedad del tallo del arroz (*S. oryzae*).

- Estudiar la actividad antagonista en macetones en laboratorio de la cepa *P.fluorescens* M1C, transportadas por el vehículo de aplicación, sobre el patógeno causante de la enfermedad del tallo del arroz (*S. oryzae*). Adicionalmente, se evaluará el efecto de la cantidad de inoculaciones.

7.3 Cultivo del arroz y ETV

7.3.1 El cultivo del arroz

7.3.1.1 Taxonomía del arroz

El arroz pertenece a las fanerógamas, tipo Espermatofitas, subtipo Angiospermas, clase Monocotiledoneas, orden Glumifloras, familia Gramineas, subfamilia Panicoideas, tribu Oryzae, subtribu oryzineas, genero *Oryza* [113-115]. Las especies del género *Oryza* son numerosas y los taxónomos las han clasificado de diversa manera. Sin embargo, solo dos especies de arroz se cultivan actualmente, *Oryza sativa* L., de origen asiático y *Oryza glaberrima* Steud, de origen africano. La expansión del cultivo se debe a la primera especie; la segunda solo se encuentra en el oeste de África [113].

7.3.1.2 Variedades de arroz

Producto de la domesticación del arroz silvestre en diferentes ambientes, surgen tres grupos o tipos de arroz: índica, japónica y bulù [116].

Tipo índica: El mismo se cultiva en los trópicos y constituye el 85% del mercado mundial. De tallo largo, macollamiento denso, hojas largas e inclinadas de color verde claro y grano mediano a largo. Posee un alto contenido de amilosa, lo que le otorga mayor resistencia a la cocción.

Tipo japónica: Se cultiva principalmente en Japón y China. A diferencia del tipo indica, se componen de hojas erectas de color verde oscuro, y tienen una capacidad de macollamiento menor. Presentan una mayor respuesta al nitrógeno, son insensibles al fotoperiodo y toleran las bajas temperaturas. Consta de granos cortos y anchos, con bajo contenido de amilosa.

Tipo javánica o bulú: Se cultiva principalmente en Java. Morfológicamente similares a las variedades de tipo japónica, pero sus hojas son más anchas y pubescentes, emiten pocas macollas y la planta es fuerte y rígida. Insensibles al fotoperiodo y sus granos son aristados.

7.3.1.3 Morfología

El arroz es una gramínea anual, de tallos cilíndricos y huecos compuestos por nudos y entrenudos, hojas de lámina plana y angosta, unidas al tallo mediante vainas y la inflorescencia en panícula. El tamaño de la planta varía de 0.4 m (enanas) hasta más de 7.0 m (flotantes) [117]. La planta comprende órganos vegetativos: raíces, tallos, hojas y órganos reproductores; este último es la panícula formada por espiguillas.

Raíz: La planta de arroz puede estar compuesta de dos clases de raíces, las seminales o temporales y las secundarias, adventicias o permanentes. Las raíces seminales, poco ramificadas, sobreviven corto tiempo después de la germinación, siendo luego reemplazadas por las raíces adventicias, las cuales brotan de los nudos subterráneos de los tallos jóvenes.

Tallo: El tallo está formado por la alternación de nudos y entrenudos. En cada nudo o región nodal se forman una hoja y una yema, esta última puede desarrollarse y formar un hijo o macolla.

El septo es la parte interna del nudo que separa los dos entrenudos adyacentes. Las hojas se unen al tallo a través de las vainas. Un tallo con sus hojas forma una macolla.

Estas se desarrollan en orden alterno en el tallo principal. Las macollas primarias se desarrollan de los nudos más bajos, a partir de estas se producen macollas secundarias y terciarias. El conjunto de macollas y el tallo principal forman la planta. El número total de macollas es una característica varietal, que puede variar según el sistema de cultivo y el medio ambiente.

Hoja: Las hojas de la planta de arroz están distribuidas en forma alterna a lo largo del tallo. En cada nudo se desarrolla una hoja. La primera hoja que emerge de un nudo basal del tallo principal se denomina prófalo. Esta estructura asegura a las macollas jóvenes al tallo principal. La última hoja que nace en el tallo se encuentra debajo de la panícula, y se denomina hoja bandera.

Flores: Las flores de la planta de arroz están agrupadas en una inflorescencia denominada panícula. La panícula está situada sobre el nudo apical del tallo, que carece de hojas y yemas, allí pueden originarse la primera o las cuatro primeras ramificaciones de la panícula, y se toma

como punto de referencia para medir la longitud del tallo. En cada nudo del eje principal (raquis) nacen, individualmente o por parejas, ramificaciones primarias, las cuales a su vez dan origen a ramificaciones secundarias de donde brotan las espiguillas, unidad básica de la inflorescencia. La flor consta de seis estambres y un pistilo. Los estambres son filamentos delgados que sostienen las anteras, las cuales contienen los granos de polen. En el pistilo se distinguen el ovario, el estilo y el estigma.

Semilla: La semilla de arroz es un ovario maduro, seco e indehisciente. El embrión está situado en el lado central de la semilla cerca del endospermo, que provee alimento al embrión durante la germinación. El embrión consta de la plúmula u hojas embrionarias y la radícula o raíz embrionaria primaria. La plúmula está cubierta por el coleóptilo y la radícula está envuelta por la coleorriza.

7.3.1.4 Fisiología

En las plantas que producen semilla, se distinguen tres fases de desarrollo, las cuales tienen períodos de crecimiento definidas en cuanto a la diferenciación de la planta y los días de duración de estas fases [117].

Fase vegetativa

De la germinación a la emergencia: Comienza con la siembra de la semilla seca y un moje de germinación posterior, a donde la semilla absorbe agua, se hincha e inicia el metabolismo de sus reservas, dando lugar al desarrollo del embrión. Durante la emergencia la primera hoja, que carece de lámina, rompe el coleóptilo y se hace visible sobre la superficie del suelo.

Plántula: Esta etapa tiene una duración de 14 a 20 días. Al principio la plántula de arroz depende totalmente de las reservas del endospermo, entre el séptimo y el octavo día, comienza a fotosintetizar y absorber nutrientes, momento en el cual se independiza de la semilla y su materia seca se incrementa rápidamente. Durante esta etapa la radícula y raíces seminales son reemplazadas por raíces secundarias adventicias. Al final de este periodo la quinta hoja emerge y se hace visible. Luego de dicha etapa las plántulas de arroz son trasplantadas.

Macollamiento: Esta etapa tiene una duración de 25 a 55 días. Luego del trasplante, la planta sufre de estrés durante 7 días. Durante esta etapa se produce un crecimiento muy activo, los macollos emergen de las yemas auxiliares que se encuentran en los nudos y se acumula almidón en las vainas de las hojas.

Elongación del tallo: Durante esta etapa se produce la elongación del 4to entrenudo del tallo principal, se inicia el primordio floral y la hoja número 11 emerge completamente. En variedades de ciclo corto las etapas de máximo macollamiento, elongación del tallo e iniciación de la panícula ocurren casi simultáneamente.

Fase reproductiva

Iniciación de la panícula: La diferenciación del meristemo en el punto de crecimiento del tallo, permite el inicio del primordio floral. Este momento marca el término de la fase vegetativa y el inicio de la fase reproductiva de la planta de arroz. El primordio floral es visible a simple vista en un período de 10 días después de su iniciación.

Desarrollo a emergencia de la panícula (embuche): Ocurre entre 12-16 días luego de la diferenciación. Durante esta etapa la panícula se desarrolla dentro de la vaina de la hoja bandera, produciendo el embuchamiento o engrosamiento de la misma, y comienzan a observarse algunos granos, se dice que el arroz está en etapa de preñez. Al final de esta etapa emerge la hoja Nro. 12.

Floración: Esta etapa inicia cuando la panícula sale de la vaina de la hoja bandera (4 a 7 días). Continúa con la apertura de las espiguillas, es seguida por la antesis o salida de las anteras, dehiscencia o apertura de las anteras y caída del polen, que al depositarse en el estigma y llegar al ovario, lo fertiliza. Para esta etapa sólo quedan 4 hojas.

Fase de maduración

Grano lechoso: Esta etapa se caracteriza por la acumulación de un líquido blanco de consistencia lechosa dentro del grano de arroz. Durante la misma las hojas basales continúan cayéndose, mientras que la hoja bandera y las dos inmediatamente inferiores mantienen su coloración verde. La panícula, también de color verde, comienza a curvarse.

Grano pastoso: Durante esta etapa la porción lechosa del grano se endurece, los granos de la panícula empiezan a cambiar de color verde a amarillo y el cultivo empieza a tornarse amarillento debido a la senescencia de tallos y hojas inferiores. Al final de esta etapa sólo permanecen dos hojas en cada macolla (hoja bandera y hoja anterior), las que empiezan a secarse en sus ápices.

Grano duro o madurez dura: Esta etapa marca el final del ciclo de vida del arroz. El arroz alcanza su madurez a los 35-40 días luego de la polinización. Los granos maduros son duros, de color amarillo y su contenido de agua no supera el 20%. La panícula, por el peso de los granos, se encuentra a 180°, colgando del tallo. En este momento las hoja bandera y anterior se secan por completo, aunque en algunas variedades pueden permanecer verdes

7.3.1.5 Etapas para la producción del cultivo

Preparación del terreno: Esta actividad se desarrolla preferentemente en otoño-invierno. Puede extenderse también hasta principios de primavera. El cultivo se inicia con la actividad de preparación del terreno, en donde las técnicas varían mucho dependiendo de los diferentes tipos de suelo y de la disponibilidad hídrica de la zona. El objetivo de esta actividad es dejar lo mejor posible el lote como para poder realizar una buena siembra. La preparación del suelo implica las siguientes etapas:

Manejo de rastrojos y cobertura: El rastrojo remanente de cultivos anteriores incide de manera directa sobre las propiedades físico químicas del suelo, por lo cual resulta fundamental realizar un adecuado manejo del mismo. Existen diferentes alternativas para el tratamiento de los rastrojos, entre las que podemos mencionar, la quema de rastrojos, el pastoreo intensivo, o el picado y la incorporación del mismo mediante el uso de herramienta pesada.

Laboreo primario: El mismo abarca el borrado de huellas y taipas, para ello se utilizan rastras a discos livianas, pesadas o semi-pesadas según las condiciones del terreno. Continúa con el emparejamiento del terreno, que resulta de mucha utilidad para facilitar el riego y drenaje interior de los lotes.

Laboreo secundario: Todas las tareas realizadas durante esta etapa están relacionadas con el manejo del agua dentro de los lotes. Las mismas incluyen, marcación y construcción de taipas y, la formación de micro drenajes. Los suelos

pueden ser preparados en condiciones secas o de fangueo, la preparación de tierras bajo condiciones de inundación o de fangueo, se recomienda cuando se cuenta con el equipo e infraestructura necesaria para mantener una lámina de agua permanente en el cultivo de arroz. El sistema de fangueo se recomienda para la producción de semilla o bien para la producción de granos de buena calidad para consumo. Sin embargo, el fangueo es más costoso que las siembras en seco.

Siembra: Esta actividad se desarrolla preferentemente en primavera. En el cultivo del arroz se utilizan varios métodos de siembra, cuya aplicación depende de las facilidades que tenga el productor y del área a sembrar. Se diferencian dos sistemas de siembra: directa (con semilla seca en suelos secos o fangueados o pre-germinada en suelos fangueados) e indirecta o por trasplante, esta última suele utilizarse para disminuir la cantidad de semilla por área de siembra o para erradicar malezas nocivas.

Abonado: los fertilizantes son empleados para suministrar elementos como nitrógeno, fósforo, potasio y zinc que puedan limitar el rendimiento de los cultivos de arroz.

Riego: Esta actividad se desarrolla preferentemente 15 días posteriores al nacimiento del cultivo y durante 100 días. El riego suele comenzarse a fines de octubre, principios de noviembre. Es importante empezar cuando el arroz se encuentra entre 4 y 5 hojas, con una planta de arroz pequeña. El consumo promedio del cultivo durante el riego es de 13000 m³/ha. Este valor incluye la cantidad de agua que el cultivo transpira para producir su biomasa, las pérdidas de evaporación e infiltración de la chacra y en la conducción del agua, la cantidad de agua necesaria para saturar el perfil del suelo y por último incluye el mantenimiento de una altura de agua constante (lámina de 5-7cm) por unos 100 días. Algunos elementos químicos que pueden estar presentes en el agua como cloro, boro y sodio, producen efectos negativos en concentraciones elevadas sobre la nutrición del cultivo.

El sistema de conducción, distribución, y desagüe, de las arroceras puede resumirse en los siguientes componentes:

Fuente de agua: El circuito de riego comienza en la fuente de agua; que puede ser una represa, el río, alguna laguna, o bien una perforación.

Instalaciones de bombeo: Tienen la función de extraer el agua desde su origen, e impulsarla hacia las chacras a través de los canales.

Canales de riego: son los caminos por los que se conduce y distribuye el agua hasta cada uno de los lotes a regar. Es aconsejable que se construyan acompañando las zonas más altas del terreno. Los canales deben estar diseñados con una pendiente que permita una velocidad del agua entre 0,4 y 1,2 m/s. Los canales se pueden clasificar en:

Canal Principal: es el primer canal por donde viene el agua desde la fuente, suele ser el más grande.

Canales secundarios: son una derivación del primario, y suelen ser más pequeños que el Primario.

Canales Terciarios: que son derivaciones del Secundario y son los que distribuyen el agua dentro de los cuadros.

Taipas: Son bordos o camellones hechos con tierra y que cumplen la función de dividir los cuadros o lotes en espacios de DESNIVEL CONTROLADO, es decir entre una taipa y la siguiente, hay un desnivel que debe permitir mojar y mantener con una lámina de agua a la totalidad del lote.

Desagües: Son los canales por los que escurre el agua que debe salir de la chacra. Generalmente deben estar localizadas en las partes más bajas del terreno.

Existen diferentes sistemas de riego:

- Riego continuo con lámina estática: 2,5 a 7 cm de profundidad.
- Inundación continua con lamina variable.
- Riego de rotación: a diferencia de las anteriores el riego no es continuo por lo que a veces el terreno puede llegar a secarse.
- Riego por aspersión.

Cosecha: Esta actividad se desarrolla preferentemente en los meses de febrero, marzo y abril. Una vez completado el ciclo biológico de la planta de arroz, encontrarse maduro el grano y haberse alcanzado la humedad deseable de cosecha (21-24% de humedad de grano) se procede a recolectar el grano de arroz. Esta actividad es generalmente mecánica y dependiente también de los factores ambientales. Una vez cosechado el grano, se lo debe acondicionar a través de un proceso de limpieza y secado, para ser almacenado con la humedad recomendable de almacenaje y comercialización del mismo.

Manejo Post Cosecha: El correcto manejo de los rastrojos, posterior a la cosecha, es la primera barrera que existe contra la infección de patógenos que, habiendo infectado al cultivo, pueden sobrevivir en dichos rastrojos e infectar al siguiente cultivo. Este es el caso del hongo patógeno *S. oryzae*, causante de la enfermedad del tallo de arroz.

7.3.2 Enfermedad del tallo del arroz

La enfermedad del tallo del arroz fue reportada por primera vez desde Italia por Cattaneo en 1876 [18]. Desde entonces se sabe que ocurre en varios países de Asia (Japón, India, Sri Lanka, Myanmar, Bangladesh, Birmania, China, Indonesia, Vietnam, Irán, Irak, Pakistán, Taiwán, Tailandia y Filipinas), Europa (Bulgaria, Francia, Portugal, Turquía y España), África (Madagascar, Mozambique, Egipto, Somalia y Kenia), América (Estados Unidos, Venezuela, Brasil, Costa Rica, Colombia, Guyana, Panamá, Surinam, Trinidad y Tobago y Argentina) y Australia [118-123].

Esta enfermedad es causada por hongos, que pertenecen a la familia *Magnaporthaceae*. Según el estado vital del hongo, es denominado de diferentes maneras, en su estado teleomorfo se conoce como *Magnaphorthe salvinii*, en su estado anamorfo, según produzca esclerocios o conidios se denomina *Sclerotium oryzae* o *Nakataea sigmoidea*, respectivamente.

Los esclerocios producidos por el hongo juegan un papel importante en el inicio y propagación de la enfermedad. Los esclerocios producidos por este hongo son de color negro, redondos, de pequeño tamaño (180-200 μm de diámetro) y se hallan en abundancia dentro del tallo cuando la infección es severa. Los esclerocios que pasan el invierno flotan en la superficie del agua durante varias operaciones de labranza, entran en contacto con las plantas, germinan y, causan infección a través de la vaina de la hoja, la raíz y la base del tallo. Se ha observado que la incidencia y la gravedad de la enfermedad están directamente relacionadas con el número de esclerocios

presentes en la capa superior del suelo antes de la siembra [124]. Se ha descubierto que las plantas son más susceptibles en la etapa de elongación del entrenudo, y la enfermedad se ve favorecida por la alta humedad y la temperatura, los fertilizantes nitrogenados, la siembra densa y el ataque del Barrenador del tallo, el añublo del nudo, el Saltahojas pardo y los Jasids.

La enfermedad aparece en forma de pequeñas lesiones negras irregulares en la vaina externa de la hoja cerca del nivel del agua en la etapa de macollamiento medio. A medida que avanza la temporada, las lesiones aumentan de tamaño y el hongo se desplaza hacia adentro, produciendo lesiones en las vainas internas de las hojas. Posteriormente, el hongo infecta las cañas, provocando la pudrición parcial o total y el acame prematuro del cultivo (Figura 29a). Las plantas severamente infectadas producen granos parcialmente llenos o sin llenar. Las plantas infectadas se pueden arrancar fácilmente del suelo debido a la pudrición de la corona. Se puede encontrar micelio grisáceo oscuro dentro de la vaina y el culmo (Figura 29b), que se convierte en numerosos esclerocios pequeños, redondos y negros cerca de la madurez (Figura 29c).



Figura 29: Infección en plantas de arroz provocadas por el hongo patógeno *Sclerotium oryzae*. En cada figura se muestran diferentes estadios de la infección.

7.4 Materiales y Métodos

El quitosano (MW:36999 g mol⁻¹; Cps: 95; desacetilación (DA) > 95%) y la lecitina de soja fueron suministrados por SAPORITTI S.A.C.I.F.I.A. Las emulsiones aceite-en-agua se prepararon con aceite de Girasol. Para llevar adelante la experiencia en campo se utilizaron las cepas *P. fluorescens* M1C y *S. oryzae*, aisladas en campos de arroz, proporcionada amablemente por Asselborn y Pedraza (INTA Concepción del Uruguay, Argentina).

Los quitosanos de diferente peso molecular se compraron en Glentham Life Sciences (Glentham Ciencias de la vida, Unidad 5 Leafield Way, Corsham SN13 9SW, Reino Unido, REINO UNIDO). La hoja de datos proporcionada por Glentham Life Sciences mostró la siguiente información: pesos moleculares promedio de quitosano (120000, 250000 y 20000 g mol⁻¹), quitosano DD (90,21%; 90, 95% y 90, 27%) y viscosidades (742 cps; 42, 23 cps y 4.84 cps).

7.4.1 Preparación de la formulación LQB

Un crio tubo conservado en UF, conteniendo 1 mL de una suspensión de células de *Pseudomonas fluorescens*, fue inoculado en 20 mL de medio King Broth contenidos en un Erlenmeyer de 100 mL y se dejó crecer bajo orbital agitando durante 10 h en una cámara de cultivo (28 °C; 150 rpm). El volumen total fue descargado sobre 230mL de King Broth contenido en un matraz Erlenmeyer de 1 L. Una vez más, el cultivo se dejó crecer hasta alcanzar su fase estacionaria. Luego, el cultivo fue centrifugado, el sobrenadante fue descartado y el pellet, conteniendo a las células, fue resuspendido en tampón fosfato (0.1M). Se midió la densidad óptica del cultivo por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 600 nm (S-20 Espectrofotómetro Boeco, Alemania). Utilizando una curva de calibrado DO vs. UFC/mL la concentración de bacterias fue ajustada a la concentración deseada. Por último, la suspensión de bacterias fue mezclada con una solución de quitosano (0.15 %) en una proporción de volumen de 3: 1. Posteriormente, la mezcla resultante se añadió a la emulsión (EL) seleccionada en una proporción de volumen de 1:1.

7.4.2 Pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) en medio solido

Se realizaron cuatro tratamientos. Se utilizó como control positivo un tratamiento (T1) con agua, para seguir la capacidad de infección del patógeno. Se realizó tratamiento con el vehículo sin las bacterias (T2), un tratamiento solo con *P. fluorescens* suspendida en la solución buffer (T3) y un tratamiento con la formulación LQB (T4).

Se seleccionó la prueba de cultivos duales en medio sólido como prueba de susceptibilidad antifúngica. Se sembró un disco de 5 mm de diámetro de micelio de *S. oryzae* (10 días de crecimiento) al final de la caja Petri con medio papa dextrosa agar; mientras que a 5 cm de distancia se sembró una estría de cultivo de *P. fluorescens*. Las placas Petri se incubaron durante 6 días a 28 °C. Para cada tratamiento se utilizaron 3 repeticiones. La inhibición del crecimiento se calculó mediante la fórmula sugerida por Vicent [125].

$$\text{Porcentaje de Inhibición (I)} = \left[\frac{\text{Control (cm)} - \text{Tratamiento (cm)}}{\text{Control (cm)}} \right] \times 100 \quad (7.1)$$

(*) Control: crecimiento micelial del patógeno en el control (T1). Tratamiento: crecimiento micelial del patógeno en las placas duales ensayadas.

7.4.3 Pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) en placa de Petri

Efecto de la concentración de bacterias, el medio de cultivo y el peso molecular del quitosano

Se analizó la actividad de la bacteria frente al hongo patógeno a través de pruebas de duales en medio sólido. Todos los ensayos fueron realizados en pruebas independientes por triplicado.

Se probaron diferentes concentraciones de bacterias (Dosis: 1-3 Log₁₀UFC/cm²) para evaluar la influencia del vehículo sobre la actividad biocontroladora de la bacteria. Para ellos se preparan tres tratamientos, uno control con el hongo patógeno e inoculado con agua estéril, otro inoculado con bacteria (*P. fluorescens* M1C) y el restante con las bacterias inmersas en el vehículo de aplicación. Se registro el cambio de tamaño del micelio fúngico en función del tiempo.

Las bacterias se cultivaron sobre diferentes sustratos solidos (Agar papa dextrosa y Agar ecológico, compuesto de una mezcla de tallos de arroz molidos y agar-agar) y se enfrentaron contra el hongo patógeno. Nuevamente, se utilizaron diferentes dosis de bacterias (2-6

$\text{Log}_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$) y un disco de 5mm del hongo fue inoculado en el centro de la placa. Se registro el cambio de tamaño del micelio fúngico en función del tiempo.

Por último, se cultivaron bacterias inmersas en el vehículo de aplicación compuesto de quitosanos con diferente peso molecular (20000; 250000 y 1250000 g mol^{-1}), se utilizaron diferentes dosis de bacterias (2-6 $\text{Log}_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$) y se enfrentaron a *S. oryzae* en PDA. En este caso, se registró el tamaño del micelio a las 130h.

7.4.4 Pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) en macetones a campo

Diseño experimental: Se realizaron cuatro tratamientos. Se utilizó como control positivo un tratamiento (T1) con agua + inóculo de *S.oryzae*, para seguir la capacidad de infección del patógeno. Un tratamiento con el vehículo sin las bacterias (T2), un tratamiento solo con *P. fluorescens* suspendidas en la solución Buffer (T3) y, finalmente un tratamiento con la formulación LQB (T4). Se realizaron tres replicas por cada tratamiento. Se utilizó un diseño aleatorizado en bloques.

7.4.4.1 Preparación de macetones

El experimento se realizó en la estación experimental agrícola INTA (Concepción del Uruguay, Argentina). Antes de comenzar, se construyeron macetones (1 x 0,58 m). Los macetones se llenaron con sustrato de campo, se distribuyeron 3 macetones por piscina y se utilizaron 3 piscinas por tratamiento, cada una correspondiente a una réplica. Las mismas se ubicaron aleatoriamente sobre 3 zonas delimitadas en el campo. En cada zona se distribuyó aleatoriamente 1 piscina de cada tratamiento.

Se utilizaron en total 36 macetones. Se sembraron cuatro líneas de plantas de arroz (INTA Camba) por macetón. A los 20 días se cortaron algunas plantas para bajar la densidad del cultivo. Se colocaron redes anti pájaros en cada una de las piletas. El riego del arroz se controló todos los días. Antes de la inundación (inicio del macollamiento), se fertilizó el cultivo con 120 Kg Urea/ha (24g/pileta).

7.4.4.2 Preparación de inóculo de *S. oryzae*

La cepa se cultivó en agar de salvado de arroz a 26°C durante 4 a 5 días en cámara de luz. Se dejaron crecer 144 placas sembradas con *S. oryzae* hasta la producción de esclerocios. Luego, los esclerocios fueron cosechados y mezclados con perlita para facilitar su dispersión en el campo.

7.4.4.3 Aplicación de los tratamientos

Sesenta días después de la emergencia del cultivo de arroz, se inició la aplicación de las formulaciones correspondientes en cada uno de los tratamientos (1L por tratamiento; Dosis: $7 \text{ Log}_{10}\text{UFC/cm}^2$) y se continuó con una aplicación por semana hasta el final del macollamiento. Acumulando un total de 5 inoculaciones. La dispersión de la suspensión líquida se realizó sobre la base del tallo (Aplicación dirigida). Se realizó una aplicación en el surco exterior y dos aplicaciones en el surco central. Posterior a la primera aplicación, el patógeno fue inoculado, distribuyéndolo de manera homogénea entre cada uno de los tratamientos. El programa de ensayos de invernadero se resume en la tabla 8.

Tabla 8: Cronograma de tareas del ensayo a campo

Semana	Estadio	Actividad
1	Inicial	Siembra
3	4ta-5ta Hoja	1era Fertilización
5	Inicio de Macollaje	Inundación, 2da Fertilización
7	Macollaje	Inoculación del patógeno y 1era inoculación de los tratamientos.
8		2da inoculación.
9		3era inoculación.
10		4ta inoculación y 1era evaluación en Pie de las Plantas.
11	Formación de la panícula	5ta inoculación y 2da evaluación en Pie de las Plantas.
13	Floración	3era evaluación en Pie de las Plantas.
14	Fin de la floración.	1er corte de tallos
15	Llenado de granos.	2do corte de tallos

7.4.4.4 Muestreo y análisis de datos

Se permitió que el cultivo creciera en condiciones de inundación para simular las condiciones del campo. Durante las diferentes etapas de crecimiento del cultivo (diferenciación, floración y llenado de grano) se realizó la observación de los síntomas de la enfermedad. Se realizaron tres análisis sobre las plantas en pie, comenzando un día después de la 4^a inoculación, después de la 5^a inoculación y la semana posterior. Los análisis restantes se realizaron al final del ensayo, con muestras tomadas de cortes de tallos. Se registró el número de tallos sanos e infectados. La severidad de la enfermedad se evaluó al final del ensayo en los tallos cortados según el índice IRRI [126].

Grado 1 (G1): Este nivel de enfermedad se caracteriza por la aparición de pequeñas manchas oscuras superficiales que afectan las vainas inferiores.

Grado 3 (G3): En este nivel las manchas oscuras son mucho más largas que en el nivel 1. Se caracteriza por el amarillamiento de las vainas y la pérdida de hojas. En esta etapa los tallos se ven afectados superficialmente.

Grado 5 (G5): La infección es moderada. Se caracteriza por el amarillamiento de todas las vainas y hojas.

Grado 7 (G7): En este nivel aumenta la gravedad de la infección. El hongo penetra y coloniza internamente los tallos, con formación de micelio y esclerocios;

Grado 9 (G9): La etapa final se caracteriza por el secado de todas las hojas y vainas, y el vaciado de la panícula. Las plantas se pueden volcar.

Se calcularon dos parámetros, el índice de enfermedad (IE) y el índice de gravedad (IS).

$$\text{Índice de Enfermedad (IE)}: \frac{\text{Tallos enfermos}}{\text{Tallos totales}} \times 100 \quad (7.2)$$

$$\text{Índice de Severidad (IS)}: \frac{0A+1B+2C+3D+4E}{4n} \times 100 \quad (7.3)$$

(*) A= Número de tallos sin síntomas; B= Número de tallos en estadio de enfermedad Grado 1 o 3; C= Número de tallos en estadio de enfermedad grado 5; D= Número de tallos en estadio de enfermedad grado 7; E= Número de tallos en estadio de enfermedad grado 9; n= total de tallos de la muestra.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de bloques aleatorios. Para el análisis de datos se utilizó el software INFOSTAT. Se corroboraron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se observó la presencia de valores atípicos. El dato de porcentaje fue transformado utilizando la transformación “arcoseno de la raíz cuadrada”. Finalmente, las medias se compararon mediante análisis de varianza no paramétrico (Método Kruskal Wallis).

7.4.5 Pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) en macetones en laboratorio - Efecto de la cantidad de inoculaciones

Diseño experimental

Se realizaron cuatro tratamientos, utilizando un control negativo (T1) con agua, para seguir el desarrollo natural de la planta en condiciones *indoor*. Por otro lado, también se utilizó un control positivo un tratamiento (T2) con agua + inóculo de *S. oryzae*, para seguir la capacidad de infección del patógeno. Los restantes tratamientos fueron inoculados con la formulación LQB (4 Log₁₀UFC/cm²). Los tratamientos inoculados con bacterias se diferenciaron en la cantidad de inoculaciones realizadas, un total de 5 para el tratamiento tres (T3) y 7 para el tratamiento cuatro (T4). Se realizaron pruebas independientes por duplicado.

7.4.5.1 Pre germinación de semillas

Las semillas se reposan sobre papel servilleta depositado sobre una placa de petri y se llevan a estufa. Las mismas se incubaron durante 5 días a 50°C.

7.4.5.2 Preparación de macetas

Se utilizaron macetas de 3L de volumen, las cuales fueron llenadas con sustrato formado por una mezcla de perlita (40%), arena (35%) y de tierra (25%)

7.4.5.3 Siembra

La siembra se realizó depositando la semilla (Camba-INTA) sobre la tierra, a una profundidad que no supera el cm. Se sembraron un total de 5 semillas por maceta. Un total de 40 macetas fueron distribuidas en una cámara de cultivo con luz discontinua (260-290 umoles/m².seg; ciclo de 12h Luz/oscuridad).

Las macetas fueron regadas periódicamente. Al emerger la 5ta hoja, las plantas fueron transplantadas y distribuidas en bandejas. Las mismas fueron separadas de la forma más

homogénea posible alcanzando un promedio de 6 plantas por bandeja. Por cada tratamiento se prepararon 2 bandejas (duplicado), cada una de las cuales se ubicó en una cámara de luz diferente.

7.4.5.4 Fertilización

Se realizaron dos fertilizaciones de 120 kg Urea/ha (1 g urea/bandeja), una posterior al trasplante y la siguiente, posterior a la inundación del cultivo.

7.4.5.5 Inundación del cultivo

Las bandejas fueron completadas con agua. Las bandejas utilizadas tienen una superficie de aproximadamente 0.10m² y demandan aproximadamente 20 L de agua. La superficie del agua debe sobrepasar al menos en 5 cm a la superficie del sustrato.

7.4.5.6 Preparación de inóculo de *S.oryzae*

Se siguió el procedimiento detallado en la sección 7.4.3.2.

7.4.5.7 Aplicación de los tratamientos

Cada bandeja es inoculada con una dosis equivalente a 4 Log₁₀UFC/cm². de formulación LQB. A diferencia de las pruebas realizadas en campo, los tratamientos fueron inoculados con una micropipeta (1000 uL) por goteo sobre la superficie del agua. Posteriormente a la primera inoculación de la formulación LQB, se inoculó el patógeno, distribuyéndolo homogéneamente entre los tratamientos 2,3 y 4. La inoculación de las formulaciones LQB se repitió cada 7 días, acumulando un total de 5 aplicaciones para el tratamiento 3 y, 7 para el tratamiento 4. El programa del ensayo realizado se resume en la tabla 9.

Tabla 9: Cronograma de tareas del ensayo en laboratorio

Semana	Estadio	Actividad
1	Inicial	Pre-germinación y Siembra
3	4ta-5ta Hoja	Trasplante y 1era Fertilización
5	Inicio de Macollaje	Inundación, 2da Fertilización
7	Macollaje	Inoculación del patógeno y 1era inoculación de los tratamientos.
9		2da inoculación.
10		3era inoculación.
11		4ta inoculación y 1era evaluación en Pie de las Plantas.
12		5ta inoculación
13	Formación de la Panícula	6ta inoculación
14	Floración	7ma inoculación y 2da evaluación en Pie de las Plantas.
18	Llenado de granos.	1 corte de tallos

7.5 Resultados y discusión

7.5.1 Pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) en placa de Petri

El crecimiento del micelio se evaluó frente a cuatro tratamientos. Un tratamiento de control positivo (T1) en presencia de agua. Un tratamiento de aplicación con el vehículo (T2). Un tratamiento de *P. fluorescens* (T3) y un tratamiento con LQB (T4).

Hallazgos previos propusieron que el quitosano es inocuo contra la cepa *P. fluorescens* en las concentraciones utilizadas para preparar esta formulación. El tratamiento (T2) tiene la intención de determinar si dicho polímero tiene actividad antifúngica contra *S. oryzae*.

En el capítulo previo, se llegó a la conclusión que no es posible evitar la floculación entre el quitosano y las bacterias en las condiciones con las que es preparada la formulación LQB. Dicho fenómeno puede interferir en la actividad antifúngica del agente biocontrolador. De la comparación entre los tratamientos 3 y 4 se puede deducir el posible efecto del vehículo en la actividad antifúngica de *P. fluorescens*.

La figura 30 corresponde al ensayo *in vitro*. Muestra las fotos de las cajas de petri tomadas 6 días después de la inoculación de los microorganismos. Tal y como se puede observar, solo en los tratamientos 3 y 4 se puede detectar un halo de inhibición que separa a las bacterias del hongo patógeno.

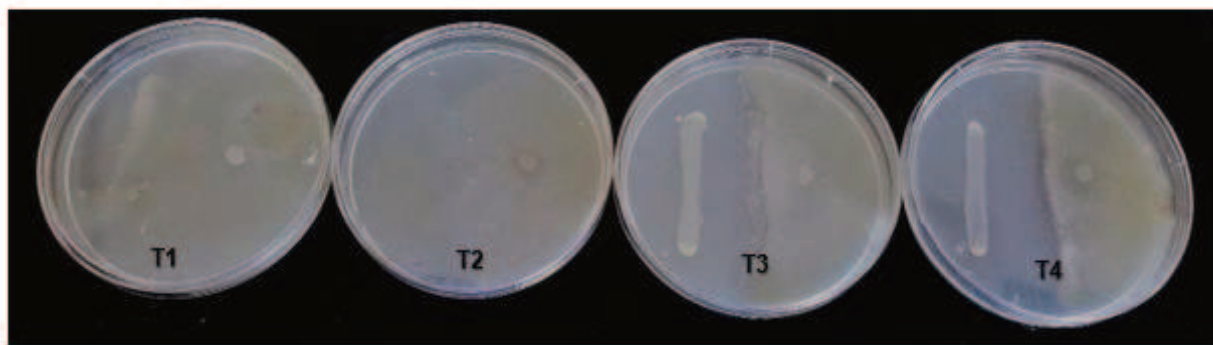


Figura 30: Imagen de placas duales 6 días después de la experiencia. A la izquierda se observan las estrías de *P. fluorescens* ya la derecha el micelio fúngico de *S. oryzae*. Tratamiento 1 Control positivo; Tratamiento 2: Portador; Tratamiento 3: Bacterias sin portador Tratamiento 4: Formulación desarrollada.

En la figura 31 se puede observar un gráfico de barras que compara el % de inhibición sobre el crecimiento del micelio fúngico como resultado de cada uno de los tratamientos.

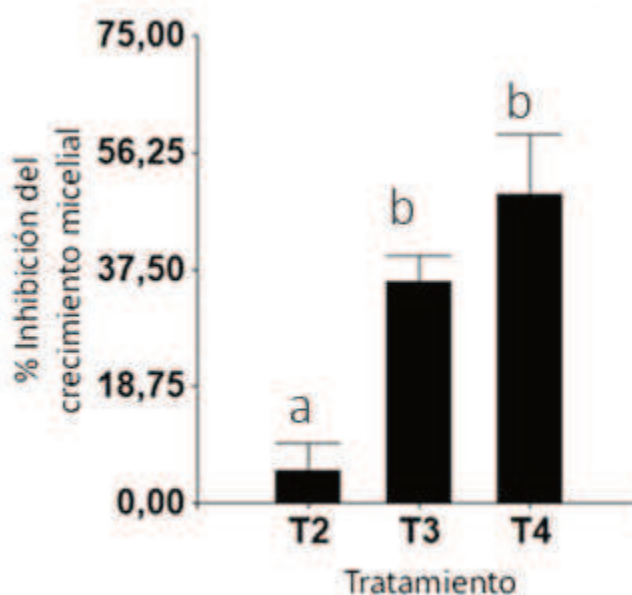


Figura 31: % de inhibición del crecimiento micelial para cada tratamiento. Tratamiento 1 Control positivo; Tratamiento 2: Portador; Tratamiento 3: Bacterias sin portador Tratamiento 4: Formulación desarrollada.

Del análisis estadístico se deduce el tratamiento 4 produce una inhibición del crecimiento micelial, significativamente diferente al resto de los tratamientos (K. Wallis; $p = 0.02$). Cabe destacar que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos 3 y 4 (K. Wallis; $p > 0.05$). De esto último, se deduce que la incorporación de *P. fluorescens* en la formulación LQB no interfiere sobre la actividad antifúngica de la bacteria.

7.5.2 Pruebas de cultivos duales con diferentes dosis de *Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae* sobre sustrato solido

7.5.2.1 Efecto de la concentración de bacterias

En las siguientes figuras se observa la evolución del tamaño del micelio fúngico en función del tiempo, expuesto a diferentes cantidades de bacterias, sobre sustrato solido (PDA).

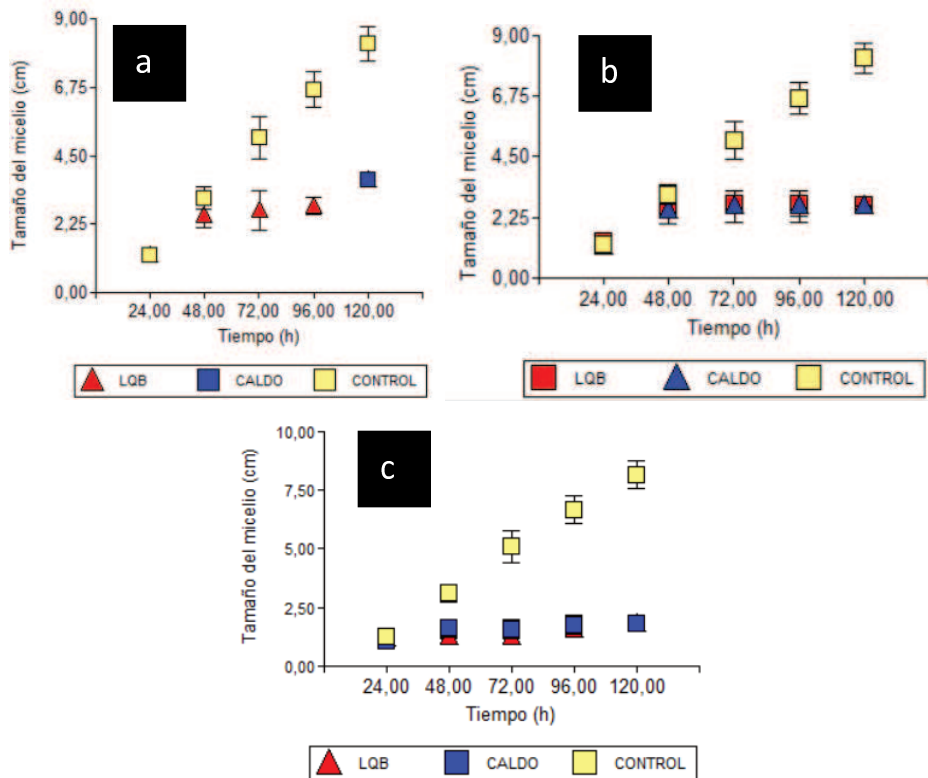


Figura 32: Pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) sobre sustrato solido utilizando diferentes dosis de bacterias. a) 1 Log₁₀UFC/cm²; b) 2 Log₁₀UFC/cm²; c) 3 Log₁₀UFC/cm².

A modo ilustrativo se muestra una imagen de una de las placas que contiene la dosis equivalente a $1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ (Figura 33).

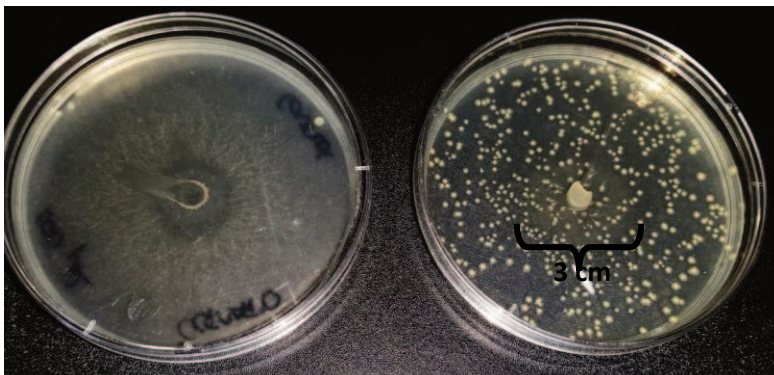


Figura 33: Fotografía de una placa de petri correspondiente al Tratamiento control (izq.) y al Tratamiento con la dosis $1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$, pasadas 130h desde su inoculación.

En la imagen se puede observar el micelio fúngico ocupar toda la placa control (+) (Izq.), se extiende por 8,5 cm de medio, mientras que no ocurre lo mismo con la placa que ha sido inoculada con bacteria (Der.), que se extiende por 3cm de medio.

A partir de los resultados, se reafirma que no existen diferencias significativas entre las bacterias solas y las bacterias inmersas en la formulación diseñada para el tratamiento de la enfermedad del arroz en condiciones *in vitro*. El tratamiento dosificado con $1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ no presenta diferencias significativas con respecto al control (K. Wallis, $p > 0,05$). Se necesita cubrir la superficie con al menos $2 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ para producir una inhibición del crecimiento del micelio fúngico en condiciones *in vitro* (K. Wallis, $p = 0.01$).

7.5.2.2 Efecto del medio de cultivo

A continuación, se presentan los resultados correspondientes al crecimiento del micelio en diferentes sustratos (PDA y Agar Arroz), expuestos a diferentes cantidades de bacterias.

De dicha experiencia podemos deducir que la actividad antifúngica de las bacterias está relacionada al medio de cultivo utilizado. En PDA, que contiene fuentes de carbono y energía fácilmente asimilables por la bacteria, se observa una mayor actividad antifúngica que si lo comparamos con el medio Agar Arroz, que contiene fuentes de carbono y energía más complejas y de difícil asimilación por la bacteria. Cuando la bacteria y el hongo se enfrentan en Agar Arroz, se necesitan al menos $3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/cm}^2$ para evitar el crecimiento del micelio fúngico.

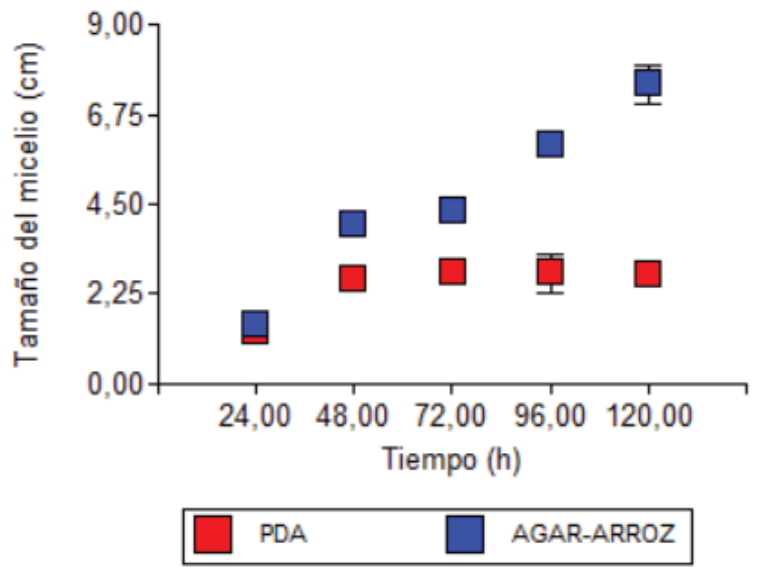


Figura 34: Resultados de las pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) sobre diferentes sustratos solidos utilizando diferentes dosis de bacterias. Se muestra únicamente la dosis a la cual se observan diferencias significativas (2 Log₁₀UFC/mL)

7.5.2.3 Efecto del Peso Molecular del Quitosano

A continuación, se muestran los resultados de los análisis realizados en formulaciones LQB utilizando quitosanos de diferente peso molecular.

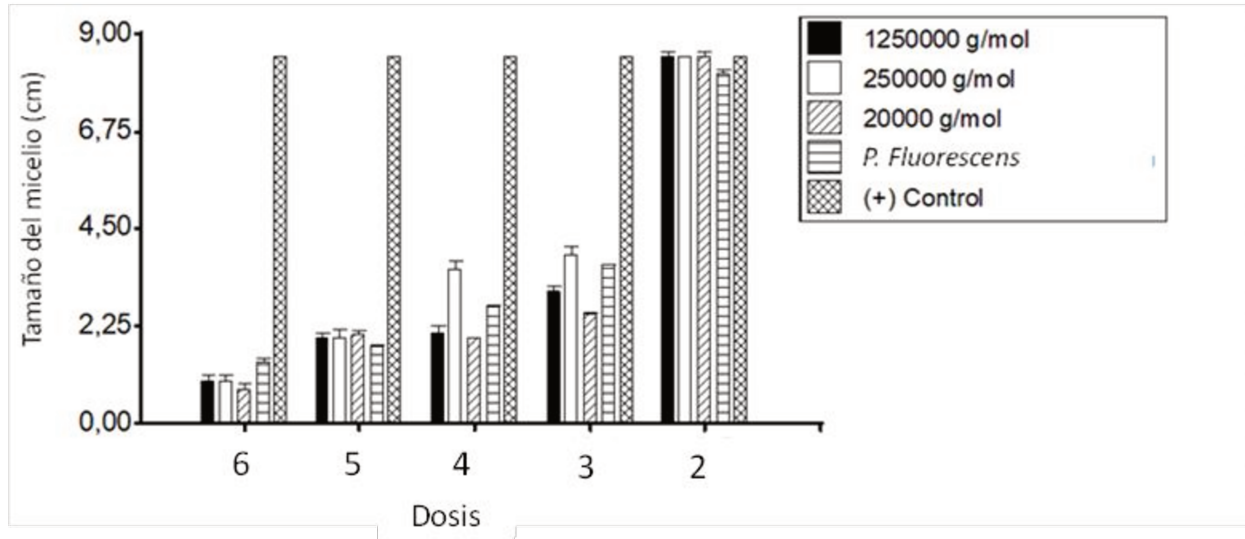


Figura 35: Resultados de las pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) sobre Agar arroz. Se muestra el tamaño del micelio con cada tratamiento a las 130 h desde su inoculación.

Se pudo establecer que no existen diferencias significativas en la actividad biocontroladora de las bacterias inmersas en una formulación LQB con quitosanos de diferente peso molecular. (K.Wallis $p > 0.05$).

7.5.3 Pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) en macetones a campo

Para estudiar la actividad de biocontrol de la formulación desarrollada frente a *S. oryzae* en condiciones de campo, se diseñó un ensayo *in vivo*. Se utilizaron los mismos tratamientos que en las pruebas en sustrato sólido (Sección 7.5.1). La Figura 36 muestra la evolución de la enfermedad a lo largo del ensayo de campo para cada tratamiento.

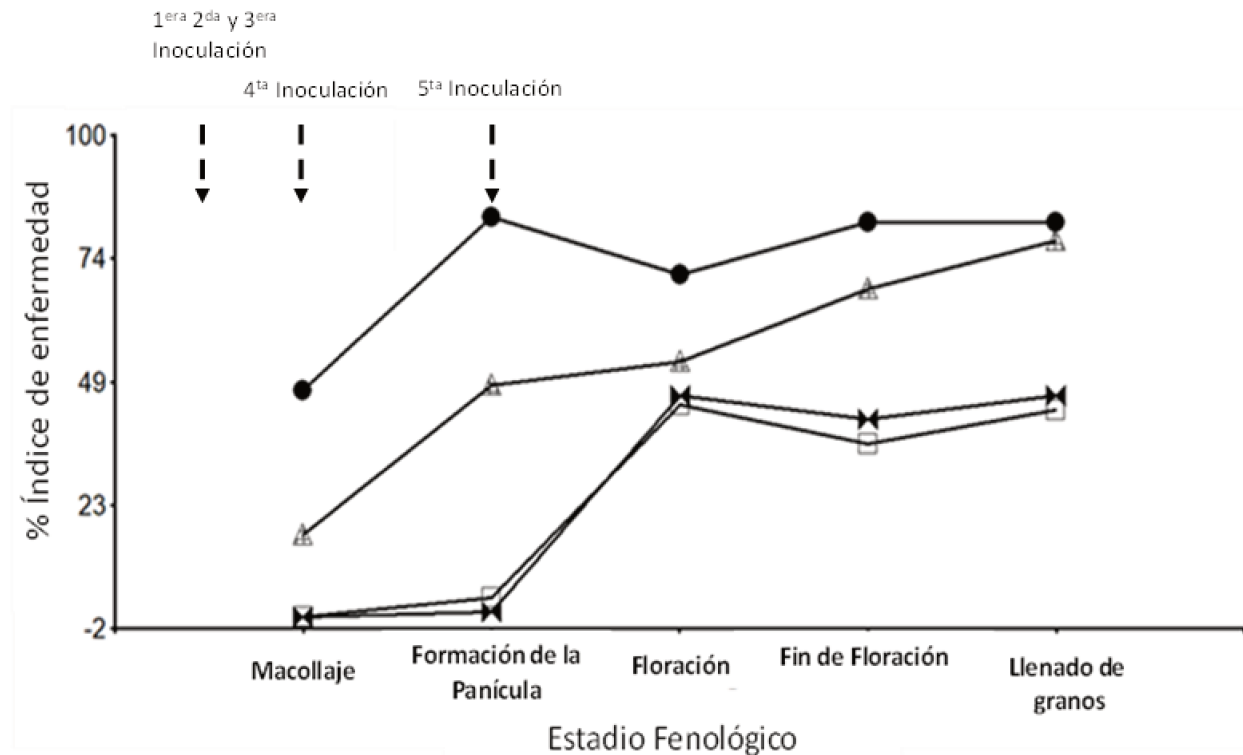


Figura 36: Valor promedio del índice de enfermedad de la enfermedad del tallo en las diferentes etapas del cultivo de arroz. A cada tratamiento se le asignó un símbolo, tratamiento 1 (Circulo), tratamiento 2 (Cuadrado), tratamiento 3 (Triangulo) y tratamiento 4 (Reloj).

Durante la inoculación de los tratamientos (Macollaje - Formación de la Panícula), las bandejas aplicadas con el tratamiento 1 presentan un porcentaje de plantas con síntomas superior al 80%, lo que indica una eficiente infección del patógeno, mientras que, las plantas inoculadas con el tratamiento 2 y 4 no superan el 5% de incidencia de la enfermedad. Por su parte, el tratamiento 3 alcanza un índice de enfermedad del 42% aprox.

Durante la floración, dos semanas después de la inoculación final, el índice de enfermedad de los tratamientos que contienen el vehículo (T2 y T4) aumentan significativamente. Indicando que a medida que se aleja de las inoculaciones bacterianas, el índice de enfermedad en estos tratamientos se acerca al control (T1). Sin embargo, tal y como se puede observar en la tabla 10, los tratamientos 2 y 4 presentan diferencias significativas en el índice de enfermedad respecto al tratamiento control durante todas las etapas.

Mientras que el índice de enfermedad en el tratamiento 3 es significativamente diferente al tratamiento control, solo hasta la etapa de floración, a donde el mismo se redujo un 25% con respecto al control. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Pedrazza y col. En

el mismo estadio del cultivo, utilizando 6 aislamientos de *Pseudomonas* (incluyendo a *P. fluorescens* M1C), dichos investigadores indicaron que el índice de enfermedad se redujo un 30% [46-47].

Tabla 10: Índice de enfermedad de pudrición del tallo para cada tratamiento

Estadio Fenológico	T1		T2		T3		T4	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
Macollaje	46,90 ^c	31,86	0,48 ^a	1,99	17,81 ^b	15,99	0,00 ^a	0,00
Formación de la Panícula	84,85 ^c	20,69	4,24 ^a	6,21	48,13 ^b	42,25	1,42 ^a	3,28
Floración	70,10 ^b	21,16	43,85 ^a	18,59	52,75 ^a	31,55	46,29 ^a	17,93
Fin de Floración	81,76 ^b	18,88	35,91 ^a	19,46	68,02 ^b	29,52	40,90 ^a	20,50
Llenado de granos	83,92 ^b	26,06	43,23 ^a	25,44	73,83 ^b	31,86	45,92 ^a	28,83

Promedios con letras comunes no son significativamente diferentes (Prueba de Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

La figura 37 corresponde a imágenes tomadas durante el periodo de floración, se observan claramente manchas oscuras (síntoma de la enfermedad) en la base de los tallos correspondientes al tratamiento 1, mientras que en los tratamientos 2,3 y 4 los tallos se observan sanos.

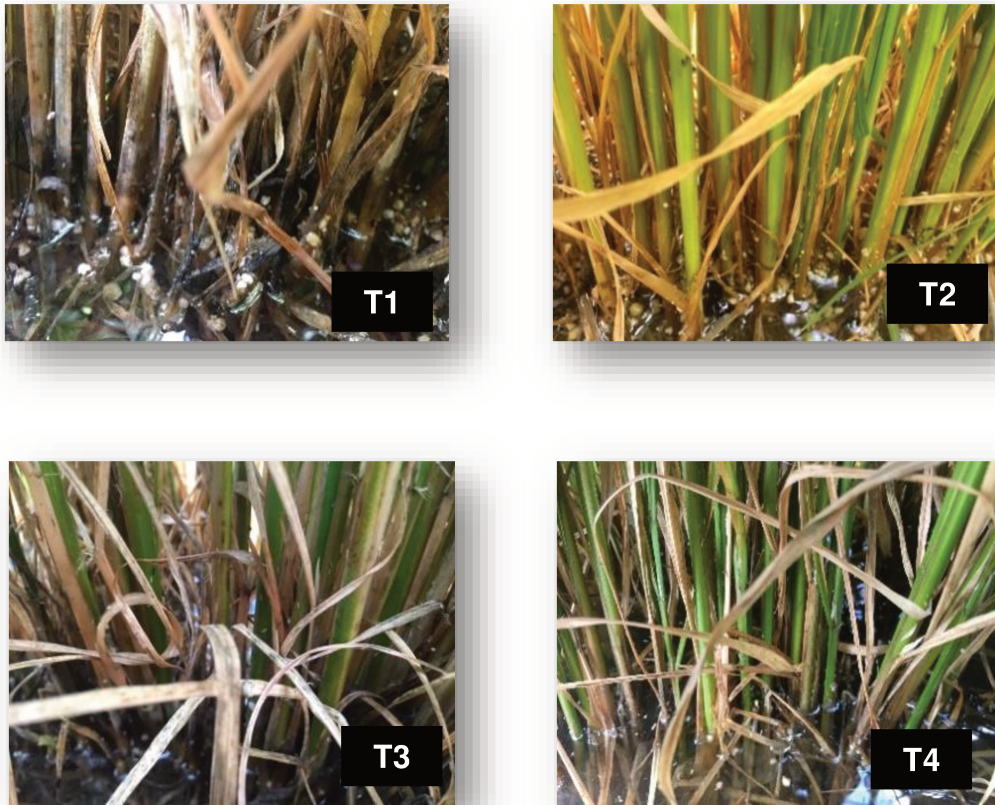


Figura 37: Imágenes tomadas durante la etapa de floración en los tallos inoculados con los diferentes tratamientos.

La figura 38 muestra la mancha característica que se produce en las primeras etapas de infección del hongo.



Figura 38: Imagen tomada de la planta de arroz infectada con *S. oryzae* en etapa temprana de la enfermedad.

Durante el ensayo de campo se hicieron cortes de tallos dos veces. Los cortes de tallos fueron útiles para estudiar el índice de severidad de la enfermedad del tallo. Uno de ellos se realizó durante el inicio del llenado de grano y el otro al final de la misma etapa. La figura 39 muestra el índice de gravedad de la enfermedad para cada tratamiento en ambas evaluaciones.

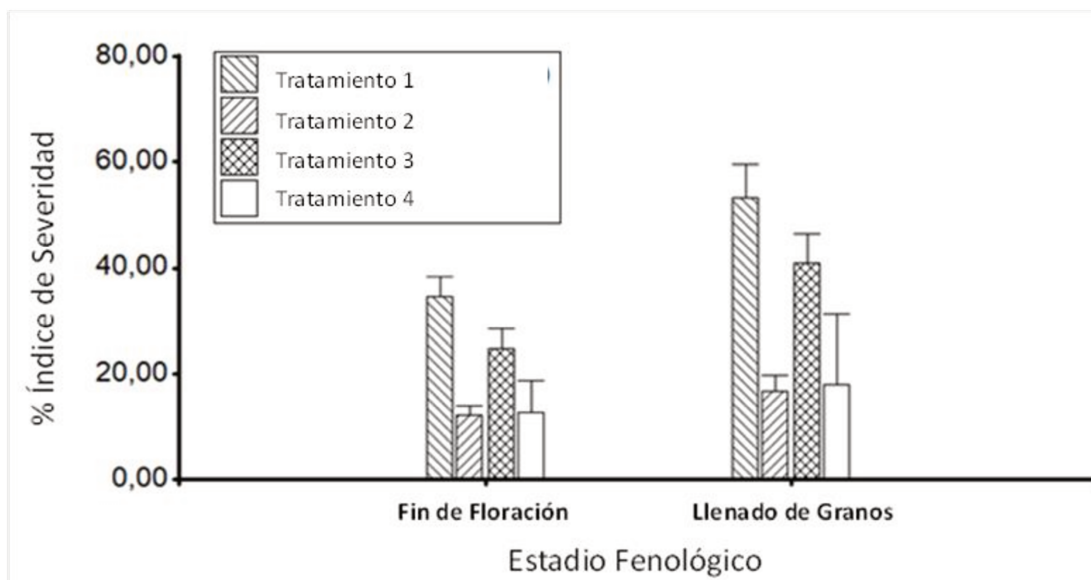


Figura 39: Índice de gravedad vs tipo de tratamiento. Muestras extraídas de los análisis destructivos en tallos de arroz para los diferentes tratamientos en las etapas de final de floración y llenado de granos.

Nuevamente, se obtienen diferencias significativas cuando se comparan los tratamientos que contienen al vehículo vs. los que no los tienen. Los tratamientos 2 y 4 son capaces de disminuir el índice de severidad del 50% (tratamiento control) a niveles por debajo del 20%. La presencia de bacterias en la formulación puede disminuir el índice de severidad del 50% al 40% aprox. sin portador y al 17% aprox. con portador. Todos los tratamientos muestran un incremento del índice de severidad de alrededor del 50% desde el final de la floración hasta las etapas de llenado de grano. El análisis estadístico se resume en la tabla 11.

Tabla 11: Índice de severidad de pudrición del tallo para cada tratamiento

Estadio Fenológico	Tratamiento	Promedio del Índice de Severidad
Fin de Floración	1	32.06 ^b
	2	09.83 ^a
	3	22.67 ^b
	4	11.06 ^a
Llenado de granos	1	49.56 ^b
	2	14.28 ^a
	3	40.89 ^b
	4	17.28 ^a

Promedios con letras comunes no son significativamente diferentes (Prueba de Kruskal Wallis, $p > 0,05$).

Estas diferencias observadas entre los tratamientos con el vehículo y sin el mismo, podrían estar relacionadas a la capacidad del quitosano de inducir respuestas de defensa en plantas.

En la Figura 40a se observa claramente el efecto de la inoculación de bacterias con el vehículo en comparación con el tratamiento control. En dicha imagen los tallos del tratamiento control tienen la característica mancha oscura que indica la infección por esclerocios. La Figura 40b muestra un tallo con una etapa avanzada de la enfermedad. Como se puede observar, la parte interna del tallo está totalmente colonizada. Corresponde a un grado 9 del índice de gravedad.

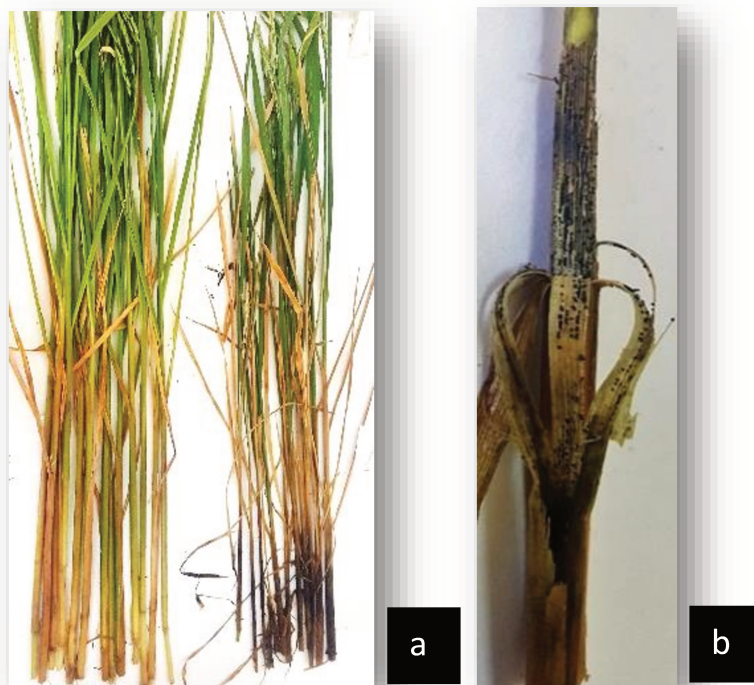


Figura 40: **a)** Imágenes tomadas de cortes del tratamiento 4 (Izquierda) y tratamiento 1 (Derecha). **b)** Imagen tomada de la planta de arroz infectada con *S. oryzae* en estado avanzado de la enfermedad. Imágenes tomadas del ensayo de invernadero.

7.5.4 Pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) en macetones a en laboratorio - Efecto de la cantidad de inoculaciones

Con el objetivo de evaluar el efecto de la cantidad de inoculaciones de la formulación LQB sobre el progreso de la enfermedad se realizaron se cultivaron plantas de arroz en condiciones controladas en el laboratorio. Se realizaron 4 tratamientos sobre las mismas. El tratamiento 1 es un control con agua, el tratamiento 2 es un control de infección con patógeno, los tratamientos 3 y 4 son inoculados con la formulación LQB ($4 \text{ Log}_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$), sobre el tratamiento 3 se realizan un total de 5 inoculaciones y sobre el tratamiento 4 un total de 7 inoculaciones de la formulación. Sobre cada uno de los tratamientos se analizó la presencia de síntomas compatibles con la enfermedad del tallo de arroz, que se caracterizan por ser pequeñas manchas oscuras que evolucionan en tamaño con el transcurso del tiempo. El índice de enfermedad representa el número de tallos enfermos sobre el número de tallos totales. Mientras que el índice de severidad tiene en cuenta el grado de avance de la enfermedad que dependerá del tamaño de la mancha y la estructura del tallo que ocupa.

En la figura 41 se pueden observar diferentes estadios de las plantas cultivadas en el laboratorio. El cultivo fue seguido hasta estadios de floración (123 días). En la figura 42 se muestran los resultados obtenidos de las evaluaciones realizadas sobre los tallos. En el Tratamiento control (-) se observó un crecimiento normal de la planta sin presencia de la enfermedad. Mientras que en el tratamiento control (+), en ambas cámaras, se observa que las bandejas presentan una evolución más marcada tanto de la incidencia como del grado de severidad de la enfermedad. Se comprueba que el hongo logra infectar la planta, sin embargo, el grado de infección obtenido es menor al que se consiguió alcanzar en las pruebas a campo.



Plántula



Inicio de Macollaje



Macollaje



Floración

Figura 41: Fotografías de las plantas de arroz tomadas en diferentes estadios fenológicos cultivadas en condiciones *indoor*.

A la hora de analizar los diferentes tratamientos que contienen bacteria, solo se puede afirmar que ambas reducen los índices de enfermedad frente al control (+). Ello demuestra que es posible controlar la enfermedad aplicando a la formulación sobre la superficie del agua.

En una de las cámaras (cámara I) respondió de mejor manera el tratamiento con 5 dosis y en la otra (cámara II) el tratamiento con 7 dosis. Por lo tanto, no se puede afirmar que el aumento del número de inoculaciones mejora la reducción de los índices de enfermedad y severidad. A pesar de ello, solo para el tratamiento con 7 dosis se obtuvieron diferencias con respecto al control durante todo el cultivo y en ambas cámaras, alcanzando reducciones mayores a 47 %, mientras que, para el tratamiento con 5 dosis, se logró reducir como máximo un 42%, pero hacia el final del cultivo la diferencia se redujo al 26 % (Tabla 12).

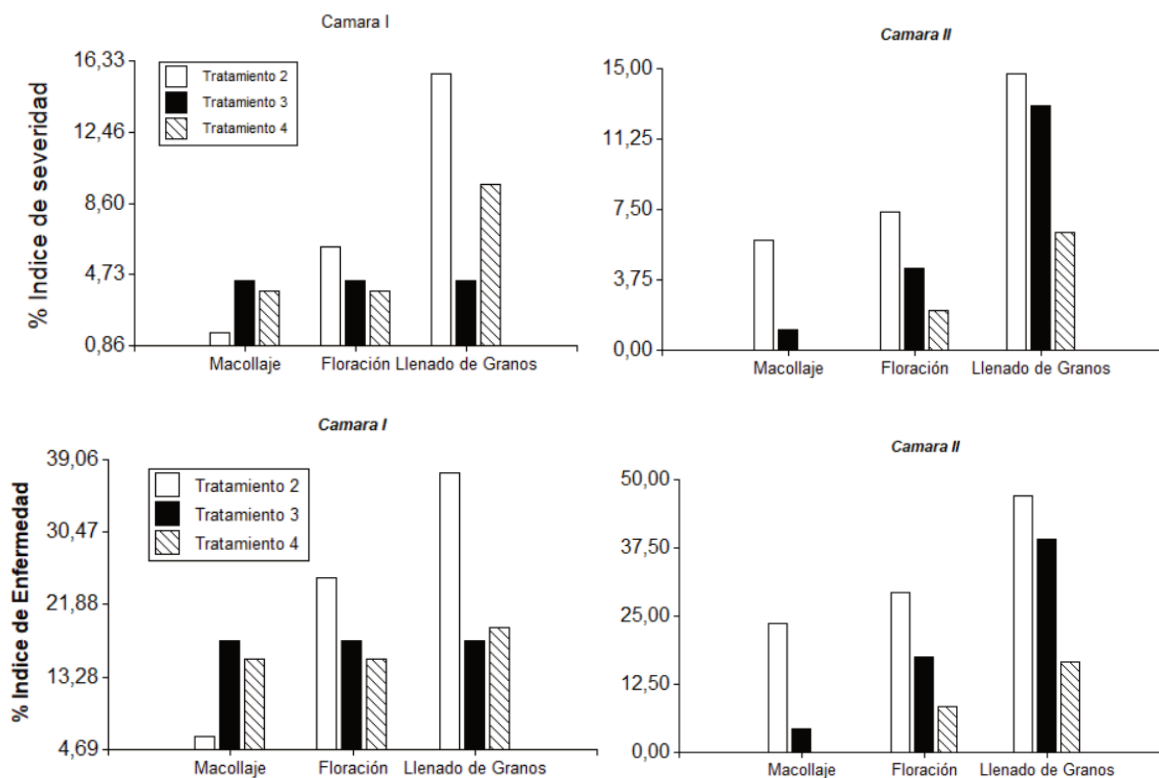


Figura 42: Se muestran gráficos de barras que representan los resultados obtenidos de los índices evaluados para las pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) en macetones a en laboratorio.

Tabla 12: Resultados de los índices evaluados para las pruebas de cultivos duales (*Pseudomonas fluorescens* vs *S. oryzae*) en macetones en laboratorio:

Estadios	% Índice de Enfermedad		
	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Cámara I			
Llenado de granos	42,28 ± 6.76	28,39 ± 15.19	17,95 ± 1.81
Floración	27,21 ± 3.12	17,52 ± 0.18	11,86 ± 4.99
Macollaje	14,89 ± 12.22	11,00 ± 9.40	7,69 ± 10.88
Cámara II	% Índice de severidad:		
Llenado de granos	15.17 ± 0.75	8,73 ± 6.10	7,93 ± 2.38
Floración	6.80 ± 0.78	4.38 ± 0.05	2.96 ± 1.25
Macollaje	3,72 ± 3.05	2.75 ± 2.35	1.92 ± 2.72

Si comparamos los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio, con el que fue realizado previamente en campo a través de aplicación dirigida, podemos decir que en este caso se logró una menor reducción de los índices hacia el final del cultivo. En el ensayo de campo, se logró disminuir el índice de enfermedad y el índice de severidad de la enfermedad del tallo un 45 y 65 %, respectivamente. Mientras que en el ensayo *indoor*, la reducción fue de 33 y 42 %, respectivamente. Sin embargo, a pesar de observar diferencias entre cada uno de los tratamientos no resultaron ser significativas al ser evaluadas estadísticamente, ello puede deberse al bajo grado de infección logrado en condiciones de laboratorio.

Cabe destacar que, a diferencia de las experiencias realizadas en campo, las bacterias fueron aplicadas sobre la superficie del agua y no mediante una aplicación dirigida sobre los tallos. Además, se utilizaron menores dosis de formulación (comparables con las que se utilizan normalmente en otros productos de biocontrol).

7.6 Conclusiones

En los ensayos realizados sobre la actividad de *P.fluorescens* vs *S.oryzae*, se pudo comprobar que la cepa *Pseudomonas fluorescens* M1C, tal y como había demostrado Pedraza y col., produce un halo de inhibición contra el desarrollo *S.oryzae* en condiciones *in vitro* sobre sustrato sólido. El mismo halo de inhibición se forma cuando las bacterias están inmersas en el vehículo de aplicación desarrollado (formulación LQB) y se enfrenta a *S. oryzae* en las mismas condiciones. Cuando se probaron diferentes dosis de ambos tratamientos, se comprobó que la presencia del vehículo tampoco influye sobre la cantidad de bacterias que son necesarias inocular para reducir la velocidad de crecimiento del hongo. Se concluye que la presencia del vehículo no cumple un rol importante ni a favor ni en contra del crecimiento del micelio fúngico en sustrato sólido.

La composición nutricional del sustrato sólido influye sobre el grado de reducción de la velocidad de crecimiento del hongo patógeno al ser expuesto a diferentes concentraciones de *P. fluorescens*. Cuando se comparó el Medio PDA, que contiene una fuente de carbono y energía fácilmente asimilable, vs. el Agar Arroz, que posee fuentes de carbono y energía más complejas, se comprobó que las bacterias ejercen una mayor actividad de biocontrol contra el hongo en PDA. La dosis de aplicación de la bacteria cumple un papel significativo en la reducción de la velocidad de propagación de la enfermedad en condiciones *in vitro*. En medio Agar arroz se requieren de 4 Log₁₀UFC/cm² para evitar el crecimiento del hongo patógeno durante al menos 130h.

En los ensayos realizados a campo, se pudo corroborar que las bacterias en estudio pueden controlar la velocidad de propagación de la enfermedad del tallo cuando se realizan aplicaciones periódicas dirigidas sobre los tallos. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo desde la última inoculación, la velocidad de propagación de la enfermedad aumenta.

Se destacan aquellos tratamientos que contienen al vehículo de aplicación (T2 y T4) sobre el resto de los tratamientos (T1 y T2) en cuanto a la reducción de la propagación de la enfermedad y la reducción del grado de severidad de la misma. Utilizando la formulación LQB, hacia el final del cultivo se logró disminuir el índice de enfermedad y el índice de severidad de la enfermedad del tallo un 45 y 65 %, respectivamente.

En los ensayos en condiciones *indoor* se evaluó el efecto de la cantidad de aplicaciones periódicas con la formulación LQB, las mismas se realizaron sobre el agua que rodea a las plantas y se utilizó una dosis menor a la utilizada en los ensayos a campo. En ambos tipos de tratamiento se lograron disminuir los índices relacionados con la enfermedad. Sin embargo, hacia el final del cultivo solo se obtuvieron mayores diferencias con respecto al control cuando se realizaron 7 aplicaciones. Los índices de enfermedad y severidad de la enfermedad del tallo se redujeron un 58 y 48 %, respectivamente. Se concluye que, el tratamiento con la formulación LQB produce una mejora del control de la enfermedad con respecto al control, cuando es aplicado por goteo sobre el agua que rodea a las plantas y en una dosis ($4 \text{ Log}_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$) comparable con las recomendadas para otros productos de biocontrol, que ya están disponibles en el mercado. Además, el aumento del número de aplicaciones produce una mayor reducción de los índices relacionados con la enfermedad.

Se espera en un futuro continuar con dicha línea de investigación, poniendo el foco en la reducción del número de aplicaciones sin detrimento de la efectividad en la capacidad biocontroladora. Ello puede ser posible utilizando estrategias que permitan proteger a las bacterias una vez aplicadas en campo.

8 CONCLUSIONES GENERALES

Se logro desarrollar un vehículo biodegradable para liberar microorganismos en la interfaz aire-agua. Este sistema se puede utilizar en programas de biocontrol o biorremediación cuando el tratamiento se limita a la interfaz aire-agua.

En el caso particular del tema de tesis, se pudo demostrar que el vehículo no perjudica la actividad antagonista de la cepa en estudio (*P. Fluorescens* M1C) por sobre el hongo patógeno de arroz (*S.oryzae.*). En las dosis adecuadas, el vehículo puede transportarlas desde un único punto de aplicación y dispersarlas en grandes superficies de agua, favoreciendo el contacto de las bacterias con los patógenos que se acumulan en la superficie (*S. oryzae* y *R.solani*), y por lo tanto el control de las enfermedades del tallo y la vaina de arroz.

9 BIBLIOGRAFIA

[1] Chauhan, BS.; Jabran, K.; Mahajan, Gulshan (ed.). *Rice production worldwide*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2017.

[2] Food and Agriculture Organization of the United Nations. "FAOSTAT Database.". FAOSTAT Datos sobre alimentación y agricultura [internet]. 2021 dic 29. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#compare>.

[3] World Rice Production 2020/2021 [internet]. 2021 29 dic Disponible en: <http://www.worldagriculturalproduction.com/crops/rice.aspx>.

[4] Pareja, Lucía, et al. Analytical methods for pesticide residues in rice. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, vol. 30, no 2, p. 270-291.

[5] International Rice Research Institute. "Rice Knowledge Bank." (2013). [internet]. 2021 29 dic. Disponible en: <http://knowledgebank.irri.org/>.

[6] World Bank. "Global Food Crisis Response Program." (2013). [internet]. 2021 29 dic. Disponible en <http://www.worldbank.org/en/results/2013/04/11/global-food-crisis-response-program-resultsprofile>.

[7] FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). High Level Expert Forum - How to Feed the World in 2050 Office of the Director, Agricultural Development Economics Division Economic and Social Development Department Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy. [internet]. 2021 29 dic. Disponible en: https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf

[8] Mohanty, S.; Wailes, E.; Chavez, E. The global rice supply and demand outlook: the need for greater productivity growth to keep rice affordable. *Rice in the Global Economy: Strategic Research and Policy Issues for Food Security*. International Rice Research Institute, Los Baños, 2010.

[9] Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015) "FAOSTAT Database.". [internet] 2022 10 ene. Disponible en <http://faostat.fao.org/>.

[10] Strange, Richard N.; Scott, Peter R. Plant disease: a threat to global food security. *Annual review of phytopathology*, 2005, vol. 43, no 1, p. 83-116.

- [11] Barnwal, Manoj Kumar, et al. A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, vol. 136, no 3, p. 443-457.
- [12] Mew, Twng Wah, et al. Looking ahead in rice disease research and management. *Critical reviews in plant sciences*, 2004, vol. 23, no 2, p. 103-127.
- [13] Savary, Serge, et al. A review of principles for sustainable pest management in rice. *Crop protection*, 2012, vol. 32, p. 54-63.
- [14] Xue-Wen, X. I. E., et al. Genetic background and environmental effects on QTLs for sheath blight resistance revealed by reciprocal introgression lines in rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, vol. 34, no 11, p. 1885-1893.
- [15] Kozaka T. Sheath blight of rice plants and its control. *Rev Plant Protect Res*, 1975, 8:69-80.
- [16] Kannaiyan S, Prasad NN. Estimation of yield losses due to sheath blight disease of rice. *Aduthurai Rep*, 1978a, 2:137-138.
- [17] Lee, Fleet. Rice Sheath Blight: A Major Rice Disease. *Plant Disease – Plant dis*, 1983, 67. 10.1094/PD-67-829.
- [18] Ou, S.H. *Rice Diseases*. 2nd Edition, Commonwealth Mycological Institute, Kew, 380 p, 1985.
- [19] Rajan CPD Estimation of yield loss due to sheath blight of rice. *Indian Phytopathology*, 1987, 40:174-177.
- [20] Baby UI. Studies on the control of rice sheath blight disease with organic soil amendments, Ph.D. Thesis. University of Madras, Madras, 128 pp, 1992.
- [21] Chen, Yu, et al. Sensitivity of *Rhizoctonia solani* causing rice sheath blight to fluxapyroxad in China. *European journal of plant pathology*, 2014, vol. 140, no 3, p. 419-428.
- [22] Paracer CS, Luthra JC. Further studies on the stem rot disease of rice caused by *Sclerotium oryzae* Catt. in Punjab. *Indian J Agri Sci*, 1944, 14:48-58.
- [23] Li Yg, Kang BJ, Feng YX, Huang DJ, Wu DB, Li TF. A brief report on the studies of rice stem rot. *Guangdong Agri Sci*, 1984, 5:35-37.
- [24] Pedraza, M. Principales actividades sobre enfermedades del cultivo en la EEA Concepción del Uruguay del INTA. Pp117-127. [internet]. 2022 15 ene. Disponible en:

https://proarroz.com.ar/static/resultados_experimentales/resultados-experimentales-2004-2005_15.pdf

[25] Gutiérrez, S., Cúndom, M. Situación actual de las enfermedades fúngicas del cultivo de arroz en la provincia de Corrientes. [internet]. 2022 15 ene. Disponible en: <https://xdoc.mx/preview/a-010-universidad-nacional-del-nordeste-5ee6931cea1c6>

[26] Laha GS, Venkataraman S, Reddy APK. Alternative approaches in the management of sheath blight disease of rice. Proceedings of international conference on integrated plant disease management for sustainable agriculture, 1997, pp 225-226. Indian Phytopathological Society, Malhotra Publishing House, New Delhi.

[27] Dantre RK, Rathi YPS. Combined effect of non-conventional chemicals and salicylic acid, GABA and IAA as systemic resistance on sheath blight of rice. *Ann Plant Prot Sci*, 2007, 15(2):506-507.

[28] Liu, He, et al. Antifungal effect and mechanism of chitosan against the rice sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. *Biotechnology letters*, 2012, vol. 34, no 12, p. 2291-2298.

[29] Mew, T. W.; Rosales, A. M. Control of *Rhizoctonia* sheath blight and other diseases of rice by seed bacterization. En *Biological control of plant diseases*. Springer, Boston, MA, 1992. p. 113-123.

[30] Krishnamurthy, K.; Gnanamanickam, S. S. Biological control of sheath blight of rice: Induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp. *Current Science*, 1997, p. 331-334.

[31] Laha, G. S.; Venkataraman, S. Sheath blight management in rice with biocontrol agents. *Indian Phytopathology*, 2012.

[32] Singh R, Sunder S, Reddy CS, Dodan DS. Disease resistance in rice: progress and perspectives. In: Sardana HR, Bambawale OM, Prasad D (eds) Sustainable crop protection strategies, 2010b, vol 1. Daya Publishers, Delhi, pp, 30-69.

[33] Sunder, S.; SINGH, Ram. Sources of multiple resistance to bacterial blight, stem rot and sheath blight of rice. *Plant Dis Res*, 2015, vol. 30, p. 106-107.

[34] Singh, R.; Kumar, A.; Jalali, B. Variability, predisposing factors and management of stem rot of rice caused by *Sclerotium oryzae* Catt.: An overview. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, vol. 1, p. 275-289.

- [35] Nishant P, Puri S. Evaluation of fluorescent *Pseudomonad* against *Sclerotium oryzae*, the causal agent of stem rot of rice. *J Mycol Plant Pathol*,2012, 42:260-262.
- [36] Chand H, Singh R. Effect of planting time on stem rot incidence. *Int Rice Res Newsletter*,1985, 10(6):18-19.
- [37] Ph, Sumitra; Iboton, N.; Tombisana, R. K. Biocontrol and fungicidal management of stem rot of rice. *Plant disease research*, 2011.
- [38] Kumar P, Sunder S. Longevity of *Fusarium moniliformae* in different parts of rice grains. 16-17 Mar 2015, p65. Disponible en: Abstracts of national symposium on understanding host-pathogen interaction through science of omics, ICAR-Indian Institute of Spices Research, Kozhikode.
- [39] Kobayashi, T., et al. Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration on the infection of rice blast and sheath blight. *Phytopathology*, 2006, vol. 96, no 4, p. 425-431.
- [40] Flint, ML.; Dreistadt, SH. *Natural Enemies Handbook: The Illustrated Guide to Biological Pest Control*. University of California Press. Clark, Jack K., ed.;1988.
- [41] Puente, Mariana Laura, et al. Plant-growth promotion of argentinean isolates of *Azospirillum brasilense* on rice (*Oryza sativa* L.) under controlled and field conditions. *Am.-Eur. J. Agric. Environ. Sci*, 2013, vol. 13, no 10, p. 1361-1369.
- [42] García De Salamone, Inés E., et al. Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. *Plant and Soil*, 2010, vol. 336, no 1, p. 351-362.
- [43] De Salamone, Inés E. García, et al. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. *Applied Soil Ecology*, 2012, vol. 61, p. 196-204.
- [44] De Salamone, Inés E. García. Use of soil microorganisms to improve plant growth and ecosystem sustainability. En *The molecular basis of plant genetic diversity*. IntechOpen, 2012.
- [45] Nico, Magalí, et al. Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants (*Oryza sativa*) inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Applied soil ecology*, 2012, vol. 61, p. 190-195.

[46] Pedraza, María Virginia, et al. Alternativa biológica para el manejo de la pudrición del tallo en arroz [*Sclerotium oryzae*]. En *Congreso Argentino de Fitopatología. 1. 2008 05 28-30, 28-30 de mayo de 2008. Córdoba. AR. 2008.*

[47] Asselborn, M.; Correa, Olga S.; Pedraza, MV. Control biológico de enfermedades de tallo y de vaina en arroz con *Trichoderma* y *Pseudomonas*. 2015.

[48] Asselborn, Miriam, et al. *Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos de Pseudomonas fluorescentes con potencial de biocontrol de enfermedades de tallo y de vaina en arroz: aplicación del control biológico al manejo de enfermedades en arroz.* 2017. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

[49] Jena KK, Hardy N (eds). Advances in temperate rice research. International Rice Research Program on Rice- Based Production Systems. IRRI. Philippines, Africa Rice, Benin and CIAT, Colombia, 2012.

[50] Dobermann, Achim. *Rice: Nutrient disorders & nutrient management.* Int. Rice Res. Inst., 2000.

[51] Bouman BAM, Humphreys E, Tuong TP, Barker R. Rice and Water, *Adv Agron*, 2006, 92:187-237.

[52] Grisp (Global Rice Science Partnership). *Rice Almanac*, 4th edn. International Rice Research Institute, Los Baños, p. 283; 2013.

[53] Gregori, L. Respuesta a la fertilización nitrogenada en la relación largo ancho de hoja en diferentes genotipos de arroz *Oryza sativa* L. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes. 101 p; 2010.

[54] Uppala, S. and Zhou, X-G. Rice Sheath Blight. *The Plant Health Instructor*, 2018, DOI: 10.1094/PHI-I-2018-0403-01.

[55] Someya, Nobutaka, et al. Potential of *Serratia marcescens* strain B2 for biological control of rice sheath blight. *Biocontrol Science and Technology*, 2005, vol. 15, no 1, p. 105-109.

- [56] Cuong, Nguyen Duc, et al. Hyphae-colonizing Burkholderia sp.—a new source of biological control agents against sheath blight disease (Rhizoctonia solani AG1-IA) in rice. *Microbial ecology*, 2011, vol. 62, no 2, p. 425-434.
- [57] Mondal, Goutam. Plant growth promoting activity of some indigenous Tricho-derma isolates and their field performance against sheath blight of rice in old alluvial zone of North Bengal. *The Journal of Plant Protection Sciences*, 2012, vol. 4, no 2, p. 16-24.
- [58] Soe, K. T.; DE Costa, D. M. Development of a spore-based formulation of microbial pesticides for control of rice sheath blight. *Biocontrol Science and Technology*, 2012, vol. 22, no 6, p. 633-657.
- [59] Wiwattanapatapee, R., et al. Preparation and evaluation of Bacillus megaterium-alginate microcapsules for control of rice sheath blight disease. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, vol. 29, no 8, p. 1487-1497.
- [60] Chen, Lihua, et al. Solid-state fermentation of agro-industrial wastes to produce bioorganic fertilizer for the biocontrol of Fusarium wilt of cucumber in continuously cropped soil. *Bioresource Technology*, 2011, vol. 102, no 4, p. 3900-3910.
- [61] Chen, Li-Hua, et al. Development and evaluation of Trichoderma asperellum preparation for control of sheath blight of rice (Oryza sativa L.). *Biocontrol Science and Technology*, 2015, vol. 25, no 3, p. 316-328.
- [62] Rijnaarts, Huub HM, et al. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1999, vol. 14, no 1-4, p. 179-195.
- [63] Muzzarelli, R. A. A., et al. Methods for the determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. *Chitin handbook*, 1997, p. 109-119.
- [64] Dumitriu S ed. *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded*, 2nd edn. United Kingdom: Taylor & Francis, 187 (Chapter 9); 2001.

- [65] Beveridge, T. J., and L. L. Graham. Surface layers of bacteria. *Microbiol*, 1991, Rev. 55:684–705.
- [66] Strand, SP.; Nordengen, T.; Østgaard, K. Efficiency of chitosans applied for flocculation of different bacteria. *Water Research*, 2002, vol. 36, no 19, p. 4745-4752.
- [67] Chen, Yan-Min, et al. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, vol. 148, no 3, p. 660-670.
- [68] Wongkongkatep, Pravit, et al. Bacteria interface pickering emulsions stabilized by self-assembled bacteria–chitosan network. *Langmuir*, 2012, vol. 28, no 13, p. 5729-5736.
- [69] Tikhonov, Vladimir E., et al. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2 (3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives. *Carbohydrate polymers*, 2006, vol. 64, no 1, p. 66-72.
- [70] Roller, S.; Covill, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International journal of food microbiology*, 1999, vol. 47, no 1-2, p. 67-77.
- [71] Chantararataporn, Patomporn, et al. Water-based oligochitosan and nanowhisker chitosan as potential food preservatives for shelf-life extension of minced pork. *Food Chemistry*, 2014, vol. 159, p. 463-470.
- [72] Takahashi, Tomoki, et al. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, vol. 40, no 3, p. 485-491.
- [73] Georgantelis, Dimitrios, et al. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. *Meat science*, 2007, vol. 76, no 1, p. 172-181.

[74] Krajewska, B.; Wydro, P.; Jańczyk, A. Probing the modes of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with membrane lipids in Langmuir films. *Biomacromolecules*, 2011, vol. 12, no 11, p. 4144-4152.

[75] Abedian, Zeinab, et al. Antibacterial activity of high-molecular-weight and low-molecular-weight chitosan upon oral pathogens. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 2019, vol. 22, no 2, p. 169.

[76] Yildirim-Aksoy, M.; BECK, B. H. Antimicrobial activity of chitosan and a chitosan oligomer against bacterial pathogens of warmwater fish. *Journal of applied microbiology*, 2017, vol. 122, no 6, p. 1570-1578.

[77] No, H. K., et al. Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu. *Journal of Food Science*, 2002, vol. 67, no 4, p. 1511-1514.

[78] Jung, Eun Ju, et al. Antibacterial activity of chitosans with different degrees of deacetylation and viscosities. *International journal of food science & technology*, 2010, vol. 45, no 4, p. 676-682.

[79] Devlieghere, F.; Vermeulen, A.; Debevere, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology*, 2004, vol. 21, no 6, p. 703-714. [80] Seo S, King JM, Prinyawiwatkul W and Janes M, (2008). Antibacterial activity of ozone-depolymerized crawfish chitosan. *J Food Sci* 73:M400–M404.

[81] Gentili, Alejandro R., et al. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2006, vol. 57, no 4, p. 222-228.

[82] Călinoiu, L. F., Ștefănescu, B. E., Pop, I. D., Muntean, L., & Vodnar, D. C. Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation. *Coatings*, 2019, 9(3), 194.

[83] Mc Clements, David Julian. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press, 2004.

[84] Heusch R. Emulsions, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. John Wiley and Sons, Weinheim, Germany, 2000.

[85] Ruckenstein, E., and D.C Prieve. The Rate of Deposition of Brownian Particles under the Action of London and Double- Layer Forces between Surfaces Characterized by Multiple Ionizable Groups, "J. Theoretical Biol., 1973.

[86] Hiemenz, P. C., & Rajagopalan, R. (Eds.). *Principles of Colloid and Surface Chemistry, revised and expanded*. CRC press, 2016.

[87] Gregory, J., & Barany, S. Adsorption and flocculation by polymers and polymer mixtures. *Advances in colloid and interface science*, 2011, 169(1), 1-12.

[88] Fioramonti, Silvana A., et al. Multilayer emulsions as a strategy for linseed oil microencapsulation: Effect of pH and alginate concentration. *Food Hydrocolloids*, 2015, vol. 43, p. 8-17.

[89] Bhattacharjee, Sourav. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release*, 2016, vol. 235, p. 337-351.

[90] Ly, Mai Huong, et al. Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions. *International journal of food microbiology*, 2006, vol. 112, no 1, p. 26-34.

[91] Ge, Yuqing, et al. Fluorescence modified chitosan-coated magnetic nanoparticles for high-efficient cellular imaging. *Nanoscale research letters*, 2009, vol. 4, no 4, p. 287-295.

[92] MIC Testing. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. Servicio Antimicrobianos. INEI ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", 2012, 32, 2.

[93] Jacobasch, Hans-Jörg. Characterization of solid surfaces by electrokinetic measurements. *Progress in Organic Coatings*, 1989, vol. 17, no 2, p. 115-133.

[94] Ottewill RH and Shaw JN, Studies on the preparation and characterisation of monodisperse polystyrene latices. *Kolloid Z. Z. Polym*, 1967, 218:34– 40.

- [95] Archakunakorn, Somwit, et al. Emulsification efficiency of adsorbed chitosan for bacterial cells accumulation at the oil–water interface. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, vol. 38, no 4, p. 701-709.
- [96] Kean, T.; ROTH, S.; Thanou, M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 2005, vol. 103, no 3, p. 643-653.
- [97] Muylaert, Koenraad, et al. Harvesting of microalgae: Overview of process options and their strengths and drawbacks. *Microalgae-based biofuels and bioproducts*, 2017, p. 113-132.
- [98] Salopek, B.; krsić, D.; filipović, S. Measurement and Application of Zeta-Potential. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik*, 1992, vol. 4, no 1, p. 147-151.
- [99] Bhatt N, Prasad RK, Singh K and Panpalia GM. Stability study of O/W emulsions using ζ potential. *J Chem Pharmaceut Res*, 2010, 2:512–527.
- [100] Mengual, O., et al. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 1999, vol. 50, no 2, p. 445-456.
- [101] Madigan MT, Martinko JM and Parker J. Brock Biology of Microorganisms, Upper Saddle River (N.J.): Prentice Hall, 10th edn; 2003.
- [102] Yeo SH and Chua LY. Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* on magnetic surfaces. *Colloids Surf*, 2004, B 36:75–80.
- [103] Wilson, W. William, et al. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of microbiological methods*, 2001, vol. 43, no 3, p. 153-164.
- [104] Wang, Qi Zhao, et al. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydrate polymers*, 2006, vol. 65, no 2, p. 194-201.

- [105] Strand, SP; VÅRUM, K.M.; Østgaard, KI. Interactions between chitosans and bacterial suspensions: adsorption and flocculation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, vol. 27, no 1, p. 71-81.
- [106] Blaakmeer, J., et al. Adsorption of weak polyelectrolytes on highly charged surfaces. Poly (acrylic acid) on polystyrene latex with strong cationic groups. *Macromolecules*, 1990, vol. 23, no 8, p. 2301-2309.
- [107] Rustemeier, O.; Killmann, E. Electrostatic interactions and stability of poly-L-lysine covered polystyrene latex particles investigated by dynamic light scattering. *Journal of colloid and interface science*, 1997, vol. 190, no 2, p. 360-370.
- [108] Domard, A.; Rinaudo, M.; Terrassin, C. Adsorption of chitosan and a quaternized derivative on kaolin. *Journal of applied polymer science*, 1989, vol. 38, no 10, p. 1799-1806.
- [109] Palleroni, N.J. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2, Part B. New York: Springer, 323-370; 2005.
- [110] Ayyadurai, N.; NAIK, P. Ravindra; Sakthivel, N. Functional characterization of antagonistic fluorescent pseudomonads associated with rhizospheric soil of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of microbiology and biotechnology*, 2007, vol. 17, no 6, p. 919-927.
- [111] Hernández, A. et al. *Produccion, purificacion y diagnostico de sideroforos a partir de la cepa de Pseudomonas Fluorescens J-143*. 1999. [112] Haas, D, Défago, G. 2005. Biological Control of soil-borne pathogens by *fluorescent Pseudomonads*. *Nature Review Microbiology*, 3: 307-319.
- [113] Angladette, A. El arroz 13ed. Colección Agricultura Tropical. Barcelona: Blume; 1969.
- [114] Gonzales F.J. Origen, taxonomía y anatomía de la planta de arroz (*Oryza sativa* L.). Tascon, E.; Garcia, E (eds.). CIAT; PNUD. Cali, Colombia. P 47-64; 2; 1985.
- [115] Porter, C O. Taxonomy of flowering plants. 1nd ed. San Franscisco, EEUU: Freeman; 2008.

- [116] Chandler, R.F Jr. Rice in the tropics. A guide to the development of national programs. Inter-Agriculture Development Service. Westview, CO, EEUU. 256p; 1979.
- [117] Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). DeGiovanni B, Martinez R., Motta O. (Eds) Producción eco eficiente de arroz en América Latina. Cali, Colombia; 2010.
- [118] Ahuja SC, Srivastava MP. Stem rot of paddy: a review. *Agri Rev*, 1990,11(2):61–78.
- [119] Garrido MJ, Malaguti G. Occurrence of *Sclerotium oryzae* in rice in Calabozo, Venezuela. *Fitopatología Venezolana*,1995, 8(1):19.
- [120] Cedeno L, Nass H, Carrero C, Cardona R, Rodriguez H, Aleman L. *Sclerotium hydrophilum* on rice in Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, 1997, 10(1):9–12.
- [121] Watson A, Priest MJ. Stem rot of rice in the Murrumbidgee Irrigation area of New South Wales. *Australasian Plant Pathol*, 1998, 27(2):80–83.
- [122] Javan-Nikkhah M, Hedjaroude GA, Sharifi-Tehrani A, Elahinia SA. Rice stem rot in Gilan, Iran. *Iranian J Plant Pathol*, 1998, 34(1/2):76–83.
- [123] Aye, S. S., et al. Stem rot of rice caused by *Sclerotium hydrophilum* isolated in Myanmar. *Plant Pathology*, 2009, vol. 58, no 4, p. 799-799.
- [124] Krause RA, Webster RK. Stem rot of rice in California. *Phytopathology*, 1973, 63:518–523.
- [125] Vincent, J.M. Distribution of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature*,1927, 159: 850.
- [126] International Rice Research Institute (IRRI). Drawing and Test Standard Paper of Throw-in Type thresher; 1981.

