

# II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y Cuyo

Trabajos completos y comunicaciones

Compiladores:

Pablo Monetta

Héctor Emilio Paroldi

Roberto Esteban Miguel



# II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y Cuyo

Trabajos completos y comunicaciones

*Compiladores:*

*Monetta, Pablo  
Paroldi, Héctor Emilio  
Miguel, Roberto Esteban*



Secretaría  
de Agroindustria



Ministerio de Producción y Trabajo  
Presidencia de la Nación

*Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria  
Estación Experimental Agropecuaria San Juan*

2019

II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y Cuyo: trabajos completos y comunicaciones / Matías Alancay ... [et al.]; compilado por Pablo Monetta; Héctor Emilio Paroldi; Roberto Esteban Miguel. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ediciones INTA. Estación Experimental Agropecuaria INTA San Juan, 2019. Libro digital, PDF

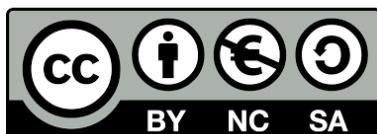
Archivo Digital: descarga y online  
ISBN 978-987-521-982-3

1. Calidad del Medio Ambiente. 2. Residuo Agrícola. 3. Agricultura. I. Alancay, Matías. II. Monetta, Pablo, comp. III. Paroldi, Hector Emilio, comp. IV. Miguel, Roberto Esteban, comp.  
CDD 631

**Diseño:**

Susana Beatriz Macías Vargas, Pablo Monetta  
INTA EEA San Juan  
Roberto Esteban Miguel  
INTA EEA Chilecito

Las fotos del diseño de la tapa fueron extraídas de los trabajos que componen el libro. Arriba izquierda: Aplicación de enmiendas orgánicas en parcelas experimentales (Soto Miranda, D. et al.); Arriba derecha: Remoción mecanizada de las pilas de compost (Orden, L. y Ahualli, P.); Abajo izquierda: Panes elaborados con harina de cáscara de zapallo (Roman, M.C. et al.); Abajo derecha: Micrografía electrónica de escobajo (Navas, C.S. et al).



## Comportamiento de hongos en medios con vinaza de caña de azúcar

Carbajo M.S.<sup>1\*</sup>, Ojeda Fermoselle, A.C.<sup>3</sup>, Meneguzzi N.<sup>1</sup>, Canteros B. I.<sup>2</sup>, Rodríguez G.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitopatología de frutales. Estación Experimental Agrícola INTA Famaillá, Ruta Prov. 301 km 32, Padilla, Famaillá, Tucumán, Argentina. <sup>2</sup>Laboratorio de Fitopatología. Estación Experimental Agropecuaria INTA Bella Vista, Ruta 27, Km 38,3, Bella Vista, Corrientes, Argentina. <sup>3</sup>Cátedra de Fruticultura, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, Av. Néstor Kirchner 1900, Tucumán, Argentina.

\* [carbajoromero.maria@inta.gob.ar](mailto:carbajoromero.maria@inta.gob.ar)

### Introducción

El incremento de los “residuos”, actualmente denominados subproductos de la actividad agropecuaria, es un grave problema desde el punto de vista ambiental. Por este motivo resulta un desafío constante encontrar tratamientos adecuados para su disposición final, como así también la búsqueda de usos alternativos. Para ello, resulta importante investigar sobre el posible uso de estos subproductos, ya sea como sustrato para la multiplicación y crecimiento de microorganismos benéficos o como posibles biocidas sobre patógenos de cultivos.

La vinaza es el subproducto resultante de la producción de bioetanol y puede provenir de diversas materias primas (caña de azúcar, remolacha, café, vino, etc.). Bernal-González et al., [1], definen a la vinaza como “una disolución de sustancias, sales minerales y orgánicas, con valor relativo y con potencial para diversos usos”. La composición de las vinazas varía según condiciones climáticas y edáficas, la fuente de origen, condiciones de cultivo y los procesos industriales dentro de cada fábrica, pero en general tienen alto contenido de materia orgánica, azúcares, sales y se caracterizan por tener bajo pH y alta conductividad eléctrica [1, 5, 6].

Por su composición la vinaza presenta características químicas favorables al desarrollo de microorganismos [9]. Los azúcares y materia orgánica, podrían ser utilizados como sustratos para favorecer la multiplicación de microorganismos benéficos como de *Trichoderma* spp. Se reportó que la vinaza acelera la descomposición de residuos de caña, cuando es aplicada al suelo, mediado por el incremento de microorganismos descomponedores [10].

Sin embargo, las vinazas también contienen ácidos orgánicos (ácido láctico, oxálico, málico y acético), ácidos grasos volátiles, glicerol, etanol, melanoidina y compuestos fenólicos que, podrían

reducir o inhibir la actividad de los microorganismos, tanto de los benéficos como de los patógenos [5, 6].

Existen pocas referencias bibliográficas del comportamiento de la vinaza frente a microorganismos, o de uso como biofungicida [2, 8].

El hongo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa, sin.: *Guignardia citricarpa* Kiely, es un patógeno de *Citrus* que causa la enfermedad mancha negra de los cítricos, restrictiva a ciertos mercados. Al final de su ciclo biológico desarrolla ascosporas en las hojas de citrus que se desprenden, asegurando así el inóculo inicial para el próximo ciclo de infección. Una medida complementaria para interrumpir su ciclo sería acelerar la descomposición de esta hojarasca. La vinaza aplicada sobre esta hojarasca podría tener un efecto directo sobre los microorganismos saprófitos presentes allí, favoreciendo la descomposición de las mismas.

En función de esto el objetivo del trabajo fue evaluar el comportamiento del patógeno *P. citricarpa* y del agente de biocontrol *Trichoderma harzianum* (Rizoderma®) en medio de cultivo adicionado con vinaza de caña de azúcar para probarlo como posible alternativa de control del primero y sustrato del biocontrolador.

### Materiales y métodos

El ensayo se realizó en el laboratorio de fitopatología de frutales del INTA Famaillá.

#### Aislamiento de *P. citricarpa* a partir de muestras cítricas

Se colectaron muestras de frutos de limón, de la variedad Eureka de lotes comerciales en Tafi Viejo (Tucumán) para realizar aislamientos de *P. citricarpa*.

El aislamiento se realizó en placas con agar papa glucosado 2% (APG 2%). Los aislamientos se incubaron en estufa a 25-27°C durante 5 días y se repicaron las colonias con características de

*Phyllosticta* sp., las cuales son de color negro, lobuladas y costrosas.

Luego estas colonias se repicaron en agar avena, para identificar los aislados, ya que en dicho medio *P. citricarpa* forma un halo amarillento característico [4].

Posteriormente se realizó un cultivo monósporo y todos los cultivos se conservaron en APG 2 % refrigerados hasta su uso y luego se activaron por repique para utilizar cultivos jóvenes (14 días de crecimiento) en los diferentes ensayos.

#### Activación del agente de biocontrol

En los ensayos se utilizó la cepa *Trichoderma harzianum* 2 (Th2), (Rizoderma®) (<http://www.rizobacter.com/argentina/rizoderma>) que fue activada, a partir del producto comercial, en medio APG 2% para utilizar cultivos jóvenes con 7 días de crecimiento.

#### Vinaza de caña de azúcar

La muestra de vinaza empleada para los ensayos fue cedida por un ingenio de Tucumán, de la zafra 2016, y sus características químicas fueron determinadas en el laboratorio de Química y Suelo de INTA Famaillá.

**Evaluación del crecimiento de los hongos:** *T. harzianum* y *P. citricarpa*, en medio de cultivo adicionado con vinaza

Para los ensayos se usaron diferentes concentraciones de vinaza: 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 20% y 30% adicionadas en medio de cultivo APG Merck®. Como testigo se empleó el APG solo, sin vinaza ajustado a pH 4,9 como el resto de los medios con vinaza.

Se colocaron discos de 6 mm de diámetro del hongo (*Phyllosticta* o *Trichoderma*) en el centro de placas de Petri. Se incubaron en estufa a 27 ° C 12 h de luz y 12 h de oscuridad y se midió el crecimiento de la colonia (cm) cada 7 días, hasta alcanzar el borde la placa. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento en un DCA.

#### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el paquete InfoStat, a través de Análisis de la Varianza (ANOVA) con comparación de medias por la prueba de Tukey a un  $\alpha=0,05$ .

## Resultados

### Aislamiento de *P. citricarpa* a partir de muestras cítricas

Luego de 5 días de incubación, se revisaron las placas y se repicaron las colonias típicas de *Phyllosticta* sp. con características tales como color negro, lobuladas y costrosas. De las 40 siembras de tejido enfermo se lograron aislar solo dos colonias con características de *P. citricarpa*.

Estas dos colonias se repicaron en placas de Petri con agar avena para observar o no la formación de halo amarillo, característico de *P. citricarpa*. En base a los resultados obtenidos, se identificó fenotípicamente como *P. citricarpa* solo una de ellas, ya que se evidenció un halo amarillo alrededor de la colonia y la otra como *Phyllosticta* sp., porque en este aislado no se formó dicho halo (Figura 1).

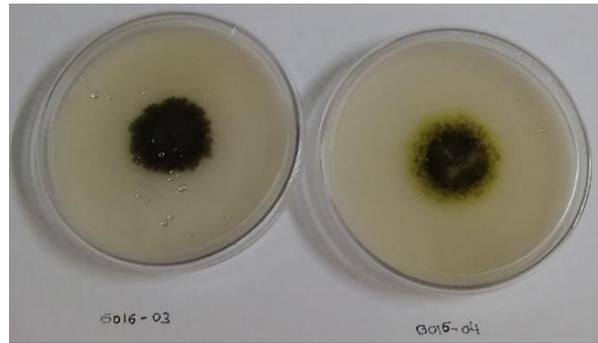


Figura 1. *Phyllosticta* sp. (Izquierda) y *Phyllosticta citricarpa* (derecha).

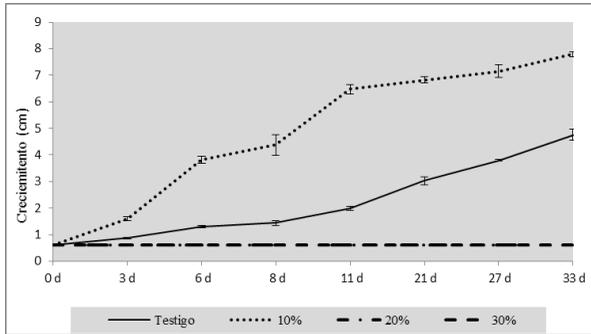
### Parámetros químicos de la vinaza

Los parámetros químicos de la muestra de vinaza empleada fueron: pH 4.7; C.E 32,8 dS/m; Na 367,8 mg/l, K 15,9 g/l y N 1,4 g/l.

### Evaluación del crecimiento de los hongos en medio de cultivo adicionado con vinaza:

*P. citricarpa*:

En el primer experimento las concentraciones de 20% y 30% de vinaza en el medio de cultivo resultaron inhibitorias para el crecimiento de *P. citricarpa*. Sin embargo solo se utilizaron estas concentraciones a modo exploratorio para observar el comportamiento *in vitro* ya que son elevadas para su aplicación en suelo. En cambio, en la concentración de 10%, y contrariamente a lo esperado, se observó un efecto estimulante del medio adicionado con vinaza en el crecimiento del hongo, con diferencias altamente significativas respecto al testigo. A los 33 días, el hongo en el medio con vinaza alcanzó los 7,8 cm de diámetro frente al testigo que a ese tiempo tuvo un diámetro de 4,7 cm (Figura 2).

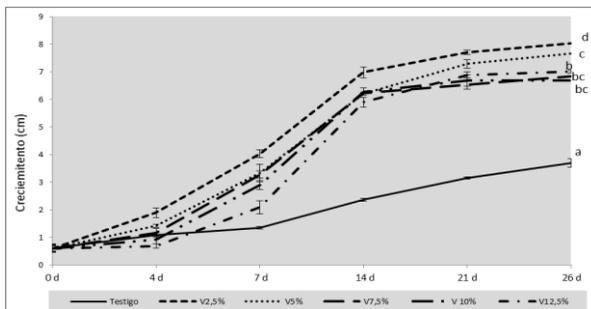


**Figura 2.** Crecimiento de *P. citricarpa* con diferentes dosis de vinaza

Luego, cuando se evaluaron concentraciones cercanas al 10% (2,5%-12,5%) también se evidenció un aumento significativo en la tasa de crecimiento del hongo para todos los tratamientos respecto al testigo (Figura 3).

En función de estas curvas se calculó el Área Bajo la Curva (ABC) y los valores difirieron significativamente del testigo, siendo el tratamiento de vinaza 2,5% significativamente el de mayor área bajo la curva (Figura 3).

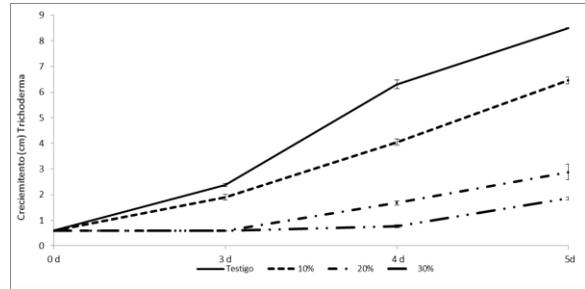
En la última evaluación, a los 26 días, *P. citricarpa* presentó valores de diámetro de crecimiento entre 7,0-8,0 cm en las diferentes dosis de vinaza, mientras que a este tiempo el testigo alcanzó valores de  $3,7 \pm 0,15$  cm (Figura 3).



**Figura 3.** Crecimiento de *P. citricarpa* con diferentes concentraciones de vinaza: 2,5%, 5%, 7,5%, 10% y 12,5 %. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas, del ABC entre tratamientos, según Tukey a un  $p < 0,05$

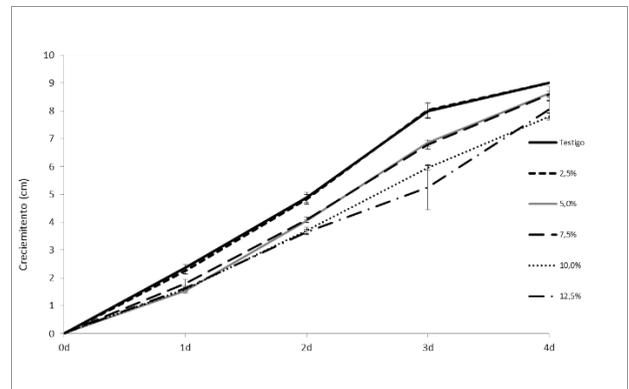
#### *T. harzianum*:

Como se puede observar en la Figura 4, las diferentes concentraciones de vinaza (10%, 20% y 30%) afectaron el crecimiento de *Trichoderma* respecto al testigo. Estas concentraciones no resultaron favorables para su crecimiento.



**Figura 4.** Crecimiento de *Trichoderma* con diferentes dosis de vinaza.

Luego, cuando se evaluaron concentraciones cercanas al 10% (2,5%-12,5%) también se observó un retraso en la tasa de crecimiento en todas las concentraciones, a excepción del tratamiento 2,5 % que fue similar a la curva del testigo (Figura 5).



**Figura 5.** Crecimiento de *T. harzianum* con diferentes concentraciones de vinaza: 2,5%, 5%, 7,5%, 10% y 12,5 %.

## Discusión

El comportamiento de los hongos frente a la vinaza fue diferente a lo esperado. Por un lado, hubo un efecto favorable de la vinaza para el patógeno y un retraso del crecimiento del hongo benéfico en la mayoría de las concentraciones de vinaza, a excepción de 2,5%. Tal como lo menciona Santos *et al.* [8], la literatura es muy escasa para comparar estos resultados con la de otros autores, ya que la mayoría de las investigaciones se concentran en el uso de la vinaza como fertilizante y mejorador de las propiedades del suelo y no en su comportamiento frente a los microorganismos.

Sin embargo, estos resultados son de gran relevancia desde el punto microbiológico, ya que su adición al medio de cultivo estimula el crecimiento de *P. citricarpa*, patógeno de muy lento crecimiento en los medios estándares, y que

es rápidamente invadido por otros hongos de los géneros *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp. o *Cladosporium* spp. Esto dificulta su diagnóstico y aislamiento [3, 7]. Por esto, el empleo de este medio podría resultar útil para el diagnóstico clásico por aislamiento directo de síntoma, como así también para multiplicar y obtener en poco tiempo inóculo, facilitando estudios de este hongo tan importante para la citricultura.

## Conclusiones

No se encontró el efecto biocida buscado de la vinaza frente a *P. citricarpa*.

Se encontró un efecto de estimulación del medio con vinaza en el crecimiento de *P. citricarpa*.

Se sugiere realizar estudios para determinar que factor físico, químico y/o biológico de la vinaza favorece el crecimiento de *P. citricarpa in vitro* y ajustar el medio para su uso.

La vinaza afectó negativamente el crecimiento de *Trichoderma* a excepción de la concentración 2,5%.

Se debe evaluar el comportamiento e interacción de estos microorganismos con vinaza en su hábitat natural.

## Agradecimientos

Agradecemos a los Ings Rocio Portocarrero y Juan Vallejo por las muestras de vinaza para este estudio y al Téc. Qco. Marcelo Gallac por el análisis de las muestras.

También se agradece a la empresa Rizobacter Argentina por la provisión del producto Rizoderma®.

## Bibliografía

- [1] Bernal-González, M., Poblano-Flores, A., Toscano-Pérez, D. y Durán-de-Bazúa, C. Ahorro de energía: Uso de reactores anaerobios termofílicos para la obtención de metano a partir de vinazas de ingenios azucareros-alcoholeros. Efecto de la temperatura en el desempeño de las biocomunidades anaerobias. *Tecnol. Cienc. y Educ.* 27, 80–88 (2012).
- [2] Cardozo, R. B., Araújo, F. F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* 15, 1283–1288 (2011).
- [3] Er HL, Hendricks K, Goss EM, et al. Isolation and biological characterization of guignardia species from citrus in Florida. *J Plant Pathol.*; 96(1):43-55. doi:10.4454/JPP.V96I1.025 (2014).
- [4] FAO. NIMF 27. Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas PD 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa en frutas. [Acceso Abril 2018] Disponible en [https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2016/01/ISPM\\_27\\_2006\\_WithoutAppendix2\\_Es\\_2](https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2016/01/ISPM_27_2006_WithoutAppendix2_Es_2)

[016-01-14.pdf](#) (2016)

[5] Fuess, L. T., Garcia, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. *J. Environ. Manage.* 145, 210–229 (2014).

[6] Parnaudeau, V., Condom, N., Oliver, R., Cazeville, P., Recous, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresour. Technol.* 99, 1553–1562 (2008).

[7] Peres N a., Harakava R, Carroll GC, Adaskaveg JE, Timmer LW. Comparison of Molecular Procedures for Detection and Identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Dis.*; 91(5):525-531. doi:10.1094/PDIS-91-5-0525 (2007).

[8] Santos, M., Diáñez, F., de Cara, M., Tello, J. C. Possibilities of the use of vinasses in the control of fungi phytopathogens. *Bioresour. Technol.* 99, 9040–9043 (2008).

[9] Shi, F.; Zhu, Y. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. *Biocontrol*, v.52, p.845-853, (2007).

[10] Yamaguchi, C. S., Ramos, N. P., Carvalho, C. S., [11] Pires, A. M. M., de Andrade, C. A. Sugarcane straw decomposition and carbon balance as a function of initial biomass and vinasse addition to soil surface. *Bragantia* 76, 135–144 (2017).