

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CON CULTIVO PARA PRESENTAR A LA COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN DE LOS USOS DE LA PLANTA DE CANNABIS Y SUS DERIVADOS

INSTITUCIÓN DONDE SE LLEVARÁ ADELANTE EL PROYECTO: Instituto de Investigaciones Biológicas, Unidad Ejecutora de doble dependencia Universidad Nacional de Mar del Plata- CONICET

INVESTIGADORA RESPONSABLE: Débora Nercessian

TITULO DEL PROYECTO: **Utilización de la biomasa de cannabis para la generación de bioinsumos hortícolas.**

OBJETIVO GENERALES

Uno de los desafíos a nivel mundial en torno al cambio climático, la degradación de recursos naturales y la contaminación ambiental, implica la necesidad de avanzar hacia procesos productivos que promuevan un desarrollo sustentable. El uso de agroquímicos como componente central de la producción agrícola y hortícola enfrenta cuestionamientos por sus efectos tanto sobre el ambiente como sobre la inocuidad de los alimentos y la salud humana. En este contexto emerge la bioeconomía como concepto y herramienta para alcanzar una utilización más eficiente y sustentable de los recursos biológicos. En este sentido, se observa a nivel mundial un crecimiento dinámico y sostenido del mercado de bioinsumos para la agricultura, estimado en torno al 15% anual desde hace una década (Starobinsky y col, 2021). Estos insumos de origen biológico encuadran en la estrategia de la bioeconomía, al ser productos ambientalmente sustentables que no dejan residuos químicos en los alimentos.

Argentina es uno de los principales países productores y proveedores de alimentos a nivel mundial. La cadena de producción hortícola ocupa aproximadamente 500.000 hectáreas y genera 230 millones de dólares en exportaciones (INTA, 2009). Por lo tanto, nuestro país desempeña un rol relevante en materia de seguridad alimentaria, y enfrenta así el desafío de reconvertir la matriz tecno-productiva del sector agrohortícola para disminuir el uso de agroquímicos avanzando hacia la difusión de tecnologías ambientalmente amigables como los bioinsumos. (Anlló y col, 2019; Trigo y col, 2016 ).

Los bioinsumos permiten abordar diversas problemáticas tales como el combate y la regulación de plagas y enfermedades, la inducción de defensas y la promoción del crecimiento y desarrollo vegetal, sin demandar derivados de recursos no renovables para su producción ni dejar trazas de residuos tóxicos en los alimentos. La definición de bioinsumos incluye biofertilizantes, bioestimulantes, biocontroladores, biorremediadores y/o reductores del impacto ambiental, biotransformadores para el tratamiento de subproductos agropecuarios y bioinsumos para la producción de bioenergía (Bocchetto y col, 2020).

Los bioinsumos agrohortícolas abarcan aquellos que tienen un efecto directo sobre la producción, impulsando el crecimiento o desarrollo vegetal, combatiendo directa o indirectamente una plaga y/o disminuyendo los efectos negativos de todo tipo de estrés biótico o abiótico sobre los cultivos. Estos bioinsumos pueden ser clasificados en dos grandes grupos: bioestimulantes que estimulan el crecimiento o desarrollo de las plantas y los biocontroladores que buscan combatir plagas o disminuir sus efectos negativos.

En los últimos años ha habido un renovado interés por las propiedades medicinales y terapéuticas de la planta *Cannabis sativa* tanto a nivel internacional como nacional.

Particularmente en nuestro país, el interés por esta planta como alternativa terapéutica ha crecido considerablemente luego de la promulgación en 2017 de la Ley 27350, que permite la investigación en cannabis con fines medicinales y de la Ley 27669 del año 2022 que aporta el marco para el desarrollo de la industria del cannabis medicinal y el cáñamo industrial.

El material utilizado para la producción de derivados de cannabis con fines terapéuticos es la inflorescencia. El resto de la biomasa, que puede alcanzar gran tamaño dependiendo de la variedad y forma de cultivo, en general no se utiliza en nuestro país. En este proyecto proponemos explorar posibles aplicaciones de los órganos de la planta de cannabis que son descartados, con el fin de aprovecharlos como bioinsumos para la actividad hortícola. Nos centraremos en estudiar sus efectos sobre el desarrollo de tomate, como especie modelo, dado que es un cultivo de interés hortícola de nuestra región (sudeste bonaerense). Para ello dispondremos de los tallos y ramas de cannabis para producir biochar, material generado a partir de la pirólisis reductiva de residuos vegetales, que puede servir como suplemento de suelos con capacidad de intercambio de electrones con microorganismos. En particular analizaremos si el biochar favorece, por un lado, el establecimiento de comunidades microbianas promotoras de crecimiento en la rizósfera de plantas de tomate y por otro lado, si el agregado de biochar en el sustrato mejora sus parámetros de crecimiento. Por otro lado, la biomasa compuesta por hojas y raíces será estudiada como bioestimulante del crecimiento de la planta de tomate y como biocontroladora para combatir infecciones provocadas por patógenos vegetales. A partir de lo expresado, el Objetivo General del proyecto es ***poner en valor los residuos biomásicos de plantas de cannabis para su aprovechamiento en el sector hortícola.***

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar y caracterizar biochar eléctricamente activo a partir de tallos de plantas de cannabis para ser utilizado como enmienda de suelos de uso hortícola.
2. Estudiar la capacidad del biochar para estimular el desarrollo de especies vegetales de interés hortícola.
3. Evaluar los efectos del biochar sobre el desarrollo de comunidades microbianas promotoras del crecimiento vegetal.
4. Evaluar la biomasa de cannabis (raíces y hojas) como bioinsumos para especies vegetales de interés hortícola.

#### HIPÓTESIS

- A. Los tallos de cannabis permiten producir biochar con características estructurales y propiedades fisicoquímicas adecuadas para ser utilizado como enmienda de suelos.
- B. El agregado de biochar de cannabis en el suelo favorece el desarrollo de microorganismos promotores de crecimiento vegetal.
- C. Los restos de biomasa de cannabis representan una fuente de nutrientes que podría reemplazar o reducir el uso de fertilizantes sintéticos.
- D. Los extractos obtenidos a partir de hojas y raíces de cannabis tienen efecto biopesticida sobre microorganismos fitopatógenos.

ACTIVIDADES PROPUESTAS: se explican las Actividades referidas a cada Objetivo, con el marco teórico que las sustenta.

Objetivo 1. Generar y caracterizar biochar eléctricamente activo a partir de tallos de plantas de cannabis para ser utilizado como enmienda de suelos de uso hortícola.

Objetivo 2. Estudiar la capacidad del biochar para estimular el desarrollo de especies vegetales de interés hortícola.

Objetivo 3. Evaluar los efectos del biochar sobre el desarrollo de comunidades microbianas promotoras del crecimiento vegetal.

El biochar es un bioestimulante ambientalmente amigable que permite mejorar la fertilidad de los suelos, estimulando el crecimiento de las plantas y aumentando la productividad de los cultivos (Semida et al., 2019). Se produce a partir de residuos vegetales sometidos a un proceso denominado pirólisis que consiste en el calentamiento del material en un ambiente con nula o muy baja concentración de oxígeno. De esta forma se generan cambios fisicoquímicos en los tejidos vegetales como la generación de compuestos húmicos, aumento de la capacidad de intercambio de iones y de absorción de agua y otros compuestos y de la electroconductividad del material. Se ha demostrado también que el biochar promueve un aumento de la actividad de microorganismos beneficiosos para el crecimiento vegetal en el suelo (Steinbeiss et al., 2009). El biochar generado a bajas temperaturas contiene compuestos que pueden ser utilizados como dador o aceptor de electrones, como grupos quinoles y otros grupos aromáticos (Al-Wabel et al., 2013), permitiendo sostener el crecimiento y la actividad microbiana. Cuando se piroliza la biomasa a altas temperaturas, los compuestos carbonados cristalizan en la estructura ordenada del grafito, confiriendo conductividad eléctrica al biochar. El biochar de alta temperatura puede así promover el intercambio de electrones entre especies de microorganismos (Chen et al., 2014) o servir como puente entre los microorganismos y aceptores o dadores de electrones (Kappler et al., 2014), potenciando la diversidad y actividad microbiana en el suelo. También potencia esta diversidad al aumentar la capacidad de adsorción de agua del suelo, ser fuente de nutrientes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) y carbono, regular el pH del medio y servir como sustrato para el crecimiento de biofilms. Sin embargo, el efecto del agregado del biochar en los microorganismos del suelo ha sido menos estudiado que su impacto en las propiedades fisicoquímicas del suelo (Palansooriya et al., 2019).

Por otra parte, durante la pirólisis, el carbono de los tejidos vegetales se convierte en una forma mineral altamente estable, evitando así su liberación a la atmósfera en forma de  $\text{CO}_2$ , como hubiera ocurrido si los residuos vegetales hubiesen seguido el ciclo tradicional de compostaje o incineración (Cui et al., 2022). De esta forma la producción de biochar permite aumentar la productividad de los cultivos vegetales, a la vez que se reduce su huella de carbono.

Las características físico-químicas del biochar y su efecto en la productividad de los cultivos dependen en gran medida de la materia prima de partida y de la temperatura de pirólisis (Albuquerque et al., 2014). En este proyecto se propone producir biochar a partir de tallos y ramas de cannabis para estudiar su efecto en la productividad de especies hortícolas de interés, como el tomate. Se ensayarán diferentes temperaturas de pirólisis para encontrar la que genere un material con características físicas y químicas acordes al uso deseado como enmienda de suelos y que presente conductividad eléctrica para interactuar con la microbiota del suelo y las raíces de los cultivos. Ensayos preliminares realizados en nuestro grupo indican que el pirolizado

de ramas de cannabis a 800°C permite obtener biochar con buena estructuración y resistencia a la compresión, lo cual es muy promisorio para avanzar en el tema.

Se analizarán las propiedades fisicoquímicas del suelo con o sin el agregado de biochar obtenido a las diferentes temperaturas ensayadas. En paralelo, se analizará la diversidad microbiana general y la de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en particular, presente en cada condición. Todas estas variables se relacionarán con el desarrollo de los cultivos de tomate mediante la estimación de parámetros como largo de raíz principal, formación de raíces secundarias, tamaño y peso de las hojas, entre otros.

**Objetivo 4.** Evaluar la biomasa de cannabis (raíces y hojas) como bioinsumo para especies vegetales de interés hortícola.

En este objetivo se propone utilizar la biomasa de *Cannabis sativa* (hojas y raíces) que se descarta luego de la cosecha de las flores, como bioestimulantes y biocontroladores. En el primer caso estos bioinsumos se utilizarán secos y en polvo como suplemento del suelo a diferentes concentraciones. En el caso del uso de la biomasa como biocontroladores se obtendrán extractos acuosos de hojas y raíces y se estudiará su efecto inhibitorio *in vitro* sobre hongos y bacterias fitopatógenas. En nuestro laboratorio hemos estudiado previamente el efecto de extractos alcohólicos de la planta de cannabis sobre esporas de hongos fitopatógenos y diferentes bacterias. Los resultados evidenciaron la actividad antimicrobiana de estos compuestos, en un grado variable dependiendo del microorganismo blanco.

Los extractos a analizar en el presente proyecto no se obtendrán usando solventes alcohólicos, por lo que no estarán enriquecidos en cannabinoides, sino que se ensayarán extractos acuosos para explorar otras potenciales aplicaciones, diferentes de las medicinales, de principios activos menos estudiados hasta el momento.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS ACTIVIDADES:** Se detalla la metodología propuesta para poder realizar cada actividad

#### **Obtención del material vegetal**

Las plantas de cannabis se cultivarán en las cámaras de cultivo que posee el grupo de trabajo, bajo condiciones controladas de humedad, luz y temperatura.

Se utilizará un fotoperiodo 18:6 luz:oscuridad durante el periodo vegetativo y de 12:12 luz:oscuridad durante el periodo de floración. La iluminación será mediante placas LED de 400W/m<sup>2</sup> de potencia. Los valores de humedad relativa se mantendrán en un rango de 50-70% y la temperatura de cultivo será de 25°C. Se utilizarán variedades de *Cannabis sativa*, correspondientes a los tres quimiotipos, que ya dispone el grupo de investigación. Una vez alcanzada la madurez de las plantas, las flores se cosecharán para ser utilizadas en otro proyecto del grupo, mientras que sus tallos y ramas más gruesas se cortarán para ser utilizadas en los Objetivos 1, 2 y 3. Las hojas y raíces se utilizarán en el Objetivo 4.

**Objetivo 1:** Generar y caracterizar biochar eléctricamente activo a partir de tallos de plantas de Cannabis para ser utilizado como enmienda de suelos de uso agrícola.

**Producción de biochar:** Ramas y tallos secos de las variedades de cannabis de los quimiotipos I, II y III serán procesados en una chipeadora para obtener tamaños de material aptos para serpirolizados (Olszyk et al, 2020; Shi et al., 2020). Se utilizarán temperaturas de pirólisis de 400 y 500 °C que son las utilizadas tradicionalmente para la producción de biochar a gran escala debido al bajo costo del equipamiento requerido para alcanzar dichas temperaturas y de 800°C debido a que a esta temperatura se obtiene un material de gran conductividad eléctrica que permitirá evaluar el efecto del intercambio de electrones entre especies de microorganismos. La pirólisis se llevará a cabo en un horno de tratamientos térmicos con atmósfera controlada disponible en el grupo de trabajo. Para asegurar la ausencia de oxígeno, se realizará vacío a la cámara que contiene el material a pirolizar y se circulará nitrógeno de grado industrial durante el proceso. El tiempo de pirólisis será fijado en 1 hora (Chen et al., 2012). Una vez obtenido, el biochar será molido y tamizado para obtener granos de aproximadamente 1mm.

**Caracterización del biochar:** Se analizará la composición de los materiales obtenidos mediante espectroscopía Raman y FTIR, ambas técnicas disponibles en INTEMA, buscando determinar las distintas fases cristalinas de carbono presentes en los materiales (utilizando grafito y grafeno como patrones) e identificar la presencia de grupos funcionales oxidables y reducibles biológicamente, comúnmente presentes en este tipo de materiales (grupos quinoles y otros grupos aromáticos) (Al-Wabel et al., 2013). Se medirá la conductividad eléctrica de los materiales utilizando una celda de cuatro puntas siguiendo procedimientos estándar. Se pesará el material antes y después de la pirólisis para determinar el rendimiento másico del proceso. Se realizará un análisis termogravimétrico (TGA) para identificar las posibles reacciones térmicas que ocurren a cada temperatura, de acuerdo a lo reportado en bibliografía para materiales similares (Tripathi et al., 2016). Se medirá la porosidad y distribución de tamaños de poro del material mediante absorción de nitrógeno. Todos estos ensayos se realizarán con los equipos disponibles en INTEMA-UNMdP-CONICET, lugar de trabajo de parte del equipo de este proyecto.

Una vez caracterizado el biochar generado con cada una de las tres variedades de cannabis (quimiotipos I, II y III) se seleccionará el que cuente con las mejores características para la interacción con los microorganismos del suelo (se elige como criterio la presencia de grupos funcionales redox y conductividad eléctrica). Los ensayos siguientes se realizarán con el biochar de ese quimiotipo seleccionado y se analizarán a las tres temperaturas de producción.

**Aplicación del biochar:** Se probará el efecto del biochar proveniente del quimiotipo de cannabis seleccionado y generado a cada temperatura (400, 500 y 800°C) para evaluar el desarrollo vegetal de tomate, como una planta de interés hortícola. Para ello se mezclará biochar con suelo de uso agrícola en proporción 10% biochar-90% suelo y se dispondrá de bandejas multiceldas (12 x 6) donde se cultivarán las plántulas (Ver más abajo).

El horno de pirólisis a utilizar tiene un rendimiento aproximado del 50% en la pirólisis y permite obtener una cantidad de aproximadamente 100 g de biochar por batch. Teniendo en cuenta que el biochar se agregará al suelo en una relación de 10 % en peso, cada batch permitiría producir

la cantidad de biochar necesaria para preparar 1 kg de suelo para cultivo. La capacidad de cada celda a utilizar es de 15 gr de suelo, por lo que con cada batch se podrán ensayar más de 600 celdas, lo que permite realizar ensayos con un elevado número de repeticiones para cada condición, sin que resulte limitante.

**Evaluación del efecto del biochar sobre las características del suelo:** Se propone analizar el efecto del biochar sobre suelo de uso agrícola, como ensayo de escalado a situaciones de campo. Para ello las muestras de suelo serán recolectadas de la Unidad Demostrativa Agroecológica Balcarce (UDAB), un predio de 40 ha ubicado en territorio de la Unidad Integrada Balcarce, donde se trabaja en el desarrollo, evaluación y transferencia de tecnologías y sistemas productivos alternativos desde el año 2017 (Maceira et al., 2020). Las muestras serán recolectadas en superficie de entre 0 y 10 cm, posteriormente tamizadas con una malla de 5 mm y mezcladas con el biochar generado a cada temperatura en una proporción del 10%. Se regará para aportar humedad y se dejarán por un período de 3-4 meses para su reestructuración. Este tiempo resulta suficiente para analizar parámetros que se modifican en escalas espacio-tiempo cortas y permiten evaluar la estructura del suelo en las diferentes condiciones de estudio. Se analizará pH, conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica total, contenido de nitrógeno y de fósforo. Se analizarán también parámetros físicos que resultan importantes desde el punto de vista agronómico: densidad aparente, capacidad de campo (CC), punto de marchitez permanente (PMP) y humedad al momento del muestreo para conocer la capacidad de agua útil de un suelo y su disponibilidad para las plantas, que es un factor relevante para evaluar el potencial efecto del biochar sobre los cultivos. Estos análisis se realizarán en el servicio de la Unidad Integrada Balcarce (UIB, EEA INTA-Balcarce) y Facultad de Ciencias Agrarias de la UNMdP, Laboratorio de Análisis de Suelo y Planta y Laboratorio de Física Ambiental. La facultad de Ciencias Agrarias es lugar de trabajo de parte del equipo de este proyecto.

**Objetivo 2:** Estudiar la capacidad del biochar para favorecer el desarrollo de especies vegetales de interés hortícola.

**Crecimiento de plántulas de tomate:** Las semillas de tomate platense (Horticultores MDP) se esterilizarán superficialmente en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30 % y Tween 20 al 0.2 % durante 10 min y se enjuagarán tres veces con agua estéril. Posteriormente se colocarán en recipientes plásticos conteniendo una capa de algodón cubierta con una capa de papel de filtro humedecidos con agua estéril. Los recipientes se cubrirán con papel film y se colocarán en cámara a 25°C, con una humedad relativa del 100%, durante 48 h en oscuridad. Luego las semillas germinadas (radícula 2-3 mm) se colocarán en bandejas de cultivo plásticas de 72 celdas con suelo de uso agrícola, con o sin el agregado de 10% biochar generado a diferentes temperaturas. Las bandejas se mantendrán a 25 °C, con un período 16/8 h de luz/oscuridad, una humedad relativa del 90% y una intensidad lumínica de 150 mM/m<sup>2</sup>/s. Las bandejas se regarán por debajo, agregando 400 ml de agua cada 2 días.

**Análisis de parámetros de desarrollo vegetal:** A lo largo del crecimiento de las plantas se monitorearán sus características morfológicas, como la longitud del vástago, tasa de crecimiento

(longitud del vástago/semana), tamaño de hojas, arquitectura radical, peso seco y fresco de la porción aérea y radical (Gange and Gadhave, 2018). También se analizará el contenido de clorofila.

**Determinación del contenido de clorofila:** El contenido de clorofila foliar se cuantificará mediante el sensor manual SPAD 502 (Minolta®). Alternativamente se determinará por extracción con solvente realizando un homogenato con 1 gramo de material fresco de la parte aérea de las plántulas de tomate en 1 ml de acetona 100 %. Luego se centrifugará a 3000 g por 10 minutos y se determinará las absorbancias a 662 y 645 nm. Los contenidos de clorofila se determinarán utilizando las ecuaciones correspondientes al solvente utilizado (Costache et al., 2012).

Clorofila a =  $11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$

Clorofila b =  $18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$

**Objetivo 3:** Estudiar la capacidad del biochar para favorecer el desarrollo de comunidades microbianas promotoras del crecimiento vegetal.

**Análisis de la comunidad microbiana de la raíz:** La diversidad microbiana se estudiará en su conjunto, a través de análisis metagenómico, a fin de conocer las poblaciones presentes en rizósfera y endorizósfera de tomate y cómo varían en función del agregado de cada tipo de biochar. En paralelo, se aislarán microorganismos de la rizósfera y se evaluará la presencia de aquellos capaces de solubilizar fósforo y fijar nitrógeno, ambos nutrientes imprescindibles para el desarrollo de las plantas de tomate.

**Estudio de diversidad microbiana:** Se analizará el suelo rizosférico y la endorizósfera de las plantas crecidas en suelo con biochar (diferentes temperaturas de generación) o en tierra sin agregados (control). Para el estudio de la rizósfera se realizará una extracción de ADN del suelo adherido a las raíces (0.5 gr) utilizando el kit DNA PuriPrep-Soil de INBIO Highway siguiendo las pautas del fabricante. El ADN extraído se resuspenderá en 30 µL de agua libre de ADNAsas y ARNAsas (provista por el kit) y se comprobará la cantidad y pureza con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). Para la microbiota de la endorizósfera las raíces se lavarán para sacar la tierra con agua estéril y luego se esterilizarán con 70 % etanol por 1 min y luego con lavandina por 5 min y se enjuagarán nuevamente con agua estéril (Cavaglieri y col. 2009). Luego se pulverizarán con nitrógeno líquido en mortero y se realizará la extracción de ADN mediante el método de CTAB descrito en Barelli et al. (2020). Se realizará la extracción por triplicado. El ADN obtenido de ambas fracciones (rizósfera y endorizósfera) se enviará a secuenciar a través de la plataforma de secuenciación Mr. DNA (Molecular Research LP, Shallowater, TX) con cebadores para la región IV del gen codificante de la subunidad 16S del ARN ribosomal. Los datos se analizarán utilizando el software Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME, versión 2).

**Aislamiento e identificación de microorganismos de interés:** Se realizarán diluciones seriadas de muestras de suelo rizosférico y endorizósfera de plantas crecidas en presencia o ausencia de biochar y se sembrarán en diferentes medios de cultivo, según la selección que se desee realizar:

- Fijación nitrógeno en condiciones de microaerofilia: alícuotas de las muestras se inocularán en medio NFb semisólido por punción en tubos de ensayo. Las muestras serán cultivadas en microaerofilia (sin agitación), a 30-32°C durante 5 a 7 días (Döbereiner et al., 1995).
- Solubilización de fósforo: para evaluar esta característica se utilizará el medio agar Pikovasky. Las muestras serán incubadas a 30-32°C durante 4 días. La aparición de una zona clara alrededor de las colonias será confirmatoria de la capacidad de solubilización de fosfato (Di Benedeto et al., 2019).
- Presencia de *Pseudomonas fluorescens* (bacteria promotora de crecimiento). Se utilizará el medio S1 y se incubarán las muestras a 25°C durante 48-72 h (Gould et al., 1985).

De cada medio se seleccionarán las colonias con diferente morfología para su aislamiento y purificación (repicando, al menos tres veces, colonias totalmente separadas de otras mediante la técnica de estriado en superficie). Se realizarán tinciones de Gram de los aislamientos para corroborar su pureza. Las cepas que arrojen un resultado positivo para alguna de las características analizadas serán identificadas molecularmente. Para ello, una colonia pura de cada aislado se resuspenderá en agua estéril (50 µl) y se hervirá por 10 minutos. Luego se centrifugará y una alícuota del sobrenadante conteniendo el ADN (1 µl) será utilizada para la amplificación por PCR del gen 16S ARNr. Se utilizarán cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3') (Dalwai et al., 2007). Los productos de amplificación serán purificados y enviados al servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del INTA Castelar. Se realizará el análisis de las secuencias obtenidas en bases de datos.

**Objetivo 4:** Evaluar la biomasa de cannabis (raíces y hojas) como bioinsumo para especies vegetales de interés hortícola.

#### **Obtención de la biomasa de cannabis como bioinsumos**

**Hojas y raíces de cannabis para su aplicación como bioestimulante:** El proceso de utilización de la biomasa desechable de la planta de cannabis comienza con la recolección y el secado de las plantas en estufa a 40°C, tras lo cual hojas y raíces se pulverizarán en mortero o molinillo. Dicha biomasa se combinará directamente con el suelo en distintas concentraciones. Las diferentes condiciones se optimizarán de acuerdo a la escala del proyecto según Salcedo et al. (2020).

**Extractos acuosos de hojas y raíces de cannabis para su aplicación como biocontrolador:** Se cosecharán hojas y raíz de las variedades de cannabis disponibles en el grupo de investigación, los cuales se homogeneizarán con dos volúmenes de buffer acetato de sodio 100 mM, pH 6.8, conteniendo 4 mM de ditioneitol (DTT) y 2.5 mM de metabisulfito de sodio. La homogeneización del tejido se realizará en un Virtis 45 (The Virtis Company, Inc., USA), a un 20% de la velocidad máxima, en cuatro períodos de 1 minuto. Los homogenatos se filtrarán con muselina y se centrifugarán a 12000 rpm por 10 minutos. Los extractos resultantes se precipitarán con sulfato

de amonio sólido al 80% de saturación. Posteriormente, se centrifugarán a 12000 rpm durante 20 minutos y los precipitados se resuspenderán en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, conteniendo 4 mM DTT y se dializarán contra el mismo buffer.

**Crecimiento de plántulas de tomate:** Las semillas de tomate platense (Horticultores MDP) se esterilizarán y crecerán como se indicó en el Objetivo 2.

**Efecto bioestimulante de la biomasa de cannabis:** Las plantas de tomates crecidas como se mencionó anteriormente se tratarán con la biomasa de hojas y raíces de cannabis secas y pulverizadas a distintas concentraciones (0.1 %, 1 % y 5% p/v). A los 7 días posteriores a su aplicación, se tomarán fotografías para determinar altura y área foliar total. Se analizarán los mismos parámetros de desarrollo que se propusieron en el Objetivo 2.

**Efecto biocontrolador de la biomasa de cannabis:** Los extractos acuosos obtenidos como se explicó más arriba de las hojas y raíces de plantas de cannabis serán evaluados como antimicrobianos sobre hongos y bacterias patógenas de plantas. Para este fin, se dispone de cultivos bacterianos de *Pseudomonas syringae* y microorganismos fitopatógenos: el oomycete *Phytophthora infestans*, (razas compatibles, aislamientos locales) y el hongo *Fusarium solani* f.sp. *eumartii*. En el caso de *P. infestans* y *F. eumartii*, se utilizarán las condiciones de aislamiento y propagación de las cepas descritas por Mendieta y col, 2006. La bacteria *P. syringae* se mantendrá en placas conteniendo medio King B-agar y se repicará en suspensiones de medio KB según Mansilla y col (2013).

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos:** Se evaluará la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos sobre la germinación de esporas de *F. eumartii* y esporangios de *P. syringae*. Para esto se incubarán suspensiones de las estructuras reproductivas de cada patógeno con diferentes concentraciones de extracto. Se evaluará y cuantificará la inhibición de la germinación de esporas y esporangios con cámara de Neubauer y bajo observación microscópica (NIKON Eclipse E2100) (Mendieta y col, 2006). Se evaluará el crecimiento del micelio fúngico en presencia de los extractos según Mesas y col, 2021. La actividad antibacteriana sobre *P. syringae* se evaluará incubando cultivos bacterianos en etapa exponencial con distintas concentraciones de extractos. A distintos tiempos se tomarán alícuotas y se cuantificará la Abs en 600 nm como medida del crecimiento bacteriano (Mendieta y col, 2006; Mansilla y col, 2013). Se obtendrán los valores de MIC que indican la mínima concentración de extracto que causa el 100% de inhibición del crecimiento del patógeno.

**Análisis del mecanismo de acción antimicrobiano del extracto de cannabis:** Se evaluará inicialmente la capacidad citotóxica de los extractos definiendo si el mismo se comporta como fungicida o fungistático. Se realizarán ensayos de viabilidad, incubando las estructuras reproductivas de *P. infestans* y *F. eumartii* en presencia y ausencia de extracto y sembrando en placas de Petri en medio sólido para la cuantificación de unidades formadoras de colonias y/o medición del radio de crecimiento (Mendieta y col, 2006). Lo mismo se realizará con bacterias, para analizar el efecto bactericida o bacteriostático. Adicionalmente se evaluará si el extracto

produce alteraciones en la permeabilidad de membrana mediante el empleo de fluoróforos como ioduro de propidio o Sytox-green (Mendieta y col, 2006; Mesas y col, 2021).

## Bibliografía

- Albuquerque JA, Calero JM, Barrón V, Torrent J, del Campillo MC, Gallardo A, Villar R. 2014. Effects of biochars produced from different feedstocks on soil properties and sunflower growth. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 177: 16–25.
- Al-Wabel MI, Al-Omran A, El-Naggar AH, Nadeem M, Usman ARA. 2013. Pyrolysis temperature induced changes in characteristics and chemical composition of biochar produced from conocarpus wastes. *Bioresource Technology* 131: 374–379.
- Anlló G, Bisang R, Campi M. (coords.) 2013. Claves para repensar el agro argentino. Eudeba.
- Barelli L, Waller AS, Behie SW, Bidochka MJ. (2020). Plant microbiome analysis after *Metarhizium* amendment reveals increases in abundance of plant growth-promoting organisms and maintenance of disease-suppressive soil. *PLoS ONE* 15: e0231150.
- Bocchetto RM, Gauna DH, Bravo GC, González CB, Rearte M, Molina Tirado L, Hilbert JA, Eisenberg P, Lecuona RE, Taraborrelli DS, Papagno SG, Vaudagna SR. 2020). Bioeconomía del norte Argentino: situación actual, potencialidades y futuros posibles. Proyecto Bioeconomía Argentina: Construyendo un Futuro Inteligente y Sustentable para el Norte Argentino 2030. Documento de Trabajo. MINCYT – INTA – INTI – UNNE – UNSa – UNSE.
- Cavaglieri L, Orlando J, Etcheverry M. 2009. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root location. *Microbiology Research* 164: 391–399.
- Chen S, He G, Hu X, Xie M, Wang S, Zeng D, Hou H, Schröder U. 2012. A three-dimensionally ordered macroporous carbon derived from a natural resource as anode for microbial bioelectrochemical systems. *ChemSusChem* 5: 1059–1063.
- Chen S, Rotaru AE, Shrestha PM, Malvankar NS, Liu F, Fan W, Nevin KP, Lovley DR. 2014. Promoting interspecies electron transfer with biochar. *Scientific Reports* 4: 5019.
- Cui X, Wang J, Wang X, Khan MB, Lu M, Khan KY, Song Y, He Z, Yang X, Yan B. 2022. Biochar from constructed wetland biomass waste: A review of its potential and challenges, *Chemosphere*. 287: 132259.
- Dalwai F, Spratt DA, Pratten J. 2007. Use of quantitative PCR and culture methods to characterize ecological flux in bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 3072–3076.
- Di Benedetto NA, Campaniello D, Bevilacqua A, Cataldi MP, Sinigaglia M, Flagella Z, Corbo MR. 2019. Isolation, screening, and characterization of plant-growth-promoting bacteria from durum wheat rhizosphere to improve N and P nutrient use efficiency. *Microorganisms* 7: 541.
- Döbereiner J. 1995. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. in *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic P., K. Alef and P. Nannipieri, Eds. London, pp. 134–141.
- Gange C, Gadhve KR. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria promote plant size inequality. *Scientific Report* 8: 13828.
- Gould WD, Hagedorn C, Bardinelli TR and Zablutowicz RM. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 49(1): 28-32.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2009. Programa Nacional hortalizas, flores y aromáticas. Argentina.
- Kappler A, Wuestner ML, Ruecker A, Harter J, Halama M, Behrens S. 2014. Biochar as an electron shuttle between bacteria and Fe (III) minerals. *Environmental Science & Technology Letters* 1: 339–344.
- Maceira NO, Martiarena DA, Rizzalli R H, Jaimes F, Castaño JA, Quiñones Martorello A, and Thougnon Islas AJ. 2020. Unidad demostrativa agroecológica Balcarce (UDAB). Fortaleciendo capacidades para una agricultura sostenible. Ediciones INTA.
- Mansilla AY, Albertengo L, Rodríguez MS, Debbaudt A, Zúñiga A, Casalogue CA. 2013. Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 6957-6966
- Mendieta JR, Pagano MR, Muñoz FF, Daleo GR, Guevara MG. 2006. Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology* 152: 2039-2047
- Mesas FA, Terrile MC, Silveyra MX, Zuñiga A, Rodriguez MS, Casalogue CA, Mendieta JR. 2021. The water-soluble chitosan derivative, N-methylene phosphonic chitosan, is an effective fungicide against the phytopathogen *Fusarium eumartii*. *Plant Pathology Journal* 37: 533-542.
- Olszyk DM, [Shiroyama T](#), [Novak JM](#), [Cantrell KB](#), [Sigua G](#), [Watts DW](#), [Johnson MG](#). 2020. Biochar affects essential nutrients of carrot taproots and lettuce leaves. *HortScience* 55: 261–271
- Semida WM, Beheiry HR, Sétamou M, Simpson CR, Abd El-Mageed TA, Rady MM, Nelson SD. 2019. Biochar implications for sustainable agriculture and environment: A review. *South African Journal of Botany* 127: 333–347.
- Shi W, Ju Y, Bian R, Li L, Joseph S, Mitchell DRG, Munroe P, Taherymoosavi S, Genxing P. 2020. Biochar bound urea boosts plant growth and reduces nitrogen leaching. *Science of the Total Environment* 701: 134424

- Starobinsky G, Monzón J, di Marzo Broggi E, Hernán B. 2021. Bioinsumos para la agricultura que demandan esfuerzos de investigación y desarrollo. Capacidades existentes y estrategia de política pública para impulsar su desarrollo en Argentina. Ministerio de Desarrollo Productivo, Argentina.
- Steinbeiss S, Gleixner G, Antonietti M. 2009. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 1301–1310.
- Trigo E, Vera Morales E, Grassi L, Losada J, Dellisanti JP, Molinari ME, Murmis MR, Almada M, Molina S. (2016). Bioeconomía argentina. Visión desde Agroindustria. Ministerio de Agroindustria, Argentina.
- Tripathi M, Sahu JN, Ganesan P. 2016. Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste through pyrolysis: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 55: 467–481.

#### CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

|            | Semestre 1 | Semestre 2 | Semestre 3 | Semestre 4 | Semestre 5 | Semestre 6 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Objetivo 1 |            |            |            |            |            |            |
| Objetivo 2 |            |            |            |            |            |            |
| Objetivo 3 |            |            |            |            |            |            |
| Objetivo 4 |            |            |            |            |            |            |

#### INTEGRANTES DEL PROYECTO:

Dra. Débora Nercessian, CONICET-UNMdP

Dra. Julieta Mendieta, CIC-PBA-UNMdP

Lic. Daniela Villamonte, CONICET-UNMdP

Lic. Eugenia Voza Berardo, CONICET-UNMdP

Dra. Cristina Lombardo, CONICET-UNMdP

Dr. Sebastián D'ippólito, CONICET-UNMdP

Dra. Melina Amenta, UNMdP

Dra. Belén Ceretta, ANPCyT-UNMdP

Dr. Sebastián Bonanni, CONICET-UNMdP

Lic. Sofía Antic Gorrazzi, CONICET-UNMdP

LUGAR PROPUESTO: El cultivo de las plantas de cannabis y las actividades de los Objetivos 2, 3, 4 y parte del 1 se realizarán en el Grupo de Investigación Biología de Cannabis del Instituto de Investigaciones Biológicas UNMdP-CONICET. La producción y caracterización del biochar (otra parte del Objetivo 1) se llevará a cabo en la División Ingeniería de Interfases y Bioprocesos de INTEMA-UNMdP-CONICET.

Grupo Biología de Cannabis del Instituto de Investigaciones Biológicas UNMdP-CONICET: Funes 3250 4° nivel, CP 7600 Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Teléfono 223 4753030 (int 13). Correo electrónico de la Secretaría del IIB: [iibsecretaria@mdp.edu.ar](mailto:iibsecretaria@mdp.edu.ar)

División Ingeniería de Interfases y Bioprocesos INTEMA-UNMdP-CONICET: Av. Colón 10850, CP B7606BWV Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Teléfono 223 6260600 (ext. 2530, 2535). Correo electrónico: [intema@intema.gob.ar](mailto:intema@intema.gob.ar)

**INFRAESTRUCTURA Y EQUIPAMIENTO:** El Instituto de Investigaciones Biológicas cuenta con una superficie de aproximadamente 800 m<sup>2</sup> organizada en 10 laboratorios y áreas de uso común, como droguero, cuarto de centrifugas, cuartos con temperaturas controladas (18°C, 25°C y 37°C) para crecimiento de plantas y microorganismos, cámara fría, cuarto de cultivo de células (equipado con citómetro de flujo y cámara de cultivo de células), bioterio, invernadero, cuarto de manejo de material radiactivo, cuarto de fotografía, sala de seminarios, biblioteca, taller, lavadero, etc. Incluye las siguientes facilidades: espectrofotómetros UV-visible, Phosphoimager, microscopios de fluorescencia e invertido, microscopio confocal, lupa, incubadores con agitación, estufas de cultivo de microorganismos, microcentrifugas, centrifugas refrigeradas de alta velocidad, ultracentrifuga, fluoroscan, fotómetro, cámaras de cultivo de plantas, cuarto estéril con flujos laminares, incubadores termostatables, contador de centelleo, hornos de hibridación, SAVANT, rotavapor, sistema de cromatografía en FPLC y HPLC, freezers de -80° C, sistema integrado de vacío, termocicladores, equipos de PCR en tiempo real, transiluminador, autoclaves, granizadoras, lector de placas de ELISA. Se cuenta también con computadoras con conexión a Internet en cada uno de los laboratorios.

La División Ingeniería de Interfases y Bioprocesos de INTEMA dispone de 170 m<sup>2</sup> de laboratorios en el nuevo edificio de INTEMA. Cuenta con un cuarto de biología molecular equipado con flujo laminar, centrífuga refrigerada, celdas de electroforesis, un equipo de DGGE, microcentrifugas y un espectrofotómetro UV-Vis. Están disponibles además los recursos necesarios para el manejo y estudio de microorganismos aerobios y anaerobios: autoclaves, cámaras de cultivo, microscopios ópticos de transmisión (con contraste de fases y fluorescencia) agitadores, bombas peristálticas, material de vidrio, sistemas de provisión de gases, etc. El equipamiento electroquímico disponible comprende: potencióstatos analógicos y digitales para técnicas de corriente continua o alterna, analizadores de iones y electrodos específicos (Cl<sup>-</sup>, Cu, pH, etc.). Se han desarrollado en el grupo celdas de flujo para el crecimiento de biofilms que permiten tanto la realización de determinaciones electroquímicas in situ, como la observación del material biológico de manera no destructiva por microscopía óptica de contraste de fases. El equipamiento informático es completo y actualizado. Se cuenta además con talleres generales del Instituto para trabajos de mecánica, vitroplastia y electrónica.

**MEDIDAS DE SEGURIDAD:** El cultivo se desarrollará en una cámara tipo contenedor de 12 x 2.5 m, que tiene doble puerta metálica con candado.

**ORIGEN DEL GERMOPLASMA A UTILIZAR:** Se trabajará con variedades de *Cannabis sativa* donadas por la Agrupación Marplatense de Cannabicultores Asociación Civil.

**FUENTE DE FINANCIAMIENTO:** El grupo cuenta con un subsidio de la ANPCyT PICT A 2020- 03535 y un Proyecto de Investigación, Extensión y Transferencia de la UNMdP.



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

**Hoja Adicional de Firmas**  
**Informe gráfico**

**Número:**

**Referencia:** EX-2022-118706427- -APN-DD#MS

---

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 12 pagina/s.