



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA



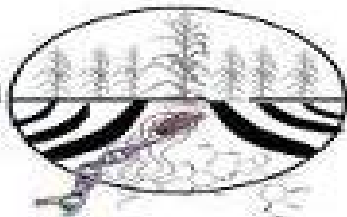
# DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN PROTOTIPO DE FORMULACIÓN DE UNA CEPA DE *Bacillus* EMPLEADA EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* EN ROSAS

Laura Marcela Boyacá Olaya

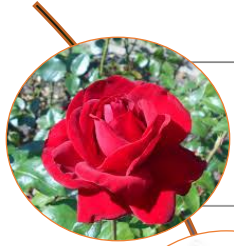
Director: Daniel Uribe Vélez

Asesor interno: Ligia Consuelo Sánchez Leal

Microbiología  
Agrícola



**IBUN** Biotecnología  
Instituto de de la Universidad Nacional de Colombia



Colombia segundo exportador a nivel mundial



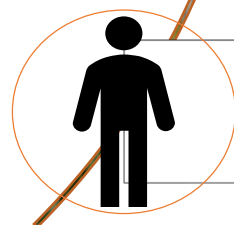
Ingresos alrededor de 1.470 millones de dólares en 2018



8433 hectáreas cultivadas y rendimiento de 28,4 Ton/Ha



Cundinamarca (66%) y Antioquia (32%)

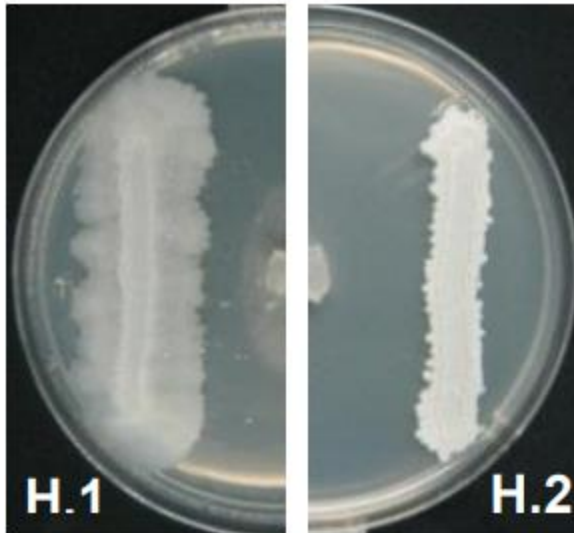


130,000 empleos formales

# Moho gris (*Botrytis cinerea*)

Filio: Ascomycota  
 Subfilo: Pezizomycotina  
 Clase: Leotiomycetes  
 Orden: Helotiales  
 Familia: Sclerotiniaceae  
 Género: *Botrytis*

NCBI, Taxonomy *Botrytis cinerea*



Antagonismo  
 aislamiento de *Botrytis*  
*cinerea* proveniente de Finca  
 Ciprés (1) y Finca Tandil (2),  
 H: IM2C6

Piraquive, 2019.

Segundo hongo  
 fitopatógeno de  
 importancia económica y  
 científica a nivel mundial

Revista "Molecular Plant Pathology", 2012

Hongo necrotrófico que  
 afecta a más de 200  
 especies.

Benito P, Rev Iberoam Micol 2000

Latente en la  
 cosecha, síntomas se  
 desarrollan durante  
 el almacenamiento

Montenegro P, Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 2015

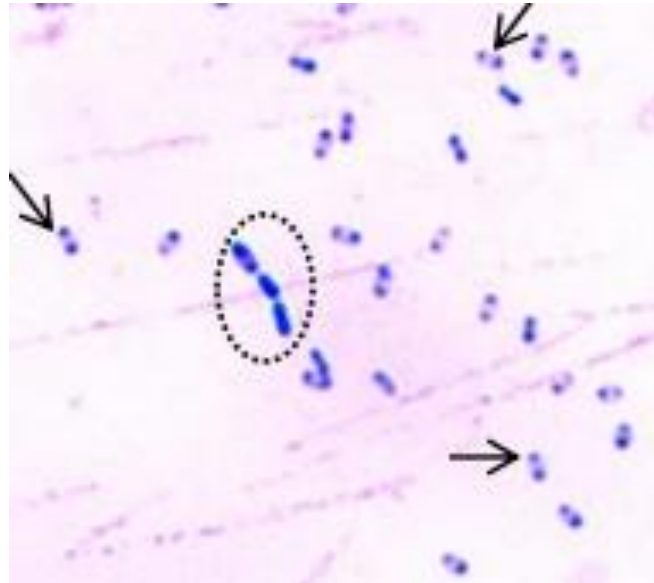
Manejo: Prácticas  
 culturales, físicas,  
**aplicaciones  
 químicas.**

Implementación de  
**Control biológico**

Williamson B et al. 2007,  
 Caicedo A, 2014

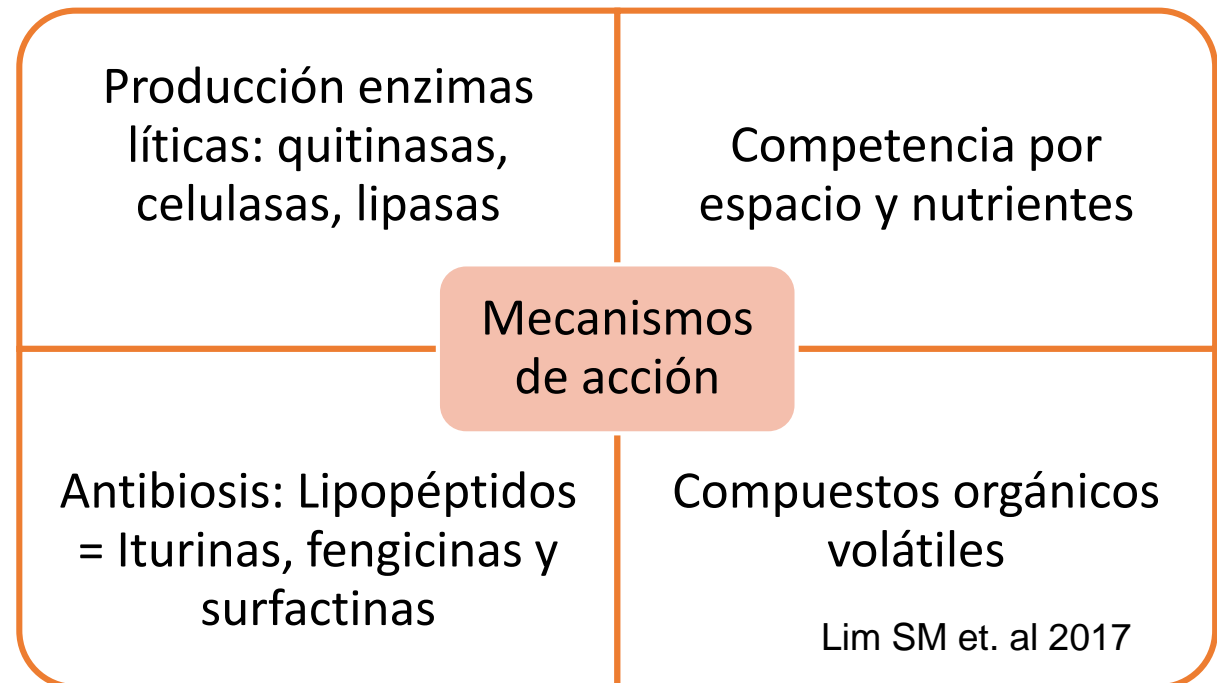
# *Bacillus sp.*

Filo: Firmicutes  
Clase: Bacilli  
Orden: Bacillales  
Familia: Bacillaceae



Piraquive 2019

Bacterias Formadoras de  
**endosporas**



# Formulación

Proceso de **combinación o mezcla** de varias sustancias, ingredientes o **materias primas biológicas** o bioquímicas, para la elaboración de **bioinsumos** de uso agrícola.

Resolución 698 del 2011, ICA

## Funciones

Fácil manejo y aplicación

Estabilización

Protección del agente

Mejorar actividad

## Clasificación

Líquidas

Sólidas

Sólida

Necesita pre-mezcla

Estables durante el almacenamiento

Facilidad de transporte y almacenamiento

Fácil dispersión y aplicación

Susceptible a contaminación.

Necesitan condiciones específicas de almacenamiento

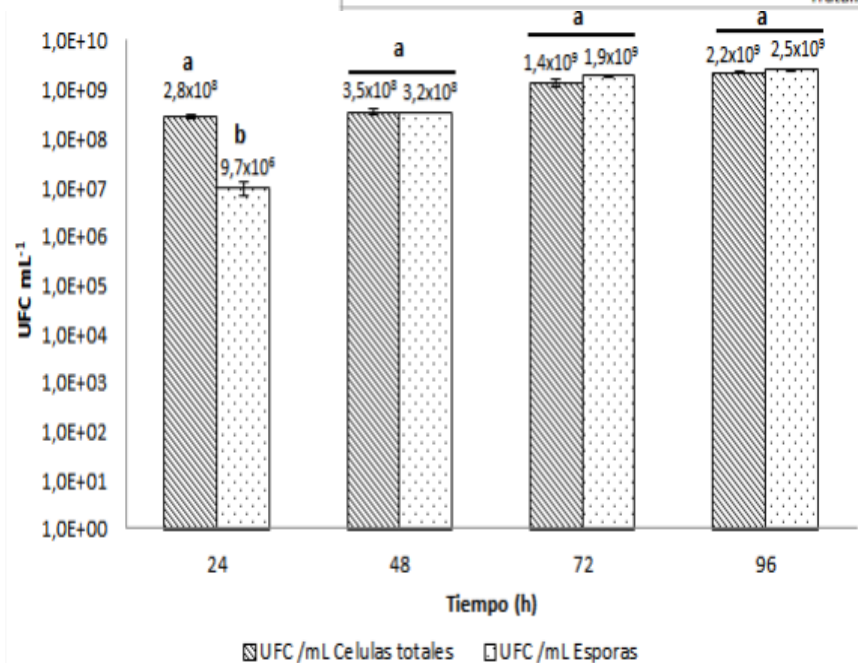
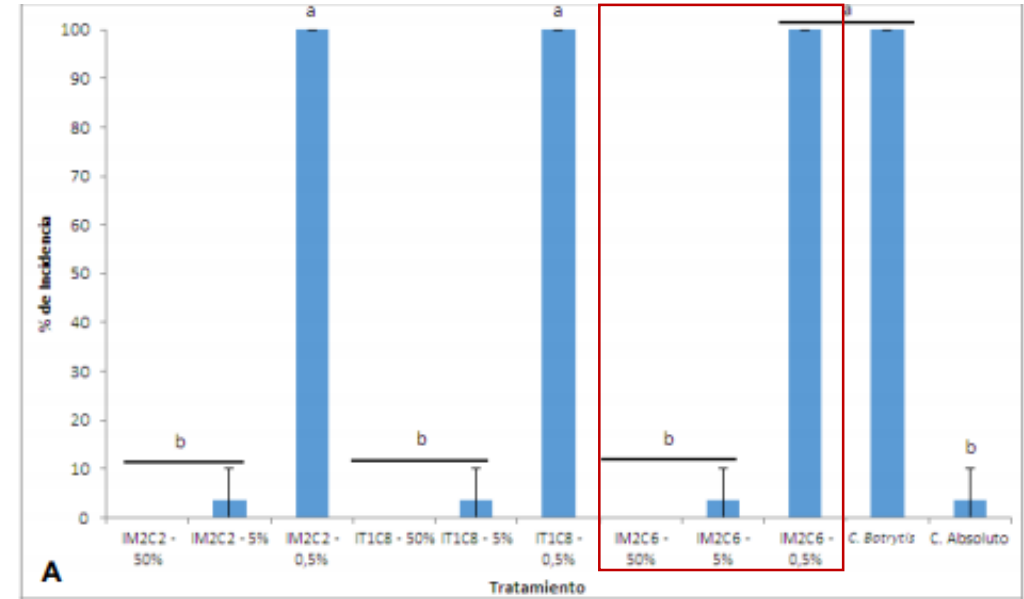
Líquida

Lozano M 2000.

Piraquive 2019 evaluó 12 cepas biocontroladoras provenientes de rizosfera iraca, maíz, papa y arroz, frente *B. cinerea*. La que mostro mejores resultados fue la IM2C6.

Diseñó prototipo de formulación líquida, determinó que era necesario cadena de frio para mantener su estabilidad, mientras que a temperatura ambiente había perdida de viabilidad.

Alternativa a cadena de frio = formulación Polvo humectable: **Liofilizado**



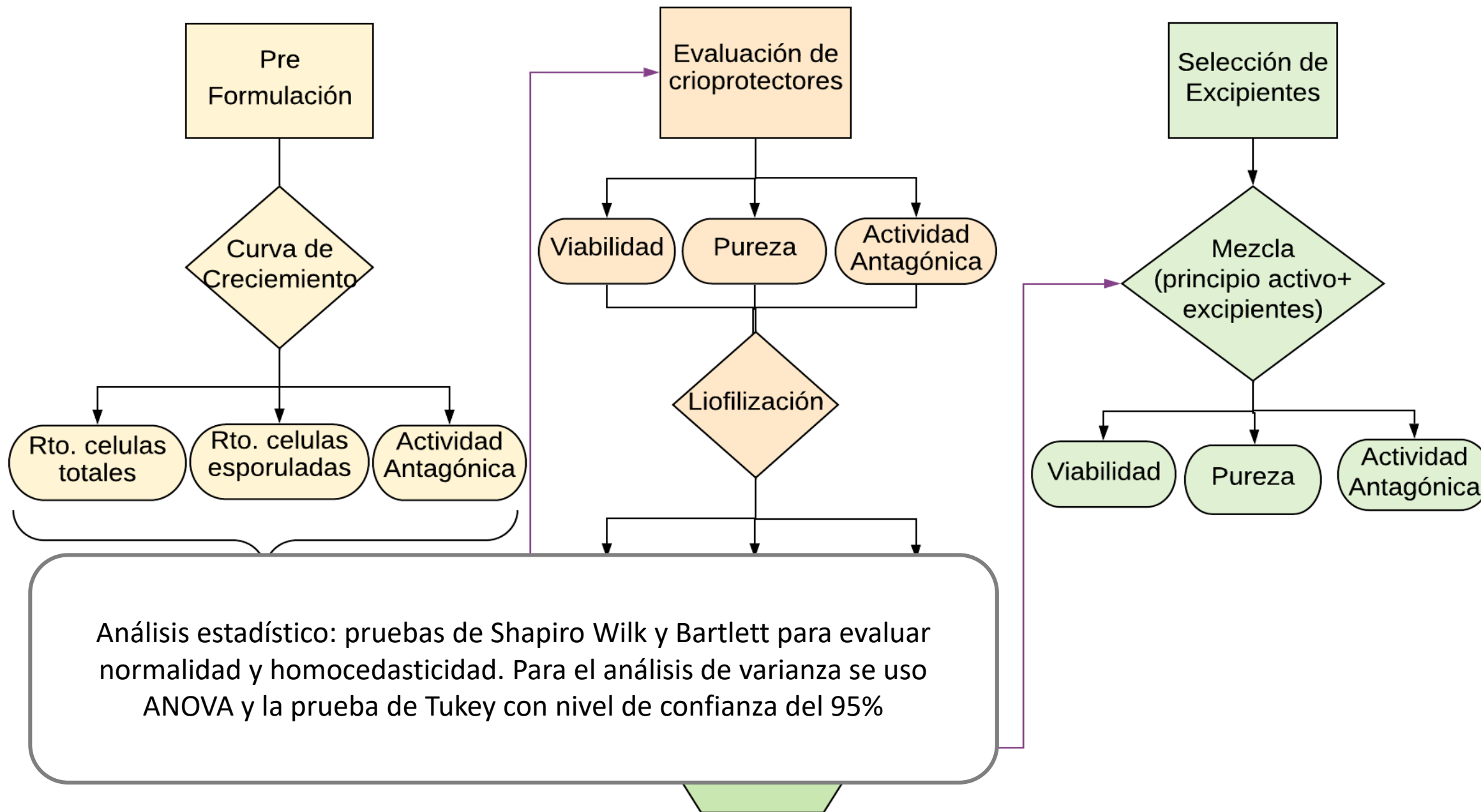
Piraquive 2019

## OBJETIVO GENERAL

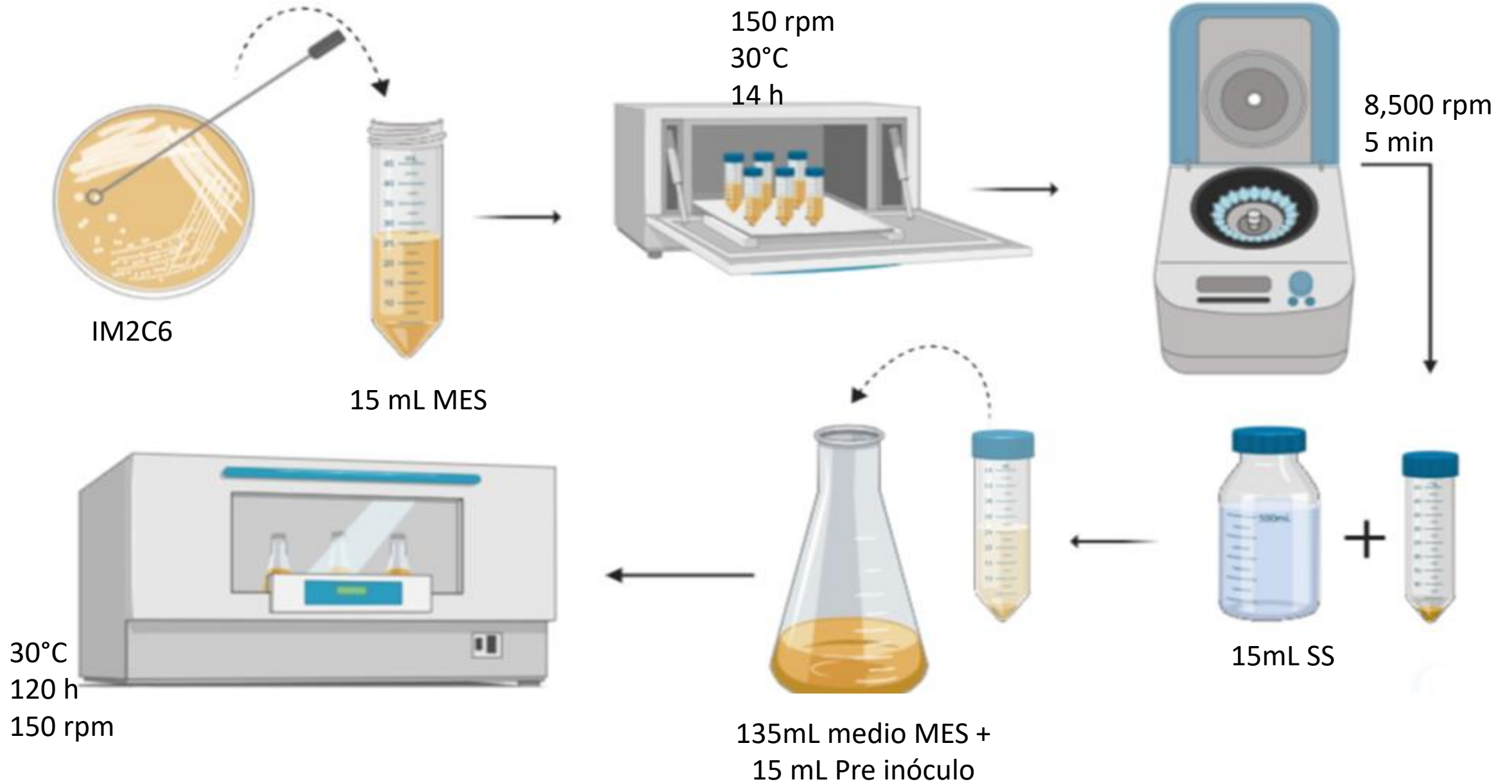
- Diseñar y evaluar un prototipo de formulación sólida a base de la cepa de *Bacillus velezensis* IBUN IM2C6 con actividad biocontroladora contra *Botrytis cinerea* en rosas tipo exportación.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

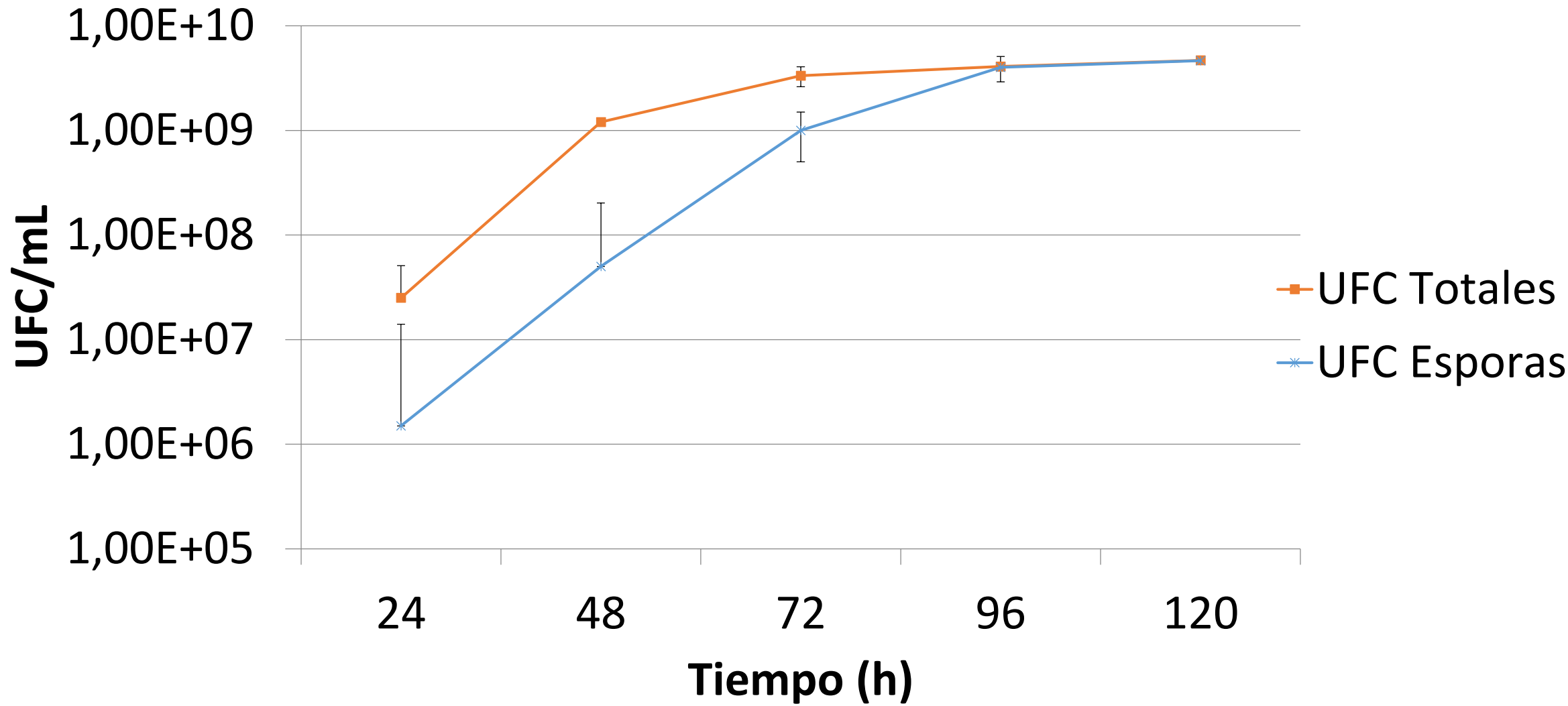
- **Elaborar** un prototipo de formulación con base de la cepa *B. velezensis* IBUN IM2C6 como principio activo con actividad antagónica contra *B. cinerea*.
- **Seleccionar** los **excipientes** para la formulación compatibles con la cepa IM2C6.
- Evaluar la **viabilidad, pureza y actividad** antagónica contra *B. cinerea*, del prototipo de formulación en función del tiempo.







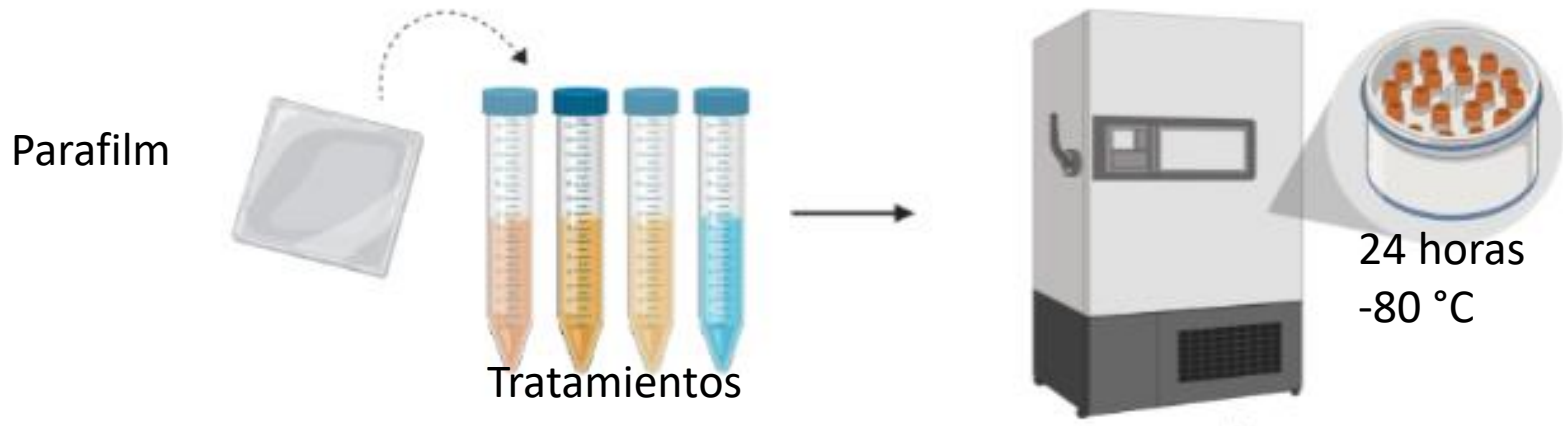
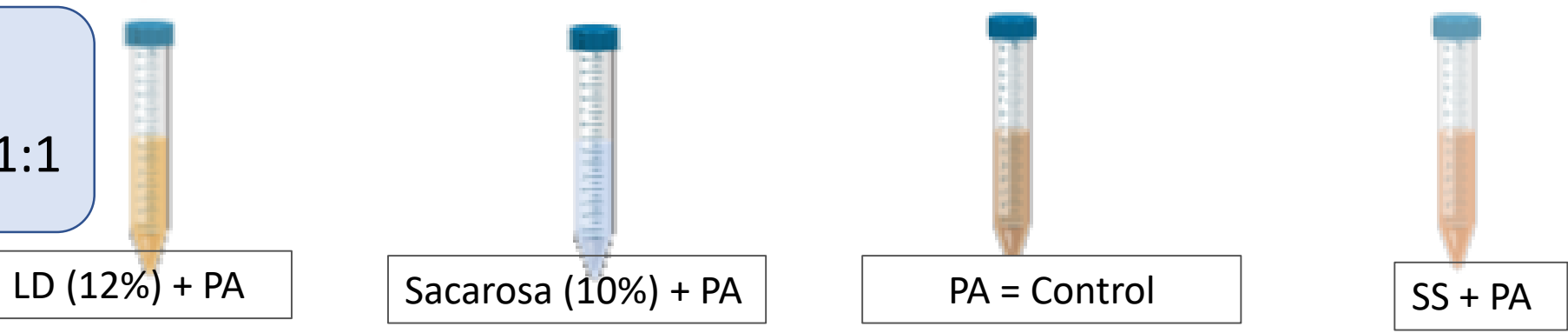
### UFC MES



Plug  
cinei

Dis  
filtr

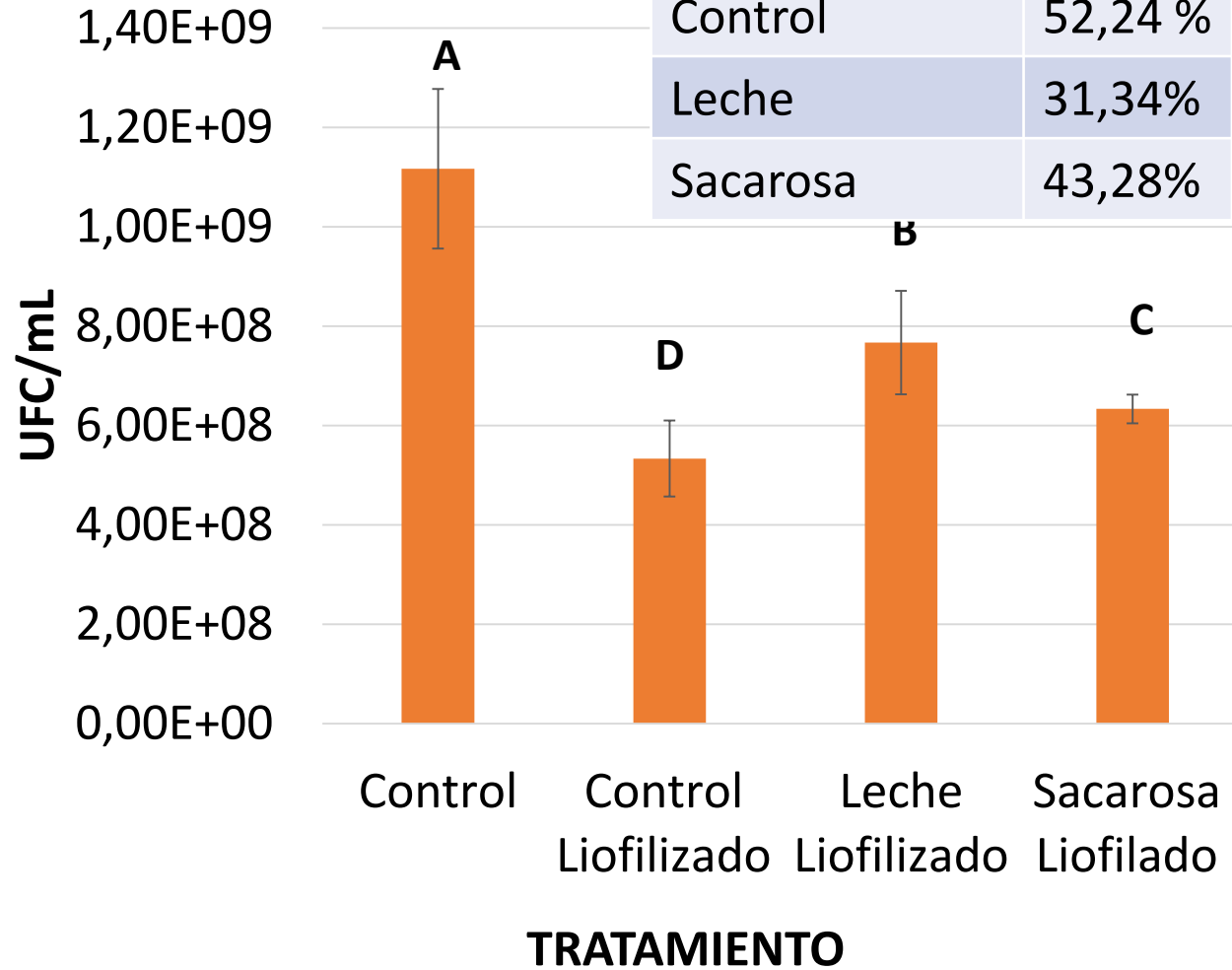
Mezclas:  
Proporción 1:1



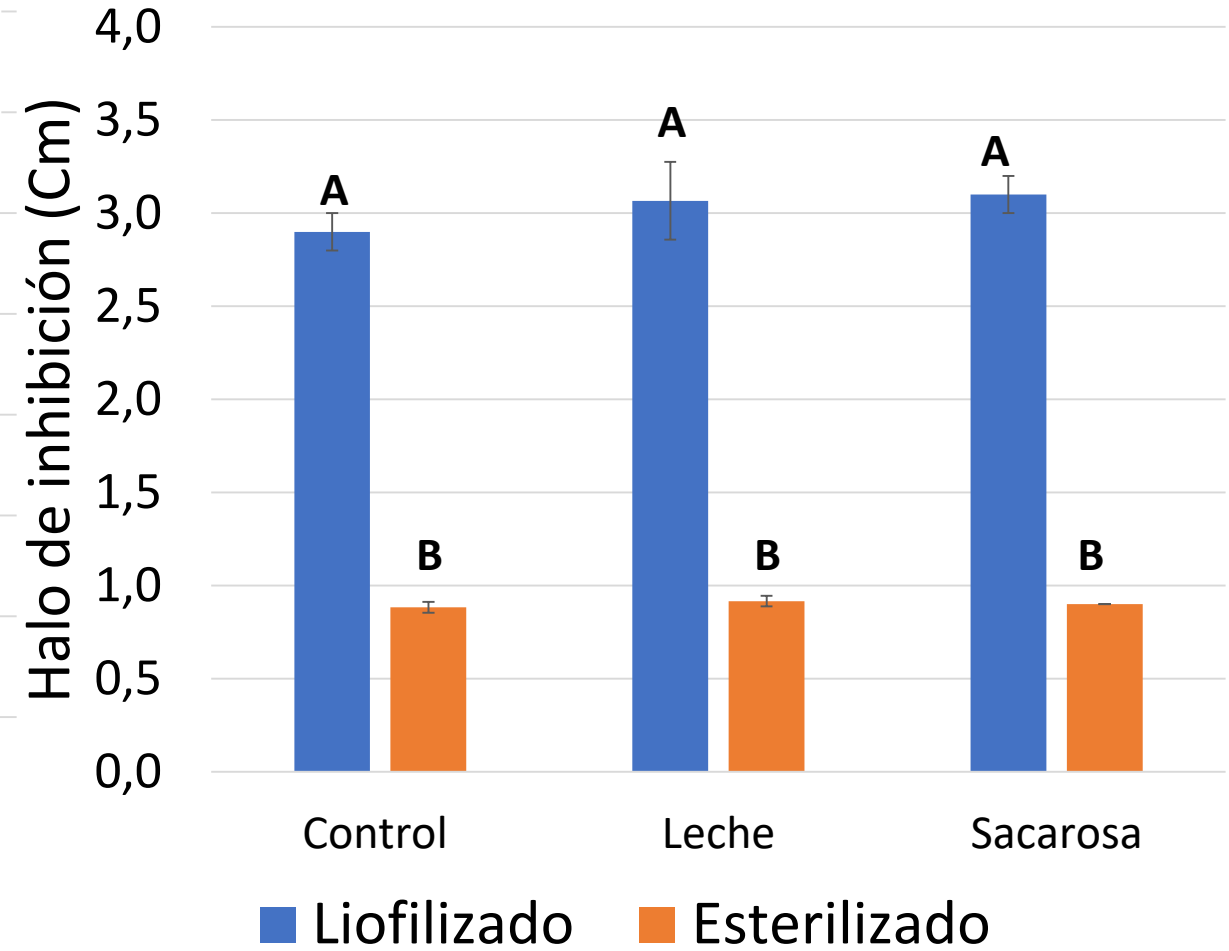
PA: principio activo  
LD: Leche descremada  
SS: Solución Salina

**Viabilidad Lic**

Perdida de Viabilidad	
Control	52,24 %
Leche	31,34%
Sacarosa	43,28%



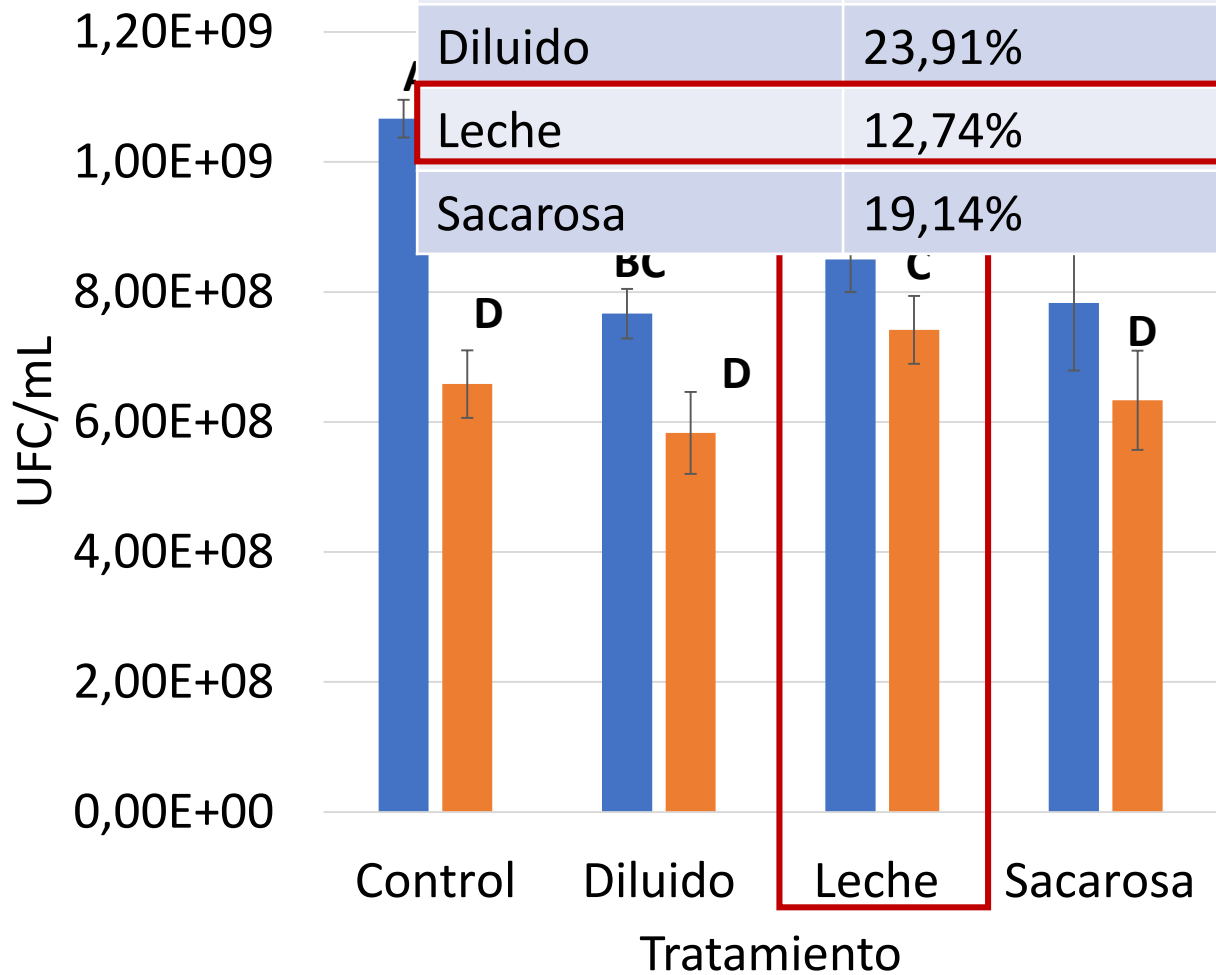
**Actividad Liofilización 1**



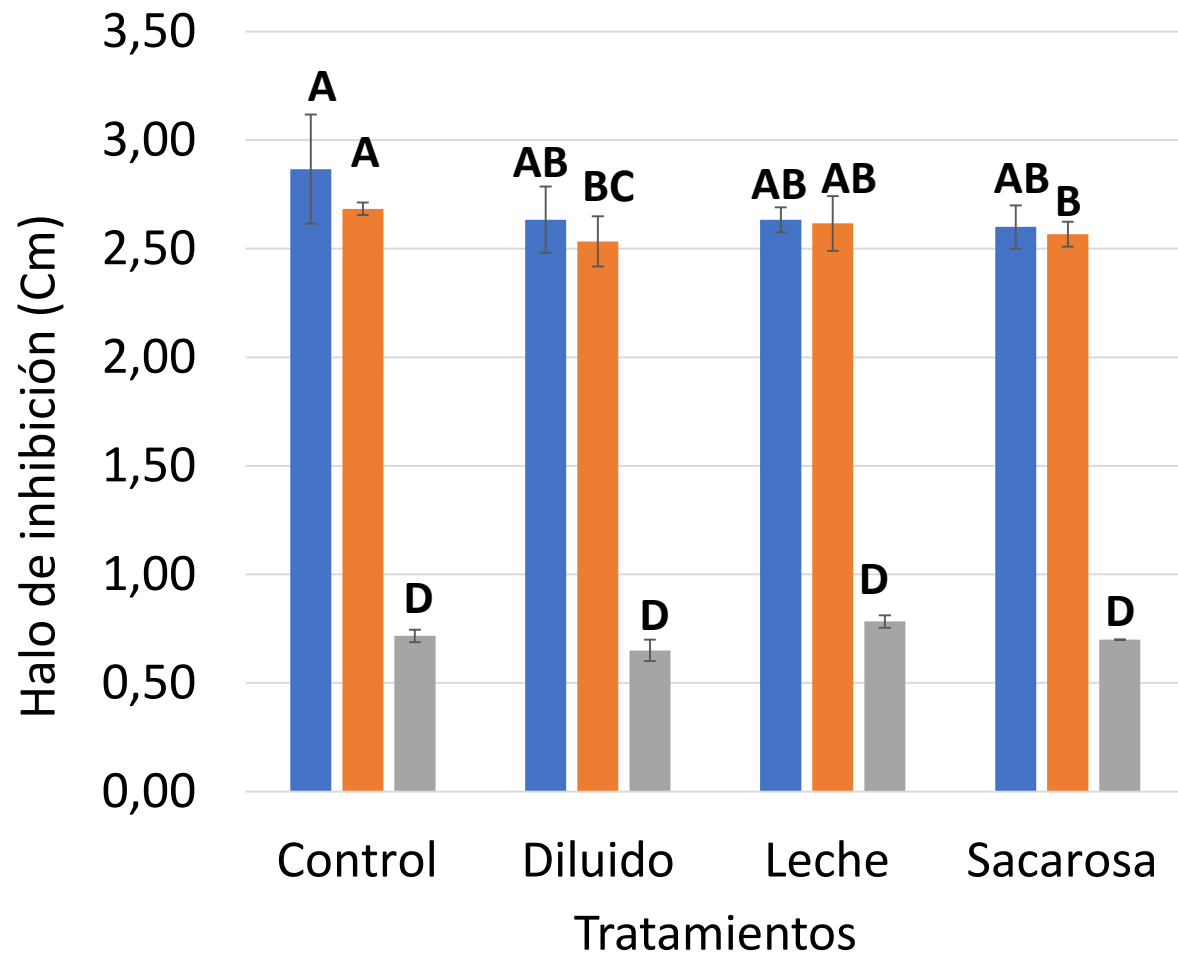
Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p<0.05)

Viab

Perdida de viabilidad c/tratamiento	
Control	38,28%
Diluido	23,91%
Leche	12,74%
Sacarosa	19,14%



Actividad Liofilización 2



■ Antes de Liofilizar ■ Después de Liofilizar ■ Antes de Liofilizar ■ Después de Liofilizar ■ Esterilizado

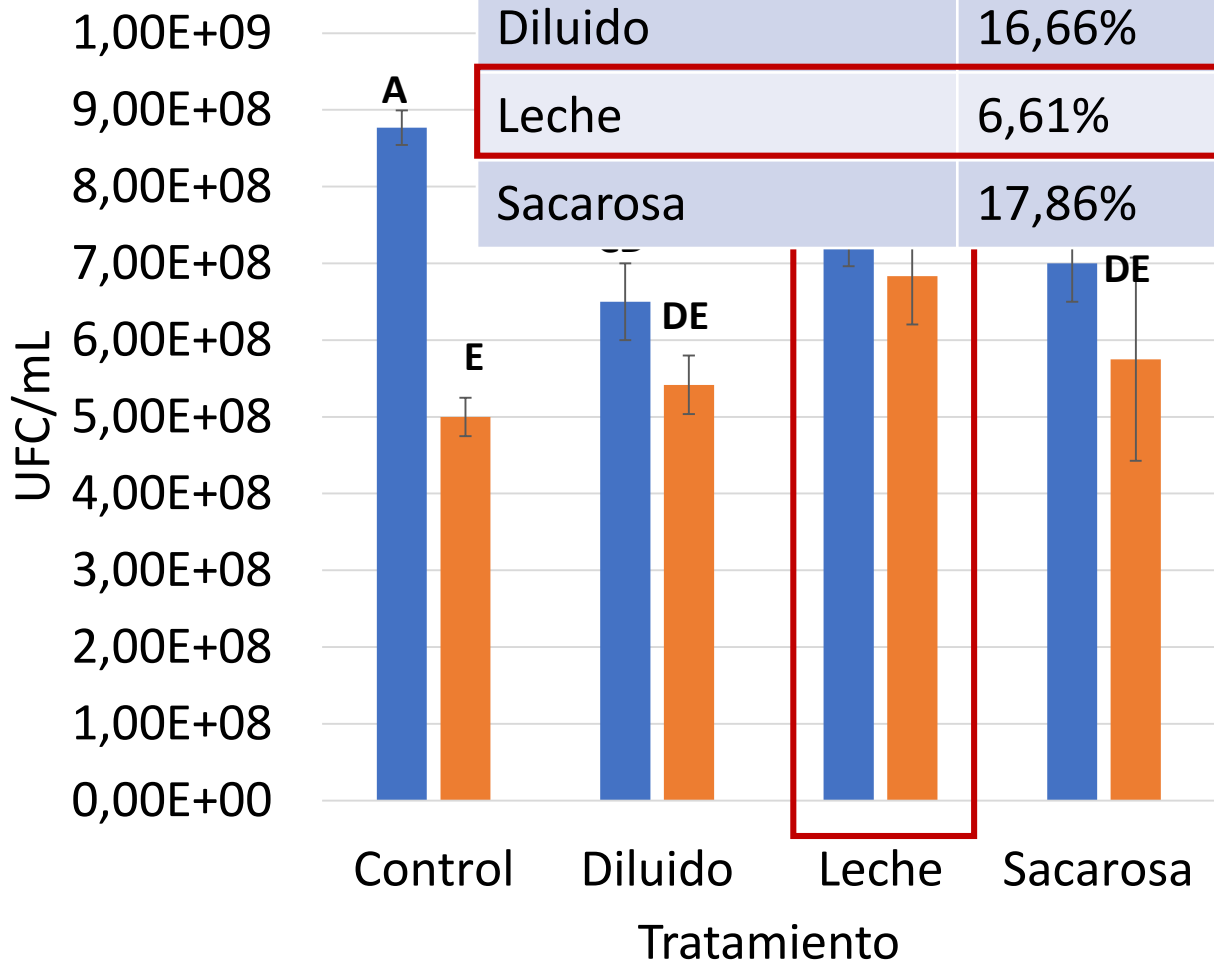
Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p<0.05)

# PRIMERA FASE

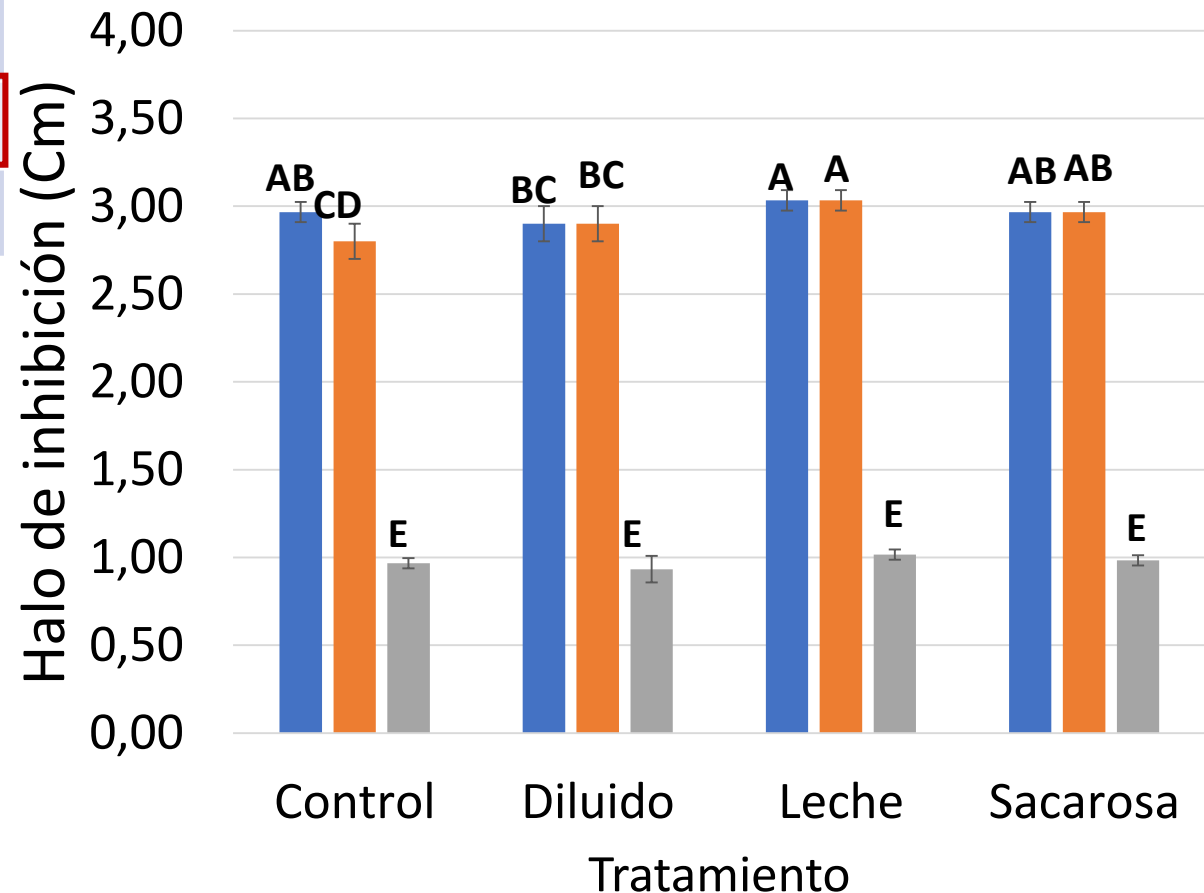
# METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Viabilidad

Perdida de viabilidad c/tratamiento	
Control	42,96%
Diluido	16,66%
Leche	6,61%
Sacarosa	17,86%



Actividad Liofilización 3

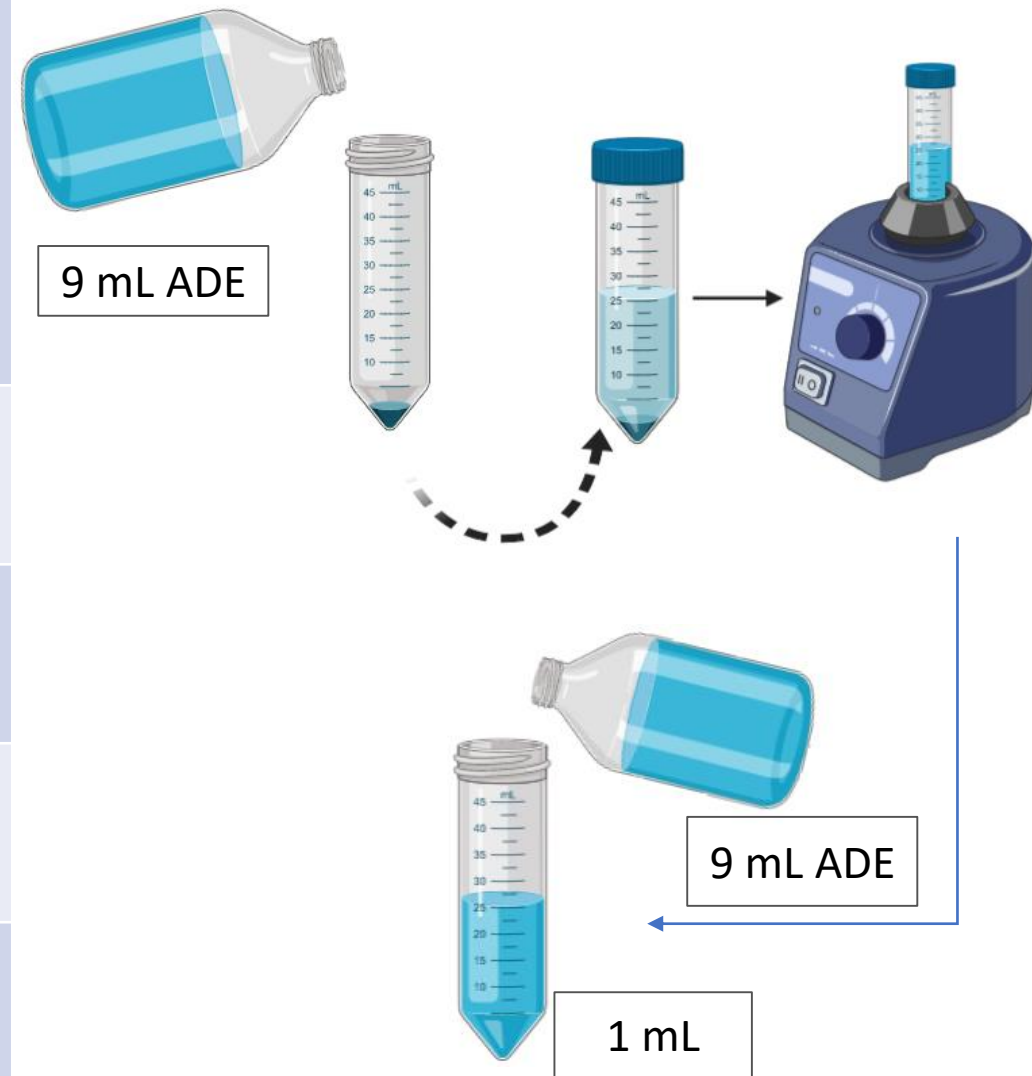


■ Antes de Liofilizar ■ Después de Liofilizar

■ Antes de Liofilizar ■ Después de Liofilizar ■ Esterilizado

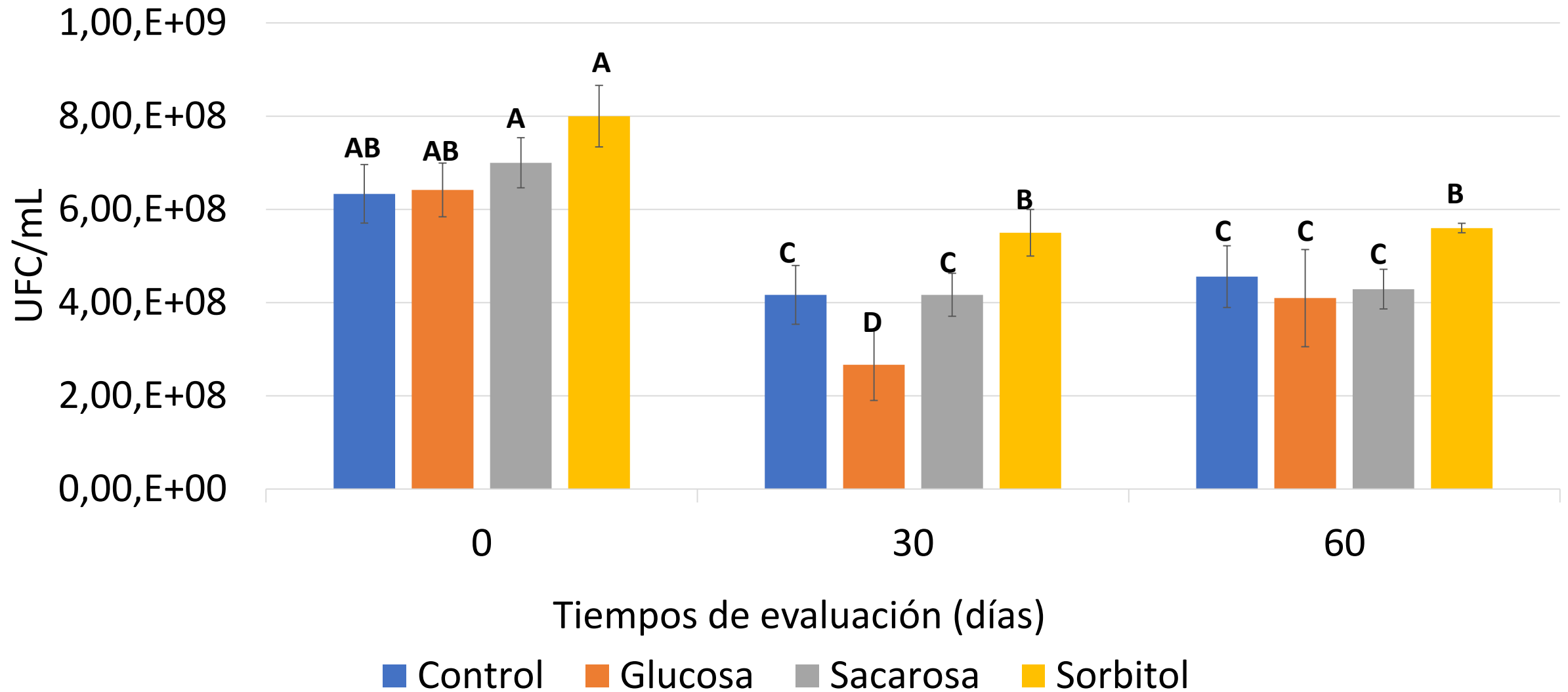
Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p<0.05)

Prototipo	Esporas + Sobrenadante 30% Talco 67,9-68,9% CMC 0,1% CaCO <sub>3</sub> 1,0%	Glucosa 1,0%	Sacarosa 1,0%	Sorbitol 1,0%
1	✓			
2	✓	✓		
3	✓		✓	
4	✓			✓



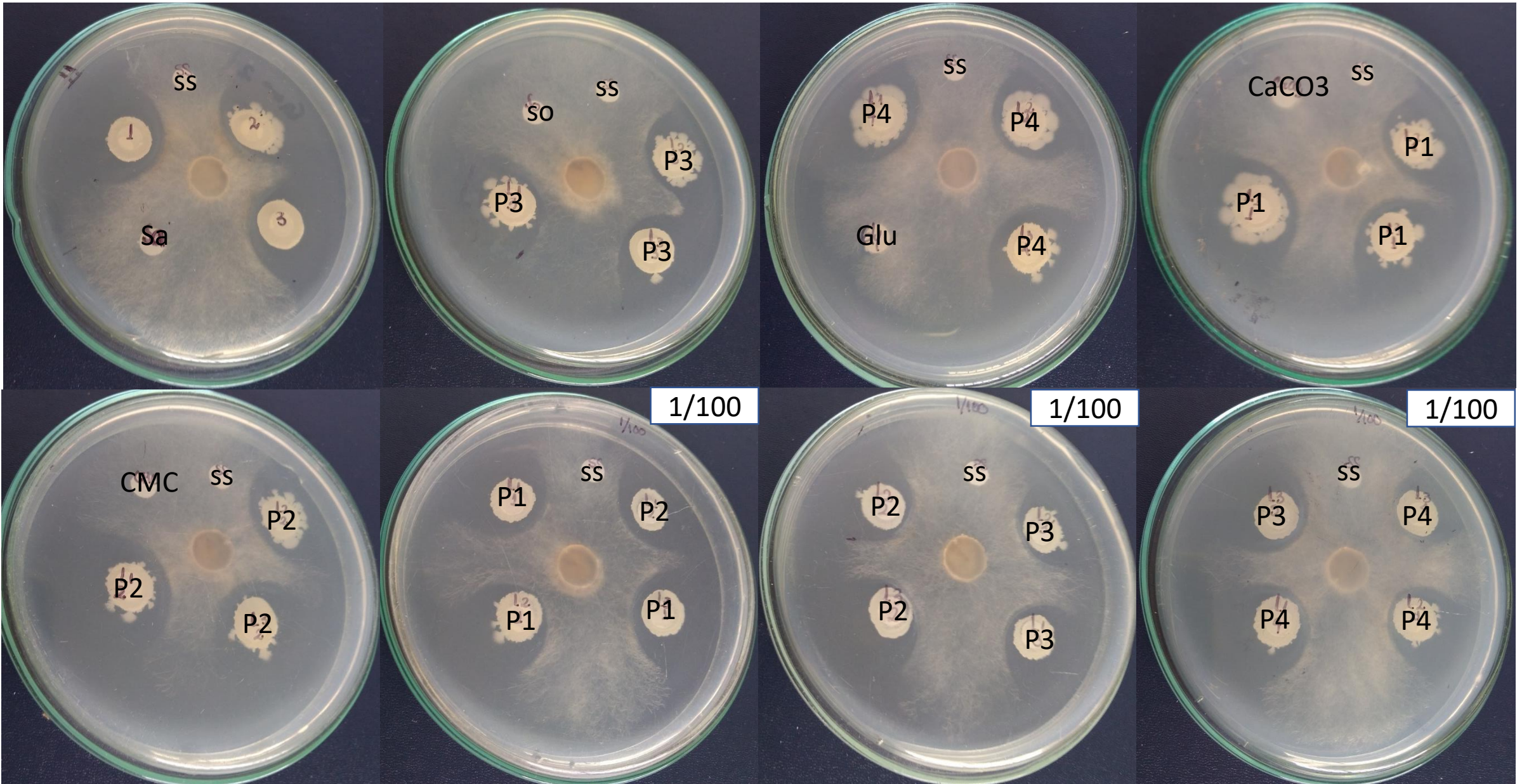
ADE: Agua Destilada Esteril

## Viabilidad

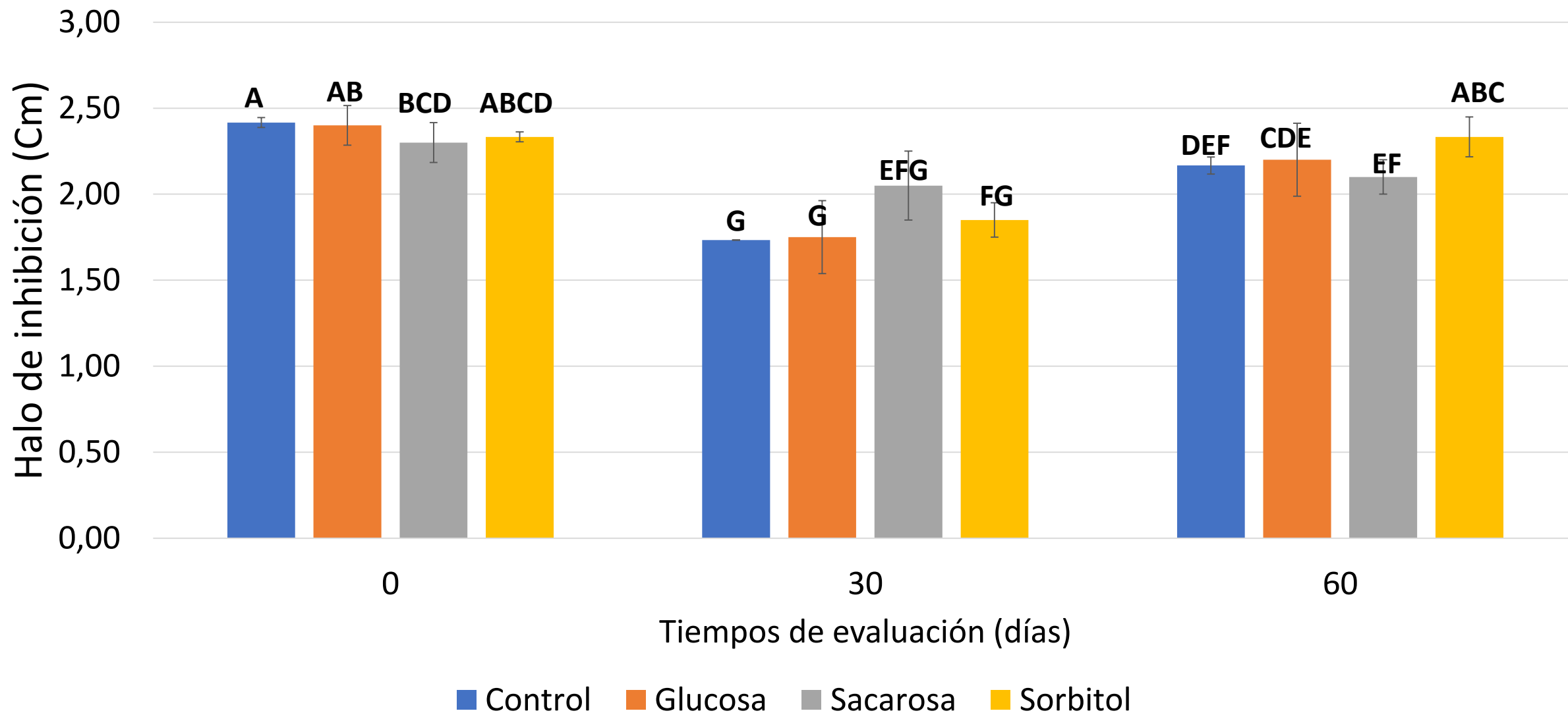


Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )



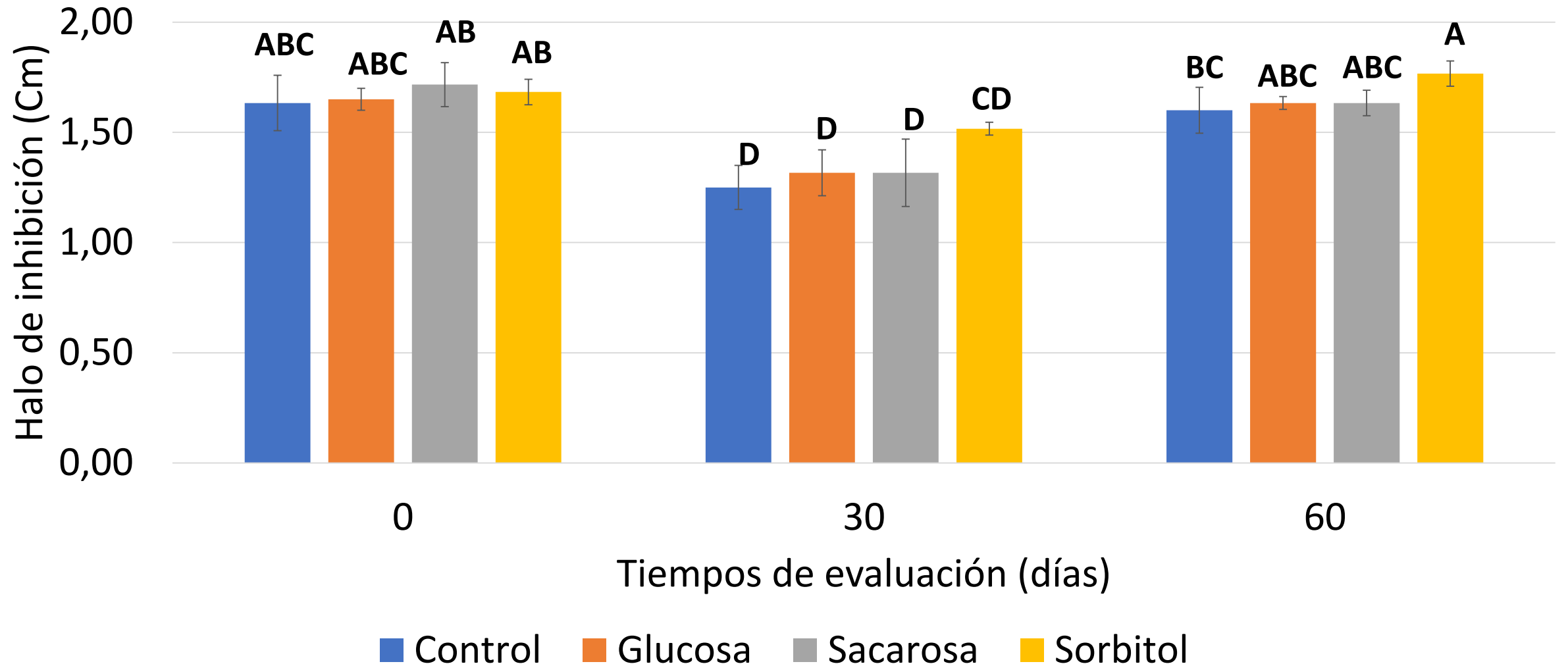


## Actividad prototipos Dil 1/10



Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )

## Actividad prototipos Dil 1/100



Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ )

- El uso de **crioprotectores** para la cepa IBUN IM2C6, tiene un **impacto positivo** al **mantener** la **viabilidad** hasta en un 93%, siendo la leche descremada en polvo la mas eficaz para la cepa.
- La **actividad antagónica** de la cepa IM2C6 **no** se ve **afectada** por el uso de **crioprotectores**, independientemente el proceso al que sea sometido, liofilización o esterilización.
- La cepa IM2C6 posee **metabolitos termoestables**.
- El **prototipo** de formulación número cuatro, el cual evaluó la **adición de sorbitol**, fue el que presentó **mejores** tasas de **crecimiento** y cuya **actividad no se vio afectada luego de 60 días** de almacenamiento a temperatura ambiente, considerándolo prometedor para llevar a ensayos in vivo y evaluar su actividad biocontroladora en pétalo o en flor.

- Realizar mas **ensayos de pre-formulación**, para así mejorar las condiciones iniciales del principio activo (Recuento celular, tiempo de obtención) a la hora de formular.
- Evaluar el prototipo durante periodos de tiempo mas prolongados.
- **Caracterizar** los compuestos producidos por la cepa IM2C6 para el control de *B.cinerea*.
- Realizar una **evaluación in vivo** de los prototipos desarrollados, para establecer su eficacia en el control de *B. cinerea*.

# AGRADECIMIENTOS

- Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional y a todo su personal, por la gestión y las facilidades brindadas para poder desarrollar este trabajo en sus instalaciones.
- A la profesora Ligia Consuelo Sánchez Leal por su asesoría y acompañamiento a lo largo de este trabajo.
- Al profesor Daniel Uribe Vélez, director del grupo de Investigación en Microbiología Agrícola, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo, por sus enseñanzas tanto a nivel profesional como personal.
- A los miembros del grupo de Microbiología Agrícola y compañeros de laboratorio por todas las enseñanzas, las risas, los momentos compartidos con cada uno de ellos y por las amistades creadas.



**Gracias**