

PLAN OPERATIVO

NOMBRE PROGRAMA/PROYECTO:

"DESARROLLO DE UN FORMULADO DE MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE POSCOSECHA DE FRUTA DE EXPORTACIÓN"

EJECUTOR:

BIOINSUMOS NATIVA LTDA.

CÓDIGO:

FIA-PI-C-2007-1-A-002

FECHA:

DICIEMBRE DE 2007



Por FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN
AGRARIA



EJECUTOR



PLAN OPERATIVO

Proyecto “Desarrollo de un formulado de microorganismos extremófilos para el control de enfermedades de poscosecha de fruta de exportación”

Objetivos

Objetivos de la propuesta

Objetivo general	
Desarrollar un formulado en base a microorganismos extremófilos, para el control de enfermedades fungosas de poscosecha, de fruta de exportación.	
Nº	Objetivos específicos (priorizar no más de 5 objetivos)
1	Recolección y reproducción de cepas de extremófilos de bajas temperaturas (ETB) y agentes causales de pudriciones de poscosecha (AF/PP) en fruta de exportación.
2	Evaluar la capacidad controladora <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> y en condiciones de almacenaje de cepas ETB, para el control de agentes causales de enfermedades de pos cosecha
3	Desarrollar un sistema de producción masivo y de formulación de las cepas ETB con potencial comercial.
4	Iniciar proceso de obtención de registro SAG.
5	Difundir ampliamente los resultados alcanzados del proyecto entre grupos de agricultores, exportadoras, etc. con potencialidad de adoptar esta tecnología.



[Handwritten signature in blue ink]

Actividades

Obj.	Actividad	Detalle	Resultado	Indicador	Inicio	Final
1	Etapa Prospección					
	1.1	Aislación de cepas de ETB clase 1	Colección cepas de ETB clase 1	Numero de muestras (200)	Dic/07	Mar/08
	1.2	Aislación de cepas de ETB clase 2	Colección cepas de ETB clase 2	Numero de muestras (200)	Abr/08	Jun/08
	1.3	Aislación de patógenos de poscosecha (AF/PP).	Colección patógenos de post cosecha (AF)	Numero de muestras (150)	Dic/07	Sep/08
	1.4	Reproducción <i>in vitro</i> de ETB	Metodología de cultivo en condiciones de laboratorio	Numero de Cepas (250)	Dic/07	Dic/08
	1.5	Reproducción <i>in vitro</i> de patógenos de poscosecha.	Metodología de cultivo en condiciones de laboratorio	Numero de Cepas (50)	Dic/07	Dic/08
	1.6	Identificación de patógenos(especie) y de ETB (familia o género)	Listado de colección	Porcentaje de identificación (50% para ETB, 100% para patógenos)	Sep/08	Dic/08
2	Etapa Evaluación					
	2.1	Evaluación <i>in vitro</i>			May/08	Oct/08
	2.1.1	Ensayo I.- Actividad Inhibitoria.	Cepas con actividad inhibitoria	Numero de cepas (50)	May/08	Jul/08
	2.1.2	Ensayo II.- MIC. Concentración mínima inhibitoria.	Cepas seleccionadas por concentración mínima	Numero de cepas (20)	Jul/08	Ago/08
	2.1.3	<u>Ensayo III.- Determinación del efecto de combinaciones entre cepas.</u>	Mezcla de cepas seleccionadas	Numero de mezclas (10)	Ago/08	Oct/08
	2.2	Evaluación <i>in vivo</i>			Nov/08	May/09



	2.2.1	<u>Ensayo IV.- Mezclas pre-post inoculación.</u>	Mezclas de cepas seleccionadas <i>in vivo</i>	Numero de mezclas (5)	Nov/08	Feb/09
	2.2.2	<u>Ensayo V.- Mezclas huerto-packing</u>	Mezclas de cepas seleccionadas, en condiciones controladas	Numero de mezclas (3)	Feb/09	May/09
	2.3	<u>Evaluación en condiciones comerciales</u>			May/09	Sep/11
	2.3.1	<u>Ensayo VI.- Evaluación en cámara refrigerada.</u>	Mezcla de cepas, momento de aplicación y dosis de ETB	Mezcla de cepas (1) Plan de manejo	May/09	Sep/11
	2.3.2	<u>Ensayo VII.- Validación en condiciones comerciales</u>	Evaluación de la disminución en perdidas causadas por enfermedades de poscosecha	Porcentaje control (30-50%)	Ene/11	Sep/11
3	Etapa Formulación					
	3.1	Determinación de condiciones de crecimiento			May/09	May/10
	3.1.1	Ensayo VIII.- Medio de cultivo.	Determinación de medio de cultivo óptimo	Unidades de producción (25)	May/09	Ago/09
	3.1.2	Ensayo IX.- Temperatura	Determinación de temperatura óptima	Unidades de producción (50)	Sep/09	Oct/09
	3.1.3	Ensayo X.- pH	Determinación de pH óptimo	Unidades de producción (75)	Nov/09	Dic/09
	3.1.4	Ensayo XI.- Oxigenación.	Determinación de oxigenación óptima	Unidades de producción (100)	Ene/10	Feb/10
	3.1.5	Ensayo XII.- Integración parámetros de crecimiento	Protocolo de producción en biodigestor	Unidades de producción (150)	Mar/10	May/10
	3.2	Extracción de ETB			May/10	Sep/10
	3.2.1	Ensayo XIII.- Selección estructura y estado de inoculo.	Determinación de unidad formadora de colonia (UFC) necesarias para el formulado.	Estructura (conidia, micelio, célula o espora)	May/10	Jul/10
	3.2.2	Ensayo XIV.- Método de extracción.	Procedimiento de extracción de UFC	Porcentaje (50%)	Jul/10	Sep/10
	3.3	Formulación:			Sep/10	Ene/11
	3.3.1	Ensayo XV.- Tipo de formulado	Determinación de formulado	Líquido, polvo mojable o gel etc.	Sep/10	Nov/10
	3.3.2	Ensayo XVI.- Selección acarreador	Determinación de agente acarreador	Formulado	Dic/10	Ene/11
	3.4	Almacenaje			Oct/10	Oct/11
	3.4.1	Ensayo XVII.- Envase	Determinación de envase.	Envase.	Oct/10	Dic/10
	3.4.2	Condición y tiempo de almacenaje	Determinación de condiciones y tiempo de almacenaje	Tiempo de almacenaje.	Ene/11	Oct/11

[Handwritten signature]



4	Etapa Registro SAG					
	4.1	Ensayos de toxicidad y características fisicoquímicas				Jul/10 Nov/10
	4.1.1	Ensayo toxicidad aguda oral, dérmica e inhalatoria	Determinación de niveles de toxicidad aguda	Certificado de toxicidad		Jul/10 Nov/10
	4.1.2	Determinaciones físico químicas	Determinación de características físico químicas	Certificado de características físico-químicas.		Ene/11 Mar/11
	4.2	Elaboración de ficha técnica, hoja de seguridad y etiqueta.	Hoja de seguridad Ficha técnica Etiqueta	Dossier solicitud registro SAG		Dic/10 Mar/11
	4.3	Preparación de dossier de solicitud.	Dossier de solicitud de registro SAG	Ingreso de solicitud a SAG		Ene/11 Jul/11
5	Difusión					
	5.1	Elaboración de página web del proyecto.	Página web	Página web en línea		Dic/08 Ene/09
	5.2	Charlas, días de campo, participación en seminarios y reuniones con asesores y equipos técnicos de empresas.	Charlas y días de campo Participación en seminarios de difusión Reunión con asesores y equipos técnicos.	Numero de actividades 4 3 5		Feb/09 Oct/11
	5.3	Participación en congresos científicos.	Difusión en congresos científicos	Resumen presentaciones.		Nov/09 Oct/11
	5.4	Elaboración de boletín divulgativo de los resultados del proyecto.	Boletín divulgativo	Unidades impresas 200		Jun/11 Oct/11

[Handwritten signature]



[Handwritten signature]

Metodología y procedimientos (máximo 3 páginas)

1. Recolección y reproducción de cepas de extremófilos de bajas temperaturas (ETB).

1.1- Recolección de cepas nativas de extremófilos de bajas temperaturas (ETB),

Los lugares de recolección, comprenderán cámaras de frío, líneas de packing y frigoríficos en general, así como ambientes naturales, los que se dividirán en 2 clases, las que son de frío permanente (media anual de temperatura menor a 8° C) y las de frío temporal (media invernal de temperatura menor a 8° C). Esto permitirá obtener ETB, que son capaces de desarrollar todo su ciclo a temperaturas menores a 8° C y organismos que podrán soportar temperaturas superiores. La recolección de la clase 1 se realizará en los meses de verano, con el fin de asegurar la existencia de las condiciones de frío durante todo el año, esto implicará la búsqueda en glaciales, nieves eternas, campos de hielo y turberas. La recolección de la clase 2, se realizará en los meses de invierno, en sectores que no presenten bajas temperaturas en los meses de verano.

La recolección consistirá en muestras de suelo, hielo, nieve y tejido vegetal, desde varias alturas y profundidades, estas muestras serán almacenadas en frío normal (cooler) y frío profundo (nitrógeno líquido). Los aislamientos, se realizarán en medios simples, para hongos y agar papa dextrosa para hongos, levaduras y agar nutriente para bacterias, de manera de evitar la necesidad de sistemas de producción y manipulación complejos. El cultivo de los microorganismos se realizará a temperatura ambiente (25° C) y a bajas temperaturas (8, 4 y 0° C)

2.- Evaluación de la capacidad controladora *in vitro*, *in vivo* y en condiciones de almacenaje de cepas ETB, para el control de AF/PP .

2.1 Evaluación de la capacidad inhibitoria *in vitro* de cepas nativas de ETB para aislados de AF/PP

Ensayo I. Actividad Inhibitoria.

Según el tipo de organismos ETB se utilizarán las siguientes metodologías:

Hongos: De cultivos puros en placas Petri se tomará un sacabocado tanto del patógeno como del ETB y se pondrán en cultivo dual. Luego de 72 horas de incubación, se evaluará el nivel de control, el que resulta de la diferencia en porcentaje, entre el crecimiento del patógeno en forma aislada (placas control) y en cultivo dual. Esto se realizará en PDA y a las temperaturas de 8, 4 y 0° C. Se usarán 5 repeticiones.

Bacterias o levaduras: De cultivos líquidos puros se extraerán alícuotas, las que serán colocadas en agujeros realizados en el medio de cultivo en placas Petri, previamente inoculadas con conidias de los patógenos. Luego de 72 horas de incubación, se evaluará el nivel de control, el que resulta de la diferencia en porcentaje, entre el crecimiento del patógeno en forma aislada (placas control) y en cultivo dual y ensayos de halo de inhibición. Esto se realizará en PDA a las temperaturas 8, 4 y 0° C.

Una vez obtenidos los resultados, se seleccionarán 10 cepas por patógeno, las que serán utilizadas en el siguiente ensayo.

Ensayo II. MIC. Mínima concentración inhibitoria.

Según el tipo de organismos ETB se utilizarán las siguientes metodologías:

Hongos: De cultivos puros en placas Petri se tomará un sacabocado tanto del patógeno a evaluar, de un cultivo puro de ETB, se homogenizará en agua destilada estéril y se someterá a diluciones seriadas, definiéndose 5 concentraciones, siendo la mayor la alcanzada por la homogenización de una placa Petri en 100 l de agua y luego diluyendo en factores de 10, hasta 5 veces. Así en placas Petri con presencia de discos de micelio del patógeno, se colocaran 10 µl de cada una de las concentraciones (una por placa). Luego de 72 horas de incubación, se evaluará el nivel de control, el que resulta de la diferencia en porcentaje, entre el crecimiento del patógeno en forma aislada (placas control) y en presencia del ETB. Esto se realizará en PDA y a las temperaturas de 8, 4 y 0° C. Se usarán 5 repeticiones.

Bacterias o levaduras: De cultivos líquidos puros de ETB, se realizarán diluciones seriadas siendo la mayor, la obtenida del cultivo líquido y las 4 siguientes diluciones en factor de 10, luego 10 µl de cada una de las concentraciones serán colocados en agujeros realizados en el medio de cultivo en placas Petri, previamente inoculadas con conidias de los patógenos. Luego de 72 horas de incubación, se evaluará el nivel de control, el que resulta de la diferencia en porcentaje, entre el crecimiento del patógeno en forma aislada (placas control) y en cultivo dual y ensayos de halo de inhibición. Esto se realizará en PDA a las temperaturas 8, 4 y 0° C.



Una vez obtenidos los resultados, se seleccionarán las mejores 3 cepas por patógeno, las que serán utilizadas en el siguiente ensayo.

Ensayo III. Determinación del efecto de combinaciones entre cepas.

Para este ensayo se utilizará la metodología del ensayo II, pero manteniendo la concentración fija, en el óptimo, y variando las distintas combinaciones de cepas, las que serán todas las combinaciones posibles para cada patógeno y entre patógenos. Una vez obtenidos los resultados, se seleccionarán las 3 mejores mezclas de cepas por patógeno, para ser utilizadas en la siguiente etapa.

2.2 Evaluación de la capacidad inhibitoria *in vivo* de cepas nativas de ETB para aislados de AF/PP

En este ensayo se evaluará el posible biocontrol preventivo o curativo de las mezclas de cepas nativas de ETB de mayor efecto *in vitro* para cada una de las enfermedades propuestas.

De esta forma, se evaluarán los siguientes sistemas patógeno/fruto, que incluyan a los AF/PP y las frutas manzana kiwi, arándano, nectarin, uva y limones.

Ensayo IV. Mezclas pre-post inoculación.

Utilizando las mejores mezclas de ETB, seleccionadas de la fase anterior, se evaluará su efecto sobre la incidencia y severidad de las enfermedades de post cosecha y frutas ya mencionadas. Para lo cual se tomarán frutas previamente esterilizadas por medios químicos y UV, las que serán asperjadas con una suspensión de ETB, en tres concentraciones, las que habrán sido determinadas por los ensayos de la fase anterior. Esto se realizará en forma previa y posterior a la inoculación con los patógenos. Además se establecerán tratamientos control con fruta si inoculación de patógenos, con solo ETB y control positivo con inoculación y control químico, consistente en los tratamientos estándar realizados para ese tipo de fruta. Luego de aplicados los tratamientos, la fruta será almacenada a las temperaturas recomendadas, realizándose evaluaciones de incidencia y severidad cada 15 días, por el periodo máximo de almacenamiento de ese tipo de fruta. Posterior a este tiempo, se dejará la fruta a temperatura ambiental por 5 días, para la realización de la evaluación final de incidencia y severidad, además de evaluaciones de calidades físicas y organolépticas, así como determinar la presencia de las cepas de ETB en la fruta.

Una vez obtenidos los resultados, se seleccionarán la mejor mezcla de cepas por patógeno, para ser utilizadas en la siguiente etapa.

Además esta mezcla así como los ETB individuales y la fruta tratada, serán sometidos a un análisis de toxicidad aguda, de ingestión, en ratones, dermal e irritación cutánea en fibroblastos humanos, para descartar efectos nocivos en mamíferos, servicio que será subcontratado a un laboratorio especializado en el tema.

Ensayo V. Mezclas huerto-packing

Utilizando las mejores mezclas de ETB, seleccionada de la fase anterior, se evaluará su efecto sobre la incidencia y severidad de las enfermedades de post cosecha y frutas ya mencionadas. Para lo cual se realizarán aspersiones con una suspensión de ETB, en tres concentraciones en pre-cosecha (huerto), lavado, hidrocóling y embalaje. Además se establecerán tratamientos control sin aplicaciones, con solo ETB y control químico, consistente en los tratamientos estándar realizados para ese tipo de fruta y un tratamiento mixto, consistente en la suma del manejo químico y el basado en ETB. Luego de aplicados los tratamientos, la fruta será almacenada a las temperaturas recomendadas, realizándose evaluaciones de incidencia y severidad cada 15 días, por el periodo máximo de almacenamiento de este tipo de fruta. Posterior a este tiempo, se dejará la fruta a temperatura ambiental por 5 días, para la realización de la evaluación final de incidencia y severidad, además de evaluaciones de calidades físicas y organolépticas, así como determinar la presencia de las cepas de ETB en la fruta.

A partir de este punto, solo se trabajará con el sistema patógeno/fruto, donde alguno de los tratamientos con ETB, hayan mostrado un desempeño similar o superior al manejo tradicional utilizado.

2.3 Evaluación de la capacidad inhibitoria en condiciones comerciales de cepas nativas de ETB, para



aislados de AF/PP.

Ensayo VI. Ensayos en cámara

Se evaluarán los 3 mejores tratamientos en base a ETB, versus el manejo tradicional. Para lo cual se realizarán las aplicaciones, según los resultados obtenidos en las etapas anteriores, luego de lo cual la fruta será sometida a todos los procesos de parking y almacenaje, evaluándose una vez cumplido el 75%, 100%, 125% y 150% del tiempo de almacenaje normal para cada tipo de fruta en evaluación. Luego se dejará bajo un periodo de tiempo y en condiciones equivalente a las de supermercado. Evaluándose incidencia, severidad y características organolépticas de la fruta.

Ensayo VII. Validación en condiciones comerciales

Los tratamientos en este ensayo consistirán en el manejo tradicional de la fruta a evaluar y el mejor manejo en base a ETB. Para lo cual se realizarán las aplicaciones, según los resultados obtenidos en las etapas anteriores, luego de lo cual la fruta será sometida a todos los procesos propios de almacenaje, exportación y puesta a exposición en destino. Las evaluaciones consistirán en determinar la incidencia, severidad y calidad de la fruta en puerto de destino y lugar de venta a consumidor final. La fruta llegada a destino será congelada y reenviada a Chile, para determinar la presencia o ausencia de ETB en los tratamientos correspondientes.

3. Desarrollo un sistema de producción masivo y de formulación de las cepas MBT con potencial comercial.

El desarrollo del sistema de producción comprende:

- Determinación de condiciones de crecimiento medio de cultivo, temperatura, pH, oxigenación y tiempo.
- Integración de parámetros de crecimiento para producción masiva en biodigestor o sistemas semi industriales.
- Extracción de ETB para su formulación.
- Formulación: líquida, sólida o gel.
- Almacenaje: temperatura, envases y tiempo.

Después de cada fase de desarrollo del sistema de producción, se realizarán ensayos *in vivo*, con la metodología ya descrita, para evaluar fluctuaciones en el nivel de control de los patógenos, respecto a las formulaciones utilizadas en las fases anteriores. Además se tomarán muestras periódicas, para determinar riesgos de contaminación en cada una de las fases (producción, extracción, formulación y almacenaje).

4.- Presentación de documentos para obtención de registro SAG.

Una vez establecido el sistema de producción y formulación, se realizarán las evaluaciones de propiedades físico-químicas, toxicidad (Aguda por ingestión, dermal e irritación ocular) y ecotoxicidad (efecto sobre organismos benéficos) del formulado final.

Además en base a los resultados de las fases anteriores, se elaborará una hoja de seguridad, ficha técnica, etiqueta y toda la documentación necesaria para la presentación de la solicitud de registro SAG:

Todos los datos obtenidos, serán sometidos a los procedimientos estadísticos necesarios, que permitan la adecuada interpretación de los resultados de cada una de las fases del proyecto y que sean lo suficientemente rigurosos, para ser aceptados en congresos y publicaciones científicas.

7.- Asociados

No hay



8- Costos

COSTO TOTAL DEL ESTUDIO	: \$	151.751.489
FINANCIAMIENTO SOLICITADO A FIA	: \$	99.999.489
APORTE DE CONTRAPARTE	: \$	51.752.000

8.1.- Resumen Estructura de Financiamiento

Item	Aporte FIA	Aporte Contraparte	Total
1. Recursos Humanos	72.096.000	39.552.000	111.648.000
2. Equipamiento	3.034.833	-	3.034.833
3. Infraestructura		-	-
4. Viáticos/movilización	5.520.000	-	5.520.000
5. Materiales e Insumos	6.000.000	-	6.000.000
6. Servicio a terceros	-	4.650.000	4.650.000
7. Difusión	2.850.000	350.000	3.200.000
8. Capacitación	-	-	-
9. Gastos generales	-	-	-
10. Gastos de administración	-	7.200.000	7.200.000
11. Imprevistos	-		-
Total	89.500.833	51.752.000	141.252.833

9. Plazos de ejecución

Fecha de inicio	01/12/2007
Fecha de término	30/11/2011
Duración (meses)	48 meses



10. Desembolsos

Fecha	Requisito	Monto (\$)
Firma contrato	Firma Contrato	27.796.689
17/10/08	IT e IF n°1	12.550.144
17/07/09	IT e IF n°2	21.974.000
16/07/10	IT e IF n°3	13.104.000
18/02/11	IT e IF n°4	8.085.000
24/02/12	IT e IF Final	5.991.000
	Total	\$89.500.833

11. Fechas de entrega informes

INFORMES TECNICOS

Informe técnico de avance 1 : 19 de agosto de 2008
Informe técnico de avance 2 : 15 de mayo de 2009
Informe técnico de avance 3 : 17 de mayo de 2010
Informe técnico de avance 4 : 16 de diciembre de 2010

INFORMES FINANCIEROS

Informe financiero de avance 1 : 19 de agosto de 2008
Informe financiero de avance 2 : 15 de mayo de 2009
Informe financiero de avance 3 : 17 de mayo de 2010
Informe financiero de avance 4 : 16 de diciembre de 2010

INFORME TECNICO FINAL : 21 de diciembre de 2011
INFORME FINANCIERO FINAL : 21 de diciembre de 2011

12. Póliza o Garantía

- Monto: \$27.800.000.-

13.- Bienes

Bienes	Año	Valor \$
Shaker Refirgerado	2008	\$3.572.856.-
Termo nitógeno	2008	\$2.284.800.-
Cámara de flujo	2008	\$4.641.000.-
	Total	\$10.498.656.-

14. Responsable del Estudio

Nombre	Formación/grado académico	Cargo dentro del estudio	RUT
Eduardo Donoso	Ingeniero Agrónomo	Coordinador Principal	14.252.965-3



Eduardo Donoso
Pablo R.