



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACIÓN PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	19 MAYO 2006
Hora	10:35
N° Ingreso	2403

## INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

### PROYECTO

**“Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas de importancia regional.”**

### EJECUTOR

**UNIVERSIDAD DE TALCA**

**Mauricio Lolas, Eduardo Donoso y Hernán Paillán**

**Mayo 2006**



## I. ANTECEDENTES GENERALES

**Código:** FIA-PI-C- 2002-1-A-84

**Nombre del Proyecto:** Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas de importancia regional.

**Región:** VII

**Agente Ejecutor y Asociados:** Universidad de Talca.

**Coordinador del Proyecto:** Mauricio Lolas Caneo

**Costo Total:** \$ 67.641.964

**Aporte del FIA:** \$ 41.532.752

**Porcentaje del costo total:** 61.4%

**Período de Ejecución:** Octubre 2002 a Abril 2006



## RESUMEN EJECUTIVO

Durante el desarrollo del proyecto se obtuvieron sobre 250 cepas de *Bacillus*, de las cuales un 47% presento actividad bactericida. Las evaluaciones *in vitro*, permitieron seleccionar las mejores 5 cepas de *Bacillus*, sus concentraciones mínimas inhibitorias, combinaciones entre cepas y su compatibilidad con agroquímicos. Dados los resultados de estos ensayos se realizaron pruebas *in vivo*, con inoculación de los patógenos, lo que permitió determinar dosis y momentos de aplicación, los que fueron validados en cultivos comerciales en los predios de diversos agricultores, ensayos en los cuales los tratamientos con *Bacillus*, lograron superar significativamente el nivel de control alcanzado por los programas normalmente utilizados por los agricultores. En cuanto al desarrollo de un sistema de producción comercial, se logro determinar el mejor medio y acarreador, que generaron un formulado, altamente adecuado, en cuanto a producción, tiempo de cultivo, almacenaje y efectividad. }

En cuanto al impacto generado por el proyecto, se firmo un convenio con la empresa Bio Insumos Nativa Ltda. para su producción y comercialización, en la misma línea que se ha realizado con las cepas de *Trichoderma*, desarrolladas por el laboratorio de Fitopatología, con el financiamiento de FIA. La empresa en el año 2004, gracias a los resultados hasta entonces obtenido, logro adjudicarse un proyecto FONTEC, para el escalamiento industrial del formulado y la empresa, por lo que se asegura la pronta disponibilidad del formulado comercial. Además existe una alta demanda de agricultores por realizar pruebas del *Bacillus*, en otras especies y enfermedades bacterianas y comprar el formulado, en especial en cultivos de tomate en Quillota y Colin.

Los resultados del proyecto se han difundido ampliamente, a través de la participación en congresos científicos, seminarios dirigidos a agricultores, reuniones con asesores y días de campos y finalmente con la elaboración de un boletín de resumen de los resultados del proyecto.



## Objetivos del Proyecto:

### 3. OBJETIVOS

General: Evaluar la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Bacillus subtilis* (Bs.) recolectadas en la VII Región, para enfermedades bacterianas en cultivos agrícolas de importancia regional.

Específicos:

Evaluación de la capacidad inhibitoria *in vitro* de cepas nativas de Bs. para aislados de *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, P.s. pv. *tomato*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Evaluación *in vivo* de la capacidad biocontroladora de las cepas de Bs. efectivas en cultivos inoculados con las bacterias fitopatógenas *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, P.s. pv. *tomato*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Evaluación *in vivo* de la capacidad biocontroladora de las cepas de Bs. efectivas en cultivos establecidos por agricultores de la zona y con historial de enfermedades bacterianas.

Desarrollar un sistema de producción masivo y de almacenaje de las cepas de Bs. biocontroladoras de las bacterias fitopatógenas en estudio.

Difundir ampliamente los resultados alcanzados del proyecto entre grupos de agricultores con potencialidad de adoptar esta tecnología.

Desarrollar e insertar un producto comercial de Bs., en conjunto con alguna empresa relacionada con insumos para producción orgánica e integrada

## 4 Metodología del Proyecto:

El proyecto fue dividido en 5 etapas, las que son:

- Prospección de cepas de Bs.
- Evaluación *in vitro*
- Evaluación *in vivo*
- Evaluación en campo
- Desarrollo de un sistema de producción y transferencia

### 4.1 Etapa I. Prospección

#### 4.1.1 Recolección de cepas de *Bacillus* spp.

La recolección fue enfocada a predios con cultivos hortícolas (tomate) y huertos con frutales de carozo (ciruelo y cerezo). Además, dada la experiencia en el proyecto FIA C98-1-A-072 donde las mejores cepas de *Trichoderma* spp. se aislaron desde reservas y parques forestales, se realizaron prospecciones en aquellas ubicadas en la VII Región: Vilches, Siete Tasas, El Belloto, Laguna Torca, Queule y Ruil. En la eventualidad de que no se encontrara un número apropiado de cepas de *B.* efectivas en el control de las bacterias fitopatógenas en estudio, se procedería a ampliar el área de recolección, hacia regiones cercanas, de manera de contar con un gran número de aislados. La obtención de muestras se realizó desde suelo (rizosfera), y de follaje y material leñoso.



Para la obtención de colonias puras de *Bs.*, se utilizó el protocolo de Cook (1989), modificado de la siguiente manera:

- 4 g de la muestra de suelo, de follaje o material leñoso fueron homogenizados en 100 ml de agua destilada estéril, mediante agitación por 12 minutos a una temperatura de 80° C.
- Luego, alícuotas de 50  $\mu$ l del sobrenadante, fueron sembradas en agar nutritivo (AN).
- Las placas fueron incubadas a 35° C por 24 horas.
- Posteriormente se separaron los cultivos puros de colonias sospechosas de *Bacillus*.
- Selección de *Bacillus* mediante test de Gram y morfología celular.

#### 4.1.2.- Recolección de bacterias fitopatógenas

Siguiendo los métodos tradicionales para la obtención de bacterias fitopatógenas desde plantas enfermas (Agrios, 1997) se confeccionó un cepario con las siguientes bacterias fitopatógenas:

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (causante de la enfermedad "cáncer bacterial del ciruelo y cerezo")

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (causante de la enfermedad "peca bacteriana del tomate")

*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* (causante del "cancro bacteriano del tomate")

*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (causante de "la mancha bacteriana del tomate y pimentón")

*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (causante de pudriciones en espárrago, papa y pimentones, y pie negro en papa, respectivamente)

Las bacterias fueron multiplicadas en medio AN y B de King dependiendo de la especie, y mantenidas en tubos de cultivo a 4° C hasta su utilización.

#### 4.2 Etapa II: Evaluación *in vitro*

**Evaluación de la capacidad inhibitoria *in vitro* de cepas nativas de *Bs.* para aislados de *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P.s.* pv. *tomato*, *Erwinia* sp. y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.**

**4.2.1 Ensayo I. Para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los aislados de *Bs.*, se utilizó la siguiente metodología:**

- Para cada cepa de *Bs.* se inoculó un tubo con 6 ml de caldo nutritivo (CN) con una colonia obtenida desde un cultivo puro, dejándose crecer en agitación constante por 24 hrs. a 20°C.
- Para las bacterias fitopatógenas, se tomó con el asa de siembra una colonia de la placa de agar y se inoculó un matraz con 200 ml de medio de cultivo CN líquido, dejándose crecer en agitación constante por 24 hrs. a 20°C
- Sobre placas Petrí con 30 ml de agar nutriente, se agregó un ml del cultivo de la bacteria patógena, la que fue esparcida homogéneamente sobre la placa. Después de 30 minutos se retiró el sobrante.
- Una vez retirado el sobrante del patógeno, se procedió a realizar orificios en el agar con un sacabocado de 0,5 cm., en un número de 9 por placa Petrí. En cada uno de éstos, se agregaron 50  $\mu$ l del cultivo de las cepas de *Bs.*



- Las placas con el patógeno y las cepas de *Bs.*, fueron puestas a 4° C por dos horas, luego de lo cual, se pusieron a incubar a 25° C, observándose la presencia de halos de inhibición hasta 72 hrs. después de la inoculación.

Para cada combinación bacteria patógena / cepa de *Bs.*, se utilizaron tres repeticiones, incluyendo además placas control con solo la bacteria patógena y la cepa de *Bs.* De esta forma fueron seleccionadas aquellas cepas de *Bs.* que produjeron un halo de inhibición significativo alrededor del orificio donde fueron sembradas y cuya presencia fue consistente en las repeticiones realizadas.

#### **4.2.2 Ensayo II. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las cepas con capacidad inhibitoria.**

- Para cada una de las cinco mejores cepas seleccionadas de *Bs.* del ensayo anterior que presentaron halo inhibitorio en cada bacteria fitopatógena, se repitió el Ensayo I (ya descrito) utilizando *Bs.* con un tiempo de cultivo en CN de 3, 12, 24 ó 28 h. De esta forma se determinó el tiempo óptimo para obtención de la máxima actividad inhibitoria y así proceder a los ensayos siguientes. Además, se midió su población en cada una de los tiempos de cultivo.

- Una vez determinado este momento de utilización de los cultivos de *Bs.*, se procedió a realizar la evaluación de actividad a distintas concentraciones, según el esquema siguiente:

- Para cada cepa de *Bs.* se tomó con el asa de siembra una colonia de un cultivo puro y se inoculó en un tubo con 6 ml de medio de cultivo AN líquido, dejándose crecer en agitación constante a 20°C por solo 24 hrs. (basándose en los resultados obtenidos y presentados en la sección siguiente),

- Para las bacterias fitopatógenas, se tomó con el asa de siembra una colonia de la placa de agar y se inoculó en un matraz con 200 ml de medio de cultivo AN líquido, dejándose crecer en agitación constante por 24 hrs. a 20°C

- Sobre placas Petri con 30 ml de agar nutriente, se agregó un ml del cultivo de la bacteria patógena, la que fue esparcida homogéneamente sobre la placa. Luego, después de 30 minutos se retiró el sobrante.

- Una vez retirado, se procedió a realizar orificios con un sacabocado de 5 mm, en un número de 5 por placa Petri.

- Los cultivos con las cepas de *Bacillus* fueron llevada a las siguientes concentración  $1 \cdot 10^8$ ,  $1 \cdot 10^7$ ,  $1 \cdot 10^6$ ,  $1 \cdot 10^5$ ,  $1 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^3$  y  $1 \cdot 10^2$  UFC/ml

- Las placas con el patógeno y las cepas de *Bacillus*, fueron mantenidas a 4° C por dos horas, luego de lo cual, se pusieron a incubar a 25° C, observándose la presencia de halos de inhibición hasta 72 hrs. después de la inoculación.

La medición consistió en el diámetro del halo de inhibición formado por cada cepa, en cada una de las diluciones utilizadas, considerándose además como expresión de inhibición, el crecimiento libre del *Bs.* sobre el patógeno.

Cada combinación cepa *Bs.* / bacteria patógena con sus respectivas diluciones de *Bs.* tuvo 5 repeticiones, dejándose además placas control con solo el patógeno y solo la cepa de *Bacillus*. Al igual que en el ensayo anterior, éstos se repitieron totalmente dos veces. Además para cada combinación cepa de *Bs.* / bacteria fitopatógena, la CMI fue estimada, seleccionándose las tres que presentaban el menor nivel. Finalmente, con estas cepas, se repitió el Ensayo I, de manera de refrendar los resultados, incluyendo la mezcla de éstas, de manera de determinar la posible existencia de una potenciación de la actividad inhibitoria (ensayo siguiente).



#### **4.2.3 Ensayos III: Determinación de la compatibilidad entre cepas nativas de *Bs.* para el control de enfermedades.**

Utilizando la misma metodología que en el ensayo I, se evaluaron todas las mezclas de las tres mejores cepas de *Bs.* por patógeno y fueron comparadas en su inhibición con las cepas individuales.

#### **4.2.4 Ensayo IV: Determinación de la capacidad de control de las cepas de *Bacillus* spp, en base a competencia.**

En base a observaciones del comportamiento *in vitro* de algunas cepas, se decidió realizar este ensayo, pese a no estar en la metodología original.

En placas Petri con agar nutriente, se realizó la siembra del patógeno en estudio, en forma de líneas paralelas, las que eran de 5,5 cm. de longitud, en un número de cuatro por placa. En forma perpendicular y en uno de los extremos de estas líneas, se realizó la siembra de las cepas de *Bacillus* spp. también en forma de línea, luego de lo cual las placas fueron puestas a incubación a 26° C por 7 días, luego de lo cual se procedió a medir tanto la inhibición del patógeno, como el nivel de crecimiento que las cepas de *Bacillus*, eran capaces de realizar sobre el patógeno, lo que se evaluó en forma del porcentaje de la línea de patógeno cubierta o inhibida por la cepa de *Bacillus*, para luego estos datos ser sometidos a un análisis de varianza y a ser significativo a una test de separación de medias. Se utilizaron 12 repeticiones por tratamiento.

#### **4.2.5 Ensayo V: Determinación de la compatibilidad de cepas nativas de *Bs.* con agroquímicos utilizados para el control de enfermedades.**

Este ensayo consistió en determinar en primer lugar, en que porcentaje la población de *Bs.*, se veía afectada por la presencia de los bactericidas Oxicloruro de Cobre, Phyton y Citocur, y segundo, si esta población no era afectada en forma importante se determinaría su efecto sobre la actividad inhibitoria de las mismas cepas en estudio.

Para este efecto, se utilizaron placas Petri con agar nutritivo, modificado con 500 µl/placa de cada uno de los agroquímicos mencionados. Luego se procedió a sembrar cada placa con 300 µl de cada una de las cepas, provenientes de una suspensión diluida 1.000 veces de un cultivo con 24 h de incubación. La comparación se realizó con la siembra de la misma suspensión bacteriana en placas con medio de cultivo pero sin el agroquímico. De esta forma, de las poblaciones resultantes fue posible estimar el efecto del agroquímico sobre la cepa de *Bs.* Lo anterior fue logrado a las 24 h de incubación, contabilizándose las unidades formadoras de colonias (UFC) en cada placa.



#### **4.2.6 Ensayo VI: Desarrollo de tolerancia de cepas de Bs. a bactericidas de uso agrícola.**

Se ha trabajado en la generación de variedades resistentes a la acción de compuestos cúpricos (Nordox) y antibióticos (Streptoplus), para lo que se han realizado cultivos *in vitro* en medio agar nutriente, a los que se les ha agregado 1/8 de la concentración recomendada para su uso en campo de los bactericidas ya mencionados. Después de 72 hrs. se seleccionan colonias puras, las que son cultivadas en AN con concentraciones crecientes de estos compuestos. Después de la obtención de cepas resistentes a 1/4 de concentración, se toman las colonias resistentes a Nordox para ser cultivadas, en medio con 1/8 de la concentración de Streptoplus y así sucesivamente, hasta obtener cepas resistentes a la dosis completa de Nordox y Streptoplus.

### **4.3 Etapa III: Evaluación *in vivo***

#### **4.3.1 Evaluación *in vivo* de la capacidad biocontroladora de las cepas de Bs. efectivas en cultivos de tomate, inoculados con las bacterias fitopatógenas *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

En bolsas de 400 ml de capacidad, conteniendo sustrato de perlita, tierra de hoja y arena (1:2:1), fueron transplantadas plantas de tomate var. María Italia con dos hojas verdaderas. Un mes después del trasplante, un grupo de plantas fue inoculada con *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* y otro con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, a una dosis de 60 ml/planta con una concentración de  $10^6$  bacterias/ml. Cada grupo de plantas fue sometido a una inoculación manual, evaluándose la influencia de inocular con heridas, lo cual fue simulado con una labor normal de desbrote para el caso de *X. campestris* y rötura de tricomas superficiales para *C. michiganense*. Los tratamientos con Bs. fueron realizados antes de la inoculación y después de ésta, de manera de evaluar la actividad *in vivo* de las cepas biocontroladoras. Las cepas de Bs. elegidas para el control de *X. campestris*, correspondieron a la mezcla de las cepas 110-1, 102-3 y 107-1, siendo las dos primeras provenientes del sector de Vilcún, Reserva Altos de Lircay y la restante, de una muestra de suelo de un predio orgánico ubicado en Mallarauco. Para *C. michiganense* se evaluaron las cepas 110-1, 102-3 y 40-1; esta última proveniente del sector del muelle en Constitución. La dosis de aplicación fue de 60 ml/planta a una concentración de  $10^8$  bacterias/ml, utilizándose la misma proporción para cada cepa biocontroladora. Los tratamientos de pre-inoculación fueron realizados 4 horas antes de la generación de heridas e inoculación del patógeno, a diferencia de los de post-inoculación, los cuales fueron realizados 4 horas después. Los ensayos se realizaron en forma independiente en los invernaderos de la Estación Experimental Panguilemo de la Universidad de Talca, el cual estuvo programado para abrir lucarnas a los 21° C, encender ventiladores a los 26° C y activar el sistema de frío a los 28°C. Cada 3 días se realizaron observaciones para detectar la presencia de síntomas y signos para ambas enfermedades, realizándose el registro de su severidad a los 25 días posterior a la aplicación de los tratamientos. Para *C. michiganense* las mediciones consistieron en el porcentaje de folíolos marchitos sobre el total de folíolos de la planta. Para *X. campestris*, se registró la presencia de manchas necróticas en las hojas en relación al total de hojas en la planta.



Los tratamientos para ambos ensayos fueron dispuestos en un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial 2 x 3, donde los factores fueron la forma de inoculación (con o sin heridas) y el momento de aplicación del biocontrolador (sin, pre o post-inoculación). De esta forma, los tratamientos, cada uno con 12 repeticiones de 1 planta cada una, correspondieron a:

- T1: Control Inoculación con heridas
- T2: Control Inoculación sin heridas
- T3: Aplicación pre-inoculación con heridas
- T4: Aplicación pre-inoculación sin heridas
- T5: Aplicación post-inoculación con heridas
- T6: Aplicación post-inoculación sin heridas

Adicionalmente, como controles negativos, se incluyeron los siguientes tratamientos, los cuales tuvieron por objetivo verificar la validez de los ensayos:

- T0: Sin inoculación, sin heridas y sin aplicación de los biocontroladores
- T7: Sin inoculación, sin heridas y con aplicación de los biocontroladores

#### **4.3.2 Evaluación de metodologías de una mezcla de cepas de *Bacillus* spp. en el control de *Erwinia carotovora*, en papa en almacenaje.**

En este ensayo se evaluó la actividad de la mezcla de las cepas 40, 102 y 110, en el control de *Erwinia carotovora*, en papas Desiré (susceptible) en almacenaje. Para este ensayo se utilizaron los siguientes tratamientos:

- T0: Testigo con aplicación de agua destilada estéril.
- T1 Testigo con aplicación de la mezcla de *Bacillus*.
- T2 Inoculación con *Erwinia* y posterior aplicación de mezcla de *Bacillus*.
- T3 Aplicación de mezcla de *Bacillus* y posterior inoculación con *Erwinia*.
- T4 Testigo con inoculación con *Erwinia*.

La inoculación se hizo primero, a través de la estimulación de la abertura de las lenticelas, por medio del acondicionamiento de las papas en condiciones de 100% de humedad relativa, y segundo, aplicando una suspensión del patógeno, a una concentración de  $1 \times 10^6$  ufc/ml, cubriendo completamente los tubérculos.

En los tratamientos con la mezcla de cepas de *Bacillus*, se aplicó una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml, utilizando 600 ml de agua destilada estéril, de manera que la aspersión cubriera completamente las papas.

Se dejaron igual número de papas testigo negativo, solamente tratadas con las cepas de *Bacillus*, de manera de controlar algún efecto de éstas sobre los tubérculos. Del mismo modo se dejaron igual número de papas sólo mojadas con agua destilada estéril, de manera de evaluar fielmente este efecto sobre las poblaciones naturales de la bacteria en ellas.

Una vez aplicado los tratamientos, se envolvió cada papa, en forma individual, con un film plástico, de forma de favorecer las condiciones óptimas de infección y de anaerobiosis. Luego de esto, cada repetición de 25 papas tratadas, fueron dispuestas en una malla de plástico en una caja de cartón, siendo almacenadas en una bodega por 3 meses. En es momento, se



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACIÓN PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

realizó la evaluación del número de papas sintomáticas dañadas en relación al número de papas totales. Los valores expresados en porcentaje fueron sometidos a un análisis de varianza, sin embargo estos previamente fueron transformados a valores angulares, de manera de cumplir con los supuestos de este análisis estadístico ( $P < 0,05$ ).



#### 4.4 Etapa IV: Ensayos en campo.

4.4.1 Evaluación capacidad biocontroladora de una mezcla de *Bacillus* spp., para el control de enfermedades bacterianas, en cultivos bajo plástico de tomate.

En la temporada 2003-2004, se instalaron 4 ensayos de campo con agricultores de Colin y Nunpai, cuyos predios tenían historia de incidencia de Cancro y Peca bacteriana, por desgracia, en ninguno de estos predios se desarrolló ninguna enfermedad, bacteriana por lo que no fue posible evaluar el efecto de *Bacillus* a nivel de campo.

En la temporada 2004-2005, se optó por realizar ensayos y unidades de validación en invernaderos de Quillota, para lo que se tomó contacto con varios asesores, entre los cuales Alejandro Diomovic y Homero Cristhie, generaron los contactos y confianzas para instalar ensayos con agricultores de esa zona. Así en Quillota se instalaron 6 ensayos, de los cuales solo dos pudieron ser evaluados, dado que después de las primeras aplicaciones de *Bacillus*, en 4 de los predios, dados los resultados de las aplicaciones de *Bacillus*, sobre ataques de peca bacteriana, los agricultores optaron por aplicar *Bacillus* en todo el predio, quedando así estos ensayos como unidades de validación.

En la zona de Colin se instalaron dos ensayos, para evaluar el efecto curativo de *Bacillus*, sobre Peca bacteriana, pudiendo ser evaluado solo uno de ellos, por las mismas razones.

Dada la nula incidencia de Cancro bacteriano, se realizó un cultivo de tomate, en los invernaderos de la Universidad de Talca, los que se manejaron en la forma tradicional, excepto por haber sido inoculados con *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*.

*llamado*

En todos los predios se utilizó la mezcla de *Bacillus*, Antumavida, Vilcun, Malleruco y Maguellines 2.

##### Ensayos Quillota

##### **Predio Enrique Correa, sector Escuela de Caballería Quillota.**

Unidad experimental: 1 nave con 4 mesas de 2 hileras, Var. Fortaleza.

##### **Predio Serafin Salazar, sector Quebrada del Aji, Boco.**

Unidad experimental: 1 nave con 4 mesas de 2 hileras, Var. Fortaleza.

Los tratamientos consistieron en:

T1: Tratamiento tradicional del huerto, basado en aplicaciones periódicas de compuestos cúpricos (Phyton) y antibióticos (Streptoplus) cada 15 días.

T2: Aplicación de la mezcla de *Bacillus* cada 15 días.

T3: Aplicación de la mezcla de *Bacillus*, más los bactericidas químicos cada 15 días.

Las mediciones, consisten en conteo de plantas con incidencia de enfermedades, con énfasis en las de origen bacteriano. A fin de temporada, se seleccionaron 50 plantas de cada repetición, para medir parámetros de vigor, como altura, biomasa aérea y seca y número de racimos alcanzados.

Cada tratamiento está conformado por 3 repeticiones, cada una de las cuales se conforma con una nave de 150 plantas.



### **Predio Pablo Salazar, sector San Miguel Colín.**

Este predio mostraba una alta incidencia y severidad de *Pseudomonas* en 6 naves y en hileras aisladas de otros invernaderos, siendo 4 de estas naves asperjadas con *Bacillus*, una con *Streptoplus* y una última con 3Tac I Beta. Dado que se inició el ensayo en plantas de 1er racimo, con prácticamente la totalidad de estas con síntomas, la evaluación consistió en las plantas que presentaron 4° racimo con flores no afectadas y que lograron producir frutos.

### **Unidades de Validación**

En estas unidades, los agricultores, realizaron las primeras aplicaciones, según los tratamientos detallados anteriormente, pero al aparecer síntomas en los tratamientos químicos, optaron, por realizar aplicaciones curativas sobre las plantas que iban mostrando síntomas, las que después de 2 a 3 aplicaciones, mostraban las lesiones secas y se detenía el avance de la enfermedad (figura 3).

### **Predio Agrotom, sector Camino San Isidro.**

Unidad experimental sector temporada pasada con *Pseudomonas*: 1 nave con 3 mesas de 1 hileras, Var. Fortaleza.

Unidad experimental sector temporada pasada con *Clavibacter*: 1 nave con 3 mesas de 1 hileras, Var. Fortaleza.

### **Predio Carolina Marcoti, sector Escuela Militar Quillota.**

Unidad experimental sector temporada pasada con *Pseudomonas*: 3 nave con 3 mesas de 1 hileras, Var. Fortaleza.

Unidad experimental sector temporada pasada con *Xanthomonas*: 1 nave con 3 mesas de 1 hileras, Var. Fortaleza.

Al momento de instalación de esta unidad de validación, existían 2 mesas con incidencia de *Pseudomonas*.

### **Predio Felipe Riggeti, sector San Miguel Colín.**

Unidad experimental sector temporada pasada con *Clavibacter*: 1 hilera, Var. Maria Italia.

En los predios siguientes, se inició el tratamiento con plantas severamente afectadas, (con daños en 1° y 2° racimo de flores), donde se optó por aplicaciones curativas, dirigidas a las lesiones y plantas aledañas, repitiéndose 3 veces. Después de la 3ra aplicación, las plantas afectadas mostraron una remisión de los síntomas.

### **Predio Jerónimo Morchio, sector La Capilla Boco Quillota.**

Al momento de instalación de esta unidad de validación, existían 3 naves con incidencia severa de *Pseudomonas*.

### **Predio Juan Hernández, sector San Miguel Colín.**

Al momento de instalación de esta unidad de validación, existían 2 naves con incidencia severa de *Pseudomonas*, las que fueron arrancadas, pero en los invernaderos aledaños se presentaron síntomas, siendo en 2 de estas naves donde se aplica el *Bacillus*

4.4.2 Evaluación capacidad biocontroladora de una mezcla de *Bacillus* spp., para el control de enfermedades bacterianas, en cerezo.

### **Ensayo Agrícola Trallay**

Este ensayo se realizó en 2 temporadas seguidas en el mismo predio, durante la temporada 2004-2005, se utilizaron 50 árboles por tratamiento, lo que se aumentó a 150 árboles por tratamiento en la temporada 2005/2006.

Material Vegetal: Huerto de cerezos de 10 años, ubicado en Colbún, VII Región.

Los tratamientos de este ensayo corresponden a:



Tratamientos	1ra temporada	2da temporada
<b>Manejo del Huerto</b>	<b>Aplicación de Nordox 200g/100 l (Oxido cuproso).</b> 3 aplicaciones en caída de hojas y después de cada lluvia hasta brotación. 12 aplicaciones totales <b>Streptoplus en floración.</b>	<b>Aplicación de Nordox 200g/100 l (Oxido cuproso).</b> 2 aplicaciones en caída de hojas y después de cada lluvia hasta brotación (5 aplicaciones totales) <b>Streptoplus en floración.</b>
<b>Bacillus</b>	300 g/100 l de agua, 3 aplicaciones en caída de hojas y después de cada lluvia hasta brotación. (12 Aplicaciones totales ) <b>Streptoplus en floración.</b>	300 g/100 l de agua, 2 aplicaciones en caída de hojas y después de cada lluvia hasta brotación (5 totales). <b>Streptoplus en floración.</b>
<b>Manejo del huerto + Bacillus</b>	300 g/100 l de <i>Bacillus</i> + Nordox 200g/100 l (Oxido cuproso). De agua, 3 aplicaciones en caída de hojas y después de cada lluvia hasta brotación. (12 aplicaciones totales) <b>Streptoplus en floración.</b>	Nordox 200g/100 l (Oxido cuproso 2 aplicaciones en caída de hojas y después de cada lluvia hasta brotación (5 aplicaciones totales). Y 10 días después 3g/ litro de <i>Bacillus</i> (4 aplicaciones) <b>Streptoplus en floración.</b>

La evaluación correspondió a la variación de severidad de cada árbol y a la variación en la cantidad de árboles, en cada categoría. La primera medición de severidad sirvió de punto base, para las mediciones de las temporadas siguientes. La escala tiene un rango de 0 a 10, donde 0 es un árbol sano y 10 un árbol muerto, así una variación positiva en este valor indica un aumento de la severidad, mientras que un valor negativo indica una mejora del árbol.

En la temporada 2005/2006, después de la 3ra aplicación de *Bacillus*, se tomaron muestras de yemas, 12 muestras, cada una conformada por 5 yemas por cada repetición y tratamiento, adyacentes a canchales activos, las que fueron sembradas en medio B-King, para luego de 72 hrs. Determinar la incidencia de la enfermedad, por medio de la presencia de fluoresceína.

### Ensayo El Colorado

En el huerto de Agrícola Trallay, ubicado en la localidad del Colorado, se instaló un ensayo similar al anterior, para el que se utilizó un huerto de 1 año de plantación, el que muestra síntomas de infección por cáncer bacterial.

Se estableció un diseño de bloques al azar, donde los bloques están conformados por las variedades. Existiendo un sector con la variedad Symphony sobre Majaleb y el segundo sector con la variedad Sweet Herat sobre Merecier.

Tratamientos: Se establecieron los siguientes tratamientos:

- T1 Aplicación de Bs. 10 días posteriores a la aplicación de Nordox. En dosis de 50 gr. /100 l. de agua, a una concentración de  $10^7$  UFC/g.
- T2 Aplicación de Nordox 200 g/100 l.



- T3 Aplicación de Nordox + la mezcla de *Bacillus*

Cada tratamiento consta de 3 repeticiones, cada una de las cuales conformada por una hilera de 100 árboles cada una. La evaluación se realizó de la misma forma que en el otro predio.

#### 4.4.3 Evaluación capacidad biocontroladora de una mezcla de *Bacillus* spp., para el control de cancro bacteriano en tomate.

Dada la ausencia de incidencia de la enfermedad, tanto en los ensayos como en las unidades de validación, se optó por realizar un cultivo, de tomate var. Maria Italia, en los invernaderos de la Universidad de Talca, el que fue manejado en la forma tradicional, de los agricultores de Colín, con la única salvedad de la inoculación con *Clavibacter michiganense* Subsp. *michiganense*. Esta inoculación se realizó en siembra, transplanta y primer desbrote.

Los tratamientos fueron los siguientes:

Control: Aplicación de agua

Preventivo: Aplicación de 3 g/l, 24 horas antes de desbrote. (1 aplicación)

Curativo: Aplicación de 3 g/l, 24 horas después de desbrote. (3 aplicaciones)

Químico: Aplicación Nordox cada 7 días hasta floración y luego Streptoplus después de cada desbrote. (7 aplicaciones)

Químico + Bs.: Igual anterior, pero aplicaciones de Cu y Ab + Bs. (7 aplicaciones)

Cada tratamiento consto de 4 repeticiones, cada una compuesta por 10 plantas.

Las mediciones comprendieron incidencia, número de frutos por planta, peso de frutos y Kg. de frutos por planta.



## 4.5 Etapa V: Desarrollo sistema de producción y transferencia

### 4.5.1. Evaluación de sustratos de producción:

Se evaluarán los siguientes sustratos para producción masiva en medio líquido

- Agua
- Agua + azúcar
- Jugo de tomate
- Jugo de pera
- Leche
- Caldo nutritivo
- Caldo nutritivo + 0,3 g/l  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
- 10 g/l peptona; 5 g/l Extracto de levadura; 10 g/l NaCl.
- 10 g/l peptona; 10 g/l dextrosa; 2 g/l extracto de levadura y 0,3 g/l  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
- M4: Extracto de levadura 30 g, extracto de malta 30 g, peptona 50 g, dextrosa 50 g,  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  5 g. completando 1.000 ml de agua.
- M4 +came vegetal 15 g y leche de soya 50 g.
- M3: Peptona 50 g, dextrosa 50 g, extracto de levadura 30, leche de soya 50 g y  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  5 g.
- GYS

Tubos de 15 ml con 6 ml de cada sustrato a evaluar, fueron inoculados con 100  $\mu$ l de una suspensión bacteriana en fase de crecimiento activo a una concentración de  $1 \cdot 10^8$  bacteria/ml, ajustada por cámara de Neubauer. Luego se incubaron por 24 horas a 25,5° C. Nuevamente por cámara de Neubauer y siembra de diluciones seriadas, se compararon las poblaciones logradas en cada uno de los medios utilizados. Además, de cada uno de los cultivos se tomaran 50  $\mu$ l, con los que se evaluó la actividad de las cepas sobre los patógenos en estudio, siguiendo la metodología del ensayo I. Cada tratamiento constó de 10 repeticiones. Los datos poblacionales fueron sometidos a un ANDEVA y a un test de separación de medias de Tukey HSD ( $P < 0,05$ ).

### 4.5.2 Evaluación de metodologías de estimulación de esporulación de la bacteria y secado de ésta.

El cultivo de las cepas fue desarrollado en frascos de cultivo (boca ancha) de 350 ml con 100 ml de caldo nutritivo, el que fue inoculado con 1 ml de una suspensión de  $1 \cdot 10^8$  ufc/ml, de un cultivo puro de 24 horas de crecimiento (fase Log). Luego cada frasco fue puesto en agitación a 150 r.p.m a una temperatura de 23° C. Pasado los 7 días, se tomó 1 ml de cada tratamiento, el que fue evaluado por microscopía, para determinar el porcentaje de esporulación.

Para la estimulación de esporulación, se utilizaron los siguientes tratamientos:

- T 0 Control, cultivo de siete días.
- T 1 Dilución, al 5° día se diluyó el medio de cultivo en un 50%, agregando agua destilada estéril y se continuó con el cultivo por dos días más.
- T 2 Temperatura, al 7° día el cultivo fue sometido en forma progresiva a 80° C por 5 minutos.

Aplicados los tratamientos para esporulación, se tomó 1 ml de cada frasco el que fue diluido 1:1.000 y teñido con verde malaquita, de manera de estimar porcentaje de esporulación. Para medir población, se tomó 1 ml de cada frasco y se diluyó 1:1.000, de donde se sembraron 500  $\mu$ l



en placa Petrí con AN, para luego ser incubado por 2 días a 27° C, y contar su población (n° de colonias).

Cada uno de los tratamientos anteriores, fue sometido a los siguientes procesos de secado

- S 1, secado al aire por 4 días.
- S 2, secado a 45° por periodos de 1 hora, con descansos de 30', 7 veces.
- S 3, secado a 60° por periodos de 30 minutos con descansos de 30', 7 veces.

Para tal propósito, parte del cultivo anterior (tratamientos de esporulación) fue mezclado con sílice micronizado (como acarreador) en una proporción de 20 gr. de sílice por cada 15 ml de cultivo, y luego sometido a los tratamientos de secado. Siete días posterior al secado, se tomó 1 gramo de cada cultivo, el que fue suspendido en 100 ml agua destilada estéril y diluido 1:1.000, para luego de esta dilución tomar 0,5 ml, los que fueron sembrados en placas Petrí, con AN y puestos en incubación a 27° C por 3 días, de forma de realizar el conteo de unidades formadoras de colonias.

Finalmente, el ensayo total tuvo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 3, donde los factores fueron método para estimular la esporulación y métodos de secado. Los resultados fueron sometidos a un ANDEVA y posteriormente a un test de separación de medias ( $P < 0,05$ ).

#### **4.5.3 Determinación de Temperatura óptima de cultivo**

#### **4.5.4 Determinación de pH inicial óptimo de cultivo**

Se están probando 4 pH se evaluara rapidez de esporulación y biomasa producida.

Los pH evaluados fueron: 6.0, 6.5 7.5 y 8.0 en cada temperatura se evaluarán todas las cepas en dos medios, uno rico en nutrientes y uno pobre siendo el medio caldo nutriente y gys respectivamente, los medios en que se evaluara ya que son los que producen esporulación más rápidamente y con una biomasa similar.

En botellas cada una con 50 ml de uno de los medios y pH se inoculo con una de las cepas (Maguellines 2, Maguellines, Antumavida, Vilcun y Mallerauco), a los cinco días se evalúa por medio de un frotis el estado de la bacteria si esta esporulada o no, si es así se procede a realizar un conteo de biomasa por medio de diluciones y su posterior sembrado en placa y conteo de las colonias que se forman a las 24 hrs. De sembrado.

Si no están esporuladas se realizan frotis cada 3 días hasta completar los 10-12 días aproximadamente.

#### **4.5.7 Evaluación de sustratos inertes y forma de secado para almacenaje y formulación**

Los sistemas de secado evaluados, fueron inicialmente dos, uno secado a temperatura ambiente dentro de la cámara de flujo laminar y el segundo en horno a 65°C.

En bandejas plásticas previamente desinfectadas, se colocaban 100 g de talco estéril con 100 ml de la suspensión de *Bacillus*, después de homogenizar, se sometían a los tratamientos de secado por 48 hrs. Pasado ese tiempo, las mezclas se guardaban en bolsas de papel, en oscuridad a temperatura ambiente por 72 hrs. después de las cuales, se tomaban 3 g, los que se suspendían en 1 litro de agua estéril, de esta solución, se tomaba 1 ml para realizar conteo, según la metodología ya explicada para este efecto y utilizando la metodología del ensayo I, de la



fase in vitro, se probaba la actividad sobre los patógenos, obteniéndose un promedio de actividad sobre cada uno de estos.

Dado que los dos sistemas de secado se mostraron altamente ineficientes en cuanto a población final y actividad, del formulado final, se modificó el secado en horno, generando un sistema de secado por capas. El que consistió en la adición de 50 g del acarreador, al que se le asperjaban 350 ml de la suspensión de *Bacillus*, luego se agregaban 50 g más y se repetía el proceso por 4 veces. Una vez terminada la 5ª capa la mezcla se colocaba en horno de secado a 80° C por 12 minutos. Continuándose con la metodología ya detallada. Después de la evaluación inicial, cada muestra se guardó, realizándose conteos de población y pruebas de actividad cada 3 meses hasta completar 12 meses. Para este efecto se evaluaron los siguientes sustratos:

- Silíce micronizado
- Talco
- Zeolita

Cada tratamiento constó de 5 repeticiones, cada repetición consistente en un placa Petri.

#### **Transferencia Sistema de Producción.**

La transferencia a Bio Insumos Nativa, consistió en el inicio de una producción a escala de laboratorio de las cepas de *Bacillus* y el método de secado. Logrando ya haber realizado 3 producciones de cada una de las cepas en las dependencias de Nativa, logrando niveles de concentración y actividad, similares a los obtenidos en los laboratorios de la Universidad de Talca.

Por su parte la empresa ha adquirido un birreactor, el que en el corto plazo empezará la producción de las cepas a una escala semi industrial.



## 5 Actividades del Proyecto:

Obj. Espe. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha programada	Fecha ejecución	Observaciones
Global	8.1.1	Compra de equipo e insumos	Dic/02	Dic/02	Los equipos estuvieron instalados y en operación a fines de Enero
8.2.1	8.2.1.1	Recolección y aislación de cepas Bs.	Ene/03	Abr/03	Las aislaciones se terminaron en la fecha estipulada, pero por el atraso en la instalación de la cámara de flujo y por la alta cantidad de cepas recolectadas, se terminó en Abril la aislación de los Bs.
	8.2.1.2	Recolección y aislación patógenos	Mar/03	Mar/03	Con la instalación de la cámara de flujo y de incubación, finalmente se pudo contar con un cepario con las bacterias fitopatógenas en estudio.
Global	8.1.2	Compra materiales e insumos	Dic/03	Dic/03	
8.2.1	8.2.1.3	Ensayo laboratorio I (Cepas)	Abr/03	Jun/03	El atraso se debió a la demora en la instalación de la cámara y al gran número de muestras a evaluar.
	8.2.1.4	Ensayo laboratorio II (Dosis)	Jul/03	Ago/03	Dado el atraso del ensayo I, se atrasaron los ensayos de lab. consecutivos
	8.2.1.5	Ensayo III (Compatibilidad entre cepas)		Dic/03	Este ensayo no estaba en la propuesta original.
	8.2.1.6	Ensayo IV (Compatibilidad agro químicos)	Nov/03	Dic/03	
8.2.2	8.2.1	Ensayo en cultivos con inoculación	Dic/03	Feb/04	La demora se debió a los retrasos iniciales de optimización de las condiciones ambientales el mejor crecimiento
8.2.3	8.2.3.1	Selección de agricultores	Dic/03	Mar/04	Se esperó a tener resultados de ensayos con inoculación.
	8.2.3.2	Desarrollo de ensayo de Campo en Tomate.	Sep/05	Ene/06	Se aplazo el periodo de ejecución del proyecto para poder completar 2 temporadas
	8.2.3.3	Desarrollo de ensayo de Campo en Ciruelo.	Sep/05	Mar/06	Se aplazo el periodo de ejecución del proyecto para poder completar 2 temporadas
8.2.4	8.2.4.1	Ensayos de producción	Dic/03	Mar/05	Se aplazo el proyecto
	8.2.4.2	Ensayos de extracción almacenaje	Sep/05	Mar/05	Se aplazo el periodo de ejecución del proyecto para poder completar 12 meses de almacenaje



8.2.5	8.2.5.1	Charla Divulgativa en Seminario Internacional de Alternativas Biorracionales al Uso de Pesticidas	May/03	Oct/04	Presentación en actividad organizada por FIA y U. de Concepción
		Exposición en Simposio de Control Biológico INIA Quilamapu		Ago/05	Presentación en actividad organizada por FIA e INIA Quilamapu
		Exposición en Seminario "Insumos para la Agricultura Orgánica"		Ago/05	Organizada por AOOCH
		Exposición en Seminario "Insumos para la Agricultura Orgánica"		Dic/05	Organizada por AOOCH
	8.2.5.2	Día de campo	Sep/03	Jun/05	Reemplazo por reunión con asesores de tomate en Quillota
Global	8.1.3	Compra materiales e insumos	Dic/04	Dic/04	
8.2.5	8.2.5.3	Día de campo	Ene/04	Oct/05	Reemplazo por reunión con asesores de tomate en Colin
	8.2.5.4	Exposición en XIV Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología	Oct/04	Dic/04	Organizado por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca
	8.2.5.5	Día de campo	Jul/04	Jul/05	Reemplazada por reunión con asesores de tomate en Colin y Mayje
	8.2.5.6	Día de campo	Nov/04	Nov/05	Realizada en Colin con resultados de ensayos de campo
8.2.6	8.2.6.1	Elaboración convenio con empresa	Dic/04	Jul/04	
Global	8.1.4	Compra materiales e insumos	Jun/05	Jun/05	
8.2.5	8.2.5.7	Día de campo	Ene/05	Dic/05	Charla de divulgación, realizada en Chillan, en conjunto con Bio Insumos Nativa Ltda.
	8.2.5.8	Exposición congreso científica	Oct/05	Nov/05	Congreso de la SOCHIFIT Arica.
	8.2.5.8	Día de campo	Jul/05		
	8.2.5.10	Día de campo	Ago/05	Abril/06	Jornada de finalización de proyecto
	8.2.5.11	Elaboración e impresión boletín divulgativo	Oct/05	Abr/06	
8.2.6	8.2.6.2	Transferencia de tecnología de producción y almacenaje.	Mar/05	Abr/06	



	8.2.6.4	Inicio producción comercial	Oct/05	Ene/05	Desde enero la empresa inicio a producción, pero mientras no funcione el biodigestor los volúmenes producidos, se están destinando a promoción del producto.
Global	8.1.5	Elaboración informe final	Oct/05	May/06	Por aplazamiento del proyecto

## 6 Resultados del Proyecto:

### 6.1 Etapa I. Prospección

#### 6.1.1 Recolección de cepas de *Bacillus* spp.

La recolección de muestras de suelo del lugar, hojarasca y material vegetal comprendió todas las reservas vegetales de la Séptima Región, además de huertos comerciales tanto orgánicos como convencionales de manzano, ciruelo, cerezo, viñas, uva de mesa, hortalizas al aire libre y de invernaderos y otras zonas detalladas en Anexo 1. Varias muestras fueron traídas desde fuera de la región, aprovechando los viajes del equipo ejecutor del proyecto. Además, en los lugares de difícil acceso y ubicación, los lugares de muestreo fueron registrados con GPS (Etrex, Garmin) para una futura recolección precisa del lugar.

Las muestras fueron repicadas entre 3 y 4 veces de forma de lograr cultivos puros de las cepas de *Bacillus*, lográndose entre 3 y 4 cepas por muestra de suelo, por lo que se cuenta con un cepario de 126 cepas. La identificación de cepas a nivel de especie se realizará una vez seleccionadas las cepas con mayor actividad. En esta fase del proyecto sólo se ha llegado a nivel de género.

#### 6.1.2.- Recolección de bacterias fitopatógenas

Las cepas de los patógenos ya descritas, fueron repicadas y almacenadas en medios selectivos, tanto para su preservación como para su utilización en los ensayos.

Cuadro 2 Cepas de *Bacillus* seleccionadas por su alta actividad frente a 4 bacterias fitopatógenas.

Cepas	Patógeno	Especie	Origen
Maguellines 2	<i>Clavibacter</i>	<i>BreviBacillus brevis</i>	Constitución Muelle
Vilcun	<i>Clavibacter, Xanthomonas, Pseudomonas Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Vilcun (Altos de Lircay)
Antumavida	<i>Clavibacter, Erwinia, Xanthomonas, Pseudomonas</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Laguna Torca
Maguellines	<i>Erwinia</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Constitución Muelle
Mallerauco	<i>Clavibacter, Xanthomonas y Pseudomonas Erwinia</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Enladrillado



## 6.2 Etapa II: Evaluación *in vitro*

Evaluación de la capacidad inhibitoria *in vitro* de cepas nativas de *Bs.* para aislados de *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P.s.* pv. *tomato*, *Erwinia* sp. y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

**6.2.1 Ensayo I.** Para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los aislados de *Bs.*, se utilizó la siguiente metodología:

Cada cepa fue evaluada para cada patógeno, determinándose aquellas con actividad alta, media, baja y nula, en relación a la consistencia de halo de inhibición en las repeticiones efectuadas. De las 170 cepas evaluadas, 81 presentaron algún nivel de actividad inhibitoria para alguno de los patógenos, lo que implicaría un alto porcentaje (47 %). En el Cuadro 3 se muestran las cepas con actividad media a alta por patógeno. De su análisis, se puede observar que *Xanthomonas campestris* fue el patógeno que fue inhibido por un mayor número de cepas de *Bs.*, mientras que *Erwinia* presentó la situación opuesta.

Cuadro 3 Cepas de *Bs.* colectadas desde distintos sectores de la VII Región. Se presenta además su actividad presentada contra bacterias fitopatógenas.

Patógeno	Cepas	Actividad	Origen
<i>Xanthomonas</i>	102-3	Alta	Laguna Torca
	8-1r	Alta	Panguilemo
	8-2	Alta	Panguilemo
	8-2 r	Alta	Panguilemo
	8-3 2r	Alta	Panguilemo
	8-3`r	Alta	Panguilemo
	9-3	Alta	Panguilemo
	9-3`r	Alta	Panguilemo
	107-1	Alta	Mallerauco
	107-4	Alta	Mallerauco
	110-1	Alta	Enladrillado
	111-1	Alta	Enladrillado
	40-1	Alta	Muelle
	46-1	Alta	Constitución
	60-2	Alta	Los Maitenes
	61-4	Alta	Queules
	62-1	Alta	Queules
64-13r	Alta	Queules	
9-3 2 r	Alta	Queules	
nn5921-3	Alta	Panguilemo	
<i>Clavibacter</i>	8-3`r	Media	Panguilemo
	9-3`r	Media	Panguilemo
	103-3	Media	Laguna torca
	110-1	Media	Enladrillado
	113-1	Media	Enladrillado

	111-1' 40-1 40-2 45-3 46-3r 107-1 102-3 110-4 115-1	Media Media Media Media Media Media Alta Alta Alta	Enladrillado Muelle Constitución Muelle Constitución Los Maitenes Los Maitenes Mallerauco Laguna Torca Enladrillado Enladrillado
<i>Erwinia</i>	102-2 110-1 60-2 61-4 83-3b 39-3 64-1r 73-2 3 r 83-4 99-1r	Alta Alta Media Alta Media Alta Alta Media Alta Alta	Laguna Torca Enladrillado Queules Queules infiernillo Muelle Constitución Queules Los Ruiles infiernillo laguna torca
<i>Pseudomonas</i>	102-3 3-2 8-2 9-3`r 110-1 107-1 31-3r 39-3 40-1 r 46-2 61-4 60-2 83-a-1r 99-1r	Alta Alta Alta Alta Alta Alta Alta Alta Alta Alta Alta Alta Alta Alta	Laguna Torca Panguilemo Panguilemo Panguilemo Enladrillado Mallerauco Sillaur Maule Muelle Constitución Muelle Constitución Queules Queules Infiernillo Laguna torca

En base a los resultados y tratando de dar una mayor representatividad a los lugares de recolección las cepas seleccionadas por patógeno fueron, las indicadas en el cuadro 4.



Cuadro 4. Cepas seleccionadas para cada uno de los patógenos en estudio.

Patógeno	Cepas	Origen
<i>Clavibacter</i>	40-1 107-1 102-3 Serenade 110-1	Constitución Muelle Enladrillado Laguna Torca  Enladrillado
<i>Xanthomonas</i>	8-2 102-3 107-1 46-1 110-1 61-4 serenade	Panguilemo Laguna Torca Mallerauco Constitución Enladrillado Los Queules
<i>Erwinia</i>	99-2 60-2 39-3 83-4 102-2 serenade	Laguna Torca Los Queules Constitución Muelle Infiernillo Laguna Torca
<i>Pseudomonas</i>	46-1 107-1 8-2 61-4 110-1 102-3	Constitución Mallerauco Panguilemo Los Queules Enladrillado Laguna Torca

### 6.2.2 Ensayo II. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las cepas con capacidad inhibitoria.

Este ensayo permitió determinar las mejores cepas de *Bs.* para continuar con los ensayos *in vivo*, mostrando las cepas seleccionadas actividad inhibitoria a concentraciones tan bajas como 1000 bacterias/ml. La selección de las cepas fue en base a la mínima concentración inhibitoria (MCI). Esta información es presentada en el Cuadro 5

Cuadro 5 Concentraciones mínimas inhibitorias (UFC/ml), alcanzadas por 5 cepas de *Bacillus* spp. Sobre cuatro bacterias fitopatógenas.

Cepa/Patógeno	<i>Clavibacter</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Pseudomonas</i>
Maguellines 2	$10^5$	$10^4$	$10^6$	$10^6$
Vilcun	$10^6$	$10^3$	$10^6$	$10^5$
Antumavida	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^3$
Mallerauco	$10^5$	$10^3$	$10^4$	$10^2$
Maguellines	$10^6$	$10^6$	$10^3$	$10^6$
Serenade	$10^5$	$10^5$	$10^6$	$10^6$

Los datos mostrados indican, que *Clavibacter* fue el patógeno más difícil de controlar, ya que fue el que tuvo la mínima concentración inhibitoria a una concentración de  $1 \cdot 10^5$  bacterias/ml. Además es importante hacer notar que en todos los patógenos se repitieron las cepas Mallerauco y Antumavida, demostrando su amplio rango de acción, y también es destacable que existían cepas específicas para cada patógeno, lo que nos indicaría una gran diversidad de cepas y métodos de control que poseen las especies de este género. Las cepas con mejor desempeño, se utilizaron en el ensayo III, con el fin de determinar la compatibilidad entre ellas.

### 6.2.3 Ensayos III: Determinación de la compatibilidad entre cepas nativas de Bs. para el control de enfermedades.

Este ensayo nos permitió definir si las cepas seleccionadas, son capaces de actuar en conjunto, permitiendo así un rango de acción mucho mayor a la futura formulación. En el grafico 1 se aprecian los resultados de la combinación de las distintas cepas.

En el caso de *Xanthomonas* la mezcla de las cepas Mallerauco/Antumavida/Vilcun fue la que obtuvo el mejor resultado, evidenciando una sinergismo entre ellas. En el caso de *Pseudomonas*, el mejor resultado lo dio la mezcla Vilcun/Antumavida, mostrando cierto grado de incompatibilidad entre las cepas Vilcun y Mallerauco, además demuestra que la principal acción esta dada por la cepa Vilcun.

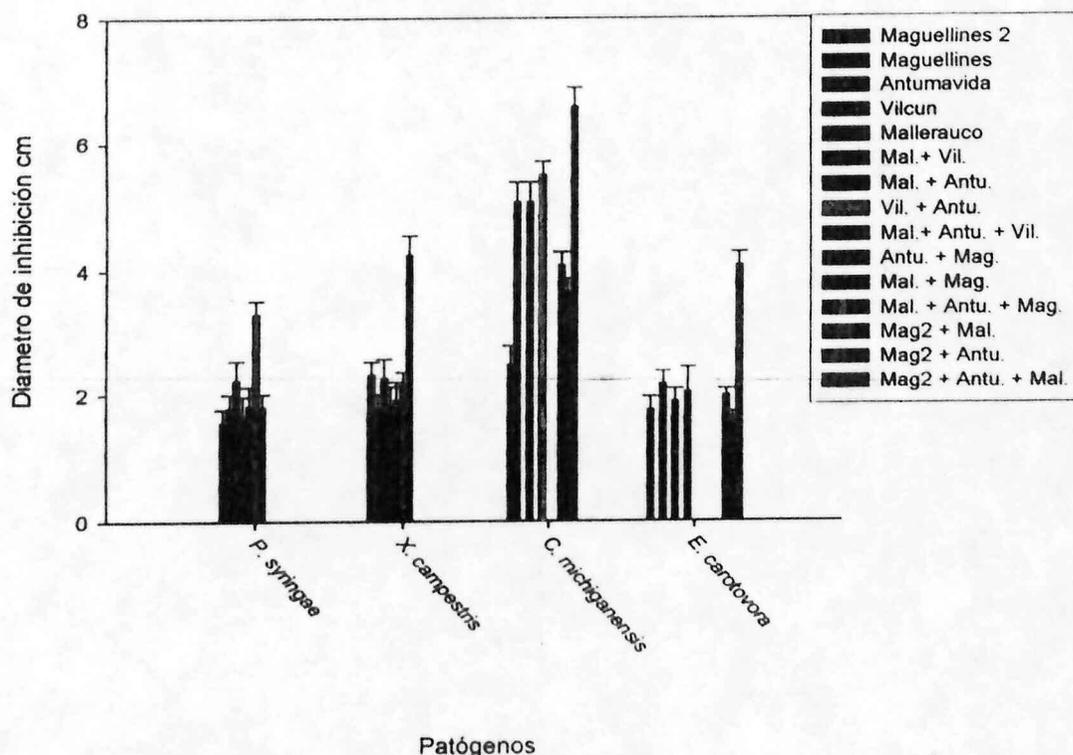


Grafico 1. Efecto inhibitorio de distintas mezclas de Bs. sobre 4 bacterias fitopatógenas.



En el caso de *Clavibacter*, pese a que la combinación Mallerauco/Antumavida/Maguellines fue la mejor, no presenta diferencias significativas con la mezcla de Mallerauco y Antumavida, considerándose esta la más apropiada, dado que estas dos cepas combinadas cada una con la Maguellines, presentan menor actividad que sin esta última cepa, la que parece tener un efecto negativo sobre las primeras.

En el caso de *Erwinia* el mejor efecto se logró al combinar las tres cepas que son Maguellines 2/Antumavida/ Mallerauco

#### 6.2.4 Ensayo III: Determinación de la capacidad de control de las cepas de *Bacillus* spp, en base a competencia.

En este ensayo, se apreció un método de control de algunas cepas, que no ha sido descrito en la literatura, como se ve en el cuadro 6, solo las cepas Vilcun y Mallerauco tienen esta capacidad y solo sobre los patógenos *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. Por su parte las cepas Antumavida, Maguellines 2 y Maguellines solo mostraron efecto por inhibición sobre los patógenos.

Cuadro 6, efecto biocontrolador de las cepas de *Bacillus* spp, sobre los patógenos, mediante inhibición (I) y como competencia (C).

Patógeno	Clavibacter		Xanthomonas		Pseudomonas		Erwinia	
	I mm	C mm	I mm	C mm	I mm	C mm	I mm	C mm
Cepa								
Maguellines 2	0 e	0 e	0 e	0 e	0 e	0 e	26.9 bc	0 e
Maguellines	45.3 b	0 e	0 e	0 e	0 e	0 e	0 e	0 e
Antumavida	21.21 cd	0 e	7.5 d	0 e	10.38 d	0 e	34.7 b	0 e
Vilcun	15.8 d	0 e	0 e	67.01 ab	0 e	35.5 c	31.4 b	0 e
Mallerauco	15.69 d	0 e	0 e	82.22 a	0 e	56.6 2 b	0 e	0 e

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

Los niveles mayores de inhibición se alcanzaron a las 48 hrs. de incubación, manteniéndose hasta 30 días después, el efecto de competencia logró su máximo a los 4 días de incubación. Se tomaron muestras con el asa de las zonas del patógeno colonizadas por las cepas, las que fueron cultivadas en placas Petri con agar nutriente, observándose solo el crecimiento de las cepas de *Bacillus*.

Estos resultados podrían explicar porque, las mezclas de cepas son más efectivas, que cada una en forma aislada, lo que estaría generando un sinergismo entre el efecto inhibitorio de unas cepas y el efecto competitivo de otras. Desde el punto de vista de producción de las cepas, se facilita enormemente, ya que es más fácil realizar una formulación de esporas, que del antibiótico purificado, además este tipo de acción controladora, disminuye notoriamente la probabilidad de surgimiento de resistencias. En cuanto a su acción en campo, si este



mecanismo de competencia ocurriera, podría generar un efecto erradicador sobre los patógenos afectados.

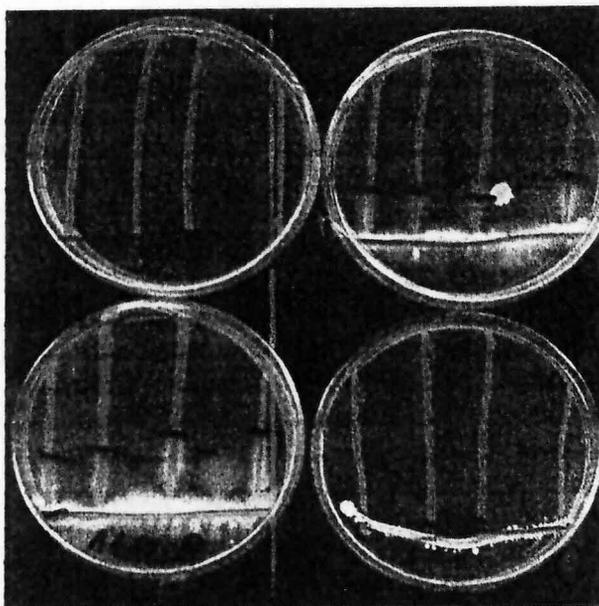


Figura 1: Efecto de competencia de 4 cepas de *Bacillus*, sobre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

#### 6.2.5 Ensayo IV: Determinación de la compatibilidad de cepas nativas de *Bs.* con agroquímicos utilizados para el control de enfermedades.

En el Cuadro 7, se aprecian los porcentajes de disminución de la población de las cepas de *Bs.*, por acción de los agroquímicos evaluados. En general, todos presentan acción inhibitoria sobre las cepas de *Bs.*, siendo Citocur, el producto que presenta una tendencia menor de actividad contra las cepas de *Bs.* en comparación a Phytón y Oxocup.



Cuadro 7 Porcentaje de inhibición del crecimiento de cepas nativas de *Bs.* por acción de bactericidas de uso agrícola.

Cepas de <i>Bs.</i>	Inhibición del crecimiento (%) <sup>a</sup>			
	Streptoplus	Citocur	Phyton	Oxi- cup
Maguellines 2	75,2	34,8 c	100	100
Antumavida	78,6	99,9 a	97,2	100
Maguellines	77,3	65,8 b	100	100
Mallerauco	79,4	76,3 b	100	100
Vilcun	78,5	62,9 b	100	100
Significancia	NS	*	NS	

\* P < 0,05, NS no significativo. Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD (P<0,05)

<sup>a</sup> Porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al testigo

### 6.2.6 Ensayo V: Desarrollo de tolerancia de cepas de *Bs.* a bactericidas de uso agrícola.

Se han logrado obtener variantes resistentes de todas las cepas de *Bacillus*, tanto para Nordox como para Streptoplus, en el cuadro 8 se detallan los niveles alcanzados para cada cepa.

Cuadro 8. Tolerancia, expresada como fracción de dosis comercial, de bactericidas de uso agrícola con cepas de *Bacillus* spp. Con bactericidas de uso

Cepa	Nordox (N)	Streptoplus (S)	Mezcla N + S
Maguellines (40)	¼ de concertación comercial	¼ de concertación comercial	¼ de Streptoplus y 1/8 Nordox
Maguellines 2 (39)	¼ de concertación comercial	¼ de concertación comercial	¼ de Streptoplus y 1/8 Nordox
Antumavida (102)	¼ de concertación comercial	¼ de concertación comercial	¼ de Streptoplus y ¼ Nordox
Vilcun (107)	¼ de concertación comercial	¼ de concertación comercial	1/8 de Streptoplus y 1/8 Nordox
Mallerauco (110)	¼ de concertación comercial	¼ de concertación comercial	¼ de Streptoplus y 1/8 Nordox

### 6.3 Etapa III: Evaluación *in vivo*

#### 6.3.1 Evaluación *in vivo* de la capacidad biocontroladora de las cepas de *Bs.* efectivas en cultivos de tomate, inoculados con las bacterias fitopatógenas *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

El Cuadro 9 indica el efecto de aplicaciones de *Bs.* sobre plantas de tomate inoculadas con la bacteria fitopatógena. El porcentaje de folíolos afectados por la mancha bacteriana fue significativamente mayor en los testigos inoculados en relación a los tratamientos que incluyeron aplicaciones de *Bs.* Lo anterior confirma la efectividad de las cepas de *Bs.* en el biocontrol de la bacteria *X. campestris* en tomate.

Cuadro 9 Disminución porcentual de la enfermedad causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* expresado como porcentaje de folíolos sanos y su severidad en tomate por efecto de aplicaciones de una mezcla de cepas nativas de *Bacillus* spp. en condiciones controladas de invernadero

Tratamientos	Severidad (0 a 2)*	Folíolos sanos (%)
<b>T1: Control Inoculado + heridas</b>	1,9 a	14,7 c
<b>T2: Control Inoculado sin heridas.</b>	1,6 ab	39,0 bc
<b>T3: Aplicación <i>Bs.</i> pre-inoculación con heridas</b>	0,1 d	93,6 a
<b>T4: Aplicación <i>Bs.</i> pre-inoculación sin heridas.</b>	0,2 cd	99,5 a
<b>T5: Aplicación <i>Bs.</i> post-inoculación con heridas.</b>	1,3 b	58,0 b
<b>T6: Aplicación <i>Bs.</i> post-inoculación sin heridas</b>	0,7 c	89,9 a
<b>Significancia</b>	*	*

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

\* (de 0 a 2, siendo 0 sin síntomas)

La influencia de conferir heridas en la inoculación y el momento de aplicación de la mezcla de cepas de *Bs.* fueron altamente significativas ( $P = 0,0002$  y  $P < 0,001$  respectivamente). Sin embargo, la interacción entre ambos factores no lo fue.



Los resultados indicaron que un mayor porcentaje de folíolos sanos se lograban al aplicar las cepas de Bs. previo a la inoculación, sugiriendo que éstas deben estar presentes antes que la bacteria llegue a las plantas de tomate (Cuadro 10). Del mismo modo, la inoculación de la bacteria fitopatogénica se vio favorecida cuando se practicaron heridas en las plantas (desbrote), encontrándose un porcentaje significativamente mayor de folíolos afectados en estos tratamientos que en aquellos sin heridas (Cuadro 11). ✓

Cuadro 10 Disminución porcentual de la enfermedad causada por *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* expresado como porcentaje de folíolos sanos en tomate por efecto de aplicaciones en pre y post inoculación de una mezcla de cepas nativas de *Bacillus* spp. en condiciones controladas de invernadero.

Momento de aplicación	Folíolos sanos (%)
Pre-Inoculación	96,6 a
Post-Inoculación	73,9 b
Sin aplicación	26,9 c
Significancia	**

+ dulce ?

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

Cuadro 11 Disminución porcentual de la enfermedad causada por *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* expresado como porcentaje de folíolos sanos por efecto de aplicaciones de una mezcla de cepas nativas de *Bacillus* spp. en tomate inoculado con y sin heridas.

Presencia de Heridas	Folíolos sanos (%)
Con heridas	55,4 b
Sin Heridas	76,3 a
Significancia	**

post inoculad?

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

Para los valores de severidad estimados, se cuantificó la misma tendencia anterior, en donde la severidad de la enfermedad fue significativamente menor en aquellos tratamientos que recibieron las cepas de Bs. previo a la inoculación y cuando ésta fue practicada sin heridas (Cuadros 12 y 13).



Cuadro 12 Severidad de la enfermedad causada por *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, en un cultivo de tomate, bajo distintos tratamientos de una mezcla de cepas nativas de *Bacillus* spp., asociado al momento de aplicación.

Momento de aplicación	Severidad
Pre-Inoculación	0,2 c
Post-Inoculación	1,0 b
Sin aplicación	1,8 a
Significancia	**

La severidad se mide de 0 a 2, donde severidad 0 indica ausencia de síntomas  
Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

Cuadro 13 Severidad de la enfermedad causada por *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, en un cultivo de tomate, bajo distintos tratamientos de una mezcla de *Bacillus* spp, asociado la presencia de heridas.

Heridas	Severidad
Presencia	1,2 a
Ausencia	0,8 b
Significancia	**

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )



### ***Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense***

El Cuadro 14 indica el efecto de aplicaciones de Bs. sobre plantas de tomate inoculadas con *C. michiganense*. El porcentaje de folíolos afectados por la marchitez fue significativamente mayor en los testigos inoculados en relación a los tratamientos que incluyeron aplicaciones de Bs. Lo anterior confirma la efectividad de las cepas de Bs. en el biocontrol de la bacteria *C. michiganense* en tomate.

Cuadro 14 Disminución porcentual de la enfermedad causada por *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* expresado como porcentaje de folíolos sanos en tomate por efecto de aplicaciones de una mezcla de cepas nativas de *Bacillus* spp. en condiciones controladas de invernadero

Tratamientos	Folíolos sanos (%)
<b>T1: Control Inoculado + heridas</b>	6,4 b
<b>T2: Control Inoculado sin heridas.</b>	22,2 c
<b>T3: Aplicación Bs. pre-inoculación con heridas</b>	26,9 b
<b>T4: Aplicación Bs. pre-inoculación sin heridas.</b>	62,5 a
<b>T5: Aplicación Bs. post-inoculación con heridas.</b>	64,6 a
<b>T6: Aplicación Bs. post-inoculación sin heridas</b>	79,9 a
<b>Significancia</b>	*

} post inoculación + sanos?

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

Los factores presencia de heridas y momento de aplicación de la mezcla de cepas fueron altamente significativas ( $P < 0,001$  y  $P = 0,000059$  respectivamente). La interacción entre ambos factores no tuvo ningún efecto. Los resultados indicaron que un mayor porcentaje de folíolos sanos se lograban al aplicar las cepas de Bs. después de la inoculación, sugiriendo que éstas pueden ser aplicadas después que la bacteria tome contacto con las plantas de tomate (Cuadro 15). Del mismo modo, la inoculación de la bacteria fitopatógena se vio favorecida cuando se practicaron heridas en las plantas (quebradura de tricomas superficiales de las hojas), encontrándose un porcentaje



significativamente mayor de foliolos afectados en estos tratamientos que en aquellos sin heridas (Cuadro 15).

Cuadro 15 Disminución porcentual de la enfermedad causada por *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* expresado como porcentaje de foliolos sanos en tomate por efecto de aplicaciones en pre y post inoculación de una mezcla de cepas nativas de *Bacillus* spp. en condiciones controladas de invernadero.

Momento de aplicación	Foliolos sanos (%)
Pre-Inoculación	44,7 b
Post-Inoculación	72,2 a
Sin aplicación	14,3 c
Significancia	**

\*

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

Cuadro 16 Disminución porcentual de la enfermedad causada por *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* expresado como porcentaje de foliolos sanos por efecto de aplicaciones de una mezcla de cepas nativas de *Bacillus* spp. en tomate inoculado con y sin heridas.

Presencia de Heridas	Foliolos sanos (%)
Con heridas	32,7 b
Sin Heridas	54,9 a
Significancia	**

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

### 6.3.2 Evaluación de metodologías de una mezcla de cepas de *Bacillus* spp. en el control de *Erwinia carotovora*, en papa en almacenaje.

Después de 90 días de almacenaje, los tratamientos fueron evaluados a través de la determinación del porcentaje de papas dañadas por *Erwinia*, considerándose dañada cualquier tubérculo con pudrición acuosa maloliente. En el gráfico 2 se aprecia el efecto de los tratamientos utilizados, siendo la inoculación con *Erwinia* efectiva en causar pudrición de tubérculos, lo que demostró la significativa efectividad del tratamiento preventivo de *Bacillus* (T3). Este fue similar al efecto que tuvieron papas sin inocular y mojadas (T0) o tratadas sólo con *Bacillus* (T1). De los datos se desprende que *Bacillus* no sería tan efectivo al ser empleado como tratamiento curativo (T2), ya que éstos fueron similares al testigo inoculado con *Erwinia* solamente (T4).

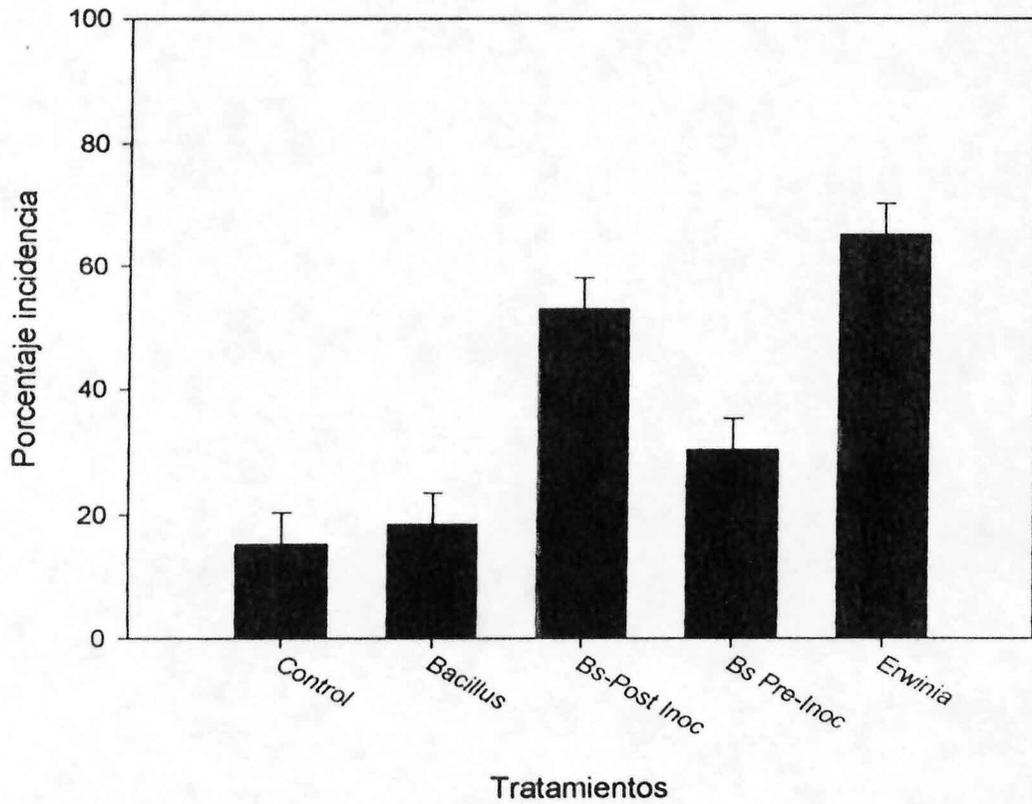


Grafico 2. Incidencia de papas podridas por *Erwinia carotovora*, tratadas con y sin *Bacillus* spp.



#### 6.4 Etapa IV: Ensayos en campo.

6.4.1 Evaluación capacidad biocontroladora de una mezcla de *Bacillus* spp., para el control de enfermedades bacterianas, en cultivos bajo plástico de tomate.

##### **Predio Enrique Correa, sector Escuela de Caballería Quillota.**

En este ensayo no se han detectado síntomas de enfermedades bacterianas, pero si se registro un ataque de *Phytophthora infestans*, siendo posible cuantificar un efecto controlador de la mezcla de *Bacillus*, la que logro un efecto significativo en el control de esta enfermedad, en relación a los manejos del predio.

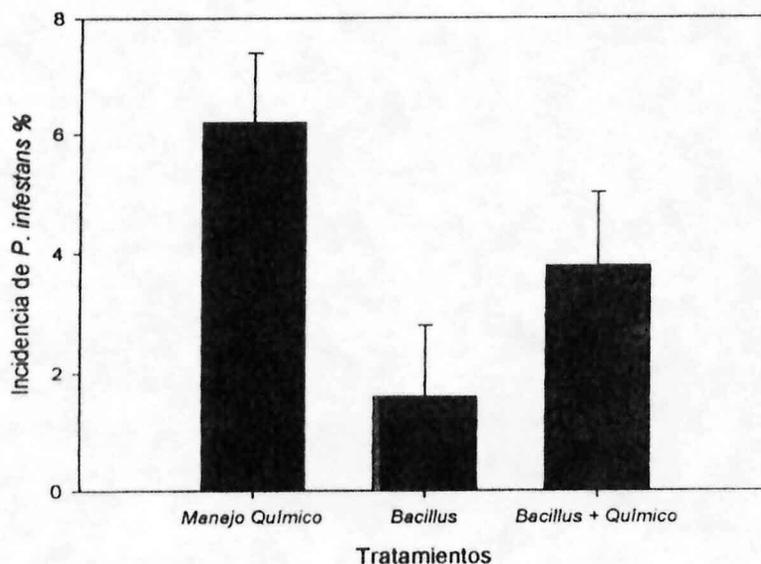


Grafico 3 Grafico 3 Incidencia de *Phytophthora infestans*, en plantas de tomate bajo plástico, tratadas con *Bacillus* spp.

##### **Predio Serafín Salazar, sector Quebrada del Ají, Boco.**

En este predio se detecto el ataque de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, siendo posible medir el efecto de *Bacillus* sobre el patógeno, el que como se aprecia en el grafico 4 es estadísticamente superior al obtenido por los tratamientos de compuestos cúpricos y Streptoplus, pero no diferenciándose de la mezcla de *Bacillus* con los compuesto químicos, pero dado el nivel de efectividad de *Bacillus* solo, se hace innecesario la aplicación de la mezcla.

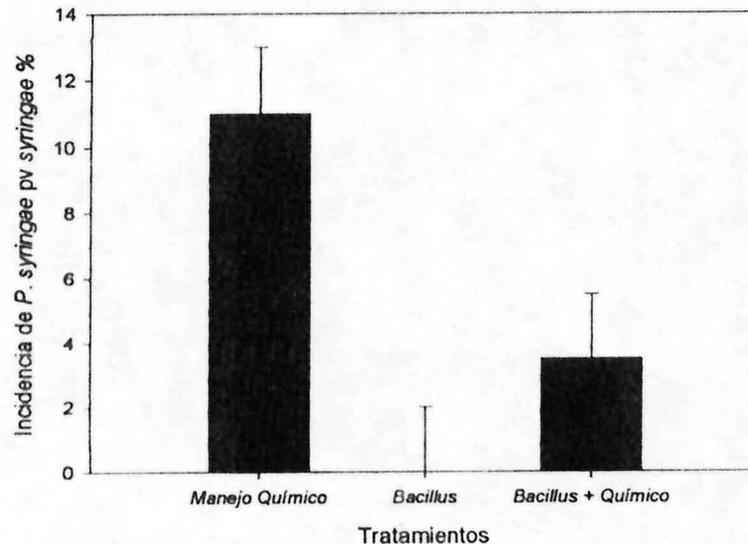


Grafico 4, Incidencia de *P. syringae* pv. *tomato*, en un cultivo de tomate, bajo tres tratamientos de control.

### Predio Pablo Salazar, sector San Miguel Colin.

En este predio, como se dijo anteriormente, se iniciaron los ensayos con prácticamente la totalidad de las plantas afectadas, lo que evito que se pudieran realizar mediciones de incidencia, además al existir una alta diversidad de síntomas y severidad de estos, tampoco se pudo evaluar el efecto sobre la severidad. Pero si se pudo evaluar la cantidad de plantas que logro llegar a 4° racimo con flores, cuaja y frutos. Como se ve en el grafico 5, el tratamiento con *Bacillus*, logro que sobre el 60% de las plantas alcanzaran 4° racimo, significativamente superior a los otros tratamientos, los cuales no superaron el 32%, manejo químico y 20%, **3 Tac I Beta**®

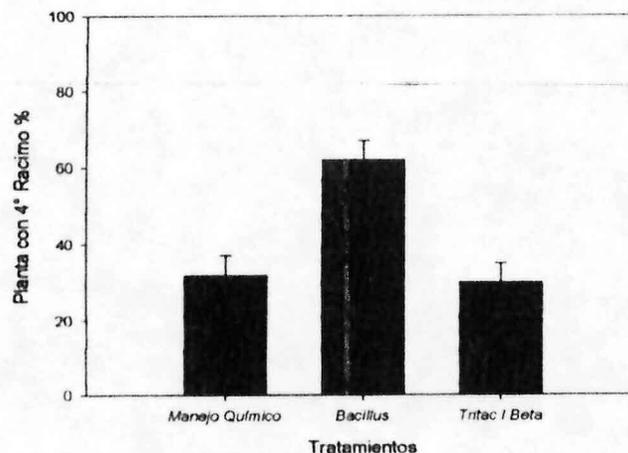


Grafico 5, Porcentaje de plantas afectadas por peca bacteriana que alcanzo 4° racimo, bajo tres tratamientos de control.



#### 6.4.2 Evaluación capacidad biocontroladora de una mezcla de *Bacillus* spp., para el control de enfermedades bacterianas, en cerezo.

En el grafico 6 se muestran los resultados de estas dos temporadas y el efecto acumulado de cada uno de los tratamientos, apreciándose que solo el tratamiento con *Bacillus* logro una disminución significativa en la severidad de ataque, mientras que la combinación de *Bacillus* con el manejo del huerto, solo logro evitar un aumento de severidad y finalmente el manejo de predio, mostró un aumento del daño generado por la enfermedad.

En cuanto a número de árboles por categoría de severidad, vemos en el grafico 7, el tratamiento con *Bacillus*, logros disminuir la cantidad de árboles, dentro de las categorías 2, 3 y 4 y aumento la cantidad de árboles en la categoría 1, que son árboles sanos. Indicando que el tratamiento con este biocontrolador solo es efectivo en árboles con severidad media a leve, es decir árboles, con canchros activos y ramillas muertas, pero sin presentar aun ramas completas muertas. En las categorías con severidad alta a muy severa, solo logro evitar un aumento de árboles afectados, pero no una recuperación (Grafico 7).

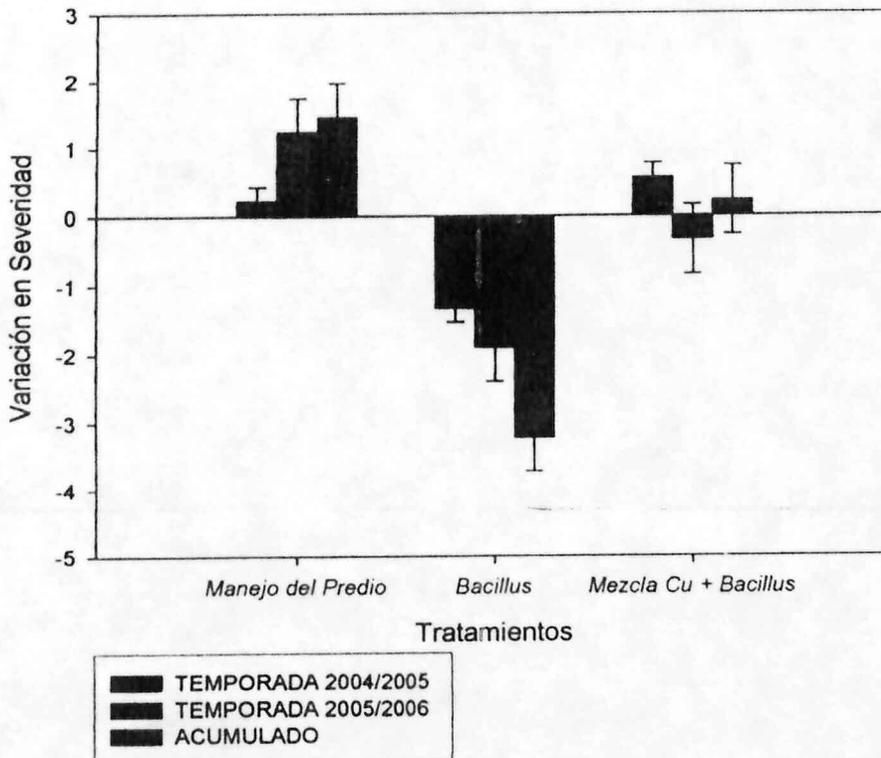


Grafico 6, Variación en severidad de daño en cerezos, ocasionado por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, con distintos tratamientos en base a *Bacillus*. y bactericida cúprico.

Por ultimo, dada la condición sistémica y estacional de la enfermedad, para poder determinar, que la disminución de severidad, se debía a un efecto directo de *Bacillus* sobre el patógeno, se realizaron mediciones de poblaciones del patógenos en yemas de árboles, de los distintos tratamientos, observándose una disminución en la incidencia de *P. syringae*, en los árboles tratados con *Bacillus*. (Grafico 8)

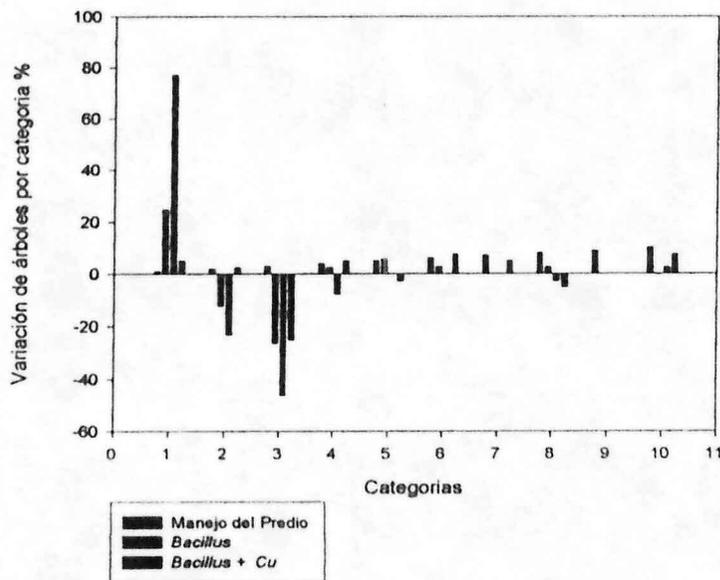


Grafico 7 Porcentaje de árboles, según categorías de severidad (0 sano, 10 muerto) de daño por de cáncer bacterial en cerezo, tratados con una mezcla de *Bacillus* y compuestos cúpricos y la mezcla de estos.

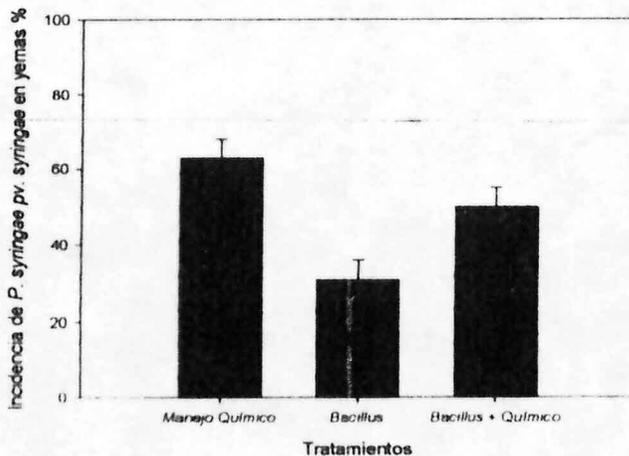


Grafico 8 Incidencia de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, en yemas de cerezo, tratadas con *Bacillus*.



#### 4.4.3 Evaluación capacidad biocontroladora de una mezcla de *Bacillus* spp., para el control de cancro bacteriano en tomate.

Los resultados del ensayo indican que el mejor tratamiento en cuanto incidencia fue el manejo curativo, junto con el Químico más *Bacillus* y el preventivo, sin diferencias significativas entre ellos y con estadísticamente distintos al manejo químico y al control sin aplicaciones. (Grafico 9). En cuanto al número de frutos por planta, solo el control curativo tuvo diferencias significativas con el testigo (Grafico 10), en cuanto a peso de frutos y Kg. de frutos por planta, solo los tratamientos curativo y preventivo mostraron un efecto superior al control Gráficos 11 y 12. El mejor efecto del control curativo sobre el preventivo, se explicaría por el mayor numero de aplicaciones en el manejo curativo (3 contra 1) y además por la actividad de competencia que presenta *Bacillus*, lo que en base a los ensayos *in vitro* de competencia, indicaría que *Bacillus* se ve estimulado por la presencia del patógeno, a desarrollarse mas rápido y abundantemente. El manejo preventivo pese a que presento una incidencia mayor a la del curativo, estas no fueron estadísticamente distintas. En cuanto a rendimiento no existieron diferencias entre una sola aplicación preventiva y 3 curativas, lo que comparado a los manejos químicos, nos muestra que *Bacillus* presenta un control altamente eficiente sobre cancro bacteriano, en ausencia de aplicaciones de compuesto s cúpricos y antibióticos, los que limitarían su accionar.

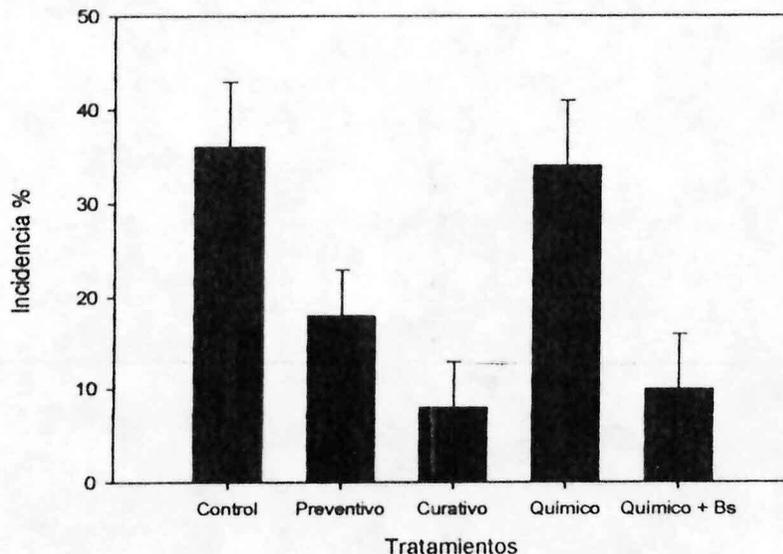


Grafico 9 Incidencia de Cancro bacteriano en tomate, tratadas con *Bacillus*.

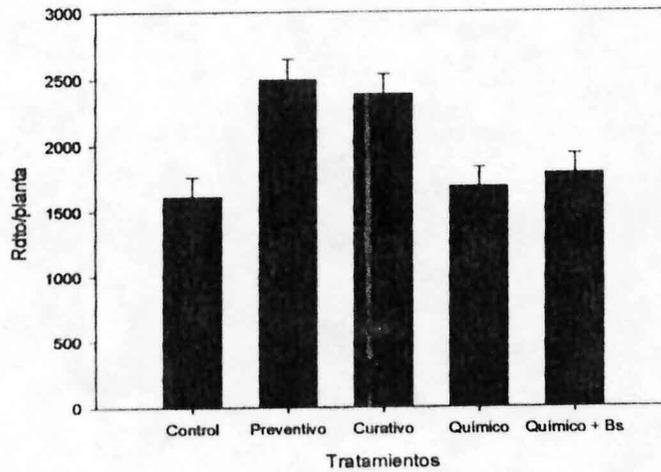


Grafico 10 Frutos por plantas, inoculadas con Cancro bacteriano en tomate y tratadas con *Bacillus*.

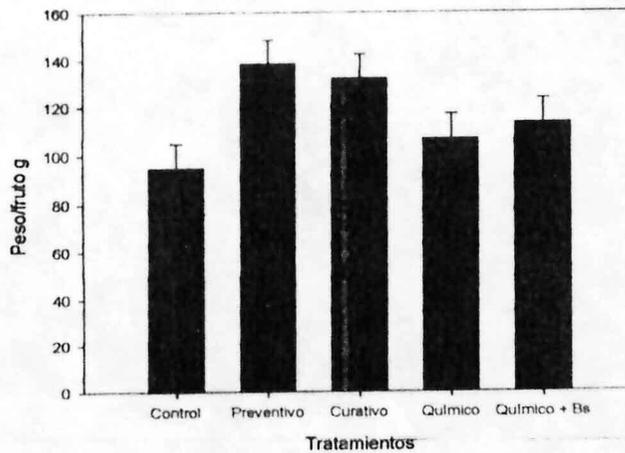


Grafico 11 Peso/Fruto por plantas, inoculadas con Cancro bacteriano en tomate y tratadas con *Bacillus*.

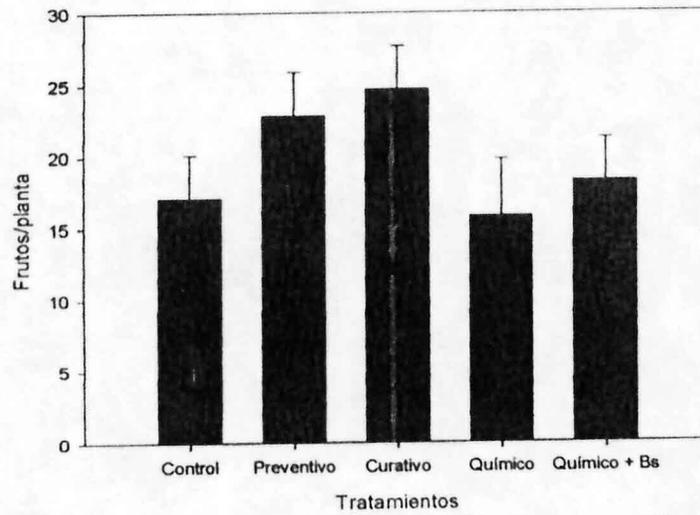


Grafico 12 Kg. de Frutos por plantas, inoculadas con Cancro bacteriano en tomate y tratadas con *Bacillus*.



## 6.5 Etapa V: Desarrollo sistema de producción y transferencia

### 6.5.1. Evaluación de sustratos:

Como se ve en el cuadro 17, ninguno de los medios modificados fue capaz de superar estadísticamente, el rendimiento de del caldo nutritivos, pero a que algunos lograron buenos niveles de producción como los medios 7 al 10, por otra parte estos medios, fueron capaces de mantener un buen nivel de actividad, a concentraciones iguales. Por lo que la decisión de elección de medios de cultivo, 7,8, 9 y 10 estaría dada por el tiempo de cultivo, que se logra cuando sobre el 80% de las células han formado endospora y el costo.

En el cuadro 18 se ven los días de cultivo a 80% de esporulación, donde el medio GYS, es el que logra el menor tiempo, con solo 5 días en promedio, a diferencia de los otros medios, donde solo algunas cepas lograban la esporulación en ese tiempo.

Cuadro 17. Población y actividad inhibitoria de cepas de *Bacillus* spp. Producidos en distintos medios de cultivo.

Medio de cultivo	Composición	Población (bact/ml)	Actividad inhibitoria (cm.)
1	Agua	$2,5 \times 10^3$ d	0,3 bc
2	Agua + azúcar	$1,2 \times 10^5$ c	1,6 bc
3	Jugo de tomate	$5 \times 10^4$ cd	2,4bc
4	Jugo de pera	$0,2 \times 10^2$ de	0 c
5	Leche	$3,5 \times 10^8$ b	0,8 bc
6	Caldo nutritivo	$9,5 \times 10^8$ ab	3,5 a
7	Caldo nutritivo + 0,3 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	$4,1 \cdot 10^9$ a	3,2 a
8	10 g/l peptona; 5 g/l Extracto de levadura; 10 g/l NaCl (PMB)	$2,6 \cdot 10^9$ a	3,2 a
9	Leche peptonizada	$2,1 \cdot 10^{10}$ a	3,6 a
10	GYS	$9 \cdot 10^9$ a	3,5 a
11	M3	$5,6 \cdot 10^6$ b	2,6 b
12	M4	$2,6 \cdot 10^7$ b	2,8 b
	Significancia	*	**

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )



Cuadro 18. Días de cultivo a 80% de esporulación, de 4 cepas *Bacillus* spp y una cepas de *Brevibacillus brevis*. Cultivado en 4 medios distintos.

Cepa /Medio	PMB	GYS	CN	M4
Maguellines 2	8	4	12 a	24
Maguellines	8	5	5 b	10
Antumavida	8	4	10 a	18
Vilcun	5	4	10 a	24
Mallerauco	8	4	12 a	18
Significancia	ns	ns	*	Ns

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )



### 6.5.3 Evaluación de metodologías de estimulación de esporulación de la bacteria y secado de ésta.

En los siguientes ensayos se entrega el promedio de las 5 cepas, dado que no se encontraron diferencias significativas entre ellas.

De la primera parte del ensayo, se obtuvo la mayor población de esporas viables al diluir a la mitad el medio de cultivo (Cuadro 19), sin embargo, el mayor porcentaje de esporas se logró con una temperatura de 80° C. Al evaluar la población final de esporas, podemos observar que la dilución, es el método que genera la mayor cantidad de esporas viables.

Cuadro 19 Porcentaje de esporas y numero de esporas viables, después de 3 tratamientos para inducir esporulación, en una cepa de *Bacillus* spp

Tratamientos	Esporulación (%)	Esporas viables /ml antes de secado
Cultivo 7 días	72,5 c	2.53 x 10 <sup>9</sup> b
Dilución	85,8 b	1.91 x 10 <sup>10</sup> a
80° C	92,2 a	3.46x 10 <sup>8</sup> c

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

La interacción de los dos factores, esporulación y secado, no fue significativa, indicando que solo el factor esporulación fue significativo para el tratamiento de dilución, lográndose los mayores niveles de población. En cuanto a forma de secado, pese a que no fue significativo, se observa una fuerte tendencia donde el secado a 45° C combinado con dilución, arrojaría la mayor población de la cepa, pese a lo cual es bastante bajo en comparación a la cantidad de UFC iniciales. Por lo tanto, es necesario seguir evaluando procesos de secado.

Cuadro 20 Porcentaje de supervivencia y UFC/gr. de *Bacillus* spp., bajo distintos sistemas de estimulación de esporulación y secado.

Método esporulación	Método secado	Supervivencia (%)	U.F.C./g
cultivo 7 días	aire	0.06	5.2 x 10 <sup>5</sup>
cultivo 7 días	Estufa 45°	0.03	2.3 x 10 <sup>5</sup>
cultivo 7 días	H 50°	0.04	3.0 x 10 <sup>5</sup>
Dilución	aire	0.01	8.9 x 10 <sup>5</sup>
Dilución	Estufa 45°	0.82	5.2 x 10 <sup>6</sup>
Dilución	H 50°	0.01	4.5 x 10 <sup>5</sup>
80° C	aire	0.34	3.9 x 10 <sup>5</sup>
80° C	Estufa 45°	0.06	7.2 x 10 <sup>4</sup>
80° C	H 50°	0.06	7.0 x 10 <sup>4</sup>

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )



### 6.5.5 Determinación de Temperatura óptima de cultivo

En el cuadro 21 se puede apreciar que la mejor temperatura con el medio CN se encuentra entre 25 y 30 °C, lo que concuerda con los resultados obtenidos con el medio GYS (cuadro 22).

Cuadro 21. Días de inoculación a esporulación, en cada una de las distintas cepas a distinta Temperatura en medio Caldo Nutriente.

Cepa/ T°	20	25	30	45	50
Maguellines 2	15	8	10	12	15
Maguellines	15	12	10	12	15
Antumavida	15	6	8	15	15
Vilcun	15	12	10	12	15
Mallerauco	15	12	10	15	15

Cuadro 22. Días de inoculación a esporulación, en cada una de las distintas cepas a distinta Temperatura en medio GYS (Glucose Yeast Salt)

Cepa / T°	20	25	30	45	50
Maguellines 2	12	6	4	12	12
Maguellines	12	5	5	12	12
Antumavida	12	5	4	12	12
Vilcun	12	5	4	12	12
Mallerauco	12	5	4	15	12

Como se aprecia en los cuadros 23 y 24 la temperatura a la que mejor crecen las cepas es cercana a los 30° C, para ambos medios, notándose un mejor crecimiento en el medio GYS.

Cuadro 23. UFC/ml, en cada una de las distintas cepas a distintas T° en medio GYS.

T°/Cepa	Maguellines 2	Maguellines	Antumavida	Vilcun	Mallerauco
20	6.35*10 <sup>6</sup> b	1.89*10 <sup>7</sup> a	2.06*10 <sup>7</sup> b	2.56*10 <sup>7</sup> b	8.65*10 <sup>6</sup> bc
25	8.00*10 <sup>6</sup> b	2.39*10 <sup>7</sup> a	2.38*10 <sup>7</sup> b	3.08*10 <sup>7</sup> b	1.52*10 <sup>7</sup> b
30	4.04*10 <sup>8</sup> a	4.10*10 <sup>7</sup> a	6.70*10 <sup>8</sup> a	1.37*10 <sup>8</sup> a	8.00*10 <sup>7</sup> a
45	3.05*10 <sup>6</sup> b	2.61*10 <sup>5</sup> b	1.87*10 <sup>6</sup> c	9.00*10 <sup>5</sup> c	2.15*10 <sup>5</sup> c
50	1.05*10 <sup>6</sup> b	1.85*10 <sup>5</sup> b	9.65*10 <sup>5</sup> c	6.35*10 <sup>5</sup> c	1.84*10 <sup>5</sup> c

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )



Cuadro 24. UFC/ml, en cada una de las distintas cepas a distintas T° en medio Caldo Nutriente

T°/Cepa	Maguellines 2	Maguellines	Antumavida	Vilcun	Mallerauco
20	3.85*10 <sup>7</sup> b	5.35*10 <sup>6</sup> b	7.63*10 <sup>6</sup> b	4.89*10 <sup>6</sup> b	2.35*10 <sup>7</sup> ab
25	4.23*10 <sup>7</sup> b	5.50*10 <sup>6</sup> b	8.00*10 <sup>6</sup> b	5.50*10 <sup>6</sup> b	2.76*10 <sup>7</sup> b
30	9.70*10 <sup>7</sup> a	6.70*10 <sup>7</sup> a	1.90*10 <sup>7</sup> a	1.02*10 <sup>8</sup> a	1.81*10 <sup>7</sup> a
45	2.85*10 <sup>5</sup> c	4.86*10 <sup>5</sup> b	1.45*10 <sup>5</sup> c	9.13*10 <sup>5</sup> b	1.83*10 <sup>5</sup> c
50	2.05*10 <sup>5</sup> c	2.64*10 <sup>5</sup> b	1.07*10 <sup>5</sup> c	9.03*10 <sup>5</sup> b	1.15*10 <sup>5</sup> c

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

### 6.5.6 Determinación de pH inicial óptimo de cultivo

Como se observa en los cuadros 25 y 26 la esporulación se obtiene más rápidamente con pH cercanos al neutro (pH 7.0)

Cuadro 25. Días de inoculación a esporulación, en cada una de las distintas cepas a distintos pH en medio Caldo Nutriente.

Cepa/ pH	6.0	6.5	7.5	8.0
Maguellines 2	15	8	10	12
Maguellines	15	10	10	12
Antumavida	15	6	8	15
Vilcun	15	12	10	12
Mallerauco	15	12	10	15

Cuadro 26. Días de inoculación a esporulación, en cada una de las distintas cepas a distintos pH en medio GYS (Glucose Yeast Salt)

Cepa / pH	6.0	6.5	7.5	8.0
Maguellines 2	12	6	5	12
Maguellines	12	5	5	12
Antumavida	12	5	5	12
Vilcun	12	5	5	12
Mallerauco	12	5	5	15

Como se aprecia en los cuadros 27 y 28 el pH al que mejor crecen las cepas es cercano pH Neutro entre 6.5 y 7.5 observándose mejores resultados en pH 7.5 en ambos medios.

Cuadro 27. UFC/ml, en cada una de las distintas cepas a distintos pH en medio GYS .

pH/ Cepa	Maguellines 2	Maguellines	Antumavida	Vilcun	Mallerauco
6.0	6.85*10 <sup>6</sup> c	2.89*10 <sup>6</sup> b	2.23*10 <sup>6</sup> a	2.89*10 <sup>7</sup> b	8.66*10 <sup>6</sup> c
6.5	8.07*10 <sup>7</sup> b	3.39*10 <sup>7</sup> a	6.83*10 <sup>7</sup> b	3.08*10 <sup>7</sup> b	6.52*10 <sup>7</sup> b
7.5	4.26*10 <sup>8</sup> a	4.15*10 <sup>7</sup> a	6.70*10 <sup>8</sup> a	1.37*10 <sup>8</sup> a	8.00*10 <sup>7</sup> a
8.0	3.05*10 <sup>5</sup> c	3.61*10 <sup>5</sup> b	1.87*10 <sup>5</sup> c	9.01*10 <sup>5</sup> c	2.75*10 <sup>5</sup> c



Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

Cuadro 28. UFC/ml, en cada una de las distintas cepas a distintos pH en medio Caldo Nutriente

pH/ Cepa	Maguellines 2	Maguellines	Antumavida	Vilcun	Mallerauco
6.0	2.96*10 <sup>6</sup> c	4.64*10 <sup>6</sup> b	6.73*10 <sup>6</sup> b c	3.61*10 <sup>6</sup> b	1.86*10 <sup>6</sup> c
6.5	5.62*10 <sup>7</sup> b	5.50*10 <sup>6</sup> b	8.16*10 <sup>6</sup> b	5.30*10 <sup>6</sup> b	5.76*10 <sup>7</sup> b
7.5	9.86*10 <sup>7</sup> a	6.53*10 <sup>7</sup> a	2.93*10 <sup>7</sup> a	1.82*10 <sup>8</sup> a	7.68*10 <sup>7</sup> a
8.0	3.65*10 <sup>5</sup> c	4.94*10 <sup>5</sup> b	1.78*10 <sup>5</sup> c	7.95*10 <sup>5</sup> b	1.65*10 <sup>5</sup> c

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

### 6.5.7 Evaluación de sustratos inertes y forma de secado para almacenaje y formulación

El método de secado por capas, se mostró notoriamente superior, a los dos métodos alternativos, logrando niveles de eficiencia del 95%, en la mayoría de las cepas y sin afectar la eficacia de las cepas al momento de controlar los patógenos., esto independientemente de la cepa evaluada (Cuadro 23), esto por un periodo de 12 meses.

Cuadro 23 Porcentaje de supervivencia y actividad de *Bacillus* spp., bajo distintos sistemas de secado después de 12 meses de almacenaje.

Cepa	Secado	% UFC/gr.	% Actividad
	Cámara	14.0% a	65.9% b
Mallerauco	Horno	8.0% a	49.0% a
	Horno en capas	95.0% b	98.0% c
	Cámara	11.0% a	76.6% a
Vilcun	Horno	9.0% a	54.3% a
	Horno en capas	96.0% b	100.0% b
	Cámara	14.3% a	60.2% b
Antumavida	Horno	9.7% a	49.0% a
	Horno en capas	95.0% b	98.0% c
	Cámara	12.3% a	42.0% a
Maguellines	Horno	10.3% a	60.2% b
	Horno en capas	94.0% b	97.0% c
	Cámara	8.3% a	42.0% b
Maguellines 2	Horno	8.3% a	61.1% b
	Horno en capas	92.0% b	97.0% a



Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ ).

En cuanto a los acarreadores, la zeolita, se mostró como la mejor alternativa, no tanto por la capacidad de preservar las esporas de *Bacillus*, donde no hubo diferencia significativa con los otros acarreadores, sino por la capacidad de aumentar la capacidad controladora de los *Bacillus* (Cuadro 24)

Cuadro 24 Porcentaje de supervivencia y actividad de *Bacillus* spp., usando 3 sustratos inertes.

Cepa	Acarreador	% UFC/gr.	% Actividad
	Talco	85.2% ab	35.7% c
Mallerauco	Zeolita	95.4% a	102.0% a
	Sílice	81.2% b	42.0% bc
	Talco	79.2% a	82.1% bc
Vilcun	Zeolita	96.2% a	106.5% a
	Sílice	79.4% a	64.2% c
	Talco	89.2% a	86.2% b
Antumavida	Zeolita	88.6% ab	105.2% a
	Sílice	73.4% b	54.2% c
	Talco	88.4% ab	61.1% b
Maguellines	Zeolita	97.2% a	112.2% a
	Sílice	84.2% b	65.4% b
	Talco	74.5% b	54.5% b
Maguellines 2	Zeolita	80.2% a	101.2% a
	Sílice	65.1% b	36.5% bc

Letras distintas en una columna indican diferencias significativas entre las medias, según test HSD ( $P < 0,05$ )

#### 6.5.8 Transferencia Sistema de Producción.

La transferencia del sistema de producción, se ha realizado en varias etapas, siendo la primera la firma de un convenio entre la Universidad de Talca y Bio Insumos Nativa Ltda. por medio del cual, se establecen las condiciones para que la empresa pueda producir y comercializar las cepas de *Bacillus* y además recibir la tecnología de producción, además de establecer los mecanismos de control de calidad tanto del producto como de las recomendaciones de uso.

En una segunda fase, se entregaron copias de las cepas a Bio Insumos Nativa Ltda. de manera de duplicar el material almacenado y entrenar al personal de la empresa en la reproducción de las cepas y en su identificación.

En una tercera etapa, se han instalado producciones a escala de laboratorio en la empresa, utilizando las metodologías desarrolladas por el proyecto, tanto para la producción, formulación y evaluación de poblaciones y actividad de las cepas.



Así en estos momentos la empresa esta integrando los parámetros de producción óptimos, mencionados anteriormente, para aplicarlo a una escala industrial, a través del uso de un biodigestor de 100 litros, el que esta siendo acondicionado para su producción.

Dado que los volúmenes de producción son bajo, mientras el biodigestor no este en plena producción, lo que se ha producido de *Bacillus*, se esta utilizando para realizar demostraciones con agricultores claves, en los rubros de carozos y tomates.

Por su parte la empresa en 2004, se adjudico un proyecto FONTEC, para la industrialización de este bio controlador, dentro de dicho proyecto, se continuaran los ensayos del *Bacillus*, para evaluar su efectividad en otros cultivos como cala, brasicas, avellano, nogal y arandanos.

Además la empresa ha iniciado los procesos de inscripción de marca y la recopilación de antecedentes para la obtención del registro SAG.



## 7 Fichas Técnicas y Análisis Económico:

- Fichas técnicas y de costos del o los cultivos, rubros, especies animales o tecnologías que se desarrolló en el proyecto (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).

Se desarrollo la siguiente ficha técnica para uso de *Bacillus*:

Cuadro 25. Recomendaciones de uso de *Bacillus* spp. para el control de enfermedades bacterianas en cultivos agrícolas.

CULTIVO	PATOGENOS	DOSIS	ÉPOCAS DE APLICACIÓN
Carozos	Cáncer bacterial ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> )	300 g/100 l	Aplicación con 5, 25, 50 75 y 100% de caída de hojas.  En caso de heladas invernales que cause heridas.  Aplicar en brotación y plena flor.
Tomate	Cancer bacterial ( <i>Clavibacter michiganensis</i> Subsp. <i>Michiganenesis</i> )  Peca bacteriana ( <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> )  Mancha bacteriana ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> )	300 g/100 l	En almacigo, transplante y posterior a cualquier labor que genere heridas.  En almacigo, transplante dos días antes e inmediatamente después de cualquier labor que genere heridas. Curativo, aplicaciones cada 3 Días, hasta que lesiones se presenten secas y sin avance
Papa	Pudrición acuosa ( <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> )	100 g/100 Kg. de papas	Aplicación inmediatamente después de cosecha.

### Compatibilidad con agroquímicos

*Bacillus* debe ser aplicado en forma separada de otros productos agroquímicos, a menos que se realice una prueba de compatibilidad. En el caso de aplicaciones con compuestos cúpricos y antibióticos, estos deben aplicarse antes del biocontrolado y espaciados a lo menos 5 días.



#### Almacenaje

La formulación de *Bacillus*, es un polvo mojable, el que mantenido en un ambiente seco y fresco es capaz de mantener su población y actividad por 12 meses. Una vez abierto el envase de *Bacillus*, debe evitarse su contacto con la humedad, en caso contrario debe utilizar inmediatamente.

#### Toxicidad

Las especies de *Bacillus*, seleccionadas en el presente proyecto presentan baja toxicidad para mamíferos, pese a lo cual se deben tomar las medidas de seguridad, propias de toda aplicación fitosanitaria. Debe evitarse la ingestión y el contacto con mucosas y heridas en la piel, en caso de ocurrir realizar lavados con abundante agua y jabón y en caso de ingestión no inducir vomito. Este biocontrolador no posee carencias ni tolerancia y el periodo de reingreso es de 2 horas.

#### Forma de aplicación

El formulado en polvo desarrollado durante el proyecto, esta compuesto por esporas de la bacteria y los compuestos obtenidos durante la fermentación de esta, mas un acarreador en base a arcillas. Estas esporas son capaces de soportar temperaturas de 80° C y falta absoluta de humedad, pero la bacteria una vez germinada requiere de temperaturas de inferiores a 35° C y humedad para desarrollarse, por lo que las aplicaciones deben realizarse en las horas de menor temperatura durante el verano y las mas calidas durante el invierno en las horas de mayor temperatura. Debe realizarse un eficiente mojado del cultivo a tratar, dado que no se ha demostrado una actividad sistémica de *Bacillus*.

**Costos** El estudio de costos, se realizo en conjunto con Bio-Insumos Nativa Ltda. y se obtuvo un precio de equilibrio entre costos de producción, venta, administración, marketing y utilidades de \$30.000 el Kg. lo que lo hace competitivo con antibióticos de uso agrícola y lo mantiene a un precio menor que alternativas químicas como cobre penta hidratados.

- Análisis económico actualizado, comparando con los análisis de la propuesta de proyecto.

Al realizar el análisis económico, con los datos actuales, esperamos que la producción aumente en un 10%, dada la ineficiencia de los productos actualmente en uso, además existe una disminución del precio del *Bacillus* formulado de \$32.000 en la propuesta a los actuales \$30.000 y una reducción de un 50% en el uso del caldo bordeles. Lo que nos genera un aumento de rentabilidad del cultivo de tomate. (Cuadros 26 y 27)



Cuadro 26. Flujo de caja cultivo de tomate con uso de *Bacillus*, presentado en la propuesta.

1. ENTRADAS	año 1	año 2	año 3	año 4	año 5	año 6
Venta de tomates	2,600,000	2,600,000	2,600,000	2,600,000	2,600,000	2,600,000
		0	0	0	0	0
Subtotal Entradas	2,600,000	2,600,000	2,600,000	2,600,000	2,600,000	2,600,000
		0	0	0	0	0
2. SALIDAS						
2.1. Inversiones						
Invernadero	3,500,000					
2.2. Gastos de Operación						
Plástico	250,000	250,000	250,000	250,000	250,000	250,000
Preparación almácigos	147,300	147,300	147,300	147,300	147,300	147,300
Preparación suelo	44,800	44,800	44,800	44,800	44,800	44,800
Fertilización	218,855	218,855	218,855	218,855	218,855	218,855
Confección melgas y acequidura	19,750	19,750	19,750	19,750	19,750	19,750
Transplante	44,800	44,800	44,800	44,800	44,800	44,800
Control de malezas	1,400	1,401	1,402	1,403	1,404	1,405
Control de plagas						
<i>Bacillus thuringensis</i>	32,000	32,000	32,000	32,000	32,000	32,000
<i>Trichoderma</i>	32,000	32,000	32,000	32,000	32,000	32,000
<i>Bacillus subtilis nativo</i>	40,000	40,000	40,000	40,000	40,000	40,000
Caldo Bordeles	15,000	15,000	15,000	15,000	15,000	15,000
Riegos	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000
Cosecha	294,000	294,000	294,000	294,000	294,000	294,000
imprevistos	38,813	38,813	38,813	38,813	38,813	38,813
Subtotal Salidas	4,713,718	1,213,719	1,213,720	1,213,721	1,213,722	1,213,723
3. BENEFICIOS NETOS TOTALES (1-2)	-2,113,718	1,386,281	1,386,280	1,386,279	1,386,278	1,386,277
	\$					
VAN (12%)	2,574,561.04					
TIR	59%					



Cuadro 27. Flujo de caja cultivo de tomate con uso de *Bacillus*, actualizado.

1. ENTRADAS	año 1	año 2	año 3	año 4	año 5	año 6
Venta de tomates	2,860,000	2,860,000	2,860,000	2,860,000	2,860,000	2,860,000
<b>Subtotal Entradas</b>	<b>2,860,000</b>	<b>2,860,000</b>	<b>2,860,000</b>	<b>2,860,000</b>	<b>2,860,000</b>	<b>2,860,000</b>
<b>2. SALIDAS</b>						
<b>2.1. Inversiones</b>						
Invernadero	3,500,000					
<b>2.2. Gastos de Operación</b>						
Plástico	250,000	250,000	250,000	250,000	250,000	250,000
Preparación almácigos	147,300	147,300	147,300	147,300	147,300	147,300
Preparación suelo	44,800	44,800	44,800	44,800	44,800	44,800
Fertilización	218,855	218,855	218,855	218,855	218,855	218,855
Confección melgas y acequiadura	19,750	19,750	19,750	19,750	19,750	19,750
Transplante	44,800	44,800	44,800	44,800	44,800	44,800
Control de malezas	1,400	1,401	1,402	1,403	1,404	1,405
Control de plagas						
<i>Bacillus thuringensis</i>	32,000	32,000	32,000	32,000	32,000	32,000
<i>Trichoderma</i>	32,000	32,000	32,000	32,000	32,000	32,000
<i>Bacillus subtilis nativo</i>	30,000	30,000	30,000	30,000	30,000	30,000
Caldo Bordes	7,500	15,000	15,000	15,000	15,000	15,000
Riegos	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000
Cosecha	294,000	294,000	294,000	294,000	294,000	294,000
imprevistos	38,813	38,813	38,813	38,813	38,813	38,813
<b>Subtotal Salidas</b>	<b>4,696,218</b>	<b>1,203,719</b>	<b>1,203,720</b>	<b>1,203,721</b>	<b>1,203,722</b>	<b>1,203,723</b>
<b>3. BENEFICIOS NETOS TOTALES (1-2)</b>	<b>-1,836,218</b>	<b>1,656,281</b>	<b>1,656,280</b>	<b>1,656,279</b>	<b>1,656,278</b>	<b>1,656,277</b>
\$						
VAN (12%)	3,691,337					
TIR	86%					

- Análisis de las perspectivas del rubro, actividad o unidad productiva desarrollada, después de finalizado el proyecto.



Las perspectivas de este bio controlador, están centradas en el control de enfermedades bacterianas en cultivos de carozo y tomates, pero se están realizando ensayos exploratorios, para su uso en arandano, calas, almendro, nogal y alcachofa, lo que podría aumentar notablemente la superficie de cultivos, susceptibles de su uso.

Dado que los compuestos químicos actualmente en uso son poco efectivos y además están siendo cuestionados por sus impactos ambientales y en salud humana, por lo que este bio controlador se estaría posesionando como la mejor alternativa, para el control de bacteria fitopatógenas, en cultivos de carozos y tomates, lo que suman 92.000 hectáreas en Chile, potenciales que podrían usar este bio controlador. .

La producción y formulado del producto se realizaría por Bio Insumos Nativa Ltda. quienes poseen una red de distribución entre las regiones I y X, por lo que se asegura una disponibilidad a lo largo del país. En cuanto a producción, la empresa estaría en condiciones de producir 20.000 Kg. del formulado anualmente.

- Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios

La estrategia de marketing en estos momentos esta centrada en, charlas de difusión con agricultores, reuniones con asesores de los cultivos y entrega de muestras del formulado, para la realización de pruebas de campo con agricultores.



## 8. Impactos y Logros del Proyecto:

- Descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.
- Indicadores de impactos y logros a detallar dependiendo de los objetivos y naturaleza del proyecto:

### *Impactos Productivos, Económicos y Comerciales*

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio	Convenio con empresa para producción y comercialización.	Convenio con empresa para producción y comercialización. Adjudicación por parte de la empresa de un proyecto FONTEC	Adjudicación por parte de la empresa de un proyecto FONTEC
Producción (por producto)	1 cepa seleccionada para producción para 400 ha	5 cepas seleccionadas para producción con empresa actual para 6000 ha.	Se lograron aislar y seleccionar 4 cepas mas de las presupuestadas, esto dado por el efecto sinérgico entre ellas. Las cepas son menos exigentes en sus necesidades de producción que lo previsto.
Costos de producción	Precio de venta de \$20.000	Precio de venta de \$30.000	Aumento de precio de productos competidores.
Ventas y/o Ingresos	No aplica	No se han realizado ventas	
<i>Nacional</i>	No aplica		
<i>Internacional</i>	No aplica		
Convenios comerciales	Convenio con empresa	Convenio con Bio Insumos Nativa Ltda.	



### Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual	1 técnico	1 agrónomo 2 técnicos 1 producto manager	Los equipos de producción requieren mayor preparación técnica y el sistema de secado requiere más mano de obra. La venta del producto requiere de alguien especializado para su comercialización.
Nuevos empleos generados			
Productores o unidades de negocio replicadas			

### Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	1	1		Formulado de <i>Bacillus</i> spp. cuyo nombre comercial será Nacillus.
Proceso	Fermentación Formulado	Fermentación formulado		
Servicio	No aplica	No aplica		

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes		
Solicitudes de patente		
Intención de patentar	1	Formulado de 4 cepas de <i>Bacillus</i> spp. Y una de <i>Brevibacillus brevis</i> , para el control de bacterias Fitopatógenas.
Secreto industrial	2	Sistema de producción y secado del formulado anterior



Resultado no patentable	5	4 cepas de <i>Bacillus</i> spp y una de <i>Brevibacillus brevis</i> , para el control de bacterias Fitopatógenas.
Resultado interés público		

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica	1	Convenio con Bio-Insumos Nativa Ltda. Para la producción y comercialización del formulado de <i>Bacillus</i> spp.
Generación nuevos proyectos	1	Proyecto Fontec, adjudicado a Bio Insumos Nativa, para el desarrollo industrial del formulado de <i>Bacillus</i> spp.

### Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (Citas, título, descripción)
Publicaciones	3	En preparación
(Por Ranking)		
Eventos de divulgación científica	4	XIV congreso Sochifit Talca 2004 Seminario Internacional de Alternativas Racionales para el manejo de Plagas Chillan 2003 I Simposio de Control Biológico. Chillan 2005 XV Congreso Sochifit. Arica 2005
Integración a redes de investigación		

### Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (Título, grado, lugar, institución)
Tesis pregrado	1	Determinación de curvas de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> . Memoria de título, Universidad de Talca
Tesis postgrado	1	Efecto de cepas nativas de <i>Bacillus</i> spp. en el control de cancro bacteriano en tomate. Tesis para el grado de Magíster. Universidad de Talca.
Pasantías		
Cursos de capacitación		



## 8 Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

- Legales: No se presentaron problema de índole legal.
- Técnicos: Los principales problemas técnicos correspondieron a la identificación de las cepas, la que aun utilizando morfología, test bioquímicas y PCR, logro solo una identificación parcial de 3 de las 5 cepas de *Bacillus*.  
En cuanto a ensayos de campo, se produjeron problemas por la ausencia de enfermedades bacteriana en tomate, en la zona de Colin.
- Administrativos: No se presentaron problemas administrativos
- Gestión: En los inicios del proyecto existieron retrasos, ocasionados por el atraso en la llegada de equipos claves y por la alta diversidad y abundancia de cepas aisladas.
- Medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

En el caso de la identificación de cepas, se opto por enviar las cepas a identificar al laboratorio de ecología microbiana de la Universidad de Chile.

En cuanto a los ensayos de campo, se amplio la zona de ensayos a la ciudad de Quillota.

En cuanto a los problemas por atraso en la llegada de los equipos y abundancia de cepas, se realizaron modificaciones en la metodología, para compensar esos atrasos.

## 9 Otros Aspectos de Interés

Los resultados de estos proyectos, poseen tres aspectos que suscitan el interés por sus implicancias en productivas como científicas. Así tenemos como primer hecho a destacar, que dos de las 5 cepas seleccionadas, provengan del sector Vega de los Trailles, en la reserva Altos de Lircay, mismo lugar de origen de la cepa Trailles de *Trichoderma parceanamosum*, que actualmente se comercializa, a su vez las 3 cepas restantes también provienen de zonas de vida silvestre, lo que refuerza la idea del alto potencial que representa la bio diversidad nativa, para la solución de problemas productivos.

E segundo punto de interés es la capacidad descrita de competencia de los *Bacillus*, sobre las bacterias fitopatógenas, lo que no ha sido reportado anteriormente y que representa una nueva visión, de la forma de acción y utilización de estos bio controladores.

Y por ultimo la excelente recepción que han tenido los agricultores, especialmente de tomates, para el uso de estos organismos, lo que se explica en parte por la eficacia de bio controlador de *Bacillus*, pero también por el pobre resultado que presentan los compuestos bactericidas actualmente en uso, que son claramente insuficientes para solucionar problemas fitosanitarios, generados por bacterias.



## 10 Conclusiones y Recomendaciones:

Las aislaciones realizadas fueron altamente efectivas, en la obtención de cepas de *Bacillus* con actividad bio controladora, sobre fitopatógenos bacterianos, lográndose un alto porcentaje de cepas con esta actividad, primando en eficacia las obtenidas desde zonas de vida silvestre.

Las cepas aisladas, presentan comportamientos no esperados en la forma de bio control, como son el sinergismo entre bacterias y la capacidad de control a través de competencia, lo que podría explicar la alta eficacia de control, obtenida tanto *in vitro* como en campo.

La utilización de *Bacillus*, requiere una restricción en el uso de agentes bactericidas basados en cobre y antibióticos, para lograr un resultado óptimo, lo que es factible, dado que las aplicaciones de *Bacillus*, sin la combinación de bactericidas químicos, presento en todos los casos, lo mejores resultados de control,

El uso de *Bacillus* en el control de enfermedades bacterianas en tomate y carozos, es un ejemplo, que el control biológico es capaz de superar a las medidas de control convencionales.

Es necesario desarrollar investigación, dirigida a determinar las formas específicas de acción de *Bacillus*, sobre los fitopatógenos, ya que este conocimiento, podría abrir vías para el desarrollo de compuestos bactericidas para uso en alimentación y salud humana y animal.

En el aspecto económico, la utilización de *Bacillus* en el control de enfermedades bacterianas, en tomate y carozos es una excelente alternativa a los compuestos actualmente en uso, dado el incremento de rendimiento y en que no genera dificultades para la obtención de certificaciones de BPA u Orgánica, por el uso de cobre y antibióticos.

Un costos de \$30.000 a \$35.000/ ha de aplicación en cerezo, es competitivo con las aplicaciones de cobre y antibióticos y con un mejor resultado, por lo que se presenta como un atractivo negocio.

La integración de Bio Insumos Nativa Ltda., al desarrollo de este biocontrolador ha generado la continuidad necesaria de desarrollo, para que a mediados del año 2006, se inicie la comercialización de este bio controlador.



## INFORME DE DIFUSIÓN

- Difusión de los resultados obtenidos **adjuntando** las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión **preparado y/o distribuido**, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.
  - Listado (número y detalle) de actividades por instrumento de difusión, como por ejemplo:

Tipo evento	Numero	detalle
Presentación en congresos y seminarios	7	<ul style="list-style-type: none"><li>- Seminario Internacional de Alternativas Biorracionales al Uso de Pesticidas (Universidad de Concepción, Chillan, Octubre 2004)</li><li>- XIV Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología (Talca, 2005)</li><li>- I Simposio de Control Biológico INIA Quilamapu (Chillan Agosto 2005)</li><li>- II Seminario "Insumos para la Agricultura Orgánica" (Santiago, agosto 2005)</li><li>- III Seminario "Insumos para la Agricultura Orgánica" (Santiago, Diciembre 2005)</li><li>- XV Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología (Arica, 2006)</li><li>- lanzamiento del "Catalogo de Insumos para el Control de Plagas y Enfermedades en la Agricultura Orgánica, en Chile" ejecutado por CCO (Abril 2006)</li></ul>
Organización de seminarios	1	Seminario de Finalización del Proyecto FIA-UTALCA "Evaluación de cepas nativas de <i>Bacillus subtilis</i> para el control de bacterias fitopatógenas" (Abril 2006)
Día de campos o reuniones técnicas	4	<ul style="list-style-type: none"><li>- Reunión con asesores de tomate en Quillota (Junio 2005)</li><li>- Reunión asesores tomate en Colin y Maule (Octubre 2005)</li><li>- Día de campo, en Colin, con exposición de resultados de ensayos de campo (Noviembre 2005)</li><li>- Charla de divulgación, realizada en Chillan, en conjunto con Bio Insumos Nativa Ltda. (Chillan, Diciembre 2005)</li></ul>
Boletín de difusión	1 con 500 copias	Boletín de difusión, con resumen de resultados del proyecto e información, sobre biología de enfermedades en estudio.