



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

MODULO I	IDENTIFICACIÓN	
País	República de Colombia	
Ciudad	Bogotá	
Entidad	Universidad Santo Tomás Vicerrectoría Universidad Abierta y a Distancia	
Entidad Externa	Investigador invitado Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)	
Facultad	Facultad de Educación	
	Facultad de Ciencias y Tecnologías	X
Unidad Académica	Centro de Investigación de la Vicerrectoría Universidad Abierta y a Distancia	
Programa Académico	Administración Ambiental y de los Recursos Naturales	
Autores		Rol
Paulo Germán García Murillo		Investigador Principal
Carlos Andrés Fajardo Gómez (UNAD)		Coinvestigador
María Paula Serrano Barrera		Auxiliar
		Asistente
Título del Proyecto	Búsqueda de microorganismos con alto potencial antagonista de <i>Botrytis cinerea</i> , procedentes de manantiales termales y salinos colombianos	
Tipo de Investigación	Cofinanciación.	
Línea Medular de Investigación	Alberto Magno: Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.	
Línea Activa de Investigación	Gestión Ambiental y de los Recursos Naturales.	
Grupo de Investigación	Gestión Ambiental y de los Recursos Naturales.	
Semillero de Investigación		

RELACIÓN PROYECTO – CONVOCATORIA.				
Convocatoria Número	12		Fecha de Inicio	1 de marzo
Modalidad Convocatoria	OPS		Fecha de presentación del informe	17 de agosto
	Nómina	X		
Proyecto Especial				
Otro (especifique)				

Síntesis de Ejecución presupuestal. Establezca los rubros según el presupuesto aprobado y establezca una comparación con lo ejecutado.

Rubros Financiados	Valor Aprobado	Valor Ejecutado	Valor Pendiente
Personal	-	-	-
Auxiliar de Investigación	-	-	-
Asistente de Investigación	\$6.400.00.00	-	\$6.400.000.00



Equipos	-	-	-
Software	-	-	-
Movilidad Académica - Viajes	\$3.130.000.00	-	\$3.130.000.00
Organización de eventos	-	-	-
Publicaciones y Patentes	\$1.500.000.00	-	-
Salidas de campo	\$7.900.000.00	\$9000.000.00	\$7.000.000.00
Materiales	\$7.658.230.00	\$7.248.204.00	\$410.026.00
Material bibliográfico	-	-	-
Servicios técnicos	\$2.144.000.00	-	-
Libro resultado de investigación	-	-	-
Imprevistos	\$2.913.223.00	-	-
Pares Académicos	\$400.000.00	-	-
Total	\$32.045.453.00	\$8.148.204.00	\$23.897.249.00
Observaciones:			
El porcentaje de ejecución del proyecto hasta el 18 de agosto de 2017 es del 25.4%			
Equipos Adquiridos: No se contemplan equipos, ya que la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), como parte de la contrapartida los sede en préstamo para desarrollo del proyecto.			

El día 14 de septiembre se solicitó al Centro de Investigación, cambio de rubro de los siguientes aspectos:

Título del Proyecto: Búsqueda de microorganismos con alto potencial antagonista de <i>Botrytis cinerea</i> , procedentes de manantiales termales y salinos colombianos.								
Investigador Principal: Paulo Germán García Muirillo.								
Centro de Costos: 640201-22.								
RUBROS FINANCIABLES	FUENTES					TOTAL	Ejecución	% de ejecución
	FODEIN Aprobado 2016	Incremento	Disminución	FODEIN con ajuste	Contrapartida			
PERSONAL				\$ -	\$ 40.861.250,0	\$ 40.861.250,0	\$ 40.861.250,0	100
AUXILIAR DE INVESTIGACIÓN				\$ -	\$ -	\$ -		0
EQUIPOS				\$ -	\$ 118.596.676,0	\$ 118.596.676,0	\$ 118.596.676,0	100
SOFTWARE				\$ -		\$ -		0
ORGANIZACIÓN DE EVENTOS				\$ -		\$ -		0
ASISTENTE DE INVESTIGACIÓN	\$ 6.400.000,0		\$ 6.400.000,0	\$ -		\$ -		0
MATERIALES E INSUMOS	\$ 7.658.230,0	\$ 8.400.000,0		\$ 16.058.230,0	\$ 6.332.100,0	\$ 22.390.330,0	\$ 20.239.748,6	90
MATERIAL BIBLIOGRÁFICO				\$ -		\$ -		0
SERVICIOS TÉCNICOS	\$ 2.144.000,0	\$ 1.130.000,0		\$ 3.274.000,0		\$ 3.274.000,0	\$ 2.173.357,2	66
SALIDAS DE CAMPO	\$ 7.900.000,0		\$ 1.000.000,0	\$ 6.900.000,0		\$ 6.900.000,0	\$ 1.800.000,0	26



MOVILIDAD ACADÉMICA (VIAJES)	\$ 3.130.000,0		\$ 2.130.000,0	\$ 1.000.000,0		\$ 1.000.000,0	\$ 1.000.000,0	100
LIBRO RESULTADO DE INVESTIGACIÓN				\$ -		\$ -		0
PUBLICACIONES Y PATENTES	\$ 1.500.000,0			\$ 1.500.000,0		\$ 1.500.000,0		0
IMPREVISTOS	\$ 2.913.223,0			\$ 2.913.223,0		\$ 2.913.223,0		0
PARES ACADÉMICOS	\$ 400.000,0			\$ 400.000,0		\$ 400.000,0	\$ 400.000,0	100
TOTAL	\$32.045.453,0	\$ 9.530.000,0	\$ 9.530.000,0	\$32.045.453,0	\$ 165.790.026,0	\$ 197.835.479,0	\$ 185.071.031,8	94

De otra parte solicito, el congelamiento de los recursos correspondientes a publicaciones y patentes (ver tabla), para su uso en el 2018. Agradezco de antemano su atención y colaboración, quedando al pendiente de lo solicitado.

MODULO II	ASPECTOS GENERALES SOBRE LA INNOVACIÓN Y EL DESARROLLO TECNOLÓGICO DESARROLLADOS ¹
-----------	---

Resumen en español del proyecto (Máximo 20 líneas):

Uno de los problemas más limitantes en la producción y poscosecha de frutas, hortalizas, ornamentales, entre otros, son los producidos por el moho gris causado por *B. cinerea*, el cual es un hongo fitopatógeno de amplia distribución geográfica. Para el control de este agente, se utiliza como primera línea los fungicidas, algunos de ellos causantes de fenómenos de resistencia en este fitopatógeno y generadores de riesgos para la salud humana y potencial riesgo de contaminación ambiental. Teniendo en cuenta esta problemática, se propone en este trabajo de investigación la búsqueda y evaluación de bacterias halófilas con actividad antagonista frente a *B. cinerea*. La metodología que se desarrollará en esta investigación consta de dos etapas: (i) selección de una concentración mínima para la manifestación de síntomas y signos del moho gris a 6°C y 20°C de frutos de fresa; (ii) aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos aislados a partir de manantiales salinos y termales colombianos, (iii) evaluación de potencial antagonista de la cepas halófilas aisladas en un modelo in planta en frutos de tomate, tanto a temperatura de 6 °C (comunes en condiciones de poscosecha) como a temperaturas de 20 °C, (iv) evaluación de la capacidad de resistencia de las bacterias seleccionadas a diferentes rangos en luz ultravioleta, y (v) evaluación en combinación con CaCl₂ para control de moho gris a temperatura de refrigeración (6 °C). Con este estudio se espera obtener una colección de microorganismos halófilos, caracterizados filogenética y fisiológicamente, que presenten una alta actividad antagonica para ser utilizadas como controladores biológicos de *B. cinerea*.

Abstract en inglés del proyecto (Máximo 20 líneas):

One of the most limiting problems in the production and postharvest of fruits, vegetables, ornamental, among others, are those produced by the gray mold caused by *B. cinerea*, which is a phytopathogenic fungus of wide geographic distribution. For the control of this agent, fungicides are used as the first line, some of them causing phenomena of resistance in this phytopathogen

¹ Tomado de NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE INFORMES RELACIONADOS CON PROYECTOS FINANCIADOS TOTAL O PARCIALMENTE POR COLCIENCIAS. Dirección de Desarrollo Tecnológico e Innovación. Bogotá D.C., febrero de 2010.



and generators of risks to human health and potential risk of environmental contamination. Taking into account this problem, the research and evaluation of halophilic bacteria with *B. cinerea* antagonistic activity is proposed in this research. The methodology to be developed in this research consists of two stages: (i) selection of a minimum concentration for the manifestation of symptoms and signs of gray mold at 6 ° C and 20 ° C and strawberry fruits; (ii) isolation and characterization of halophilic microorganisms isolated from saline and thermal springs in Colombia, (iii) evaluation of antagonistic potential of halophilic strains isolated in an in-plant model of tomato fruit, both at 6 ° C (in post-harvest conditions) and at temperatures of 20 ° C, (iv) evaluation of the resistance capacity of selected bacteria at different ranges in ultraviolet light, and (v) evaluation in combination with CaCl₂ for control of gray mold at temperature Cooling (6 ° C). This study aims to obtain a collection of halophilic microorganisms, characterized phylogenetically and physiologically, that present a high antagonistic activity to be used as biological controllers of *B. cinerea*.

Key Words: biologic control, gray mold, bioprospecting, halofite microorganisms.

Cumplimiento de los Objetivos.

Objetivo general: Identificar y evaluar microorganismos halófilos y halotolerantes con alto potencial antagonista de <i>B. cinerea</i> , procedentes de manantiales termales y salinos colombianos.	91.33	Fueron evaluados hasta el momento 20 aislamientos de bacterias de 30, procedentes de 3 municipios de Cundinamarca. Esta evaluación fue hecha <i>in planta</i> e <i>in vitro</i> ; encontrándose hasta el momento porcentajes de eficacia medios contra <i>B. cinerea</i> .
--	-------	--

Observaciones: Cada objetivo específico tiene un valor en porcentaje de 33.33% del total.

Objetivo específico: Aislar y caracterizar microorganismos halófilos a partir de manantiales salinos y termales en tres municipios del departamento de Cundinamarca.	33,3%	Se realizaron aislamientos, de aguas termales de Guasca, Choachi y Tenjo todos pertenecientes al departamento de Cundinamarca. De cada municipio se están identificados molecularmente 2 aislamientos a especie de cada uno de los municipios citados.
---	-------	--

Observaciones: Se tenían prevista salidas a los municipios de Huila y Boyacá, pero debido a las dificultades para solicitar los tramites en la sede central, se decidió hacer cambios de rubro a materiales.

Objetivo específico: Evaluar la capacidad antagónica de las cepas halófilas y halotolerantes aisladas de <i>B. cinerea</i> en un modelo in planta a 6 °C y 20 °C.	30.0%	Para la realización de este objetivo se aisló <i>Botrytis</i> de frutos de fresa. También se está determinando mediante técnicas moleculares su especie. Se realizó una prueba de patogenicidad a 6°C y a 20°C con este aislamiento, eligiéndose una concentración de fitopatógeno que manifiesta síntomas y signos a temperatura ambiente y refrigeración.
--	-------	---



		Se evaluaron 20 aislamientos de 30 bacterias procedentes de manantiales termales contra el moho gris, en un modelo "in planta". En los resultados preliminares se observó un porcentaje de protección medio.
Observaciones. Debe revisarse la prueba en frutos de fresa, ya que muestra demasiada susceptibilidad a <i>Botrytis</i> , se recomienda explorar el modelo <i>in planta</i> en tallos de rosa, que en ensayos anteriores han mostrado mayor consistencia en los resultados (anteriores proyectos).		
Objetivo específico: Evaluar el crecimiento de las cepas halófilas y halotolerantes aisladas, en presencia de tres rangos de intensidad de luz ultravioleta.	28.0%	Se realizó un ensayo "in vitro", con 20 aislamiento de bacterias procedentes de fuentes termales, de una parte se evaluó, posibles efectos de metabolitos intra y extracelulares de las bacterias aisladas contra <i>Botrytis</i> y de otra parte a tres dosis de luz UV. Preliminarmente no se observaron efectos de metabolitos extra o intracelulares sobre el fitopatógeno.
Observaciones.		

Productos		
Comprometidos	Nivel de Avance	Soporte
Relacione los productos comprometidos en el Proyecto	En una escala de 0-100 Establezca el nivel de avance del producto comprometido	Relacione el soporte del producto que será entregado al Centro de Investigación.
Generación de Nuevo Conocimiento	0	Ninguno (En espera de la totalidad de los resultados).
Apropiación social de conocimiento.	100	Certificados de los siguientes eventos: • Congreso Internacional de Criminología Verde (Anexo 2). • III Congreso Nacional Ciencias Ambientales (Anexo 1). • II Encuentro Internacional Virtual Académico de Ciencias Ambientales (Anexo 3). • Programa Radial: "Al Aire sin límites" (Anexo 4).
Formación de recursos humano	60	Trabajos de grado de los estudiantes: Jennifer Vannesa Almerares Aragón, Programa Administración Ambiental y



		de los Recursos Naturales, Facultad de Ciencias y Tecnologías, VUAD/USTA. Orlando Vásquez prieto, Programa Ing. Ambiental UNAD.
--	--	--

Desarrollo del enfoque metodológico.

En general de la metodología planteada, se ha cumplido hasta el momento en su gran mayoría, sin mayor modificación en lo planteado en el proyecto.

En una escala de 0-100 Establezca el porcentaje de cumplimiento del enfoque metodológico.	90%
---	------------

Observación (Si aplica): Las pruebas de patogenicidad y de antagonismos se están ajustando en frutos de fresa, ya que la manifestación de síntomas y signos producidos por *B. cinerea*, es más consistente, que en frutos de tomate cherry. De otra parte, en la Sabana de Bogotá, el moho gris es mucho más limitante en fresa que en tomate, lo que lo hace un mejor modelo de evaluación de biocontroladores para su posterior evaluación en campo (futuros proyectos).

Cumplimiento del Cronograma.

Primer objetivo:

Se aislaron 30 morfoespecies de bacterias de muestras de aguas termales de los municipios de Guasca, Choachí y Tenjo, a las cuales también se les hicieron análisis fisicoquímicos. Actualmente se está haciendo mediante técnicas moleculares, la determinación a especie de dos aislamientos de estos microorganismos de cada municipio. También se aisló un hongo causante de sistemas compatibles con el moho gris en frutos de fresa, al cual también se le está determinando su especie. Con este último fitopatógeno, se hizo una prueba de patogenicidad tanto a 6°C y 20°C, seleccionándose una concentración de 1×10^5 conidios/ml para ambas temperaturas, que se utilizaría en las pruebas de antagonismo "in planta".

Segundo objetivo:

Se evaluaron en un modelo "in planta" 12 aislamientos de bacterias procedentes de fuentes termales procedentes de Guasca, Choachí y Tenjo, contra el moho gris en frutos de fresa, encontrándose una eficacia media contra la enfermedad.

Tercer objetivo:

Se evaluó de una parte, los efectos de los metabolitos intra y extracelulares de 20 aislamientos de bacterias procedentes de fuentes termales, sin encontrarse un efecto de inhibición frente a *Botrytis* sp. Y de otras el efecto de la luz ultravioleta sobre la viabilidad de las cepas halófilas y halotolerantes aisladas; hasta el momento esta actividad no se encuentra retrasada ya que se programó para los meses del 12 al 14.

Observación (Si aplica):	
--------------------------	--



MODULO III

TEXTO O CUERPO DEL INFORME (Para todos los proyectos)

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Inicialmente el modelo de evaluación *in planta* se planteó en tomate, pero se cambió a fresa debido a que esta especie es muy susceptible al moho gris causada por *B. cinerea* en la Sabana de Bogotá y representa un buen modelo de evaluación de microorganismos biocontroladores en campo como en condiciones de poscosecha. Si bien en el primer semestre, se aisló el patógeno de frutos de fresa procedentes de varios establecimientos comercialización de frutas y hortalizas (plazas de mercado). De otra parte, por iniciativa de la investigadora Diana Carolina Rubiano Labrador de la Universidad Abierta y a Distancia (UNAD), fueron aisladas 2 bacterias de fuentes termales, procedentes del municipio de Tabio, Cundinamarca. Estos microorganismos están en proceso de purificación y conservación para su próxima evaluación de antagonismo frente a *B. cinerea*. Los demás muestreos no se han podido programar debidamente, ya que los desembolsos de los anticipos de salidas de campo no se están cumpliendo en los plazos (15 días), lo que genera inevitablemente retrasos en todos los objetivos, ya que de los muestreos depende el aislamiento de nuevos microorganismos para su evaluación.

2. AVANCES EN EL MARCO TEÓRICO

La utilización de microorganismos en el control biológico de enfermedades de las plantas constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos. Entre los microorganismos con un alto potencial biocontrolador se encuentran los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* (Whipps, 2001). Para el control de *B. cinerea* muchos hongos (*Trichoderma* sp., *Alternaria* sp.), bacterias (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.) y actinomicetes (*Streptomyces* sp., *Micromonospora* sp.) han sido utilizados (Elad *et al.*, 1994; Loqman *et al.*, 2009; Mónaco *et al.*, 2009).

A continuación, se presentan antecedentes del uso de microorganismos, para el control de *Botrytis* sp., en campo (a cielo abierto e invernadero), y poscosecha de frutas, hortalizas y ornamentales.

Control biológico del moho gris

Los primeros trabajos de selección de microorganismos antagonistas de *B. cinerea* se realizaron mediante la aplicación preventiva de aislamientos de especies del género *Trichoderma*, los cuales fueron capaces de controlar la infección causada por *B. cinerea* y otros fitopatógenos. Sin embargo, esta capacidad es limitada, una vez se establece infección con posterior invasión de los fitopatógenos de los tejidos del hospedero causando pudrición (Cheng & Yang, 2012).

Algunas especies de *Trichoderma* presentan alto antagonismo debido a los mecanismos de acción que posee este hongo biocontrolador frente a *B. cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, tales como: micoparasitismo, competencia por nutrientes y espacio e inducción respuestas de resistencia (Jaimes, Moreno y Cotes-Prado, 2009).

Otros microorganismos, también presentan altos niveles de control del moho gris, tal es el caso de la levadura *Pichia membranifaciens* en cultivos de vid; observándose en el citoplasma de las hifas del fitopatógeno, fenómenos de coagulación por interacción con la levadura antagonista (Masih, 2001).

En otros trabajos de investigación, se observan niveles del 83% y 62% de control de *B. cinerea* en plantas de tomate cultivadas bajo invernadero con *Candida guilliermondii* (cepa 101 y US 7) y con *Candida oleophila* (cepa I-182), respectivamente (Saligkarias, 2002). Resultados similares de control se reportan, tanto para *Penicillium expansum* y *B. cinerea* con la aplicación de la levadura *Candida sake*, en manzanas y peras respectivamente (Nunes, 2002).



En Colombia se han realizado diversos estudios en los cuales seleccionaron aislamientos nativos de bacterias y hongos (levaduras y filamentosos), con alta eficacia y actividad biocontroladora contra el moho gris en campo y postcosecha de tomate, cebolla de bulbo y mora de castilla (Zapata, 2004). Por otro lado, en cultivos de mora de castilla se ha registrado evaluaciones in planta de hongos levaduriformes (cepas Lv297 y Lv298) contra el moho gris; obteniéndose con estos microorganismos una reducción de la incidencia de la enfermedad entre el 67,4% y 78% respectivamente (Zapata, 2004).

A pesar de los resultados promisorios a nivel internacional y nacional del uso de microorganismos antagonistas de *B. cinerea* en poscosecha y campo, se requiere hacer estudios de formulación de los ingredientes activos (antagonistas) al igual que hace con las moléculas químicas; esto tendiente a proteger a los microorganismos biocontroladores, de factores y cambios en la humedad, temperaturas, incidencia del viento y en especial la radiación UV. De otra parte, la formulación también garantiza la estabilidad del ingrediente activo, para su óptima aplicación en campo o la poscosecha, y su adecuado almacenamiento (Cotes-Prado, 2004).

Microorganismos halófilos y halotolerantes como biocontroladores

Los halófilos y halotolerantes representan otro grupo de organismos productores de antibióticos y metabolitos antifúngicos, y en los últimos años se ha centrado la atención en estos microorganismos debido a su gran biodiversidad y variedad de estrategias de adaptación y producción de metabolitos para defensa frente a organismos competidores, lo que supone una fuente importante de nuevos compuestos químicos (Essghaier *et al.* 2009).

Estos organismos pueden ser clasificados con respecto a su concentración de NaCl óptima de crecimiento, y pueden ser halófilos extremos, capaces de crecer óptimamente en un medio con una concentración de NaCl entre 150 y 300 g.l⁻¹ (2.5–5.2 M), halófilos moderados, que crecen óptimamente en un medio con una concentración de NaCl entre 100 y 150 g.l⁻¹ (0.2–2.5 M), y halotolerantes, que crecen óptimamente en un medio con una concentración de NaCl menor a 100 g.l⁻¹ (0.2M) pero son capaces de tolerar altas concentraciones de sal (Kerkar 2004).

Dentro de los estudios donde se reporta la capacidad de microorganismos halófilos y halotolerantes se encuentran los realizados por Sadfi-Zouaoui *et al.* (2007, 2008) donde se mostró que bacterias halófilas moderadas (*Halomonas* spp, *Bacillus* spp., *Planococcus* spp., *Salinicoccus* spp., *Halobacillus* spp. y *Marinococcus* spp.), aisladas de lagos salados en Túnez, inhibían el crecimiento de *B. cinerea*, y podrían ser consideradas como candidatos potenciales para biocontrol.

Por otra parte, Essghaier *et al.* (2009) aislaron bacterias halófilas aisladas de ecosistemas hipersalinos y se evaluó la capacidad antifúngica, frente a *B. cinerea*, de sus enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios. Este estudio permitió el aislamiento de bacterias halófilas de las especies *Virgibacillus marismortui*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *Terribacillus halophilus*, *Halomonas elongata*, *Planococcus rifietoensis*, *Staphylococcus equorum* y *Staphylococcus* sp. Estas bacterias presentaron actividad antifúngica y redujeron el porcentaje (50% a 91.66%) de frutas infectadas después de 3 días de almacenamiento a 20 °C.

Berrada *et al.* (2012) aislaron bacterias halófilas de ambientes hipersalinos en Marruecos relacionadas con los géneros *Bacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Planococcus*, *Salinivibrio*, *Vibrio* y *Photobacterium*. En las evaluaciones in vitro 12 de las cepas aisladas secretan compuestos difusibles, enzimas hidrolíticas o compuestos volátiles. Las evaluaciones in vivo de las cepas *Bacillus safensis* CCMM B582 y *Bacillus oceanisediminis* CCMM B584 mostraron una actividad antagónica permanente en los frutos de tomate, con un 100% de inhibición de *B. cinerea* después de 7 días.

A continuación, se presentarán algunos aspectos de proceso del proceso de infección *Botrytis* sp. causante del moho gris, y aspectos relevantes del control microbiológico de esta enfermedad.

Moho gris causado por *Botrytis* sp.

Este hongo fitopatógeno tiene una distribución geográfica cosmopolita, el cual afecta un gran número de hospederos como frutas, hortalizas y plantas ornamentales. La enfermedad puede afectar las



plantas de cultivo a cielo abierto o en invernadero, así como los productos en la poscosecha a temperaturas de refrigeración o ambiente (Jarvis, 1980).

La entrada de los propágulos del hongo patógeno al hospedero, es facilitada de forma directa a través de las heridas, causadas por mala manipulación en el momento de la cosecha, empaques inadecuados, presencia de insectos entre otros. En condiciones de alta humedad y temperaturas cercanas a los 20 °C, puede penetrar directamente las estructuras de las plantas a través de la cutícula; esto mediado por la producción de enzimas, que degradan los componentes de ésta (Horst, 1999).

Otros órganos como bulbos, semillas y otros materiales de propagación también son susceptibles a la enfermedad. La infección puede ocurrir en condiciones de alta humedad, con o sin presencia de películas de agua; esta puede permanecer en reposo, agresivo, restringido o ampliamente en desarrollo. En condiciones de reposo, se pueden generar respuestas de resistencia en muchos frutos jóvenes e inmaduros a la infección producida por *B. cinerea* registrados en uvas, al parecer esto se debe, a su alto contenido de compuestos fenólicos, que lo inhiben (Elad, Williamson, Tudzynski, & Delen, 2007). Este tipo de infección se denomina "quiescente" y puede iniciarse a partir de los procesos de floración; momento en el cual las conidiosporas de *B. cinerea* pueden acceder las estructuras florales manteniéndose latente, hasta cuando los frutos alcanzan la madurez. Lo anterior se ha demostrado en cultivos de uva, fresa y tomate (Elad, 1996).

Comúnmente la infección es controlada, mediante la utilización de fungicidas de síntesis; pero como se señaló anteriormente, esta herramienta de control presenta diversas limitaciones debido a los fenómenos de resistencia del fitopatógeno y toxicidad ambiental (Saito & Susuki, 2009). Esta situación ha motivado el uso de otras alternativas de manejo de este y otros fitopatógenos, como el control biológico de enfermedades mediante el uso preferiblemente de microorganismos nativos, principalmente debido a su baja toxicidad, alta especificidad y adaptabilidad a las áreas de aplicación, fácil producción y formulación (Cotes-Prado, 2014).

Control Biológico de Enfermedades en Plantas. El control biológico se define como la disminución del inoculo o de la actividad de este, capaz de causar enfermedad; llevada a cabo a través de uno o más organismos incluyendo la planta hospedero, pero excluyendo la intervención del hombre (Jarvis, 1992). De acuerdo a Hoyos-Carvajal en 2012, se define control biológico como "*uso o manipulación de organismos vivos, nativos o introducidos que estimulen la resistencia de la planta o supriman la actividad en poblaciones de uno o más fitopatógenos*".

El uso de microorganismos para control de biológico de enfermedades, en diversos cultivos y poscosecha, se atribuye a sus mecanismos de acción contra los fitopatógenos tales como: la antibiosis, directa interacción, en algunos casos como el micoparasitismo (hongos fitopatógenos), competencia por nutrientes (macro o micro) y espacio, supresión de esporulación e inducción de mecanismos de resistencia en los hospederos (Huang, y otros, 2011).

Como agentes de control biológico de *B. cinerea*, se ha reportado que las levaduras presentan mecanismo de acción tales como producción de enzimas que degradan la pared celular, producción de metabólicos volátiles, inducción de resistencia, competencia por nutrientes y espacio; siendo este criterio una herramienta útil para producirlas eficientemente y para diseñar formulaciones que les permita activarse rápidamente y proteger las células cuando son aplicadas en campo (Nunes, 2002).

Contribución del proyecto a las líneas de investigación del grupo

Este trabajo se desarrolla bajo la línea de investigación, Gestión Ambiental y de los Recursos Naturales en Colombia, perteneciente al grupo de investigación con el mismo nombre perteneciente a la Facultad de Ciencias y Tecnologías de la (VUAD) Universidad Santo Tomás. Este proyecto se realizará en colaboración con el Grupo de Conservación, Bioprospección y Desarrollo Sostenible, perteneciente a la Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente (ECAPMA) de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), donde se articula con la línea de investigación Gestión y manejo ambiental y Biodiversidad y recursos naturales.



Este proyecto se articula con las mencionadas líneas de investigación debido a que plantea la bioprospección, mediante el uso de la biodiversidad microbiana perteneciente a manantiales salinos y termales en diferentes municipios de los departamentos de Cundinamarca y Huila. Lo anterior con el fin de obtener microorganismos halófilos y halotolerantes potencialmente antagonistas de fitopatógenos de cultivos de importancia económica, lo cual es de gran importancia, ya que el control de plagas tradicionalmente emplea agentes de control químico que pueden ser causantes de contaminación de suelos, aguas y fauna, pudiendo comprometer hasta la salud humana. La contribución de este trabajo, se orienta a la generación de nuevas tecnologías de control biológico, con un mínimo de impacto para el medio ambiente, las cuales pueden ser incorporadas a estrategias de manejo Integrado de Plagas.

3. METODOLOGÍA

Para el cumplimiento del objetivo número 1:

Se recolectarán muestras de agua a partir de manantiales termales y salinos ubicados en los municipios de Macheta, Guasca y Tabio en el Departamento de Cundinamarca, y en los municipios de Rivera y Timaná en el Departamento de Huila. Las muestras se recolectarán en frascos de vidrio estériles, se rotularán y serán almacenados a temperatura ambiente. Los frascos serán transportados al laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Parte de cada muestra se empleará para análisis fisicoquímicos y medios de cultivo, y la otra parte se usará como inóculo para el aislamiento de microorganismos.

Caracterización fisicoquímica de las muestras

La temperatura y pH de cada manantial se registrará in-situ. Los análisis de cloro, conductividad, bicarbonato, hierro total, sulfato, calcio, sodio, magnesio, manganeso, potasio y sólidos disueltos totales se realizarán en un laboratorio de referencia de acuerdo al standard methods (Eaton et al. 2005).

Enriquecimiento, aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos y halotolerantes con potencial actividad antagónica

La estrategia de aislamiento empleada en este estudio se basará en las características fisicoquímicas de cada sitio de muestreo e involucrará el uso de medios de cultivo reportados en la literatura que hayan registrado buenos resultados en la recuperación de microorganismos halófilos y halotolerantes, así como el uso directo de las aguas de salmueras para su uso como medio de cultivo. Para el diseño de estos medios de cultivo se tendrá en cuenta el uso de diferentes aceptores de electrones (O_2 , NO_3 , SO_4 , Mg^{+4} , Fe^{+3} entre otros), diferentes concentraciones de fuentes de carbono (azúcares, aminoácidos, peptona, almidón, etc.) diferentes relaciones en el contenido carbono: nitrógeno, pH, salinidad y temperatura, entre otros, buscando al máximo mimetizar en estos medios las condiciones de los hábitats.

Para los aislamientos será empleado un medio básico de sales que contiene (un litro de agua desionizada): 0.3 g of KH_2PO_4 ; 0.3 g of K_2HPO_4 ; 1.0 g of NH_4Cl ; 23 g of $NaCl$; 0.1 g KCl y 0.1 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Rubiano et al, 2015).

Una vez se aislen los microorganismos y se mantengan en condiciones de laboratorio se describirán características fenotípicas básicas (tipo de colonia, morfología celular, características de tinción, cinética de salinidad, entre otras), y se procederá a su identificación usando como marcador molecular el gen que codifica para el 16S ARNr, para lo cual se amplificará su DNA usando los iniciadores universales del dominio Bacteria Fd1 y Rd1 correspondientes a las posiciones 8-1542 de E. coli (Van de Peer & De Wachter, 1993) y para el dominio Archaea los iniciadores Arch-0109F y Uni-1492R para obtener un producto PCR de aproximadamente 1.5 pb y 1.4 pb respectivamente. El pPCR purificado será enviado a un laboratorio externo (Macrogen, Corea) para secuenciación. Las secuencias del 16S rDNA se analizarán por el servidor BLAST del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (Boon et al, 2002) y en el rRNA Database Project (RDP).

Evaluación de cinéticas de crecimiento a 6° y 20° de las cepas de bacterias aisladas



La evaluación de cinéticas de crecimiento a 6° y 20°C se realizará en medio básico de sales, suplementado con un sustrato asimilable por los microorganismos, usualmente glucosa (20 mM) o peptona (5 g.l-1). Los medios de cultivo serán inoculados con células microbianas pre-adaptadas a las condiciones de estudio, e inmediatamente después de la inoculación se registrará la DO (DO to) a una longitud de onda de 580 nm y se llevará a incubación. Cada hora se realizará una nueva lectura de la DO a 580 nm.

Los datos de DO serán transformados a logaritmo natural (LN) para realizar una gráfica LN vs tiempo, a partir de esta gráfica se realizará una regresión lineal y se calculará la pendiente que corresponde a la tasa de crecimiento (μ).

Los diferentes aislamientos de microorganismos halófitos, se seleccionarán bajo 3 criterios en relación con su actividad biocontroladora:

Por su capacidad de crecer y desarrollarse a temperatura de 6 °C y a 20 °C, cada cepa aislada será sembrada en cajas de Petri con medio básico de sales, siendo puestas posteriormente a incubar a ambas condiciones de temperatura, observándose diariamente su capacidad de crecimiento y desarrollo cualitativamente.

Para el cumplimiento del objetivo número 2:

Aislamiento y mantenimiento de una cepa de *B. cinerea*

Se utilizará una cepa monosporica de *B. cinerea*, la cual fue aislada previamente de frutos de fresa con los síntomas y signos característicos producidos por el moho gris, obtenidos de un mercado local en la ciudad de Bogotá y mantenido en una colección de trabajo del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Santo Tomás. Esta cepa será utilizada para realizar las pruebas de patogenicidad para el moho gris en fresa, y los ensayos de evaluación in planta de la actividad biocontroladora de los microorganismos halófilos y halotolerantes. Para ambos tipos de pruebas, se utilizarán cultivos del hongo fitopatógeno en agar Sabouraud incubados por 12 días a 20 °C en oscuridad.

Pruebas de patogenicidad in planta de *B. cinerea* en frutos de fresa

Este ensayo se elaborará para determinar la mínima concentración de *B. cinerea* que manifieste síntomas y signos en frutos de fresa en estado de madurez fisiológica (estados en los que son cosechados) a temperaturas de 6 °C y 20 °C. Para lograr lo anterior se evaluarán las concentraciones: 1×10^3 conidios.ml-1, 1×10^4 conidios.ml-1, $1,0 \times 10^5$ conidios.ml-1, $1,5 \times 10^5$ conidios.ml-1, de basado a la metodología utilizada por Fuentes y García-Murillo en 2001.

Evaluación in vitro de la actividad antagonica de microorganismos halófilos y halotolerantes

Las cepas aisladas serán evaluadas para detectar su actividad antagonica (antibiosis), usando el método de discos de difusión. Las cepas se cultivarán en frascos de 250 ml que contienen 100 ml de medio MB. Los cultivos serán incubados a 37 °C durante 24 h y agitación constante (150 rpm), transcurrido el tiempo de incubación los cultivos serán centrifugados a 12000 rpm durante 30 min. El sobrenadante que se obtenga será esterilizado mediante filtración a través de filtros de membrana de 0.22 μ m, para ser usado en los ensayos de antagonismo.

De otra parte, el pellet obtenido a partir de la centrifugación, se suspenderá y lavará en solución salina (0.85% NaCl) y se ajustará a una concentración de 1×10^8 células.ml-1. 300 μ l del sobrenadante o del o de las células suspendidas serán colocados sobre la superficie de una placa de agar PDA, que ha sido previamente inoculada con una suspensión conidial de *B. cinerea*. Transcurridos 7 días de incubación a 23 °C, las placas serán revisadas para evidenciar la formación de halos de halos de inhibición (Zhao *et al.* 2003).

Evaluación in planta sobre frutos de fresa de la actividad biocontroladora de microorganismos halófilos y halotolerantes contra *B. cinerea*

Las cepas halófilas y halotolerantes, que presenten alta actividad en las evaluaciones in vitro serán nuevamente evaluadas, pero en una prueba en un modelo in planta en frutos de fresa maduros fisiológicamente, inoculando preventivamente cada cepa aislada a una concentración de 1×10^8 ufc.ml-1



(Senthil *et al.* 2011), en dos heridas hechas en la parte media de los frutos con aproximadamente 2 mm de diámetro y 2 mm de profundidad.

Los frutos serán puestos en cámaras húmedas, un primer bloque a 6 °C y el otro a 20 °C por 48 horas; para posteriormente ser inoculadas las heridas, pero con una suspensión de *B. cinerea* a una concentración que se establecerá en la prueba de patogenicidad.

Una vez aparezcan los síntomas, serán registrados los diámetros de lesión para cada fruto de fresa, en cada tratamiento (cepa de cada bacteria) y los controles absolutos, y comercial correspondiente al fungicida Sportak® (I. A. Prochloraz/dosis 0,8 g.l-1), y el control patógeno.

La medición de los diámetros de lesión será registrada, hasta cuando el control patógeno alcance un 100 % de tomates con síntomas y signos (incidencia) y un 80 % de la superficie de la fresa invadida por *B. cinerea* (severidad). Cada tratamiento consta de 10 repeticiones, en donde la unidad experimental es un fruto de tomate. El análisis de los resultados de esta prueba, estará basado en los procedimientos propuestos por García-Murillo y Cotes-Prado, en 2001; quienes calcularon las áreas bajo la curva producida por la enfermedad, y a partir de estos valores se calculará los % de protección, para cada tratamiento y los controles.

Para el cumplimiento del objetivo número 3:

Efecto de la luz ultravioleta sobre la viabilidad de las cepas aisladas

Teniendo en cuenta que los microorganismos utilizados para control biológico de *B. cinerea*, deben ser aplicados a campo abierto o bajo invernadero, específicamente al follaje, flores o frutos, o eventualmente en la poscosecha en combinación de luz UV; es relevante determinar los efectos de la luz ultravioleta (tipo UV-C y UV-B) sobre la viabilidad de los microorganismos halófilos y halotolerantes aislados que hayan presentado en las pruebas in planta porcentajes de control contra *B. cinerea* superiores al 85%, tanto a temperaturas de refrigeración como ambiente. Para lo cual se seguirá la metodología propuesta por (Fosencá-Ramírez, Cotes-Prado, y Moreno-Velandia, 2009) pero modificada para este tipo de bacterias, en la cual se preparan suspensiones en agua destilada estéril a una concentración de 1×10^3 ufc x ml-1.

De cada suspensión se tomarán alícuotas de 10 µl y se inocularán 5 gotas en uno de los cuatro cuadrantes de una caja de Petri con agar nutritivo. El inóculo de cada cepa en cada caja de Petri sin tapa, será expuesto a una distancia de 20 cm de la fuente de emisión artificial de la radiación ultravioleta; en donde se empleará una lámpara monocromática (UVP 3UV-38, Cambridge UV) que emite tres longitudes de onda (254 nm, 302 nm y 365 nm). El tiempo máximo de exposición será de 90 segundos para el caso de la luz ultravioleta C (254 nm) y de 10 minutos en el caso de la luz UV-B (302 nm). Posteriormente las cajas serán selladas con papel aluminio y se llevarán a incubación a 25 °C durante 48 horas.

Después de este tiempo se realizará un conteo de colonias y se determinará el porcentaje de inhibición de la viabilidad de las células mediante la siguiente expresión matemática:

% Viabilidad: $[(\text{UFC/ml control no expuesto}) - (\text{UFC/ml tratamiento n}) / (\text{UFC/ml control no expuesto})] \times 100$.

La unidad experimental consistirá en un cuadrante de la caja de Petri con 5 gotas de inóculo de la bacteria a evaluar. Para cada cepa se incluirá un testigo, que consiste en la cepa no expuesta a la luz UV. Para este ensayo se propone un diseño experimental completamente al azar con 3 repeticiones.

4. AVANCE Y LOGROS

Aislamiento de dos bacterias procedentes de un manantial termal en el municipio de Tenjo, Cundinamarca.

Aislamiento del hongo fitopatógeno *B. cinerea* de frutos de fresa.

Elaboración de un ensayo de patogenicidad en frutos de fresa con madurez fisiológica. Se utilizó un diseño de bloques al azar, correspondientes a la temperatura de 6°C (refrigeración) y 20°C (ambiente).



Los tratamientos correspondieron a las concentraciones de 1×10^3 conidios*ml⁻¹, 1×10^4 conidios*ml⁻¹, 1×10^5 conidios*ml⁻¹, $1,5 \times 10^5$ conidios*ml⁻¹. Se elaboraron controles absolutos y Tween 80. Se analizarán los datos mediante análisis de varianza y posterior comparación de medias de los tratamientos y controles, mediante la prueba de Tukey ($\alpha > 0.005$).

5. IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación fortalecerán la cadena de adición de valores de la biodiversidad microbiana de fuentes termales. Estos resultados serán la base inicial para la selección de microorganismos halófilos con potencial actividad antifúngica.

De otra parte, este trabajo está orientado a contribuir con nuevas herramientas de control biológico del moho gris, basadas en el uso de microorganismos halófilos y halotolerantes, las cuales podrían ser combinadas con otras alternativas poscosecha. Bajo este contexto existe la posibilidad de generar nuevos desarrollos tecnológicos a partir de la selección de microorganismos halófilos y halotolerantes con alta actividad contra *B. cinérea*. Los resultados esperados en este proyecto se detallan en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Resultados relacionados con la generación de conocimiento y/o nuevos desarrollos tecnológicos.

Resultado / producto esperado	Indicador	Beneficiario
Desarrollo de un modelo de bioprospección que permita la identificación y selección de microorganismos halófilos con potencial actividad antifúngica.	Identificación y selección de microorganismos halófilos con potencial actividad antagonista de hongos fitopatógenos, a partir de diferentes ambientes extremos	- Comunidad regional (productores de mora, fresa, flores de corte entre otros). - Comunidad científica de las áreas de ambientales, agronómicas y microbiológicas. - Agroindustria Nacional.
Generación de una colección de microorganismos antagonistas de hongos fitopatógenos, a través de la incorporación de cepas identificadas.	Registro de la colección ante el IAvH	- Unidades de investigación. - Comunidad científica.
Aislamiento y descripción de las cepas aisladas de manantiales salinos y termales colombianos.	Descripción filogenética de las cepas aisladas.	Comunidad científica local nacional e internacional
Selección de microorganismos halófilos antagonistas de <i>B. cinerea</i>	Identificación de microorganismos halófilos con capacidad biocontroladora de <i>B. cinerea</i>	Comunidad científica nacional e internacional Industria nacional



Tabla 2. Fortalecimiento de la capacidad científica nacional

Resultado / producto esperado	Indicador	Beneficiario
Formación a nivel profesional (3)	Trabajos de grado (3 estudiantes)	Estudiantes Pregrado USTA / VUAD y UNAD.
Fortalecimiento de los vínculos de cooperación con los asesores externos del proyecto.	Fortalecimiento del convenio de cooperación USTA / VUAD y UNAD.	Comunidad científica. Estudiantes y profesores de las diferentes unidades académicas

Tabla 3. Apropiación social del conocimiento

Resultado / producto esperado	Indicador	Beneficiario
Reconocimiento de los manantiales salinos y termales estudiados como hábitat de diferentes especies de microorganismos con potencial actividad antifúngica	Divulgación de resultados a entidades ambientales locales y regionales	Comunidad regional Comunidad científica Industria biotecnológica
Fortalecimiento de la base de datos de la biodiversidad microbiana en ambientes salinos y termales en Colombia.	Colección de microorganismos halófilos caracterizada fenotípica y genotípicamente.	Comunidad regional Comunidad científica Industria biotecnológica

6. CONCLUSIONES (parciales)

- Una concentración de 1×10^5 conidios*ml⁻¹, ocasiona una manifestación de síntomas y signos (esporulación) del moho gris, causada por *B. cinerea* en frutos maduras de fresa, tanto a 6°C (refrigeración) y 20°C (ambiente).
- De la totalidad de muestras de fresa colectadas en diferentes mercados locales en la ciudad de Bogotá, todas presentaron lesiones compatibles con el moho gris.



Anexo 1. Certificación, evidencia fotográfica y muestra de programación del III Congreso Nacional de Ciencias Ambientales.



Evidencia de presentación del proyecto de investigación en poster por parte del docente Paulo Germán García Murillo. Fuente, el autor 2017.



Anexo 2. Certificación, evidencia fotográfica y muestra de programación del Congreso Internacional de Criminología Verde.



MIÉRCOLES, 27 de Septiembre de 2017

09:30 - 10:00		Registro de Asistentes	
10:00 - 10:05	Exposiciones	Instalación DRA. ANA MARIA GONZÁLEZ Profesora Facultad de Derecho - Universidad Antonio Nariño	
		Búsqueda de Microorganismos con Alto Potencial Antagonista de Botrytis Cinerea, Procedentes de Manantiales Termales y Salinos Colombianos. DR. PAULO GERMÁN GARCÍA MURILLO -Universidad Santo Tomás- DR. CARLOS ANDRÉS FAJARDO GÓMEZ -Universidad Nacional Abierta y a Distancia-	
10:05 - 10:35			

Muestra programación ponencia oral, por el docente Paulo Germán García Murillo. Fuente el autor, 2017



Fotografía ponencia oral Congreso Internacional Criminología Verde, por el docente Paulo Germán García Murillo. Fuente el autor, 2017.

Anexo 3. Evidencia fotográfica y muestra de programación del II Encuentro Virtual Académico de Ciencias Ambientales.



II Encuentro Virtual Académico de Ciencias Ambientales – 23 y 24 de noviembre de 2017.
Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD
Sede Nacional José Celestino Mutis. Calle 14 sur No. 14-23
Bogotá D.C.
Teléfono: 3447700 ext. 1529
Email: congreso.ambiental@unad.edu.co

Viernes	
08:00-08:49AM	"Responsabilidad Extendida del Productor" Edgar Erazo - Grupo Retorna
08:50-09:29AM	***"Degradación fotocatalítica de un colorante industrial usando Zeolita X, sintetizada a partir de cenizas volantes, como soporte" José Herney Ramírez, PhD - Universidad Nacional de Colombia
09:30-10:09AM	Consejo Colombiano de Seguridad
10:10-10:24AM	Consejo Colombiano de Seguridad
10:25-10:49AM	Coffee break
10:50-11:19AM	"Valorización de yesos rojos de la industria del TiO ₂ y su carbonatación para secuestro de CO ₂ " Silvia Pérez Moreno - Universidad de Huelva
11:20-11:59AM	"Tratamiento de aguas residuales producto de actividades de lavado de ropa con humedales artificiales" Juan David Solorza y David Leonardo Ramírez - Universidad EAN
12:00-01:59PM	***"Avances en gestión de sustancias química en el país, marco normativo" (pendiente) Rodolfo Alarcón - Ministerio de Medio Ambiente
02:00-02:39PM	Almuerzo libre
02:40-02:59PM	***"Nuevas tecnologías en alcantarillado" Jonathan Ochoa - ACODAL
03:00-03:19PM	***"Energía Solar y dispositivos Fotovoltaicos: Generaciones y tecnologías emergentes" Luis Alejandro Duarte, MSc - UNAD
03:20-03:39PM	"Obtención de las características hidrodinámicas de un tramo del río Odiel afectado por drenaje ácido de minas" Diego Alejandro Pérez Giraldo - Universidad de Huelva - Universidad Internacional de Andalucía
03:40-03:59PM	"Busqueda de microorganismos con alto potencial antagonista de Botrytis cinerea, procedentes de manantiales termales y salinos" Carlos Fajardo - UNAD, Universidad Santo Tomás
04:00-04:29PM	"Evaluación de cuatro biofungicidas y dos aislamientos del género Trichoderma contra Botrytis cinerea" Paulo Germán García - Universidad Santo Tomás
04:30-04:49PM	"Análisis de ciclo de vida: aplicaciones, tendencias y casos de estudio en Bogotá" Yohen Cuellar - UNAD
04:50-05:09PM	"Extracción de plaguicidas en suelo empleando fluidos súper críticos" Ricardo Forero, MSc - Universidad Nacional de Colombia
05:10-05:29PM	"Gestión ambiental desde la propuesta de "Territorios Campesinos Agroalimentarios" en el norte de Nariño y el sur del Cauca" Nicolás Jiménez - UNAD
05:30-06:30PM	"17 Objetivos de Desarrollo Sostenible" Ing. Víctor Fabián Forero, MSc - UNAD
	Premiación del logo de la cadena de formación ambiental Ing. Víctor Fabián Forero, MSc - UNAD
	Ceremonia de clausura & Presentación de la banda "NO NAME", desde Facatativá, Cundinamarca.



Muestra programación ponencia oral, por el docente Paulo Germán García Murillo. Fuente el autor, 2017.



Fotografía ponencia oral II Encuentro Virtual Académico de Ciencias Ambientales, por el docente Paulo Germán García Murillo. Fuente el autor.



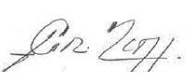
**II Encuentro Internacional
Virtual y Académico de Ciencias Ambientales**
23 y 24 de noviembre de 2017



Universidad Nacional
Abierta y a Distancia

Certificado

La Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente certifica que **Paulo German García Murillo** participó en el II Encuentro Internacional, Virtual y Académico de Ciencias Ambientales, en la conferencia titulada **Búsqueda de microorganismos con alto potencial antagonista de botrytis cinerea, procedentes de manantiales termales y salinos colombianos** realizada en la Sede Nacional José Celestino Mutis de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia en la ciudad de Bogotá D.C. durante los días 23 y 24 de noviembre de 2017.



Julialba Angel Osorio
Decana nacional
Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente – UNAD



Víctor Fabián Forero Ausique
Líder nacional de programa Ingeniería Ambiental
Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente – UNAD



Symbiont
Investigación & Desarrollo



ACODAL
ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE ORGANISMOS
AGROPECUARIOS Y AMBIENTALES
SECCIONAL OCCIDENTAL
SECCIONAL OCCIDENTAL



Grupo
Retorna
Alta calidad y precios accesibles





Certificado de ponente de los resultados del proyecto de investigación en el II Encuentro Internacional Virtual y Académico de Ciencias Ambientales.

Anexo 4. Evidencia fotográfica y muestra de programación del I Primer coloquio de investigación: fortaleciendo la cultura de la ciencia la tecnología y la innovación con perspectiva de región vicerrectoría de universidad abierta y a Distancia-VUAD 2017.

BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS CON ALTO POTENCIAL ANTAGONISTA DE BOTRYTIS CINEREA, PROCEDENTES DE MANANTIALES TERMALES Y SALINOS COLOMBIANOS

Paulo Germán García Murillo¹, Carlos Andrés Fajardo Gómez²
¹Universidad Santo Tomás (VUAD), Facultad de Ciencias y Tecnologías; Programa Administración Ambiental y de los Recursos Naturales. german.garcia@ustomas.edu.co
²Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente, Programa de Ingeniería Ambiental. carlos.fajardo@unad.edu.co

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Sentido estricto.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: Gestión Ambiental y de los Recursos Naturales de Colombia.

NOMBRE DEL SEMILLERO: Bioprospección y Biosistemas Integrados.

LÍNEA MEDULAR: Línea Alberto Magno: Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.

LÍNEA ACTIVA DE INVESTIGACIÓN: Gestión Ambiental y de los Recursos Naturales de Colombia.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN DEL PROGRAMA ACADÉMICO (Sublíneas): Ordenamiento y Manejo de los Recursos Naturales en las Cuencas Hidrográficas.

Impacto proyectado sobre el currículo: En los espacios académicos del programa de Administración Ambiental y de los Recursos Naturales, tales como **Manejo Integrado del Medio Ambiente**, el cual incluye las disciplinas de bioprospección de microorganismos para el control biológico de plagas y en el espacio de académica **Tecnologías Limpias**, los cuales abarcan desarrollos tecnológicos alternativos al manejo integrado de plagas en la producción agrícola.

Impacto o articulación con programa de proyección social: Beneficio a los agricultores en los ámbitos rurales y urbanos, fortaleciendo de la competitividad local, pero reduciendo los impactos ambientales por efecto del control de plagas y enfermedades en el cultivo de la rosa en zonas productoras de la sabana de Bogotá.

Metodología

1. Toma de muestras de agua de microantiales termales y salinos ubicados en: Chusqueá, Chusquea, Guasca, Manizales y Tabio en el Departamento de Cundinamarca.
2. Enriquecimiento, aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos y halotolerantes con potencial actividad antagonista.
3. Evaluación de cinética de crecimiento a 4° C y 20° C de los microorganismos aislados.
4. Efecto de la luz ultravioleta sobre la viabilidad de los microorganismos aislados.
5. Pruebas de patogenicidad de *B. cinerea* en un modelo "in planta".
6. Evaluación "in vitro" y "in planta" de la actividad bactericida a 4° C y 20° C de microorganismos halófilos y halotolerantes contra *B. cinerea*.

Objetivo general: Identificar y evaluar microorganismos halófilos y halotolerantes con alto potencial antagonista de *B. cinerea*, procedentes de manantiales termales y salinos colombianos.

Resultados (preliminares)

- Aislamiento de microorganismos de fuentes hidrotermales: Guasca, Cundinamarca: 12 aislamientos de bacterias; Chusqueá, Cundinamarca: 13 aislamientos de bacterias.
- Prueba de patogenicidad de *Botrytis cinerea* en un modelo "in planta" en tallos de rosa y tallos de fresa.

Concentración	4°C	20°C	4°C	20°C
100%	✓	✓	✓	✓
100%	✓	✓	✓	✓
100%	✓	✓	✓	✓
100%	✓	✓	✓	✓

Establecimiento de un modelo de evaluación in vitro en tallos de rosa y fresa para pruebas de antagonismo de microorganismos

De 8 aislamientos de bacterias evaluados contra *B. cinerea*, todos presentaron porcentajes de protección por debajo del 80%.

De 8 aislamientos de bacterias procedentes de Guasca evaluados contra *B. cinerea* en fresa, todos presentaron porcentajes de protección por debajo del 80%.

Apropiación Social del Conocimiento Eventos Científicos:

- III Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Barranquilla, 23-25 Octubre de 2017
- Congreso Internacional Criminología Verde. Bogotá, 25 al 27 Septiembre de 2017.

Problematika del Control químico

Moho Gris (Botrytis cinerea)

Atmosfera

Agua y organismos acuáticos

Población Humana

Organismos beneficios

Problematika del Control químico

Infografía presentada en el I Coloquio de Investigación VUAD. Fuente el autor, 2017.



Anexo 5. Evidencia de participación en el programa radial "Al aire sin límites", correspondiente a la emisión del 28 de noviembre de 2017. Este programa conto con la participación de estudiantes del semillero Bioprospección y Biosistemas Integrados (VUAD/USTA) y del semillero Methamorfo (Ing. Ambiental, UNAD).



Bogotá, diciembre de 2017

ESCENARIO RADIO
EMISORA DE LA UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

CERTIFICA QUE

El 28 de noviembre se desarrolló el programa radial "Al Aire sin Límites" con el tema "Búsqueda de microorganismos con alto potencial antagonista de *Botrytis cinerea*, procedentes de manantiales termales y salinos colombianos" con los docentes invitados, Paulo Germán García Murillo con C.C. 79.058.666 y Carlos Andrés Fajardo Gómez con C.C. 91.080.106.

Los docentes participaron con su conocimiento y de manera activa por la emisora digital "Escenario radio" que lidera la Vicerrectoría la Universidad Abierta y a Distancia de la Universidad Santo Tomás, el cual se emite todos los martes de 5:00pm a 6:00pm.

Adicionalmente, se abrieron los micrófonos para conocer la experiencia de los semilleros "Bioprospección y Biosistemas Integrados" de Administración Ambiental de la USTA, y "Methamorfo" de Ingeniería Ambiental de la UNAD. Aquí participaron los estudiantes de la UNAD: Diana Marcela Torrijos Gómez, C.C. 1.032.417.120; Orlando Emilio Velázquez Prieto, C.C. 80.100.966; Rodrigo Guatibonza, C.C. 1.118.533.656; por parte de la USTA, Jennifer Vanessa Almerares Aragón con C.C. 1.192.756.956.

Se puede escuchar su intervención en <http://escenario.usta.edu.co/al-aire-sin-limites/>

Atentamente,

CLARISA CHAVES
Directora
Escenario



UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA
www.escenarioradio.com - <http://escenario.usta.edu.co>
escenario@usantomas.edu.co Tel. 5878797 ext 1138

Certificado de participación en el programa radial "Al aire sin límites".



Evidencia fotográfica del desarrollo del programa radial "Al aire sin límites" del 28 de noviembre. Fuente el autor, 2017.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1996). Fitopatología. México, Mexico: Limosa.
- Alexopoulos, C. J., W., M. C., & M., B. (1996). Phylum Ascomycota- Order *Saccharomycetales*. En C. J. Alexopoulos, M. C. W., & B. M. (Edits.), *Introductory Mycology* (págs. 272-291). New York, USA: John Wiley & Sons.
- Asocolflores. (2004). <http://www.asocolflores.org/>. Recuperado el 28 de agosto de 2015, de http://www.asocolflores.org/aym_images/files/Asocolflores.pdf.
- Averre, C., Jones, R., & Milholland, R. (2014). Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp.). *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 8(1), 44-56.
- Baddi, M. H., & Landeros, J. (2007). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. Recuperado el 4 de agosto de 2015, de Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad: <http://desarrollandome.net/ambiens/plaguicidas/archivos/plaguicidas-que-afectan-a-lasalud-humana-y-la-sustentabilidad.pdf>.
- Boon, N., Windt, W., Verstraete, E. & Top, E. 2002. Evaluation of Nested PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) with Group-Specific 16S rRNA Primers for the Analysis of Bacterial Communities from Different Wastewater Treatment Plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 101-112.
- Castañó, Z. J. (1994). Manejo de enfermedades en plantas: Una revisión. *Fitopatología Colombiana*, 20, 69-79.
- Cheng, C., & Yang, C. &. (2012). Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* Mycelium in Culture Conditions. *Phytopathology*, 102, 1054-1063.
- Cotes-Prado, A. M. (2002). Control biológico de patógenos del suelo. En Ascolfi, *Memorias XXIII Congreso Ascolfi, Nueva Tendencias en Fitopatología*. Bogotá, Colombia: Universidad nacional de Colombia sede Bogotá.
- Cotes-Prado, A. M. (2014). Bioprospección microbiana y sus implicaciones en el control biológico. *Actualidades Biológicas*, 20, 40-41.
- Eaton AD, Franson MAH, American Public Health Association., American Water Works Association., Water Environment Federation. (2005) *Standard methods for the examination of water & wastewater*, 21st edn. American Public Health Association, Washington, DC.
- Elad, Y. &. (2002). Biological Control of Fungal Plant Pathogens. En K. E. BENNETT, *The Mycota XI* (págs. 93-109). Berlin, Alemania: Springer – Verlag.
- Elad, Y. (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited disease. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 719-732.
- Elad Y., H. Yunis and J. Katan, 1992. Multiple resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in *Botrytis cinerea* isolates in Israel. *Plant Pathology* 41, 41-46.
- Essghaier B., Fardeau ML, Cayol J.L., Hajlaoui M.R., Boudabous A., Jijakli H. and Sadfi-Zouaoui N. 2009. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 833-846.
- Fuentes-Murillo, O., García-Murillo, P. G., & Cotes-Prado, A. M. (2005). Selección de Levaduras Potencialmente Biocontroladoras de *Alternaria alternata* en Poscosecha de Tomate (*Lycopersicon esculentum*). En A. M. Cotes-Prado (Ed.), *Las Levaduras Como Alternativa De Control Biológico De Fitopatógenos En Postcosecha De Frutas Y Hortalizas* (pág. 16). Bogotá, Colombia: Produmedios.
- Flórez, C. (2001). Pautas y prioridades en la investigación de la diversidad microbiana. Importancia de la DM en términos de conocimiento, conservación y uso sostenible, recomendando pautas de acción sobre el tema para Colombia. *Biosíntesis Boletín Informativo* (Vol. 28, pp. 1-4). Bogotá, Colombia: Humboldt
- Fonsenca-Ramirez, J. M., Cotes-Prado, A. M., & Moreno-Velandia, C. A. (2009). Selección de levaduras por su versatilidad fisiológica y por su actividad biocontroladora de *Botrytis cinerea*



- en tomate (*Solanum lycopersicum*), (Trabajo de grado de Maestría en Biología Aplicada). Bogotá: Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ciencias.
- García, P., & Cotes-Prado, A. M. (2004). Búsqueda de alternativas de control biológico de *Rhizopus stolonifer* (Ehr.: Fr) Vuill., en la postcosecha de tomate, mediante la utilización de levaduras. En A. M. Cotes-Prado (Ed.), Las Levaduras Como Alternativa De Control Biológico De Fitopatógenos En Postcosecha De Frutas Y Hortalizas (págs. 7-8). Bogotá, Colombia: Promedios.
- García-Murillo, P. G., & Cotes-Prado, A. M. (2001). Búsqueda de alternativas de control biológico de *Rhizopus stolonifer* en la postcosecha de tomate, mediante la utilización de levaduras. (Tesis Maestría inédita). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Grijalba-Rativa, C. M., Calderón, L. A., & Pérez-Trujillo, M. M. (2010). Rendimiento y calidad de la fruta en mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), con y sin espinas, cultivada en campo abierto en Cajicá (Cundinamarca, Colombia). Revista de Ciencias Básicas, 6(1), 24-41.
- Hannusch, D. J. (1996). Interaction of air temperature, relative humidity and biological control agents of grey mold of bean. European journal on plant pathology, 102, 133142.
- Higuera, N., Villamizar, L., & García-Murillo, P. G.-P. (2004). Desarrollo, caracterización y determinación de la estabilidad de un bioplaguicida granular a base de la levadura *Pichia onychis* para el control de *Rhizopus stolonifer* en poscosecha del tomate. En A. M. Cotes-Prado (Ed.), Las Levaduras Como Alternativa De Control Biológico De Fitopatógenos En Postcosecha De Frutas Y Hortalizas (págs. 11-12). Bogotá, Colombia: Produmedios.
- Horst, R. K. (1999). Compendium of Rose Diseases. St. Paul, USA: The American Phytopathological Society.
- Hoyos-Carvajal, L. (2012). Conceptos generales en el manejo biológico de fitopatógenos. En L. Hoyos-Carvajal (Ed.), Enfermedades de plantas: Control Biológico (págs. 1-10). Bogotá, Colombia: code Ediciones.
- Hunt, E. J., Kuhlmann, U., Sheppard, A., Qin, T. -K., B. I. P. Barratt, B. P., Harrison, L., Goolsby, J. (2008). Review of invertebrate biological control agent regulation in Australia, New Zealand, Canada and the USA: recommendations for a harmonized European system. J. Appl. Entomol., 132, 89–123.
- Jaimes, Y., & Moreno-Velandia, C. A.-P. (2009). Inducción de resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en tomate por *Trichoderma koningiopsis* Th003. Acta biol. Colomb., 14, 111 – 120.
- Jarvis, W. R. (1980). The Biology of Botrytis. London, UK: Academic Press.
- Jarvis, W. R. (1992). Managing diseases in greenhouse crops. St. Paul, Minnesota, USA: APS press.
- Jijakli, M. H., & Lepoivre, P. (1995). Utilisation des biopesticides pour la protection des pommes en conservation. Le Fruit Belge, 45, 83-88.
- Jimenez, Y., & Neisa, A. C.-P. (2004). Selección de levaduras para el control de *Botrytis alli* en cebolla de bulbo. En Cotes-Prado (Ed.), Las Levaduras Como Alternativa De Control Biológico De Fitopatógenos En Postcosecha De Frutas Y Hortalizas (págs. 6-7). Bogotá, Colombia: Promedios.
- Kalogiannis, S. T. (2006). Selection and evaluation of phyllosphere yeast as biocontrol agents against grey mould of tomato. Plant Pathol, 116, 69-76.
- Kerkar, S. (2004). Ecology of hypersaline microorganisms. In: Ramaiah N (ed) Marine Microbiology: Facets & Opportunities, pp 37-47.
- Lima, G. I. (1997). Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. Postharvest Biol. Technol, 10, 169-178.
- Loqman S., E. Ait Barka, C. Clément and Y. Ouhdouch, 2009. Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25, 81–91.



- Masih, E. S.-D. (2001). Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the control of *Botrytis cinerea*, causing grey mold disease of the grapevine. FEMS Microbiol. Lett., 202, 227-233.
- Mónaco C., G. Dal Bello, M.C. Rollán, L. Ronco, G. Lampugnani, N. Arteta, C. Abramoff, A. Aprea, S. Larran and M. Stocco, 2009. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato using naturally occurring fungal antagonists. Archives of Phytopathology and Plant Protection 42 (8), 729–737.
- Nunes, C. U. (2002). Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apples and pears with the combination of *Candida sake* and *Pantoea agglomerans*. J. Food Protect., 65, 178-184.
- Pava, E., García-Murillo, P. G., & Cotes-Prado, A. M. (2005). Búsqueda de alternativas de control biológico de *Botrytis cinerea* en la postcosecha de tomate mediante el uso de levaduras. En A. M. Cotes-Prado (Ed.), Las Levaduras Como Alternativa De Control Biológico De Fitopatógenos En Postcosecha De Frutas Y Hortalizas (págs. 17-18). Bogotá: Colciencias, Corpoica.
- Sadfi-Zouaoui N., B. Essghaier, I. Hannachi, M.R. Hajlaoui and A. Boudabous, 2007. First report on the use of moderately halophilic bacteria against stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. Annals of Microbiology 57(3), 337– 339.
- Sadfi-Zouaoui N., B. Essghaier, M.R. Hajlaoui, M.L. Fardeau, J.L. Cayol and B. Ollivier, 2008. Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mould disease on tomato fruits. Journal of Phytopathology 156, 42–52.
- Saito, S., & Susuki, S. (2009). Fungicide Resistant Profiles of *Botrytis cinerea* in a Vineyard. J. ASEV Jpn, 20, 8-14.
- Senthil, R., Prabakar, K., & Rajendran, L. (2011). Efficacy of different biological control agents against major postharvest. Phytopathol. Mediterr., 50, 55-65.
- Van de Peer, & De Wachter Y., R. 1993. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. Comput. Applic. Biosci. 9:177-182.
- Warrior, P. (2000). Living Systems as Natural Crop – Protection Agents. Pest Management Science, 56, 681-687.
- Whipps, J. 2001. Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52:487-511.
- Zapata, J. A. (2004). Selección de de levaduras aisladas de estructuras reproductivas de la mara de castilla (*Rubus glaucus* Benth), para el control del moho gris producido por *Botrytis cinerea*. En J. A.-P.-G. Zapata (Ed.), Las levaduras como alternativa de control biológico de fitopatógenos en postcosecha de frutas y hortalizas. (págs. 18-19). Mosquera, Cundinamarca, Colombia: Produmedios.
- Zhao, J., Li, J. & Kong, F. (2003). Biocontrol activity against *Botrytis cinerea* by *Bacillus subtilis* 728 isolated from marine environment. Annals of Microbiology, 53: 2935.

Informe avalado por:

Julio Ernesto Rojas Mesa
Director Centro de Investigación VUAD

Claudia Patricia Pérez Romero
Decano Académico
Facultad de Ciencias y Tecnologías
Vicerrectoría Universidad Abierta y a Distancia



UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA
EDUCACIÓN ABIERTA Y A DISTANCIA

Centro de Investigación
Vicerrectoría Universidad Abierta y a Distancia

