



Fundación para la  
Innovación Agraria

OFICINA DE PARTES 2 FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	18 ABR 2019
Hora	08:20
Nº Ingreso	56404

## INFORME TECNICO FINAL

<b>Nombre del proyecto</b>	“Desarrollo de un probiótico que fortalezca la producción y calidad frutícola de la industria del arándano”
<b>Código del proyecto</b>	PYT-2016-0066
<b>Informe final</b>	
<b>Período informado</b> (considerar todo el período de ejecución)	desde el 01-03-2016 hasta el 01-04-2019
<b>Fecha de entrega</b>	01-04-2019

<b>Nombre coordinador</b>	Erica Eliana Castro Inostroza
<b>Firma</b>	

## INSTRUCCIONES PARA CONTESTAR Y PRESENTAR EL INFORME

- Todas las secciones del informe deben ser contestadas, utilizando caracteres tipo Arial, tamaño 11.
- Sobre la información presentada en el informe:
  - Debe dar cuenta de todas las actividades realizadas en el marco del proyecto, considerando todo el período de ejecución, incluyendo los resultados finales logrados del proyecto; la metodología utilizada y las modificaciones que se le introdujeron; y el uso y situación presente de los recursos utilizados, especialmente de aquellos provistos por FIA.
  - Debe estar basada en la última versión del Plan Operativo aprobada por FIA.
  - Debe ser resumida y precisa. Si bien no se establecen números de caracteres por sección, no debe incluirse información en exceso, sino solo aquella información que realmente aporte a lo que se solicita informar.
  - Debe ser totalmente consistente en las distintas secciones y se deben evitar repeticiones entre ellas.
  - Debe estar directamente vinculada a la información presentada en el informe financiero final y ser totalmente consistente con ella.
- Sobre los anexos del informe:
  - Deben incluir toda la información que complementa y/o respalde la información presentada en el informe, especialmente a nivel de los resultados alcanzados.
  - Se deben incluir materiales de difusión, como diapositivas, publicaciones, manuales, folletos, fichas técnicas, entre otros.
  - También se deben incluir cuadros, gráficos y fotografías, pero presentando una descripción y/o conclusiones de los elementos señalados, lo cual facilite la interpretación de la información.
- Sobre la presentación a FIA del informe:
  - Se deben entregar tres copias iguales, dos en papel y una digital en formato Word (CD o pendrive).
  - La fecha de presentación debe ser la establecida en el Plan Operativo del proyecto, en la sección detalle administrativo. El retraso en la fecha de presentación del informe generará una multa por cada día hábil de atraso equivalente al 0,2% del último aporte cancelado.
  - Debe entregarse en las oficinas de FIA, personalmente o por correo. En este último caso, la fecha válida es la de ingreso a FIA, no la fecha de envío de la correspondencia.
- El FIA se reserva el derecho de publicar una versión del Informe Final editada especialmente para estos efectos.

## CONTENIDO

<b>INFORME TECNICO FINAL</b> .....	1
CONTENIDO .....	3
1. ANTECEDENTES GENERALES .....	4
2. EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO .....	4
3. RESUMEN EJECUTIVO .....	4
4. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO.....	9
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE).....	9
6. RESULTADOS ESPERADOS (RE) .....	10
7. CAMBIOS Y/O PROBLEMAS DEL PROYECTO.....	37
8. ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO.....	41
9. POTENCIAL IMPACTO .....	42
10. CAMBIOS EN EL ENTORNO .....	44
11. DIFUSIÓN.....	42
12. PRODUCTORES PARTICIPANTES .....	46
13. CONSIDERACIONES GENERALES .....	46
14. CONCLUSIONES .....	49
14.1.1 .....	
14.1.2 .....	
14.1.n .....	
15. RECOMENDACIONES.....	49
16. ANEXOS.....	51
17. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	206

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre Ejecutor:	Universidad San Sebastián
Nombre(s) Asociado(s):	BerBerries SpA
Coordinador del Proyecto:	Erica Eliana Castro Inostroza
Regiones de ejecución:	Región del Bío Bío
Fecha de inicio iniciativa:	Marzo 2016
Fecha término Iniciativa:	Marzo 2019

## 2. EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO

Costo total del proyecto		
Aporte total FIA		
Aporte Contraparte		

Acumulados a la Fecha		Monto (\$)
<b>Aportes FIA del proyecto</b>		
1. Aportes entregados	Primer aporte	
	Segundo aporte	
	Tercer aporte	
	Cuarto aporte	
	Quinto aporte	
	Sexto aporte	
	n aportes	
2. Total de aportes FIA entregados (suma N°1)		
3. Total de aportes FIA gastados		
4. Saldo real disponible (N°2 – N°3) de aportes FIA		
<b>Aportes contraparte del proyecto (Ejecutor y asociados)</b>		
1. Aportes Contraparte programado	Pecuniario	
	No Pecuniario	
2. Total de aportes Contraparte gastados	Pecuniario	
	No Pecuniario	
3. Saldo real disponible (N°1 – N°2) de aportes Contraparte	Pecuniario	
	No Pecuniario	

### 3. RESUMEN EJECUTIVO

#### 3.1 Resumen del período no informado

Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos durante el período comprendido entre el último informe técnico de avance y el informe final. Entregar valores cuantitativos y cualitativos.

Esta última etapa de proyecto estuvo marcada por la realización de ensayos en terreno, especialmente en el fundo “Los Nogales” San Ignacio, Región de Ñuble y la culminación de procesos comprometidos en la ejecución de proyecto.

Las aplicaciones de las formulaciones basadas en cepas ácido lácticas y controles en el huerto Los Nogales, fueron la base para estudios de polinización, productividad y biocontrol de hongos fitopatógenos. Éste estudio consintió en contabilizar y registrar el número de visitas de polinizadores (abejas y abejorros) en plantas de arándano por tratamiento por vez. Se observó que el efecto del tratamiento varía dependiendo del tiempo de aplicación. Se concluyó que la aplicación principalmente de la cepa AB9 mejora significativamente la atracción de los polinizadores en las plantas de arándano, no obstante la cepa AB1B también presentó resultados promisorios (Ver anexo 10).

En la misma localidad de San Ignacio, se evaluó algunos parámetros productivos luego de la aplicación de los cinco tratamientos ya mencionados. Para la evaluación del calibre, se tomó una muestra aleatoria representativa de cada réplica y tratamiento, se determinó el calibre y dureza de los frutos de acuerdo a directrices estipuladas en Protocolos de Exportación. Se observó diferencias estadísticamente significativas, al comparar el efecto en el calibre de los frutos de las cepas AB9 y AB1B en relación a la aplicación del tratamiento comercial basado en microalgas. El análisis de firmeza en una primera cosecha efectuada, demostró que los frutos con mayor firmeza, fueron aquellos tratados con la cepa AB1B. Los frutos tratados con esta bacteria fueron estadísticamente más firmes que aquellos tratados con la cepa AB9, mezcla de cepas y ambos controles. La aplicación de la mezcla de cepas AB9 y AB1B de la misma forma, mostró resultados promisorios en los frutos analizados, existiendo diferencias con significancia estadística al comparar la aplicación de la mezcla en relación al control negativo ( $p < 0,05$ ). La aplicación de la cepa AB1B otorga claramente cualidades apetecidas en sistemas de producción frutal, al ser la firmeza un indicador de calidad y estabilidad en los frutos, y un mayor calibre se relaciona directamente con mayores ingresos económicos (ver anexo 12).

Efectos biocontroladores fueron también evaluados en la incidencia de *Botrytis* en floración y frutos en la temporada 2018-2019 en el huerto Los Nogales en la localidad de San Ignacio y huerto orgánico de la Universidad de Concepción en Chillán. Muestras de flores incubadas en cámara húmeda evidenciaron que el hongo más recurrente fue *Botrytis cinerea*, que en el experimento se observó en el 43,4% de las flores. Si bien no existieron diferencias estadísticamente significativas, se observó que la mezcla de cepas ácido lácticas (AB1B+AB9), exhibió el menor nivel de *B. cinerea* con 22,2 unidades porcentuales promedio menos que el tratamiento control absoluto, las flores tratadas con

la cepa AB1B mostró 16,6 unidades porcentuales menos que el grupo control (ver anexo 14).

La evaluación de frutos cosechados en San Ignacio, después de un almacenaje de postcosecha de 20 días en frío, no arrojó diferencias estadísticas entre tratamientos para los frutos sanos ( $P=0,83$ ) ni para aquellos infestados por *B. cinerea* ( $P=0,588$ ). El daño por *B. cinerea* en los frutos alcanzó promedio para el experimento un 17,4% de los frutos y la presencia de este hongo fue similar para todos los tratamientos, a pesar de que la mezcla de cepas lácticas tuvo 15 unidades porcentuales menos que el tratamiento control fungicida comercial (Ver anexo 18).

En esta etapa se realizaron gestiones para realizar ensayos en frutillas, se evaluó el efecto biocontrolador de las formulaciones basadas en bacterias lácticas sobre la incidencia natural de *Botrytis cinerea* sobre frutos de frutilla en San Ignacio. Los tratamientos basados en las cepas lácticas AB1B, mezcla de cepas y cepa AB9, tuvieron entre 5 y 13,9 unidades porcentuales menos que el tratamiento control absoluto (agua). (Ver anexo 19). Así, se iniciaron también pilotajes en la comuna de Contulmo en productores de frutilla blanca y otros berries.

Mediante pruebas colorimétricas se analizó el contenido de antioxidantes en frutos. Se analizaron muestras de frutos frescos de arándanos, los cuales en período de precosecha fueron aplicados al menos dos veces con cepas de este proyecto, como con un formulado orgánico. Los resultados indicaron que los frutos tratados con la formulación con la cepa AB9USS presentaron mayor producción de polifenoles totales en relación a los cultivos de arándano control tratados solo con agua o con el producto orgánico. La mayor producción de polifenoles totales en frutos tratados con la formulación basada en la cepa AB9USS, se relaciona con mayores aportes de antioxidantes en la dieta de los potenciales consumidores de estos frutos.

Como actividad de difusión final, se llevó a cabo el seminario de cierre de proyecto, en la localidad de Contulmo, Región del Biobío. Este seminario en terreno contó con la participación de 36 personas, principalmente ligadas al fomento, producción agrícola e investigación universitaria. Destacando la participación de una delegación de Prodesal, INIA, INDAP, SAG, productores locales de berries, académicos y comunidad de la zona (ver anexo 22).

### 3.2 Resumen del proyecto

Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos durante todo el período de ejecución del proyecto. Entregar valores cuantitativos y cualitativos.

La creciente industria hortofrutícola a nivel mundial debe controlar los aspectos productivos que limitan la producción de estos productos. Entre otros riego, nutrición vegetal, fitopatógenos, aspectos relacionados a cosecha y post cosecha. La producción de alimentos en ecosistemas agrarios implican normalmente el uso intensivo de fertilizantes y plaguicidas y en menor medida los productores más pioneros incorporan además bioestimulantes.

Las exportaciones chilenas de arándanos frescos en el periodo 2017-2018, alcanzaron las 110.000 toneladas, ubicando a nuestro país en el primer lugar del hemisferio sur con un incremento de 6% de las exportaciones. Sin embargo, la producción creciente de los berries debe controlar variables como riego, nutrición vegetal, la presencia de fitopatógenos y aspectos relacionados a la cosecha y post cosecha. Particularmente, la proliferación de hongos patógenos como *Botrytis cinérea* que origina el "moho gris", es causa de pérdidas devastadoras. Según un estudio del Comité de Arándanos de la Asociación de Exportadores de Frutas de Chile, se identificó que sólo 64% de los envíos a Estados Unidos llega al consumidor final. Es decir, por cada kilo de fruto, sólo son vendidos 640 gramos de fruto.

Una alternativa para mejorar el control fitosanitario del arándano, es el uso de microorganismos como las bacterias ácido - lácticas (BAL), las cuales tienen una diversidad de beneficios para humanos, animales y plantas. En el marco de esta iniciativa FIA se desarrolló un bioestimulante y bioprotector, proceso de fabricación y usos del mismo en el área agrícola. El bioestimulante y bioprotector presentó mejora en parámetros productivos y acción antimicrobiana, además de poseer características como potenciadora del crecimiento y polinización para arándanos y frutillas, asegurando una mayor calidad y estabilidad postcosecha. La formulación del bioestimulante y bioprotector se basa en bacterias de la familia *Lactobacillaceae* aislados de insectos polinizadores y entorno silvestre. Las Bifidobacterias y lactobacilos son parte importante de la microbiota de abejas y abejorros, así como comensales de humanos, insectos y animales, siendo reconocidos como microorganismos de grado alimenticio, inocuos y empleados ampliamente como cepas probióticas. Bacterias ácido lácticas (BAL), han demostrado mejora de plantas y frutos, asociadas a desarrollo y rendimiento de estos últimos y actividad biocida contra fitopatógenos que afectan la producción agrícola, como *Botrytis cinerea*, *Pseudomonas syringae* y similares. Adicionalmente son productoras de ácido láctico como principal metabolito de fermentación, el cual es considerado un compuesto antimicrobiano y

asociado con funciones de atracción de insectos polinizadores y delimitación de la zona de trabajo de éstos, haciendo más eficiente el proceso de polinización. Debido a la importancia de la polinización en ecosistemas agrícolas, el contar con microorganismos que puedan incrementar la tasa de polinización en flores es un beneficio adicional importante del bioestimulante y bioprotector desarrollado. Adicionalmente, BAL, debido a su capacidad de síntesis enzimática y generación de elementos de micronutrientes, pueden ser empleadas como microfertilizante, aportando trazas de calcio y aminoácidos, importantes para la cuaja, viabilidad, y posterior calidad de los frutos, otorgando además vigor a la planta.

Los resultados obtenidos en el marco de este proyecto son promisorios y generó la instauración de una nueva línea de I&D asociada al empleo de BAL en la agricultura, favoreciendo una práctica sustentable en un contexto de cambio climático. Se ha fortalecido un equipo de investigación multidisciplinario y alianzas con la empresa acompañante y productores que avizoran una positiva transferencia. Se ha adjudicado un proyecto de difusión tecnológica a través del cual se ha comenzado a realizar pilotajes para ocupar la tecnología desarrollada en productores del rubro.

#### 4. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Desarrollar un preparado biotecnológico y ambientalmente inocuo a base de una cepa probiótica, con impacto sanitario y productivo en la industria del arándano.

#### 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

##### 5.1 Porcentaje de Avance

El porcentaje de avance de cada objetivo específico se calcula luego de determinar el grado de avance de los resultados asociados a éstos. El cumplimiento de un 100% de un objetivo específico se logra cuando el 100% de los resultados asociados son alcanzados.

Nº OE	Descripción del OE	% de avance al término del proyecto <sup>1</sup>
1	Validar <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> la acción probiótica de las cepas seleccionadas sobre aspectos productivos y fitosanitarios del cultivo del arándano.	100%
2	Producir tecnológicamente a escala piloto, un prototipo probiótico con potencial comercial en la industria del arándano.	100%
3	Validar en ensayos de campo el impacto del prototipo diseñado sobre aspectos productivos y fitosanitarios del cultivo del arándano.	100%
4	Diseñar las bases del modelo de escalamiento y de transferencia del proceso productivo y resultados obtenidos.	100%

<sup>1</sup> Para obtener el porcentaje de avance de cada Objetivo específico (OE) se promedian los porcentajes de avances de los resultados esperados ligados a cada objetivo específico para obtener el porcentaje de avance de éste último.

## **6. RESULTADOS ESPERADOS (RE)**

Para cada resultado esperado debe completar la descripción del cumplimiento y la documentación de respaldo.

### **6.1 Cuantificación del avance de los RE al término del proyecto**

El porcentaje de cumplimiento es el porcentaje de avance del resultado en relación con la línea base y la meta planteada. Se determina en función de los valores obtenidos en las mediciones realizadas para cada indicador de resultado.

El porcentaje de avance de un resultado no se define según el grado de avance que han tenido las actividades asociadas éste. Acorde a esta lógica, se puede realizar por completo una actividad sin lograr el resultado esperado que fue especificado en el Plan Operativo. En otros casos se puede estar en la mitad de la actividad y ya haber logrado el 100% del resultado esperado.

Nº O E	Nº R E	Resultado Esperado <sup>2</sup> (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real <sup>8</sup>	% de cumplimiento
			Nombre del indicador <sup>3</sup>	Fórmula de cálculo <sup>4</sup>	Línea base <sup>5</sup>	Meta del indicador <sup>6</sup> (situación final)	Fecha alcance meta programada <sup>7</sup>		
1	1	Obtención de cepas con potencial rol biotecnológico	Lactobacilos con resistencia y/o tolerancia a condiciones medioambientales.	Nº cepas seleccionadas / total de cepas investigadas	0	3	30.07.16	30.07.16	100%

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Previo a la ejecución de este proyecto FIA, nuestro equipo de investigación ya disponía de resultados experimentales que sirvieron como base para la adjudicación de este fondo. Específicamente, nuestro trabajo permitió la conformación de un cepario de 21 bacterias ácido-lácticas aisladas desde el tracto intestinal de abejas silvestres (6 cepas) y bosque nativo (15 cepas) con potencial acción benéfica. Éstos microorganismos fueron identificados molecularmente mediante reacción PCR (reacción en cadena de la polimerasa), asociando las cepas al grupo bacteriano ácido láctico. De esta forma, se aseguró un conjunto de microorganismos idóneos para su posterior estudio de caracterización y la aplicación de criterios de selección.

Una vez iniciada la ejecución, efectuadas las modificaciones sugeridas en el plan operativo, se procedió a caracterizar exhaustivamente cada uno de los aislados microbianos con el fin de generar perfiles comparativos que nos permitiese discernir y seleccionar de manera correcta. De esta forma se efectuó un *screening* que contempló el estudio de las propiedades superficiales bacterianas, ejecutando pruebas de hidrofobicidad de la superficie bacteriana, autoagregación, adhesión a proteínas extracelulares; pruebas de tolerancia a diversos grados de acidez (pH 3, 4, 5 y 7); producción de metabolitos con acción antagónica como ácido láctico. Con microorganismos que mostraron perfiles promisorios se efectuó una identificación genética en base a secuenciación parcial de ADN que codifica para ARN ribosomal subunidad 16S, fragmento genético muy empleado en genotipificación. Así, la cepa AB1B correspondió a *Lactobacillus kunkeii*, las cepas AB4, AB5B y AB9 fueron identificadas como *Pediococcus acidilactici*.

De este proceso de *screening* se estableció que las bacterias: *L. kunkeii* AB1B, y las cepas AB4, AB5B y AB9 de la especie *Pediococcus acidilactici*, son los microorganismos que cumplen de mejor forma los criterios de selección aplicados, conformando así un subgrupo de bacterias con el mayor potencial de aplicación.

<sup>2</sup> Resultado Esperado (RE): corresponde al mismo nombre del Resultado Esperado indicado en el Plan Operativo.

<sup>3</sup> Nombre del indicador: corresponde al mismo nombre del indicador del Resultado Esperado descrito en el Plan Operativo.

Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 1. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES PREVIOS AL PROYECTO. (Página 51)

ANEXO 2. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS LÁCTICAS AISLADAS DE ABEJAS Y BOSQUE NATIVO.(Página 52)

---

<sup>4</sup> Fórmula de cálculo: corresponde a la manera en que se calculan las variables de medición para obtener el valor del resultado del indicador.

<sup>5</sup> Línea base: corresponde al valor que tiene el indicador al inicio del proyecto.

<sup>6</sup> Meta del indicador (situación final): es el valor establecido como meta en el Plan Operativo.

<sup>7</sup> Fecha alcance meta programada: es la fecha de cumplimiento de la meta indicada en el Plan Operativo.

<sup>8</sup> Fecha alcance meta real: es la fecha real de cumplimiento al 100% de la meta. Si la meta no es alcanzada, no hay fecha de cumplimiento.

Nº O E	Nº R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
1	2	Pool de lactobacilos con rol probiótico en arándanos.	Lactobacilo con acción sobre un fitopatógeno prevalente del arándano.	Nº cepas con capacidad antipatógena/fitopatógenos ensayados	0	1	30.07.16	30.07.16	100%

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

#### **Pruebas de antagonismo y antibacterianas.**

Se determinó propiedades antagonistas de 8 cepas lácticas, de acuerdo a los resultados obtenidos, existe un subconjunto de tres cepas ácido lácticas, AB5B, AB4 y AB1B, que tienen el mayor potencial de control de fitopatógenos de importancia para la industria del arándano, como lo son la bacteria *Pseudomonas syringae* y el hongo *Botrytis cinerea*. Adicionalmente, las cepas AB1B y AB9 tuvieron un efecto inhibitorio sobre *Neofusicoccum*

#### **Producción de peróxido de hidrógeno.**

La determinación de la producción de peróxido de hidrógeno de las BAL (bacterias ácido lácticas) se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Felten et al., 1999. La identificación de bacterias productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se evidenció por la formación de pigmentos azules alrededor de las colonias además de la inclusión del pigmento, de las 8 cepas estudiadas sólo una (AB-4) es productora de peróxido de hidrógeno, la producción de ésta sustancia es relevante para limitar el crecimiento de otras bacterias ya que el peróxido de hidrógeno tiene características bactericidas y pudiese ser una de las vías de inhibición de patógenos, sin embargo existen otras formas de inhibir como el ácido láctico o las bacteriocinas.

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 3. PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y ANTIBACTERIANAS (página 65).

ANEXO 4. PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (página 69).

Nº O E	Nº R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
1	3	Cepa probiótica para arándanos con estándares europeos	Lactobacilo con estándares internacionales de resistencia antibiótica	Nº lactobacilos con rango UE/total cepas investigadas	0	1	30.07.16	30.07.16	100%	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Se utilizó el método E-test (ABBIODISK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante para la evaluación de la susceptibilidad antibiótica. La determinación de resistencia antibiótica es una prueba relevante en la selección de bacterias que serán empleadas en el medioambiente, lo cual se rige por normativa que debe cumplir los estándares internacionales.

Las cepas bacterianas analizadas poseen un reducido perfil de resistencia, entre los que se encuentran principalmente streptomycin, vancomycin, metronidazole, and in lesser degree para amikacin, ciprofloxacin and netilmicin. La mayor parte de la resistencia encontrada es considerada resistencia intrínseca y no móvil, sin embargo, se excluyó un microorganismo que presentó un perfil riesgoso y se expuso evidencia de la inocuidad de microorganismos que cumplieron con los estándares deseados.

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 5. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA. (página 70)

Nº O E	Nº R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
2	1	Producción de biomasa estable que conserve sus propiedades originales.	Biomasa probiótica con mínimo 10E8 y estable a 90 días de producción	UFC/gr de biomasa seca al día 90	0 UFC/gr	10 <sup>8</sup> UFC/gr	30.03.17	30.03.17	100%	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

En esta etapa, se desarrollaron estudios cinéticos de crecimiento de las cepas ácido lácticas AB

1B, AB4, AB5B y AB9 en medio comercial MRS y en medio de cultivo a base de lactosuero, con y sin hidrolizar la lactosa. Se utilizó el modelo cinético de Gompertz para modelar las fases de latencia, exponencial y estacionaria de las cepas. Se encontró que en general las cepas cultivadas en medio a base de lactosuero hidrolizado igualaron o superaron el crecimiento obtenido en el medio comercial MRS.

Estimaciones efectuadas por el grupo de ingeniería que ejecuta el proyecto, indican que el costo de producción a mayor escala se reduce en un 33% si se utiliza el medio a base de lactosuero hidrolizado comparado con el medio comercial MRS.

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 6. DISEÑO DEL PROCESO PRODUCTIVO DE BIOMASA DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS SELECCIONADAS A ESCALA DE LABORATORIO (página 76).

Nº O E	Nº R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
2	2	Partida productiva a escala piloto de probiótico para arándano.	Prototipo probiótico para arándanos estable a 90 días de almacenaje.	UFC/ml producto al día 90	10 <sup>9</sup> UFC/gr	10 <sup>8</sup> UFC/gr	30.09.17	30.09.17	100%	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Se estudió la obtención de un preparado probiótico para arándanos utilizando la técnica de secado por atomización a escala piloto. Definidas las variables del proceso, se evaluó la aplicación de tres medios encapsulantes,

En el desarrollo de estas actividades se obtuvo que independiente de los medios encapsulantes, el almacenamiento de la biomasa de las cepas AB1B, AB4, AB5B y AB9 en material trilaminado al vacío mantiene una viabilidad de  $1 \times 10^8$  UFC/g aproximadamente hasta el día 180 tanto en almacenaje a 4°C e incluso a temperatura ambiente.

Con el propósito de demostrar la inocuidad de este prototipo, se realizó un estudio en animales, en los cuales no se apreciaron efectos adversos al consumir una dosis de  $10^8$  UFC/ratón/día durante una semana, los parámetros microbiológicos demostraron permanecer estables. A nivel inmunológico, se observó en este modelo que la administración vía oral de las tres cepas no induce cambios en el hematocrito. Tampoco provocaría infección como una bacteria patógena. Ni tampoco genera inflamación local ni sistémica.

Estos resultados demuestran la obtención de un preparado piloto estable, el cual al ser aplicado en el ambiente y consumido por personas no provocaría efecto adverso alguno.

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 7. DESARROLLO DE UN PROCESO DE FABRICACIÓN DEL PREPARADO EN POLVO (página 87).

ANEXO 8. EVALUACIÓN DE INOCUIDAD IN VIVO DEL PROTOTIPO MEDIANTE UN MODELO MURINO.(página 95).

N° O E	N° R E	Resultado o Esperado o (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
2	3	Impregnación del suelo por la cepa probiótica LBL.	Índice de colonización del suelo por la cepa probiótica	UFC/m <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup> UFC/ m <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup> UFC/m <sup>2</sup>	30.10.17		100%	
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.										

El estudio microbiológico de suelo, se efectuó en muestras de suelo obtenidas desde el huerto perteneciente al fundo "San Florencio" en Monteáguila y huerto "Los Nogales" en San Ignacio.

En Monteáguila, se determinó la viabilidad, estabilidad y modulación de la microbiota de suelo tratado con el prototipo de la formulación biotecnológica en relación a tratamientos antifúngicos comúnmente empleados en la industria, así como tratamiento control negativo. En el recuento microbiológico, pudimos observar que luego de transcurrida una hora desde la aplicación, el recuento de cepas lácticas es abundante en todos los tratamientos, alrededor de  $10^4$  UFC/g de suelo, el grupo control, tratado con agua, como es de esperar, mostró los menores recuentos. Sin embargo, llama la atención el alto recuento obtenido en T6, tratado con producto comercial Bellis, donde se cuantificó sobre  $10^5$  UFC/g de suelo. Esto puede deberse a que el producto comercial favorece la presencia de cepas lácticas limitando el crecimiento de otras, o simplemente debido a deriva de los tratamientos. El siguiente monitoreo, que fue realizado nueve días después de la aplicación, mostró predominancia en los recuentos hechos en T3, tratado con cepa ácido láctica AB9, manteniéndose un recuento aún mayor a  $10^4$  UFC/g de suelo. Todos los demás tratamientos mostraron una disminución de bacterias lácticas, sin embargo, estas logran permanecer viables disminuyendo aproximadamente un ciclo logarítmico, lo cual demuestra una gran capacidad de colonización y resistencia de las bacterias hacia las condiciones abióticas y bióticas del microhábitat, como exposición solar, humedad, y factores microecológicos. Los recuentos de bacterias Gram negativas totales luego de una hora post-aplicación alcanzaron entre  $10^5 - 10^6$  UFC/g de suelo.

A su vez, en el huerto "Los Nogales", se efectuó una toma de muestras de suelos no tratados subyacentes a la zona de aplicación de cada uno de los tratamientos experimentales, resultados que fueron comparados a los obtenidos en recuentos microbiológicos realizados en suelos tratados con cada uno de los siguientes tratamientos: Tratamiento 1: Control (agua), Tratamiento 2: Cepa AB9, Tratamiento 3: Cepa AB1B, Tratamiento 4: Mezcla de cepas, Tratamiento 5: Control comercial en base a microalgas.

Los resultados indicaron que la aplicación de cada uno de los tratamientos basados en cepas ácido lácticas, se manifiestan en un aumento significativo de recuento de bacterias ácido lácticas totales. Además se observó que en el tratamiento control (agua), también existe un aumento de la cantidad de microbiota ácido láctica, lo cual pudo deberse a deriva al momento de la aplicación o lo que podría ser más interesante, una ampliación de la zona de colonización microbiológica por éste tipo de bacteria. Es importante notar además, que el tratamiento control comercial, fue el único que mostró un descenso en el recuento de bacterias ácido lácticas posterior a la aplicación de éstas, lo cual puede deberse a efectos inhibitorios ocasionados por algún componente de esta formulación.

De este análisis se puede concluir que existe un efecto modulador de las cepas lácticas con las cuales fue tratado cada uno de los suelos, observado mayores recuentos luego de una hora post-aplicación, pero manteniéndose un efecto modulador por nueve días. Además se pudo determinar que la aplicación de las formulaciones basadas en cepas ácido lácticas se relaciona con un mayor recuento de microorganismos luego de la aplicación, incluso en zonas control solo tratadas con agua, pero no así en zonas donde se aplicó tratamiento comercial basado en

microalgas, formulación que es probable inhibe la colonización de bacterias ácido lácticas, probablemente por algún componente de la formulación.

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 9. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE SUELO TRATADO CON PROTOTIPO BIOTECNOLÓGICO (página 108).

N° O E	N° R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
3	1	Polinización aumentada en sembrados con probiótico	Índice de polinización	N° flores visitadas por polinizadores x minuto una vez a la semana/período floración arándano	3	5	30.01.19	30.01.2019	100%

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Para poner a prueba el efecto de los tratamientos sobre la visita de polinizadores, se realizaron 3 salidas a terrenos, donde por periodos de 20 minutos se contabilizó y registró el número de visitas de polinizadores (abejas y abejorros) a 12 plantas de arándano por tratamiento por vez. Los tratamientos aplicados fueron: Tratamiento 1: AB9, Tratamiento 2: AB1B, Tratamiento 3: Agua, Tratamiento 4: Mezcla de cepas, Tratamiento 5: Químico comercial.

Se observa que el efecto del tratamiento varía dependiendo del tiempo de aplicación, en la primera medición, no se observa un efecto significativo de los tratamientos sobre el número de visitas de abejas ni de abejorros.

En la segunda medición, se observó un efecto significativo del tratamiento sobre el número de visitas de abejas y el número de visitas de abejorros. El número de visitas de abejas es significativamente mayor en el tratamiento AB9 que en los tratamientos AB1B ( $Z = -2,918$ ;  $v-p = 0,004$ ), Agua ( $Z = -2,686$ ;  $v-p = 0,007$ ), Mezcla de cepas ( $Z = -2,657$ ;  $v-p = 0,008$ ), Químico comercial ( $Z = -2,108$ ;  $v-p = 0,035$ ) y 6 ( $Z = -3,294$ ;  $v-p = 0,001$ ). El número de visitas de abejorros es significativamente mayor en el tratamiento AB9 que en los tratamientos Agua ( $Z = -2,134$ ;  $v-p = 0,033$ ) y Químico comercial ( $Z = -2,134$ ;  $v-p = 0,033$ ). Adicionalmente, el número de visitas de abejorros es significativamente mayor en el tratamiento Mezcla de cepas que en los tratamientos AB1B ( $Z = -2,064$ ;  $v-p = 0,039$ ), Agua ( $Z = -3,023$ ;  $v-p = 0,003$ ) y Químico comercial ( $Z = -3,023$ ;  $v-p = 0,003$ ).

En la tercera medición, se observa un efecto significativo del tratamiento únicamente sobre el número de visitas de abejas. El número de visitas de abejas en el tratamiento AB9 es significativamente mayor que en los tratamientos Agua ( $Z = -2,685$ ;  $v-p = 0,007$ ), Mezcla de cepas ( $Z = -2,195$ ;  $v-p = 0,028$ ), y químico comercial ( $Z = -2,916$ ;  $v-p = 0,002$ ). Por otra parte, el número de visitas de abejas en el tratamiento AB1B es significativamente mayor que en los tratamientos agua ( $Z = -2,626$ ;  $v-p = 0,009$ ), Químico comercial ( $Z = -2,830$ ;  $v-p = 0,005$ ).

Por lo tanto, podemos concluir que la aplicación de la cepa AB9 mejora significativamente la atracción de los polinizadores en las plantas de arándano.

Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 10. EFECTO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE POLINIZACIÓN DE ARANDANOS (página 114).

Nº O E	Nº R E	Resultado o Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
3	2	Incremento en la producción de arándanos tratados con probióticos.	Rendimiento del cultivo de arándanos por ha	Ton/ha	7,8	8,0	30.01.19	100%	100%
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.									

La evaluación del rendimiento productivo en relación a la aplicación de las formulaciones biotecnológicas basadas en cepas probióticas, se fundamentó en el análisis de calibre de frutos cosechados y la firmeza que estos presentaron al momento de la cosecha. Este estudio se llevó a cabo en dos temporadas de cosecha, 2017-2018 en el huerto San Florencio en Monteáguila y temporada 2018-2019 en el huerto Los Nogales en la localidad de San Ignacio.

En ambos eventos experimentales, las formulaciones biotecnológicas y controles comparativos fueron aplicados mediante aspersión de cada tratamiento en un diseño experimental de bloques al azar. Las formulaciones biotecnológicas consistieron en biomasa estabilizada en concentración de aproximadamente  $10^9$  UFC/g de polvo, suspendidas en agua en relación 1g de producto por litro de agua. Para la evaluación del calibre, se tomó una muestra aleatoria representativa de cada réplica y tratamiento y se llevó en refrigeración al laboratorio donde fue determinado el calibre mediante un caliper Vernier manual. La evaluación de la dureza de los frutos se efectuó por medio de un penetrómetro siguiendo las directrices estipuladas en Protocolos de Exportación. Adicionalmente se cuantificó polifenoles totales, como una medida de poder antioxidante.

Los resultados de la temporada 2017-2018, demostraron que los arándanos cosechados en Monteáguila, tratados con las cepas lácticas AB1B, AB5B y AB9 presentaron un calibre significativamente mayor que el control absoluto (agua) y controles referenciales (fungicida orgánico y químico comercial) en las 2 cosechas realizadas ( $p < 0,05$ ). En cuanto a la determinación de firmeza en los frutos cosechados, se pudo determinar que la aplicación de las formulaciones basadas en cepas lácticas resultó en frutos cuya firmeza fue semejante a la registrada para los frutos del grupo control solo tratado con agua. La mayor producción de polifenoles totales en frutos tratados con la formulación basada en la cepa AB9USS, se relaciona con mayores aportes de antioxidantes en la dieta de los potenciales consumidores de estos frutos.

Los resultados de la temporada 2018-2019, demostraron que los arándanos cosechados en San Ignacio, tratados con la cepa AB1B, AB9 se relaciona con un mayor calibre en los frutos cosechados con respecto a plantas tratadas solo con agua, sin embargo estos datos no fueron estadísticamente significativos. Sí se observó diferencias estadísticamente significativas, al comparar el efecto en el calibre de los frutos de las cepas AB9 y AB1B en relación a la aplicación del tratamiento comercial basado en microalgas. Pudimos además evidenciar en estas muestras que la cepa AB9 se asocia con los mayores calibres en relación al grupo control tratado con agua ( $p = 0.0553$ ) y control comercial ( $p < 0,0001$ ). El análisis de firmeza en una primera cosecha efectuada, demostró que los frutos con mayor firmeza, fueron aquellos tratados con la cepa AB1B. Los frutos tratados con esta bacteria fueron estadísticamente más firmes que aquellos tratados con la cepa AB9, mezcla de cepas y ambos controles. La aplicación de la mezcla de cepas AB9 y AB1B de la misma forma mostró resultados promisorios en los frutos analizados, existiendo diferencias con significancia estadística al comparar la aplicación de la mezcla en relación al control negativo ( $p < 0,05$ ), no así al control comercial que mostró resultados bastante satisfactorios pero inferiores a la aplicación de la cepa AB1B y mezcla de bacterias lácticas.

La aplicación de la cepa AB1B otorga claramente cualidades apetecidas en sistemas de producción frutal, al ser la firmeza un indicador de calidad y estabilidad en los frutos, y un mayor calibre se relaciona directamente con mayores ingresos económicos.

Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 11. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN ARÁNDANOS CV. O'NEAL COSECHADOS EN HUERTO SAN FLORENCIO, MONTEÁGUILA. (página 118).

ANEXO 12. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y POST-COSECHA EN PLANTARES DE ARÁNDANOS VARIEDAD DIUC EN HUERTO "LOS NOGALES" SAN IGNACIO. (página 124).

N° O E	N° R E	Resultado o Esperado o (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
3	3	Bajo índice de <i>Botritis</i> a nivel de campo	% pérdida de arándanos por infección	% g fruta no apta x 100) / kg fruta apta	10	6	30.09.18	30.09.18	100%
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.									

La evaluación de la incidencia de *Botrytis* se efectuó durante las temporadas 2017-2018 en el huerto San Florencio en Monteágula y temporada 2018-2019 en el huerto Los Nogales en la localidad de San Ignacio y huerto orgánico de la Universidad de Concepción en *Chillán*.

#### Temporada 2017-2018.

*Hongos fitopatógenos en floración.* Del total de flores muestreadas en Monteágula y mantenidas en condiciones propicias para la proliferación de hongos por 7 días, se encontró menor incidencia de *B. cinerea* en los tratamientos AB1B, AB9 y fungicida químico "Bellis®".

*Enfermedades de la madera o tallo.* A 5 g de biomasa de las cepas AB1B, AB5B y AB9 en concentración  $10^9$  UFC/g, se le adicionó 3 ml de solución fisiológica, para conformar una pasta. Un total de 3 aplicaciones de cada una de las pastas se efectuaron empleando pinceles, se aplicó principalmente en zonas afectadas por cancro y subyacentes. La aplicación de dos preparaciones en pasta, basadas en biomasa de las cepas AB1B y AB5B lograron disminuir la severidad de enfermedades que afectan la madera o tallo en plantas de arándanos.

#### Temporada 2018-2019.

*Hongos fitopatógenos en floración.* Las muestras de flores incubadas en cámara húmeda no presentaron diferencias significativas entre tratamientos para la incidencia de *B. cinerea* ( $P = 0,599$ ), así tampoco para los otros hongos de los géneros recurrentes que fueron identificados, como fueron *Alternaria* ( $P = 0,31$ ), *Cladosporium* ( $P = 0,45$ ) y *Fusarium* ( $P = 0,77$ ). El hongo más recurrente fue *Botrytis cinerea*, que en el experimento se observó en el 43,4% de las flores. Si bien no existieron diferencias estadísticamente significativas, se observó que la mezcla de cepas ácido lácticas (AB1B+AB9), exhibió el menor nivel de *B. cinerea* con 22,2 unidades porcentuales promedio menos que el tratamiento control absoluto, las flores tratadas con la cepa AB1B mostró 16,6 unidades porcentuales menos que el grupo control.

*Enfermedades de la madera o tallo.* Se comparó los registro de las lesiones obtenidas en el inicio del experimento y luego de transcurridas las 12 semanas de experimento. El análisis estadístico correspondiente a ANOVA de dos vías, demostró que existen diferencias significativas en el tamaño de las lesiones al aplicar la formulación basada en la bacteria AB1B en relación a todos los otros tratamientos. Esta formulación demostró disminuir significativamente las lesiones ocasionadas por el agente fúngico.

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 13. ENSAYOS EN FLORACIÓN DE ARÁNDANOS Y EVALUACIÓN DE BOTRITIS EN TERRENO EN FUNDO "SAN FLORENCIO", MONTEÁGUILA. (página 129).

ANEXO 14. EFECTO CONTROL DE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS Y QUÍMICO SOBRE LA INCIDENCIA DE BOTRYTIS EN FLORES DE ARÁNDANO EN HUERTO ORGÁNICO. (página 133).

ANEXO 15. EVALUACIÓN FORMULACIONES BASADAS EN CEPAS ÁCIDO LÁCTICAS SOBRE FLORES DE ARÁNDANOS EN HUERTO LOS NOGALES, COMUNA DE SAN IGNACIO. (página 137).

ANEXO 16. EFECTOS DE APLICACIÓN DIRECTA DE FORMULACIONES BASADAS EN CEPAS LACTICAS SOBRE ENFERMEDADES DE LA MADERA O TALLO. (página 139).

N° O E	N° R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
3	4	Bajo índice de Botritix en período de guarda	% pérdida de arándanos por infección	% g fruta no apta x 100) / kg fruta apta	8	4	30.09.18	30.09.18	100%

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Se efectuó análisis de la incidencia de Botrytis tanto en frutos cosechados durante la temporada 2017-2018 en Monteáguila y temporada 2019-2019 en San Ignacio.

El análisis de los frutos que fueron cosechados en Monteáguila y sometidos a incubación en cámara húmeda mostraron que no hubo mayor infestación por patógenos en el huerto (80% de los frutos no tuvieron signos de algún hongo fitopatógeno), no hubo diferencias entre tratamientos para el número de frutos sanos ni para el total de frutos infestados con algún micelio de alguna especie de hongo. *Botrytis cinerea*, fue observada en muy baja prevalencia, con un expresión del 0,63% del total de frutos evaluados (n=1440 frutos). Los tratamientos basados en las cepas AB5B y AB9, mostraron una tendencia a reducir en un 66,8% la presencia de *B. cinerea* con respecto al grupo control.

La evaluación de frutos cosechados en San Ignacio, después de un almacenaje de postcosecha de 20 días en frío, no arrojó diferencias estadísticas entre tratamientos para los frutos sanos (P=0,83) ni para aquellos infestados por *B. cinerea* (P=0,588). El daño por *B. cinerea* en los frutos alcanzó promedio para el experimento un 17,4% de los fruto y la presencia de este hongo fue similar para todos los tratamientos, a pesar de que la mezcla de cepas lácticas tuvo 15 unidades porcentuales menos que el tratamiento control fungicida comercial.

Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)  
 Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 17. EVALUACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN FRUTOS DE ARANDANOS CV. O'NEAL COSECHADOS EN HUERTO SAN FLORENCIO, MONTEAGUILA (página 147).

ANEXO 18. EFECTO CONTROL DE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS SOBRE LA INCIDENCIA DE BOTRYTIS EN FRUTOS DE ARÁNDANOS EN FUNDO LOS NOGALES, SAN IGNACIO. (página 153).

ANEXO 19. EFECTO CONTROL DE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS SOBRE LA INCIDENCIA DE BOTRYTIS EN FRUTILLAS. (página ).

Nº O E	Nº R E	Resultado o Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
4	1	Protección de los resultados	Patente de invención	Nº patente ingresada INAPI	0	1	28.02.19		

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Como requisito prioritario en el proceso de redacción de la patente de invención comprometida en este proyecto, se hizo depósito de los microorganismos *Lactobacillus kunkeei* AB1BUSS (DSM32669) y *Pediococcus acidilactici* AB9USS (DSM32954) en el cepario internacional DSMZ de Alemania. Las bacterias fueron depositadas en la modalidad "Depósito con fines de patentamiento", de acuerdo al Tratado de Budapest (figuras 1 y 2).

De forma conjunta, la Oficina de Transferencia y Licenciamiento (OTL) y el Departamento de patentes del Estudio de Abogados Silva, efectuaron la búsqueda en bases de datos de invenciones relacionadas a la formulación resultante de nuestra investigación. De esta forma, el estudio de abogados logró la redacción completa del escrito de la patente, la cual fue enviada electrónicamente al INAPI para su evaluación el día 27 de marzo del 2019.

Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)  
 Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 20. PROTECCIÓN DE LOS RESULTADOS. ENVÍO DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS A CEPARIO INTERNACIONAL DSMZ CON FINES DE PATENTAMIENTO (página 158).

N° O E	N° R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
4	2	Producción científica	Publicación en Corriente internacional.	N° publicaciones	0	1	28.2.19	17.04.19	100%	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

En el marco de este proyecto se ha ingresado la publicación "Efecto del empleo de un preparado a base de bacterias lácticas sobre la polinización de arándanos". Esta es una que se ha generado, pero en el marco de esta iniciativa se están trabajando varias más. Se debe hacer mención que estas publicaciones sólo deben ingresarse después de haber accedido al N° de ingreso de la patente.

Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 21. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA. Se adjunta ingreso de publicación “Efecto del empleo de un preparado a base de bacterias lácticas sobre la polinización de arándanos” en la revista Ciencia e Investigación Agraria y copia del artículo generado (página 162) .

Nº O E	Nº R E	Resultado o Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
4	3	Días de campo para compartir resultados promisorios del producto, efecto en fruta de guarda y resultados en la cosecha y reproducción	Eventos en terreno para compartir resultados obtenidos con otros productores del rubro.	Nº de veces de reuniones con productores del rubro	0	3	23.01.19	28.03.2019	100%	
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.										

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 22. EVENTOS EN TERRENO. DÍAS DE CAMPO(página 173).

N° O E	N° R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
4	4	Modelo de TT para este proyecto.	Documento con las bases del modelo de empaquetamiento del prototipo obtenido.	Número de documentos con estructura de modelo	0	1	28.02.19	30.03.19	100%	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Asociado a esta actividad se ha realizado el modelo de negocio y profundización en el encadenamiento productivo, además de los parámetros a considerar en una simulación de costo beneficio en mayor detalle con más parámetros incorporados al modelo con datos productivos del campo.

La empresa decidió difundir los resultados del proyecto y promoción del producto a través de una plataforma digital, que es la única forma de acceder a los tres tipos de clientes definidos. De esta manera, con lenguaje dirigido a cada segmento, le permitirá ser el apoyo de las ventas para la transferencia tecnológica a los productores.

La plataforma creada está en el link [www.lactofort.cl](http://www.lactofort.cl), la que está en etapa de desarrollo.

Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 23. MODELO DE NEGOCIO PARA EL PROYECTO DESARROLLADO. PAGINA WEB DE SARROLLADA POR EMPRESA ASOCIADA BERBERRIES(página 196).

Nº O E	Nº R E	Resultado o Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcanse meta real	% de cumplimi ento
			Nombre del indicador	Fórmul a de cálculo	Líne a base	Meta del indicador (situació n final)	Fecha alcanse meta programad a		
4	5		Postulaci ón a proyecto de empaquet amiento tecnológic o	Código proyect o ingresa do	0	1	28.02.19	24.11.18	100%

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Pensando en la transferencia tecnológica, se presentó una iniciativa para apoyar la difusión tecnológica de los resultados de este proyecto. Nos hemos adjudicado el proyecto de Difusión tecnológica PDT18PDT-104021 “Fortalecimiento de la producción limpia y aplicación de intervenciones innovadoras amigables con el ambiente, en la producción agropecuaria y agroalimentaria de la Región del Bio Bío”, con el que se ha iniciado un proceso de transferencia de la tecnología. En este contexto, 20 productores de berries harán uso de esta tecnología durante 2019 en la comuna de Contulmo.

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

ANEXO 24. CONVENIO DE ADJUDICACIÓN DE LA INICIATIVA FORTALECIMIENTO DE LA PRODUCCION LIMPIA Y APLICACIÓN DE INTERVENCIONES INNOVADAS AMIGABLES CON EL AMBIENTE, EN LA PRODUCCION AGROPECUARIA Y AGROALIMENTARIA DE LA REGION DEL BIOBIO( (página 205).

## 6.2 Análisis de brecha.

Cuando corresponda, justificar las discrepancias entre los resultados programados y los obtenidos.

Todos los resultados obtenidos fueron logrados. El único desfase en 17 días se produjo con el ingreso de la publicación, la cual no podía ocurrir antes del ingreso de la patente. Se ingresó una publicación, pero de este proyecto se desglosarán dos o tres más que se han comenzado a trabajar.

## 7. CAMBIOS Y/O PROBLEMAS DEL PROYECTO

Especificar los cambios y/o problemas enfrentados durante el desarrollo del proyecto. Se debe considerar aspectos como: conformación del equipo técnico, problemas metodológicos, adaptaciones y/o modificaciones de actividades, cambios de resultados, gestión y administrativos.

Describir cambios y/o problemas	Consecuencias (positivas o negativas), para el cumplimiento del objetivo general y/o específicos	Ajustes realizados al proyecto para abordar los cambios y/o problemas
Lento crecimiento de cepas autóctonas aisladas de abeja y bosque nativo en medio tradicionales.	El escaso desarrollo de las cepas aisladas en medio comercial MRS, generó que todos los estudios se vieran levemente aplazados. Sin embargo, esta situación no afectó el logro de resultados e hitos comprometidos. Positivamente, se generó un protocolo de crecimiento de laboratorio para estas cepas autóctonas que pueden emplearse en otras áreas agrarias.	Se investigó en literatura científica y se probaron suplementaciones al medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS). Tras varias pruebas, se logró estandarizar un medio de crecimiento para las cepas mencionadas.
Cepas patógenas del cultivo del arándano ensayadas.	La obtención de cepas autóctonas de enfermedades del arándano no fue sencilla. Se había contactado algunos equipos de investigación, pero a la hora de concretar la colaboración con las cepas, no se llegó a buen puerto. Finalmente, con el Dr. Ernesto Moya del Laboratorio de Fitopatógenos de la Universidad de Concepción, se logró una alianza estratégica que permitió el desarrollo sin problemas de los ensayos con fitopatógenos.	Dr Ernesto Moya efectuó la evaluación de ensayos de interacción con fitopatógenos.
Obstrucción de la columna para determinación cuantitativa de ácido láctico.	Atraso en unas semanas hasta la llegada del insumo.	Ya fue solicitado el insumo, el que al llegar se ajusta al equipo HPLC y se desarrolla el ensayo.
Salidas a terreno extraordinarias no contempladas en esta etapa.	La aplicación de un preparado piloto comprometido, significó salidas a terreno extraordinarias no contempladas inicialmente en el plan operativo del proyecto. Así, las interacciones con los fitopatógenos se desarrollaron en el laboratorio del Dr. Ernesto Moya, de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción.	Estos ajustes realizados, significaron un desvío del ítem movilización y viáticos en \$324.246., lo que implicó solicitar una reitimización de los aspectos financieros a la agencia. Estos cambios significaron por una parte alianzas de trabajo con el equipo del Dr. Moya, quien

		<p>es un destacado fitopatógeno, experto en la evaluación de biocontroladores. Por otra parte, el haber desarrollado un ensayo piloto preliminar en forma precoz, permite poner a punto y ajustar ensayos posteriores que se realizarán en terreno.</p>
<p>Cambio equipo técnico 4</p>	<p>El cambio de profesional correspondiente al equipo técnico 4 no ocasionó problemas en la ejecución del proyecto ni atrasos en el cumplimiento de los objetivos</p>	<p>Se reemplaza por el Ingeniero Civil Industrial Sr. Ignacio Campos Aravena, jefe de operaciones de la empresa asociada al proyecto Berberries SpA y que formaría parte del equipo de profesionales de nuestra institución.</p>
<p>Clima inestable y de mucha lluvia y frío</p>	<p>La ocurrencia de eventos climáticos en el periodo que se informa ha tenido consecuencias negativas en cuanto al cumplimiento de objetivos específicos como ejemplo una floración y polinización más tardía y errática.</p> <p>Se proyectaba la aparición de botón hinchado a finales de julio, sin embargo esto ocurrió la primera quincena de agosto.</p>	<p>Mayor cantidad de veces que se aplicaría el producto, programando una aplicación semanal debido a la ocurrencia de lluvias.</p>
<p>Intervención bancaria del predio.</p>	<p>En primera instancia pareciera tener consecuencias negativas. Sin embargo, gracias a la gestión de la empresaria asociada y de las explicaciones técnico científicas de parte de nuestro equipo, no hay impedimento en que se continúen los ensayos en forma normal como se han efectuado hasta ahora, lo que fue comunicado por correo oficial).</p>	<p>No obstante a lo anterior, se presenta una oportunidad de generar mayores alianzas. Junto a la empresaria y a la red de contactos a nivel regional, se dispone de varios predios interesados donde realizar pruebas de diagnóstico a partir de esta temporada para realizar ensayos de campo durante el 2018.</p>

<p>Extensa licencia de María José Aguayo (seis meses).</p>	<p>Hubo ue buscar profesionales idóneos que pudieran cubrir en forma eficiente esta ausencia.</p>	<p>Se integró a profesionales que habían realizado su práctica en el laboratorio y se reclutó a colegas ue habían laborado en el equipo para cubrir la contingencia. No hubo atrasos en las actividades.</p>
<p>Predio sin manejo agrícola.</p>	<p>Dependiendo del análisis que se realice ha presentado consecuencias favorables y desventajosas. Por una parte, se han realizado los ensayos en un predio que lamentablemente fue intervenido el último semestre, el cual dejó de recibir todo el manejo de suelo, control de maleza y de riego. En este contexto, los cambios climáticos que se observaron en la última temporada con elevadas temperaturas, lluvias extemporáneas y humedad, paradójicamente protegieron de <i>B. cinérea</i>, la que se ha presentado en bajísimas proporciones. Sin embargo, se ha observado una proporción mayor de otros hongos ambientales en los frutos. Aún en estas condiciones adversas de manejo del predio, se han observado resultados favorables, como el incremento de calibre en las parcelas en las cuales se administraron las cepas lácticas a prueba en este proyecto. Asimismo, el ensayo de impregnación del suelo con las cepas lácticas quedó inconcluso.</p>	
<p>Incorporación de dos nuevos predios: Fundo Los Nogales y centro experimental "EL Nogal" de la UdeC para continuación de estudios. Ingreso de pilotajes en Contulmo.</p>	<p>Como se señaló en el informe anterior, el fundo inicial ya o es parte de la empresa. De ahí que se han incorporado dos predios y productores de Contulmo.</p>	<p>Se presentó una reitimización para abordar los costos principalmente de salidas a terreno.</p>
<p>La principal modificación efectuada al plan operativo aprobado por</p>	<p>Esta modificación no significó mayores modificaciones en los compromisos establecidos, sino que permitió efectuar un cierre de proyecto que incluyó los</p>	<p>El ajuste principal es un desfase de unas semanas en la entrega de informe técnico y financiero de cierre del proyecto, que</p>

<p>FIA en la última etapa de proyecto, correspondió a la extensión de un mes en la fecha de cierre del proyecto</p>	<p>resultados obtenidos en la última temporada de cosecha.</p>	<p>consideramos no significativos.</p>
---	--	--

## **8. ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO**

### **8.1 Actividades programadas en el plan operativo y realizadas durante el período de ejecución para la obtención de los objetivos.**

Todas las actividades programadas en el plan operativo fueron realizadas durante el período de ejecución para la obtención de los objetivos.

### **8.2 Actividades programadas y no realizadas durante el período de ejecución para la obtención de los objetivos.**

Todas las actividades programadas fueron realizadas.

### **8.3 Analizar las brechas entre las actividades programadas y realizadas durante el período de ejecución del proyecto.**

En el desarrollo del proyecto no se presentaron brechas significativas. Todos los resultados fueron obtenidos dentro de los plazos. Un desfase se observó con el análisis de suelos, que al cambiar de sitio para el desarrollo de los ensayos y al quedar al descuido debido a las razones explicadas en su momento, no serían confiables los resultados. Estos se completaron a cabalidad y con resultados sólidos en el predio donde se desarrollaron actividades todo 2018.

## 9. POTENCIAL IMPACTO

### 9.1 Resultados intermedios y finales del proyecto.

Descripción y cuantificación de los resultados obtenidos al final del proyecto, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias; ventas y/o anuales (\$), nivel de empleo anual (JH), número de productores o unidades de negocio que pueden haberse replicado y generación de nuevas ventas y/o servicios; nuevos empleos generados por efecto del proyecto, nuevas capacidades o competencias científicas, técnicas y profesionales generadas.

Se ha obtenido un producto con un alto potencial de comercialización el cual es capaz de competir con las distintas alternativas para el tratamiento y prevención de infecciones fúngicas en el cultivo de berries para mantener la calidad de producción orgánica y que interfiere de forma positiva sobre el rendimiento productivo por hectárea en un 20% añadiendo además características importantes para la comercialización como lo es el incremento del calibre de los frutos, lo que impacta directamente en el precio de comercialización. Respecto a los resultados esperados fueron logrados en su totalidad y con resultados positivos, lo cual permitió ingresar una solicitud de patentamiento para establecer a futuro vinculación y encadenamiento para la producción y distribución del producto con empresas y productores.

Tanto la capacitación del equipo técnico, como los días de campo, permitieron optimizar y generar vínculos para poder expandir el nicho agrícola para la utilización del biocontrolador ya que la producción de alimentos en ecosistemas agrarios implican normalmente el uso intensivo de fertilizantes y plaguicidas y en menor medida los productores más pioneros incorporan además bioestimulantes, actualmente existen productores interesados en probar el producto en cultivos de frutillas y otros berries de alta importancia económica, destacando además el interés de probar productos inocuos para el medioambiente, se realizó un modelo de negocios el cual se resume en el siguiente cuadro:

EL DIAGRAMA SIGU(IEBTE PONER

MODELO DE NEGOCIO CANVAS

Socios Claves	Actividades Claves	Propuesta de Valor	Relación con Clientes	Segmentos de Clientes
Los socios claves del proyecto son: a. Proveedor de Enzimas Probióticas b. Centro de O para posteriores investigaciones c. Revistas especializadas para publicaciones, Reportajes y Marketing d. Proveedores de productos especializados para arándanos y profesionales de sesiones e. ANSA SAG QSDA y otros. Se acuerda liberar que registren probióticos y productos para uso de bioestimulantes probióticos en uvo de arándano otros cultivos.	1. Definición de la vida útil de los probióticos en arándanos y otros cultivos 2. Transformación de los resultados de laboratorio económico 2.1. Evaluación de la efectividad de la producción a. Aumento de la polinización y aumento de calibre c. Disminución de enfermedades de fruto y relación de disminución de pérdidas 1.2. Evaluación de la efectividad de la producción económica a. Calibre de fruto y valor comercial b. Firmeza de fruto y valor comercial c. Firmeza de fruto y estado de infección por hongos d. Estado sanitario de la cosecha y disminución de pérdidas por rechazo de: * Hongos * Control sanitario SAG * Biotino 1.3. Evaluación de la efectividad de la producción en el huerto de arándano y otros cultivos a. Estado sanitario de la planta y enfermedades de la madera y raíces b. Estado sanitario de la planta y evaluación de la cosecha (vitalidad) 2. Determinar la inocuidad del fruto para el ser humano 3. Impactar a la empresa y transferencia tecnológica de la planta 4. Desarrollo de estrategia comercial Recursos Claves Los recursos claves son: * Capacidad de evaluar los resultados de los ensayos y datos económicos transmitibles al cliente * Capacidad de recibir la capacitación en el interior de la empresa y agencias de venta * Capacidad de desarrollar la estrategia comunicacional de la oferta de producto	Desarrollo de un probiótico que fortalecerá el crecimiento de la planta de arándano y mejorará la calidad del fruto, con un producto inocuo para el ser humano y el ecosistema	Se realizarán permanentemente nuevas investigaciones acerca de los beneficios, las que se darán a conocer en: 1) Revistas de Biotecnología y Alimentos 2) Informes de Redes Sociales Canales 1) Contacto directo con productores de Día de Campo, Asesorías y Travencadenamiento productivo, en Chile y el extranjero. Publicación de especializadas, Canales de Redes Sociales 2) Contacto directo con productores de Día de Campo, Asesorías y Travencadenamiento productivo. 3) Canales Online, Redes Sociales	1) Productores de tamaño industrial Productores de menor tamaño Mercado Hobby
Estructura de Costos a. Tratamientos valor del producto (mano de obra, aplicador, insumos, equipo y combustible utilizar) b. Costos de comercialización (productos, visitas a clientes, días de campo, encargos, publicaciones, investigaciones, comisiones comerciales, manejo de redes sociales, etc.) (permanente)	Fuentes de Ingresos El cliente productor estará dispuesto a pagar por el producto, de acuerdo al aumento de sus ingresos, que se le ve reflejado en los siguientes parámetros: Aumento de producción: 1. Mayor producción * 10% más de producto por aumento de calibre * 10% más de producción por aumento de la polinización * Disminución de pérdidas por Botrytis cinerea (10,8%), 2,2% 2. Conservación del huerto (valor residual del proyecto) * Conservación del huerto sano, enfermedades de la madera (5% de plantas más sanas) 3. Aumento en parámetros de calidad de producto * Calibre: Aumento de calibre (valor real del producto 10% más) * Firmeza: o 10% mayor valor real de la fruta o 20% menos de ataques de hongos post cosecha * Ataques fúngicos: 15% menos de ataques por Botrytis en frutos durante la postcosecha estimados de acuerdo a los resultados de los ensayos, sujetos a verificación posterior.			

El modelo de negocios considera la propuesta de valor como: Desarrollo de un probiótico que fortalecerá el crecimiento de la planta de arándano y mejorará la calidad del fruto, con un producto inocuo para el ser humano y el ecosistema, el que considera como fuente de ingreso para el productor del probiótico, la venta directa del preparado, en el caso de productor, al aplicar el producto se consideran 3 puntos fuertes:

1. Mayor producción
  - 10% más de producto por aumento de calibre
  - 10% más de producción por aumento en la polinización
  - Disminución pérdidas por Botrytis cinerea (10,8%)
2. Conservación del huerto (valor residual del proyecto)
  - Conservación del huerto sano, enfermedades de la madera (5% de plantas más sanas)
3. Aumento en parámetros de calidad de producto
  - Calibre: Aumento de calibre (valor real del producto (10% más))
  - Firmeza:
    - o 10% mayor valor real de la fruta
    - o 20% menos de ataques de hongos post cosecha
  - Ataques fúngicos: 15% menos de ataques por Botrytis en frutos durante la postcosecha

La realización de transferencia tecnológica será realizada por Universidad San Sebastián, quien posee la solicitud de patentamiento de la innovación, luego se procederá a realizar difusión del nuevo producto a productores de arándanos con la finalidad de ser más extensiva su utilización y el conocimiento de la tecnología.

La transferencia tecnológica se podrá realizar mediante la venta o licenciamientos *know-how* para la producción y comercialización del nuevo probiótico. Las empresas interesadas en emprender el escalamiento productivo serán empresas productoras biotecnológicas o de productos fitosanitarios, quienes mediante un contrato de venta de licenciamiento de la tecnología con la entidad propietaria (Universidad San Sebastián), emprenderán el negocio de producción, venta y comercialización de un nuevo producto a base de cepa probiótica para la Industria de berries, con la finalidad de poder ofertar el producto a una mayor cantidad de productores.

## 10. CAMBIOS EN EL ENTORNO

Indique si existieron cambios en el entorno que afectaron la ejecución del proyecto en los ámbitos tecnológico, de mercado, normativo y otros, y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

A contar de abril de 2017 existe un acuerdo de homologación de normativas con la de la Unión europea en cuanto a normativas que promuevan el desarrollo de agricultura orgánica.

Se abrieron fondos concursables, como el de la empresa Hortifrut Chile en conjunto con CORFO, los cuales están aportando fondos destinados a mejorar las condiciones de llegada de los berries chilenos a los mercados de destino, los que son cada vez más distantes, innovando para resolver problemas de calidad. Por otra parte el CREA de la Universidad UCSC en conjunto con CORFO, desarrollan una propuesta que aborda la implementación y difusión de alternativas tecnológicas para la reducción de la contaminación microbiológica en el recurso hídrico de su uso productivo en productores de arándanos de la provincia de Biobío.

Si bien los cambios mencionados anteriormente están asociados a las nuevas necesidades del mercado, no implicó un problema directo al desarrollo del proyecto. Desde el punto de vista comercial podrían desarrollarse competidores con el desarrollo de estos proyectos, los cuales continúan siendo teóricos ya que aún se encuentran en ejecución. Otra arista comercial es que se potencia un nicho para el desarrollo y comercialización de nuevos productos que tiendan a potenciar las producciones orgánicas, en este sentido se puede deducir que el nuevo interés productivo y económico respalda la ejecución de este proyecto ya que el manejo fitosanitario habitual emplea el uso intensivo de plaguicidas preventivos conteniendo ingredientes activos de base química, los cuales, si bien controlan eficazmente plagas y enfermedades, conllevan efectos nocivos sobre la producción, el ambiente, los mercados y los trabajadores de esta industria. A nivel de ecosistema se afectan principalmente suelos, cursos de agua y especies de insectos benéficos, normalmente encargados de la polinización.

Buenas prácticas productivas son indispensables hoy en día, incluyendo el uso de fertilizantes y plaguicidas de menor impacto ambiental, de máxima eficacia y con un mínimo o cero residuos a cosecha. En este contexto, una agricultura competitiva demanda elementos de innovación y diferenciación que se encuentren al alcance de cualquier productor. Es así que la utilización de un producto biotecnológico asequible e integral, a base de microorganismos benéficos, entregará un valor agregado a cada huerto, dado que permitirá un control oportuno de plagas complejas, disminuirá el impacto ambiental producido por el constante uso de productos químicos, incrementando el volumen de producción y prolongando la durabilidad del fruto post cosecha.

permitiéndole llegar a destino con la calidad requerida y valor agregado de buenas prácticas productivas.

## 11. DIFUSIÓN

Describa las actividades de difusión realizadas durante la ejecución del proyecto. Considere como anexos el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares.

	Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Documentación Generada
1	28/12/2016	Yumbel	Día de Campo 1	18	Dípticos, PPT Powerpoint. Listado de asistentes.
2	21/12/2016	Concepción	Capacitación 1	8	PPT Powerpoint, Listado asistentes.
3	29/08/2018	San Ignacio	Día de Campo 2	45	Dípticos, PPT Powerpoint. Listado de asistentes.
4	20-12-2017	Concepción	Capacitación 2	15	PPT Powerpoint, Listado asistentes.
5	28-03-2019	Contulmo	Seminario de Cierre	36	Díptico, PPT Powerpoint. Listado de asistentes.
			Total participantes	122	

## 12. PRODUCTORES PARTICIPANTES

Complete los siguientes cuadros con la información de los productores participantes del proyecto.

### 12.1 Antecedentes globales de participación de productores

Debe indicar el número de productores para cada Región de ejecución del proyecto.

Región	Tipo productor	N° de mujeres	N° de hombres	Etnia (Si corresponde, indicar el N° de productores por etnia)	Totales
Nuble	Productores pequeños	0	2		2
	Productores medianos-grandes				
Bio bio	Productores pequeños	2	1	1	3
	Productores medianos-grandes				
<b>Totales</b>		<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	

### 12.2 Antecedentes específicos de participación de productores

Nombre	Ubicación Predio			Superficie Há.	Fecha ingreso al proyecto
	Región	Comuna	Dirección Postal		
David Rodríguez "Agrícola El Coihue Ltda"	Ñuble	San Ignacio		15	Octubre 2018
Sergio Sepúlveda "Agrícola Los Nogales"	Nuble	San Ignacio		115	Agosto 2018
Nelson Marin	Bio bio	Contulmo		1	Diciembre 2018
Silvia Lara	Bio bio	Contulmo		4	Diciembre 2018
Nibia Muñoz	Bio bio	Contulmo		4	Diciembre 2018

## 13. CONSIDERACIONES GENERALES

### 13.1 ¿Considera que los resultados obtenidos permitieron alcanzar el objetivo general del proyecto?

Los resultados obtenidos confirman la obtención del cumplimiento de nuestro objetivo general, logrando desarrollar un preparado biotecnológico y ambientalmente inocuo a base de una cepa

probiótica, con impacto sanitario y productivo en la industria del arándano, el cual ha demostrado dentro de sus características principales, generar una disminución del impacto de infecciones por fitopatógenos en arándanos además de obtener un incremento de calibre en los frutos, lo implica beneficios directos sobre el rendimiento productivo por hectárea. Nuestros resultados además permiten el ingreso de la patente de invención a INAPI.

### **13.2 ¿Cómo fue el funcionamiento del equipo técnico del proyecto y la relación con los asociados, si los hubiere?**

El funcionamiento del equipo técnico en conjunto con la empresa asociada fue excelente, con muy buena retroalimentación de ambas partes, lo que permitió que se pudiera llevar a cabo los estudios acordados y proyectados de acuerdo al plan operativo, pudiendo cumplir con las exigencias y programación, destacando además la disposición a continuar la colaboración post-proyecto. De hecho, estaba incorporada Berberries SpA ya en el segundo año se realizaron ensayos en predios de dos productores, Agrícola Los Nogales y Agrícola el Coihue de San Ignacio y el tercer año además productores de Contulmo coordinados a través del UDEL de la I. Municipalidad.

### **13.3 A su juicio, ¿Cuál fue la innovación más importante alcanzada por el proyecto?**

La principal innovación alcanzada por este proyecto e haber generado dentro de la institución una nueva línea de investigación y desarrollo, como es el empleo de tecnologías amigables como el empleo de las bacterias lácticas, para apoyar una agricultura sustentable en un contexto de cambio climático. Como se ha señalado, después de la adjudicación de este proyecto, como equipo nos hemos adjudicado una iniciativa FONDEF de inocuidad alimentaria y un proyecto de Difusion tecnológica de Fomento BioBio “, se avizora un escenario favorable y pertinente con esta nueva línea de desarrollo.

**13.4 Mencione otros aspectos que considere relevante informar, (si los hubiere).**

Se generó una alianza entre equipos de dos universidades. El equipo del Dr. Ernesto Moya de la Universidad de Concepción fue un asesor en este proyecto FIA. Pero, con el trabajo junto se generó una alianza que actualmente ha presentado otras iniciativas conjuntas.

## 14. CONCLUSIONES

Realice un análisis global de las principales conclusiones obtenidas luego de la ejecución del proyecto.

Con el desarrollo de esta iniciativa:

1. Se ha desarrollado un bioestimulante y bioprotector a base de bacterias lácticas, el que ha sido patentado, con impacto en el cultivo de berries y extendido a la agricultura en general.
2. El prototipo generado, incrementa en los arándanos, el tamaño de los frutos, la firmeza de la piel, la concentración de los polifenoles, la polinización. Respecto al control de fitopatógenos, la composición desarrollada muestra resultados promisorios sobre *Chondrostereum purpureum* y sobre *Botrytis cinérea*.
3. Se ha generado una nueva línea de Investigación & Desarrollo relacionada con el desarrollo de técnicas amigables a base de bacterias benéficas para favorecer una agricultura sustentable. Esto ha prosperado con la adjudicación del proyecto FONDEF ID17AL0035 "Desarrollo de un biocontrolador probiótico para el manejo del tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans*)".
4. Del desarrollo de esta iniciativa se han generado interesantes hipótesis para apoyar el desarrollo de tesis de pre y posgrado, asociadas a dilucidar los mecanismos a través de los cuales se generan los resultados encontrados en los aspectos fitosanitario dl arándano.
5. Los resultados de este proyecto FIA, ha sustentado la adjudicación de un proyecto de Difusión Tecnológica 18PDT-104021 "Fortalecimiento de la producción limpia y aplicación de intervenciones innovadoras amigables con el ambiente, en la producción agropecuaria y agroalimentaria de la Región del Bio Bio", con el que se ha iniciado un proceso de transferencia de la tecnología.
6. Se ha consolidado un equipo de trabajo de triple hélice y alianzas estratégicas para favorecer el empaquetamiento tecnológico de la tecnología desarrollada.

## 15. RECOMENDACIONES

Señale si tiene sugerencias en relación a lo trabajado durante el proyecto (considere aspectos técnicos, financieros, administrativos u otro).

FIA es una agencia muy ordenada y estricta en la forma de llevar la parte financiera de las propuestas. Esto finalmente se agradece.

La sugerencia sería que en facturas y gastos que están dentro del límite del cierre de la iniciativa, estas puedan ser pagadas después del cierre, certificando que los gastos se realizaron dentro del plazo. Eso da días dentro del sistema logístico de la entidad beneficiaria para proceder oportunamente.

Otra sugerencia, es que puedan iniciativas que finalizan con buenos resultados, acogerse a un proceso de segunda instancia de apoyo, para favorecer el empaquetamiento tecnológico si corresponde.

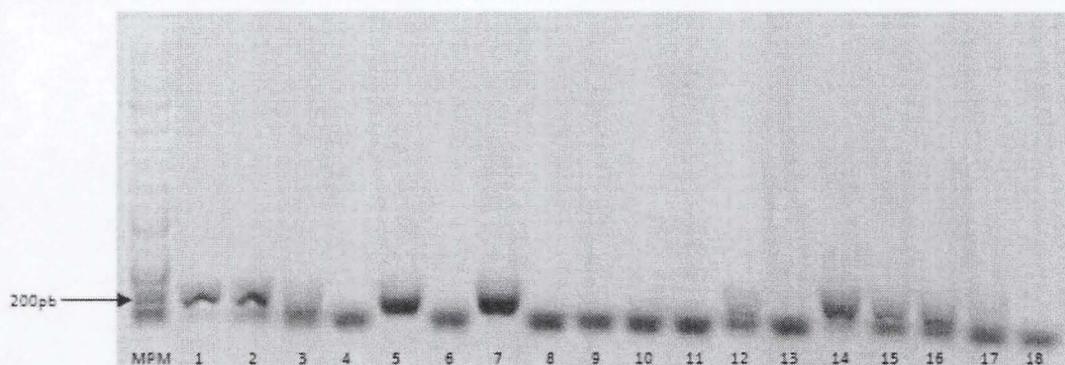
Por último, sería pertinente, que FIA apoye la difusión de resultados exitosos, apoyando en estos casos la divulgación de resultados o que estos fondos estén paralelos para postular.

## 16. ANEXOS

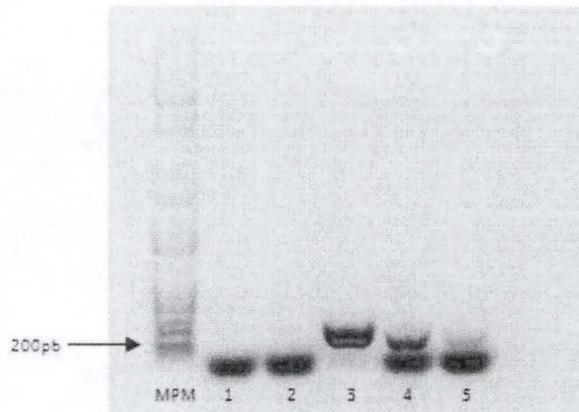
### ANEXO 1.

#### ANTECEDENTES EXPERIMENTALES PREVIOS AL PROYECTO.

Nuestro equipo de investigación ya dispone de un cepario de microorganismos aislados desde el tracto intestinal de abejas y bosque nativo con potencial acción benéfica. Las bacterias han sido caracterizadas molecularmente. Identificación de cepas aisladas de bosque nativo y tubo digestivo de abejas. Se procedió a la activación de las cepas en caldo MRS y luego sembradas en placas con Agar MRS para corroborar la pureza de las cepas así como para extraer colonias, a partir de las cuales, se realizó la extracción de ADN y posterior amplificación por PCR con cebadores específicos para identificar la pertenencia al género *Lactobacillus* de cada una de las cepas. Para obtener el ADN bacteriano total, se realizó la extracción de ADN a las colonias utilizando InstaGene Matrix (BioRad). Para esto se tomaron algunas colonias y se re suspendió en 1 ml de agua estéril, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El pellet bacteriano fue resuspendido en 200 µl de InstaGene Matrix y se incubó a 56°C por 30 min, luego se procedió a agitar en agitador vórtex durante un minuto para finalmente incubar a 100°C por 8 min. Se procedió a agitar fuertemente y centrifugar a 12000 rpm por 3 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo de micro centrifuga nuevo para almacenar la suspensión de ADN a -20°C. La detección molecular se realizó mediante la amplificación de ADN cromosomal bacteriano, utilizando los partidores R16-1(16S) (5'-CTTGACACACCGCCCGTCA-3') y LbLMA1-rev (ITS) (5'-CTCAAACTAAACAAAGTTTC-3'). Se preparó una mezcla maestra de PCR calculada para 25 µl de reacción que consistió en: buffer PCR 1X; MgCl<sub>2</sub> 4mM; dNTP 0.2mM; Primer A 1 µM; Primer B 1 µM; Taq 0.25 U; 9.25 µl H<sub>2</sub>O y 1 µl de ADN. Para la visualización de los resultados, los productos PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% pre teñido con GelRed® Nucleic Acid Stain (Biotium) durante 90 min a 80 volts.



**Figura 1.** Gel agarosa 1.5% de cepas ácido lácticas aisladas de abejas. Carriles de izquierda a derecha: (MPM) Marcador de peso molecular, (1) Control positivo, (2) BN-6, (3) BN-1.3, (4) BN-Ac, (5) BN-Bc, (6) BN-2(2), (7) BN-8, (8) BN-5, (9) BN-A, (10) BN-3(2), (11) BN-Cc, (12) BN-22r, (13) BN-B, (14) BN-1(2), (15) AB-13A, (16) AB-1A, (17) AB-3, (18) BN-C.



**Figura 2.** Gel agarosa 1.5% de cepas ácido lácticas aisladas de abejas. Carriles de izquierda a derecha: (MPM) Marcador de peso molecular, (1) Control negativo, (2) BN-2.1, (3)AB-10, (4)AB-7, (5)AB-12. \*\*Cepas con prefijo “BN-” corresponde a Bosque nativo; prefijo “AB” corresponde a cepas de abeja.

De las 21 muestras sometidas a éste estudio (AB=6 y BN=15), todas las cepas de abeja pertenecen al género *Lactobacillus*, en tanto sólo 5 de 15 aislados de bosque nativo son a la prueba de identificación molecular, siendo identificadas como *Lactobacillus*, los resultados se evidencian por los amplicones de aproximadamente 250pb claramente distinguidos en las imágenes de geles de agarosa obtenidos por electroforesis (figuras 1 y 2).

## **ANEXO 2.**

### **CARACTERIZACIÓN DE CEPAS LÁCTICAS AISLADAS DE ABEJAS Y BOSQUE NATIVO.**

#### **Hidrofobicidad de la Superficie bacteriana**

En 1990 Rosenberg y Doyle definieron el método de partición de solventes orgánicos MATH (del inglés Microbial Adhesión to Hydrocarbons), el que permite determinar la hidrofobicidad de la superficie de la pared bacteriana.

Para la realización del método de partición de solventes orgánicos MATH se realizó un cultivo de las cepas aisladas de abejas y de bosque nativo en tubos de cultivo microbiológico con caldo MRS Merck® a 37°C durante 18 horas, los cultivos se centrifugaron por 4 minutos a 3600 rpm y se eliminó el sobrenadante, luego se re suspendió en 2 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) para lavar el pellet bacteriano, la centrifugación y re suspensión se realizó dos veces.

Se utilizaron 3 tubos por cada cepa los que contenían 3,6 ml de solución salina al 0,9% a los que se inocularon con un alícuota de la cepa aislada, el volumen inoculado de cada cepa fue variable, dependiente del crecimiento de cada cepa y se ajustó su densidad óptica en un espectrofotómetro (Spectronic 20D) en un rango que fluctuó entre 0,4 a 0,6 de

densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm. Se registro la absorbancia de cada uno de los tubos ajustados para luego adicionar tres solventes orgánicos: xileno p.a. Merck®, tolueno p.a. Merck® y n-hexadecano p.a. Merck®, cada uno por separado a los 3 tubos mencionados anteriormente que se ajustaron para cada cepa. Luego se agitaron manualmente de forma enérgica durante 1 minuto y se procedió a la lectura de la densidad óptica, se repitió cada una hora hasta completar 3 mediciones, incluida la primera medición con el solvente orgánico; la determinación del grado de hidrofobicidad se realizó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ hidrofobicidad} = [(DO \text{ antes} - DO \text{ después}) / DO \text{ antes}] \times 100$$

Donde, "DO antes", corresponde al registro de DO<sub>600</sub> de la cepa antes de la adición del solvente orgánico; "DO después" es la media de la DO<sub>600</sub> entre las 3 mediciones realizadas a cada tubo; la fórmula se aplicó a las mediciones de cada uno de los tres tubos de cada cepa (Ocaña, 2001). El grado de hidrofobicidad se clasificó como bajo: 0–35%, medio: 36–70%, alto: 71–100% para cada uno de los solventes orgánicos según la escala de Ocaña et al., 1999.

A continuación se muestran en la tabla 1, los resultados de la prueba aplicada.

**Tabla 1.** Hidrofobicidad de la superficie bacteriana. Densidad Óptica a longitud de onda de 600 nm.

Cepas		Absorbancia INICIAL			Absorbancia FINAL			% de hidrofobicidad			Índice de HIDROFOBICIDAD		
Origen	Nombre	X*	T**	H***	X*	T**	H***	X*	T**	H***	X*	T**	H***
Abejas silvestres	AB-1B	0,436	0,456	0,452	0,089	0,050	0,107	79,587	89,035	76,327	Alta	Alta	Alta
	AB-4	0,404	0,432	0,356	0,063	0,044	0,036	84,406	89,815	89,888	Alta	Alta	Alta
	AB-5B	0,480	0,474	0,478	0,049	0,117	0,137	89,792	75,316	71,339	Alta	Alta	Alta
	AB-10B	0,422	0,470	0,408	0,058	0,062	0,169	86,256	86,809	58,578	Alta	Alta	Media
	AB-1A	0,444	0,448	0,442	0,128	0,080	0,139	71,171	82,143	68,552	Alta	Alta	Media
	AB-2	0,452	0,412	0,434	0,060	0,059	0,189	86,726	85,680	56,452	Alta	Alta	Media
	AB-6A	0,418	0,420	0,388	0,121	0,117	0,137	71,053	72,143	64,691	Alta	Alta	Media
	AB-9	0,412	0,454	0,458	0,080	0,053	0,184	80,583	88,326	59,825	Alta	Alta	Media
	AB-10A	0,382	0,345	0,392	0,059	0,144	0,089	84,555	58,261	77,296	Alta	Media	Alta
	AB-16	0,462	0,482	0,412	0,105	0,269	0,169	77,273	44,191	58,981	Alta	Media	Media
	AB-9P	0,436	0,436	0,430	0,199	0,100	0,035	54,358	77,064	91,860	Media	Alta	Alta
	AB-11B	0,414	0,416	0,470	0,193	0,121	0,166	53,382	70,913	64,681	Media	Alta	Media
	AB-5A	0,420	0,464	0,474	0,129	0,136	0,196	69,286	70,690	58,650	Media	Alta	Media
	AB-6B	0,418	0,404	0,368	0,136	0,121	0,166	67,464	70,050	54,891	Media	Alta	Media
AB-7A	0,488	0,500	0,486	0,196	0,067	0,226	59,836	86,600	53,498	Media	Alta	Media	
Bosque nativo	BN-2RR	0,520	0,522	0,524	0,482	0,490	0,484	7,308	6,130	7,634	Baja	Baja	Baja
	BN-AC	0,480	0,466	0,474	0,496	0,498	0,488	-3,333	-6,867	-2,954	Baja	Baja	Baja
	BN-B	0,479	0,455	0,489	0,476	0,433	0,481	0,626	4,835	1,636	Baja	Baja	Baja
	BN-BC	0,468	0,458	0,450	0,496	0,484	0,444	-5,983	-5,677	1,333	Baja	Baja	Baja
	CLMUSS-01	0,560	0,550	0,549	0,067	0,140	0,105	88,036	74,545	80,874	Alta	Alta	Alta
	CTUSS-87	0,542	0,583	0,524	0,125	0,108	0,099	76,937	81,475	81,107	Alta	Alta	Alta

X\* = Xileno, T\*\* = Tolueno, H\*\*\*= n-Hexadecano

## Auto-agregación

Se utilizaron cultivos de las cepas, incubadas a 37°C por 12 horas en caldo MRS Merck®, se centrifugaron a 3700 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, la cepa fue lavada 2 veces con buffer PBS estéril, para luego ajustar la densidad óptica a  $0,6 \pm 0,5$  en 3 ml de PBS estéril en un espectrofotómetro (Spectronic 20D) a una longitud de onda de 570nm. Se registró la absorbancia inicial, luego se procedió a incubar a 37°C sin agitación y se registró la DO (densidad óptica) durante 4 horas con intervalos de 1 hora, de acuerdo a lo descrito, se calculó el índice de auto-agregación (IC) mediante la siguiente fórmula:

$$IC = [1 - (DO \text{ final} / DO \text{ inicial})] \times 100$$

De acuerdo a las características de auto-agregación, las cepas se clasificaron en tres categorías: alta (71-100 %), medio (36-70 %) y baja (0-35 %). A continuación se muestran en la tabla 2, los resultados de la prueba aplicada.

**Tabla 2.** Índice de auto-agregación. Densidad Óptica a longitud de onda de 570nm.

Cepas		Absorbancia INICIAL	Absorbancia Final	% de auto-agregación	Índice de auto-agregación
Origen	Nombre				
Abejas silvestres	AB-10A	0,564	0,562	0,355	Bajo
	AB-10B	0,564	0,566	-0,355	Bajo
	AB-11B	0,566	0,564	0,353	Bajo
	AB-16	0,558	0,554	0,717	Bajo
	AB-1A	0,566	0,564	0,353	Bajo
	AB-1B	0,564	0,562	0,355	Bajo
	AB-2	0,534	0,526	1,498	Bajo
	AB-4	0,568	0,566	0,352	Bajo
	AB-5A	0,564	0,562	0,355	Bajo
	AB-5B	0,560	0,558	0,357	Bajo
	AB-6A	0,562	0,554	1,423	Bajo
	AB-6B	0,564	0,560	0,709	Bajo
	AB-7A	0,540	0,530	1,852	Bajo
	AB-9	0,542	0,538	0,738	Bajo
	AB-9P	0,564	0,558	1,064	Bajo
Bosque nativo	BN-2RR	0,542	0,532	1,845	Bajo
	BN-AC	0,390	0,357	8,462	Bajo
	BN-B	0,257	0,214	16,732	Bajo
	BN-BC	0,544	0,538	1,103	Bajo
	CLMUSS-01	0,564	0,564	0,000	Bajo
	CTUSS-87	0,564	0,562	0,355	Bajo

## **Adhesión a proteínas de matriz extracelular**

La lignina, un polímero orgánico, es particularmente importante en la formación de las paredes celulares, especialmente en la madera y la corteza de vegetales, ya que prestan rigidez y no se pudren fácilmente. Químicamente las ligninas son polímeros fenólicos reticulados, insolubles en ácidos y solubles en álcalis fuertes como el hidróxido de sodio, que no se digieren ni se absorben.

La lignina presenta la particularidad que no es atacada por la microbiota gástrica, por ello es también considerada una fibra dietética (Slavin, 2013). Sin embargo se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas promueven la fermentación y descomposición de materiales como lignina y celulosa, eliminando así los efectos indeseables de la materia orgánica no descompuesta.

La importancia del estudio de este polímero y su relación con los objetivos abordados por este proyecto, radica en que la lignina presente en plantas de arándanos podría afectar la colonización de cepas lácticas, impidiendo así ejercer los efectos y potencialidades que se han planteado, por ello hemos propuesto estudiar la interacción de este polímero orgánico con cepas lácticas seleccionadas.

Inicialmente, se estipuló la realización de una prueba de adherencia a matrices de lignina, sin embargo, debido a factores intrínsecos del polímero, como pH muy básico y escasa solubilidad, se planificó el estudio de tolerancia y crecimiento en medio MRS suplementado con el polímero lignina en solución.

### **Objetivos.**

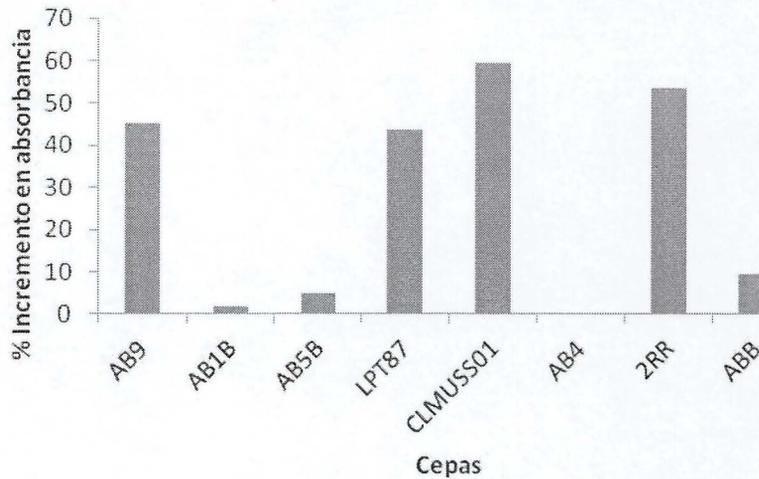
Determinar la tolerancia y capacidad de crecimiento de cepas lácticas seleccionadas en medio de crecimiento suplementado con lignina en solución.

### **Metodología.**

Lignina comercial (lignina alkali o lignina Kraft), de la empresa Sigma-Aldrich fue suspendida en buffer PBS alcalinizado con hidróxido de sodio. Posteriormente la solución obtenida fue filtrada a 0.2 micras y diluida en caldo MRS para obtener soluciones a concentraciones de 100 ug/ml y 1 mg/ml. El medio suplementado con el polímero en ambas concentraciones fue inoculado con las 8 cepas lácticas seleccionadas y ajustados a una absorbancia de 0.1 a 625 nm. Cada tubo de concentración 100 ug/ml y 1 mg/ml fue luego incubado por 3 y 16 horas respectivamente a 37°C, para luego ser leída nuevamente su absorbancia y determinar así tolerancia al polímero y crecimiento en su presencia. Los resultados del ensayo se informaron como porcentaje de viabilidad, obtenido indirectamente desde las mediciones de absorbancia.

### **Resultados**

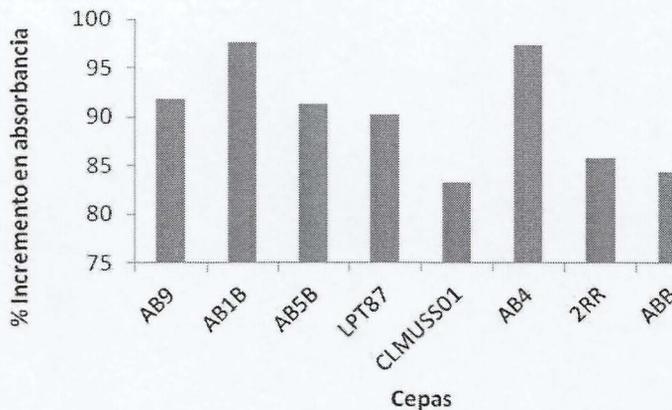
Un total de 7 de las 8 cepas lácticas probadas mostró tolerancia a una concentración de 100 ug/ml de lignina en un período de incubación de 3 horas. La cepa AB4, no mostró desarrollo en el medio adicionado del polímero, y las cepas AB9, LPT87, CLMUSS01 y 2RR mostraron desarrollo sobre el 40% evidenciando crecimiento (figura 3).



**Figura 3.** Porcentaje de incremento en absorbancia medido a 625 nm en medio MRS enriquecido y adicionado de 100 ug/ml de lignina.

A una concentración mayor de lignina de 1 mg/ml y efectuando una incubación por 16 horas, todas las cepas lácticas toleraron la presencia del polímero y mostraron desarrollo por sobre el 80% (figura 4).

De acuerdo a estos resultados, las ocho cepas lácticas ensayadas no presentan mayor dificultad en crecer en presencia de lignina.



**Figura 4.** Porcentaje de incremento en absorbancia medido a 625 nm en medio MRS enriquecido y adicionado de 1mg/ml de lignina.

## Discusión

En el plan operativo del presente proyecto se planteó el estudio de la capacidad adherente de cepas lácticas seleccionadas a matrices de lignina en microplaca mediante la metodología propuesta por Styriak et al., 2003, para el estudio de cepas probióticas a matrices de moléculas extracelulares, especialmente colágeno y fibronectina. Sin embargo, debido a factores intrínsecos del polímero, como pH muy básico y escasa solubilidad, la técnica ideada para proteínas no pudo ser aplicada según el protocolo original, por ello se planificó una modificación al protocolo, evaluando la tolerancia y crecimiento en medio MRS suplementado con el polímero lignina en solución.

Se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas promueven la fermentación y descomposición de materiales como lignina y celulosa, eliminando así los efectos indeseables de la materia orgánica no descompuesta. La importancia del estudio de este polímero y su relación con los objetivos abordados por este proyecto, radica en que la lignina presente en plantas de arándanos podría afectar la colonización de cepas lácticas, impidiendo así ejercer los efectos y potencialidades que se han planteado, por ello hemos propuesto estudiar la interacción de este polímero orgánico con cepas lácticas seleccionadas.

Los resultados del ensayo mostraron que siete de las ocho cepas puede desarrollarse en medio de cultivo comercial adicionado de lignina en una concentración de 100ug/ml, concentración semejante a la empleada por Styriak *et al.*, (2003) en ensayos con colágeno, sólo no existiendo crecimiento de la cepa AB-4, sin embargo, al probar una concentración 10 veces mayor del polímero lignina en el medio, las ocho cepas mostraron desarrollo significativo, resultando en un aumento de absorbancia mayor al 80% en relación a la determinación basal. Estos resultados demuestran que lignina a pesar de su alcalinidad es un polímero que no afecta el crecimiento de las cepas lácticas.

La importancia de este resultado radica en que las cepas lácticas no tendrían un efecto inhibitorio de las fibras de lignina presentes en plantas de arándano, más bien podría incluso esta fibra orgánica presentar algún efecto potenciador del crecimiento, el cual podría ser abordado en estudios próximos.

### **Pruebas de Tolerancia de las cepas lácticas.**

#### **Metodología**

Se utilizó el sedimento bacteriano de cada una de las cepas (AB1B, AB4, AB5B, AB9 y CLMUSS-1 como control), previamente cultivadas en 4 ml de caldo MRS Merck® (Man-Rogosa-Sharpe) enriquecido en condiciones de microaerofilia, el que se centrifugó a 3.500 rpm durante 5 min.

Se prepararon tubos de ensayo a pH 3, pH 4, pH 5 y pH 7 que contenían 3 ml de caldo MRS enriquecido y acidificado con HCl 0,1 N, estos fueron inoculados con un cultivo bacteriano de cada una de las cepas seleccionadas hasta conseguir una turbidez del 0.5 de la escala de Mc Farland. Los tubos se incubaron a 37°C, y medidos con potenciómetro pH-metro a las 2 horas y 4 horas desde la inoculación. Se realizaron siembras de estas muestras sobre placas de agar

MRS e incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia para obtener un recuento en superficie y cuantificación de las UFC/ml.

### Resultados

Las pruebas de tolerancia demostraron que las cepas lácticas exhibieron una tolerancia semejante a los distintos grados de acidez probadas (figuras 5-9). Éstas se desarrollaron sin mayor problemas a pH7, pH5 y pH4, manteniendo recuentos en todos los casos por sobre 10<sup>6</sup> UFC/ml.

A a pH 3, se observó un leve descenso en los recuentos de todas las cepas en relación al crecimiento a grados de acidez superiores, sin embargo las mayores diferencias se observó en la tolerancia de las cepas en relación al tiempo a pH3, observando que a las 4 horas de interacción ya no existe desarrollo bacteriano, siendo entonces el pH3 inhibitorio para las cepas en un trascurso mayor a 2 horas.

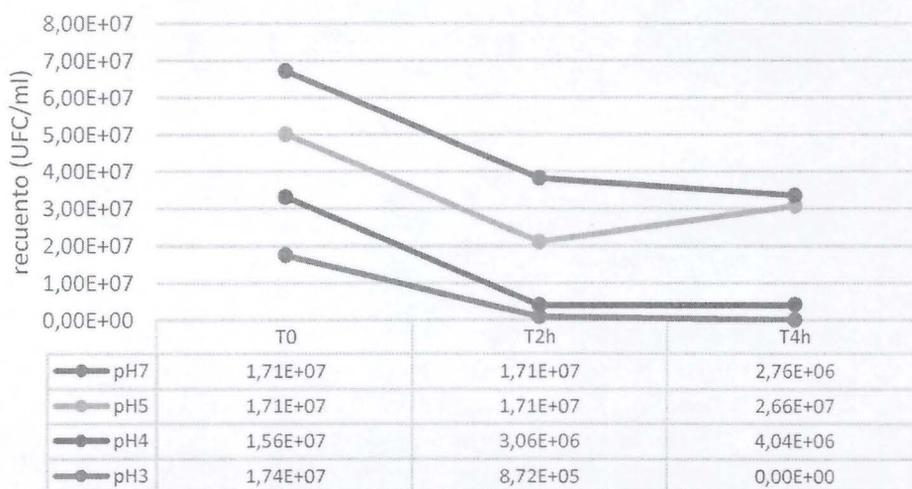
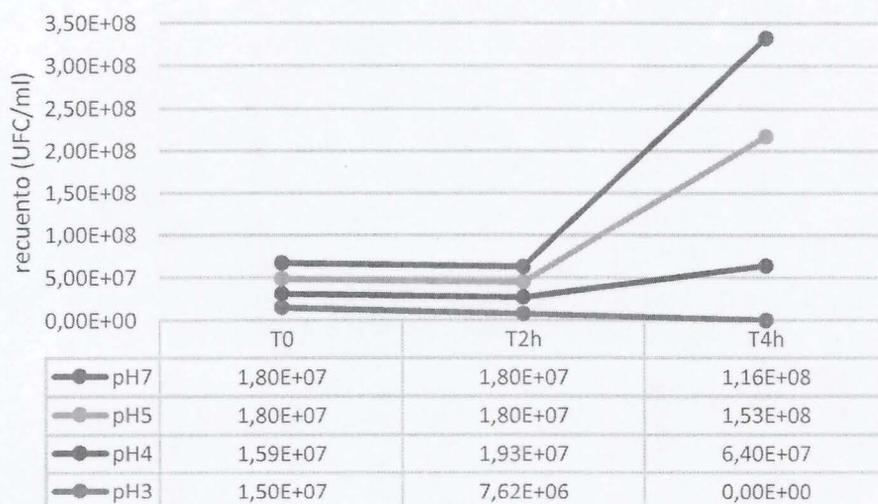
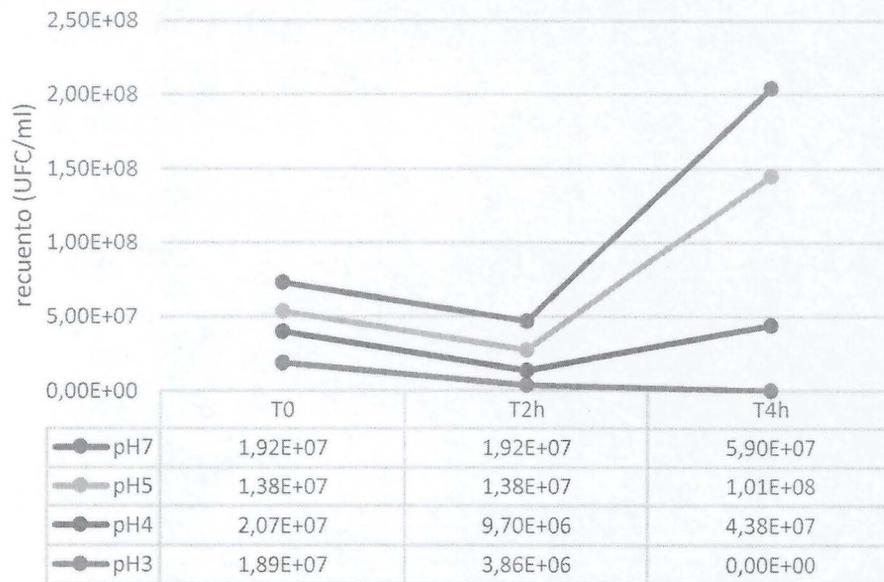


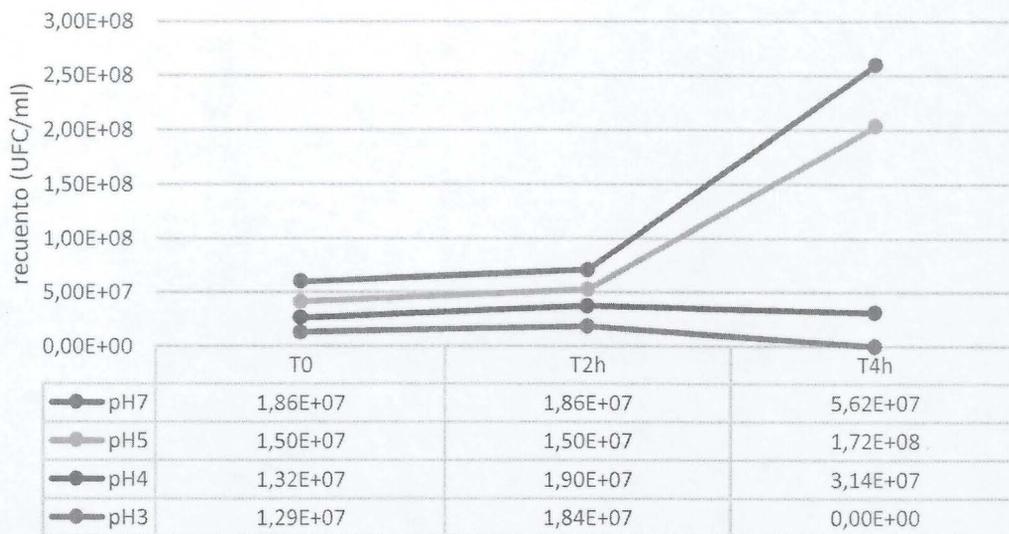
Figura 5. Recuentos y graficas de curvas de tolerancia, cepa AB1B.



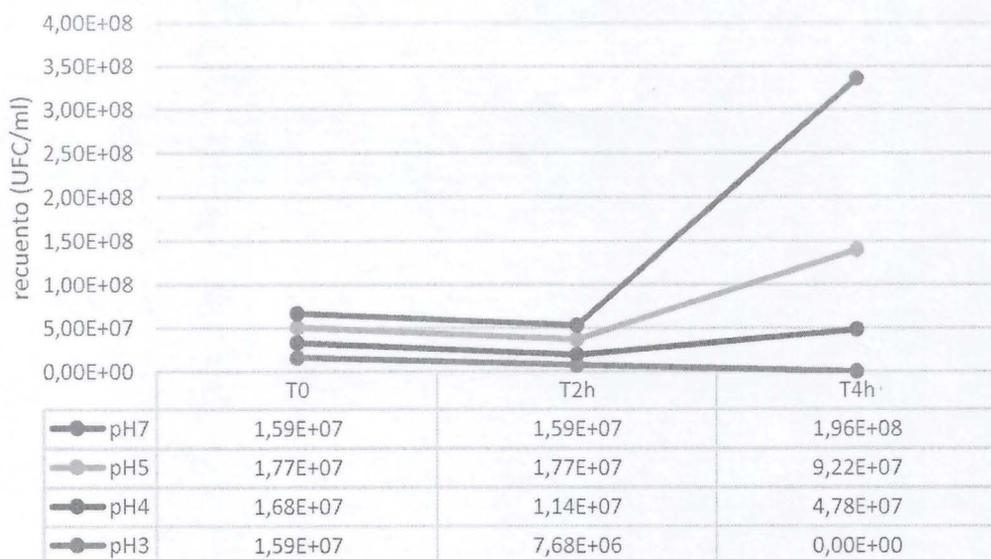
**Figura 6.** Recuentos y graficas de curvas de tolerancia, cepa AB4..



**Figura 7.** Recuentos y graficas de curvas de tolerancia, cepa AB5B.



**Figura 8.** Recuentos y graficas de curvas de tolerancia, cepa AB9.



**Figura 9.** Recuentos y graficas de curvas de tolerancia. Cepa CLMUSS-1.

## **Identificación genética de las cepas ácido lácticas seleccionadas a nivel de especie.**

### ***Introducción***

La secuenciación de ADN ribosomal 16s ha ganado popularidad entre los microbiólogos, principalmente como herramienta de caracterización molecular e identificación o descubrimiento de nuevos aislados a nivel de sub-especie (cepas). La mayor ventaja sobre los métodos de caracterización bioquímica, radica en una identificación precisa de cepas con características atípicas (Chandok *et al.*, 2014).

Se ha descrito previamente que *Lactobacillus* es un género diverso (Stiles & Holzapfel, 1997) incluyendo más de 150 especies (<http://www.dsmz.de/microorganism/>), cuya estructura filogenética es verdaderamente compleja (Felis & Dellaglio, 2007). Para diferenciar aislados bacterianos se han empleado diversos métodos, desde los morfológicos ya obsoletos, pasando por aquellos fermentativos hasta los genotípicos. En cuanto a los métodos fenotípicos, si bien facilitan la identificación por su fácil y rápido empleo, tienen limitaciones, y se ha reportado ambigua especificidad. Boyd *et al* (2005), encontraron que un tercio (33 de 97) cepas identificadas por API50CHL no fueron identificadas a nivel de especie.

En esta actividad, las cepas preseleccionadas por poseer el mayor potencial de aplicación fueron sometidas a análisis de secuencia nucleotídica que codifica para la subunidad 16S ARN ribosomal.

### ***Objetivo***

Amplificar parte del gen que codifica para la subunidad 16S ARN ribosomal mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### ***Metodología***

Extracción de ADN.

Se realizó extracción de ADN a las cepas ácido lácticas con el producto comercial InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories), para obtener ADN genómico y ADN episomal de alta pureza. Para esto se utilizó el sedimento bacteriano de cada una de las cepas, previamente cultivadas en 4 ml de caldo MRS Merck® (Man-Rogosa-Sharpe) enriquecido en condiciones de microaerofilia, el sedimento se obtuvo mediante centrifugación a 3.500 rpm durante 5 min., el que luego se resuspendió en 400 ul de agua libre de nucleasas estéril, posteriormente se centrifugó por 2 min a 11.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El pellet bacteriano fue resuspendido en 200 µl de InstaGene Matrix, se incubó a 56 °C por 30 min y finalmente se sometió a un nuevo proceso de calentamiento a 100 °C durante 8 minutos. Se enfrió, agitó fuertemente y centrifugo a 12.000 rpm por 3 min. El ADN obtenido se congeló a -20°C en el mismo tubo con la matriz. Cuando se ocuparon las muestras se centrifugó y se tomó de la fase superior como ADN molde.

### Amplificación por PCR

Se realizaron amplificaciones mediante la técnica PCR de la cepa empleando los primers definidos en literatura (Tabla 3). Se preparó una mezcla maestra de PCR calculada para 25 µl de reacción que consistió en buffer PCR 1X; MgCl<sub>2</sub> 2,2mM; dNTP 0,2mM; Primer P0 0,5 µM; Primer P6 0,5 µM; Taq 0,1 U y 2 µl de ADN; H<sub>2</sub>O libre de nucleasas csp. 25 µl por reacción. El programa PCR consistió en 1 ciclo a 95°C por 1min, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, seguidos por 1 min a 54,5°C y 1 min a 72°C, con un ciclo de elongación final a 72°C por 5 min.

### Electroforesis

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% con una corriente de 90Volts por 45 minutos y se visualizó en fotodocumentador con transiluminación UV.

**Tabla 3.-** Oligonucleótidos empleados en PCR.

Blanco	Partidores	Secuencia (5' →3')	Tamaño de amplicón (pb)	T° de <i>melting</i>	Referencia
Gen 16s Ribosomal	P0	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1400 a 1500	54-58 °C	Koll-Klais et al., 2004
	P6	CTACGGCTACCTTGTACGA			

### Purificación y concentración

La banda correspondiente al amplicón esperado del producto PCR fue escindida del gel empleando un transiluminador UV y sometida a digestión-purificación utilizando el kit comercial "E.Z.N.A. gel extraction kit", según las recomendaciones del fabricante. El ADN purificado fue concentrado por medio de un equipo concentrador centrífugo, obteniendo una concentración mínima final de 100ng/ul de ADN.

### Secuenciación y análisis bioinformáticos.

El producto PCR purificado, concentrado y cuantificado fue enviado a la Unidad de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile para su análisis mediante tecnología ABI PRISM

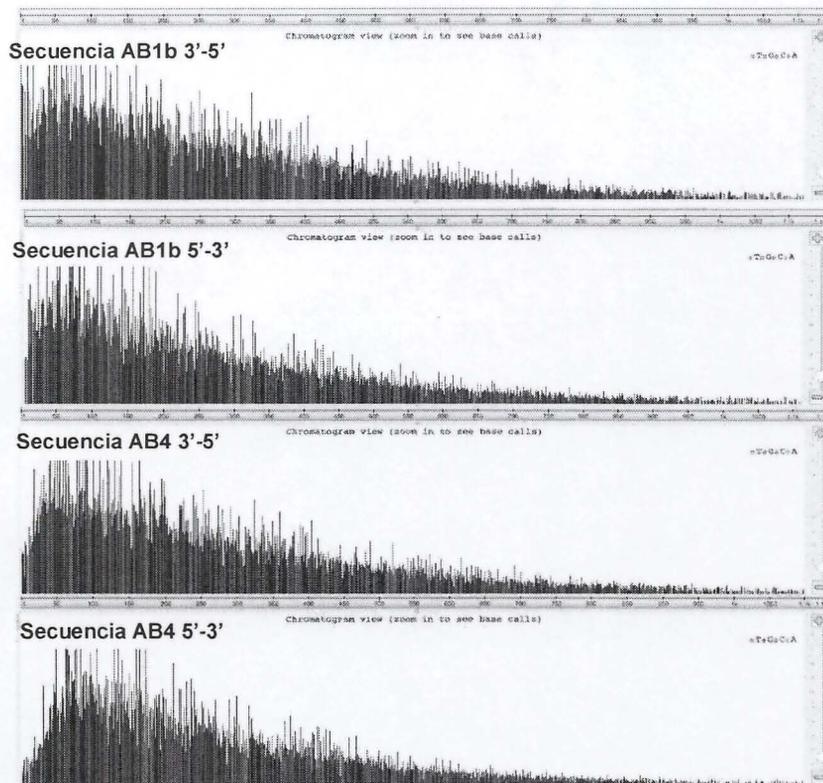
3100. Las secuencias obtenidas fueron formateadas, alineadas, editadas y comparadas en base de datos NCBI mediante el software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

### Resultados

Posterior a la reacción PCR, purificación y concentración del amplicón obtenido, muestras de cada una de las cepas preseleccionadas AB1B, AB4, AB5B y AB9 fueron enviadas a la Unidad de Secuenciación de la PUC para obtener las secuencias nucleotídicas de cada microorganismo. Las secuencias recibidas en formato digital fueron analizadas y se conformaron cromatogramas de cada una de las cepas y de esta forma poder depurar las secuencias a ser comparadas en bases de datos (figura 10).

Posteriormente, cada secuencia obtenida fue asignada a un formato fasta y comparada en base de datos mediante el software BLAST (Zhang *et al.* 2000; Morgulis *et al.* 2008)

Con las secuencias se realizó el recorte de los extremos utilizando un límite de probabilidad de error de 0.01 en los extremos 3' y 5'. Para el alineamiento de las dos hebras se utilizó alineamiento global utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch.



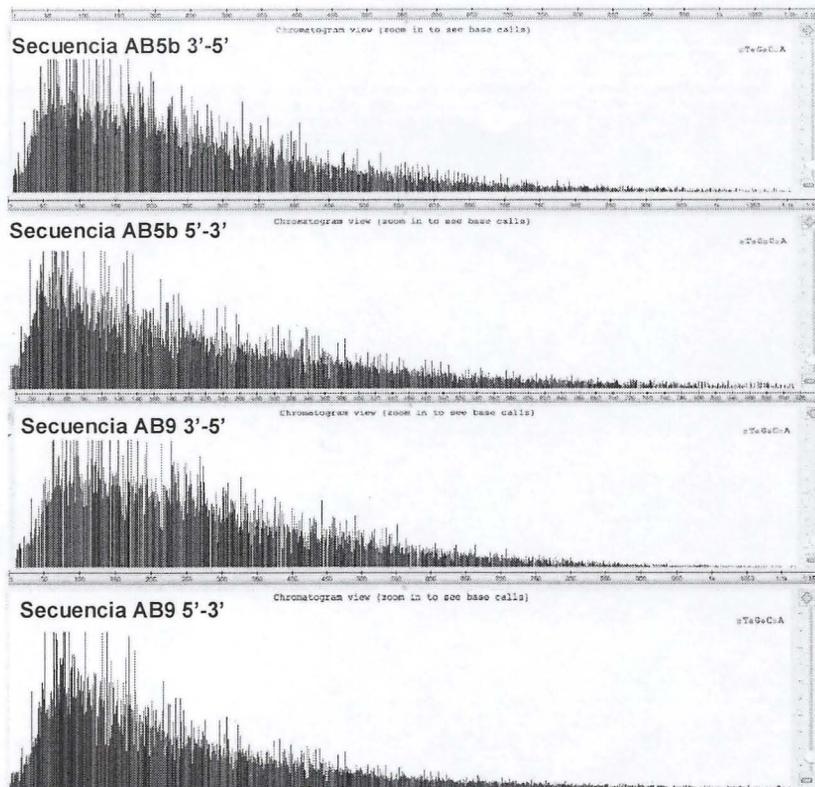


Figura 10.- Cromatogramas visualizados en software Unipro UGENE ver. 1.26.1.

Los alineamientos fueron comparados en la base de datos NCBI mediante el software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Los resultados para cada una de las cepas fue el siguiente:

Cepa AB1b: Mostró un 99% de identidad con *Lactobacillus kunkeei*

Cepa AB4: Se aprecia un 99% de identidad para *Pediococcus acidilactici* y con *Pediococcus lolii*

Cepa AB5b: Se aprecia un 100% de identidad para *Pediococcus acidilactici* y con *Pediococcus lolii*

Cepa AB9: Se aprecia un 100% de identidad para *Pediococcus acidilactici* y con *Pediococcus lolii*

El análisis de la cepa AB1b confirma que es una cepa de *Lactobacillus kunkeei*, en el caso de las cepas AB4, AB5b y AB9, se confirma que pertenecen al género *Pediococcus*, figurando dos especies, *P. acidilactici* y *P. lolii*, con la misma identidad, sin embargo, se ha comentado en literatura científica, la posibilidad de que algunas cepas identificadas como *P. lolii* sean cepas de *Pediococcus acidilactici* según lo descrito en la publicación de Wieme *et al.* 2012.

## **ANEXO 3**

### **PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y ANTIBACTERIANAS.**

#### **Antibiosis de cepas ácido lácticas sobre fitopatógenos.**

##### **Objetivo**

Evaluar la capacidad antagonista de 8 bacterias del género *Lactobacillus* spp. sobre *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss), agente causal del tizón bacteriano del arándano, y sobre los hongos de los géneros *Botryosphaeria*, *Botrytis* y *Verticillium*, asociados a pudrición de madera, brotes, flores y frutos en arándano y otras especies vegetales.

##### **Metodología**

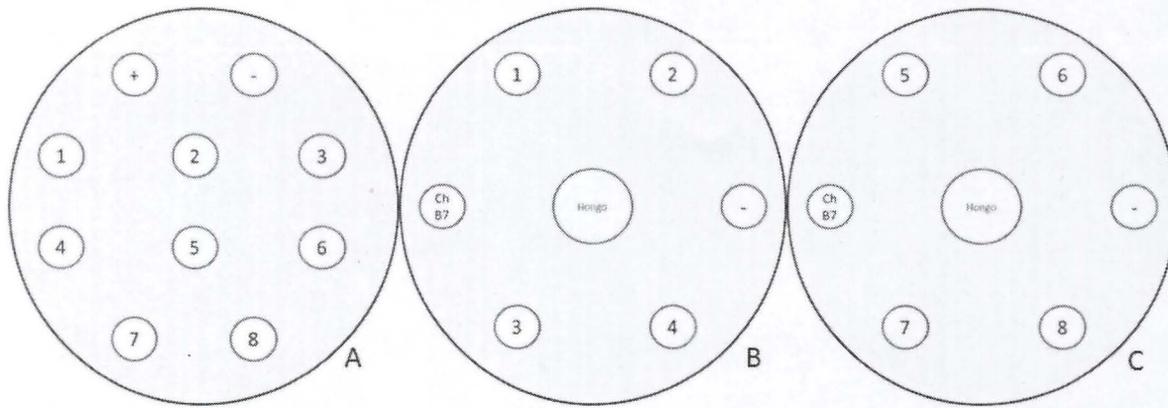
Para realizar los ensayos cepas lácticas preseleccionadas y el fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* fueron incubadas durante 24 horas en caldo MRS y caldo KB, respectivamente. En el caso de los hongos, estos fueron utilizados durante su fase de crecimiento activo.

#### **Antibiosis sobre *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss).**

400 µL del fitopatógeno *P. syringae* fueron sembrados por diseminación sobre placas Petri de 9 cm conteniendo medio APD, una vez seca la placa se sembraron alícuotas de las 8 bacterias lácticas, 1 control negativo (agua) y 1 control positivo (ciclohexamida) en dosis de 10 µL (Figura 1). El tratamiento se repitió 3 veces. Después de 48 horas se evaluó la presencia de halos de inhibición alrededor de la colonia bacteriana colocada sobre el césped o tapiz de la bacteria fitopatógena.

#### **Antibiosis sobre hongos**

Las bacterias lácticas fueron evaluadas sobre dos medios de cultivo diferentes (APD y APD + ácido láctico) con el propósito de observar el efecto de estos sobre un aislados de *Botryosphaeria*, *Verticillium* y *Botrytis cinerea*. Discos de 8 mm de medio PDA con micelio en crecimiento activo del hongo fueron puestos en el centro de la placa y las bacterias fueron dispuestas en grupos de 4 al costado de la placa, además se sembró un control positivo (*Pseudomonas protegens* cepa ChB7) y un control negativo (agua) (figura 1). Los tratamientos fueron sembrados equidistantes a una distancia de 3 cm del hongo. Se evaluó después de 5 días la actividad de inhibición de las bacterias sobre el crecimiento micelial de los hongos, lo cual se evidenció por ausencia de crecimiento fúngico.

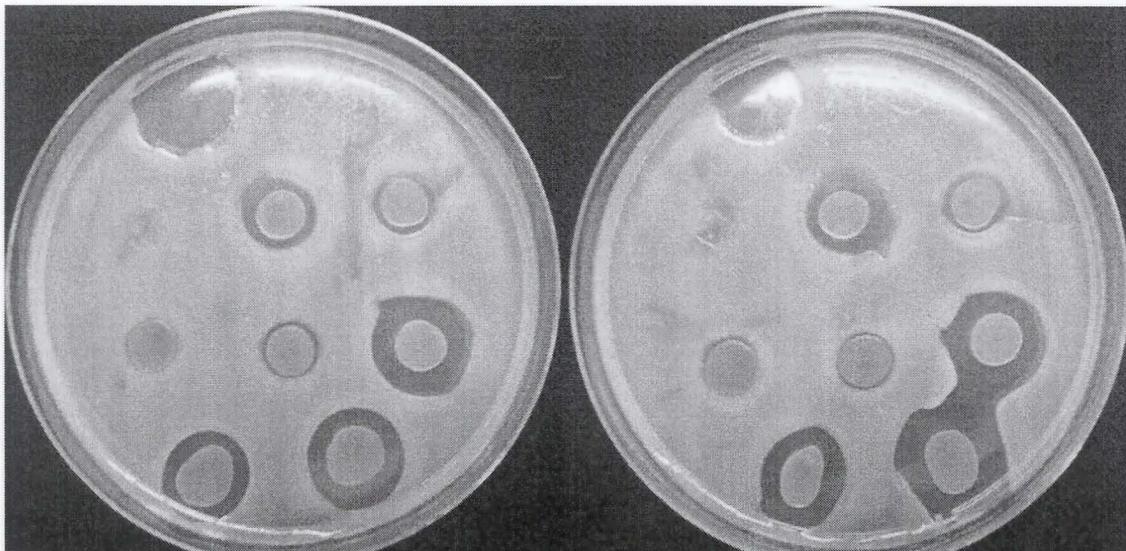


**Figura 1.** Disposición de las ocho bacterias ácido lácticas preseleccionadas sobre placas Petri con diferentes medios para evaluar inhibición sobre una cepa bacteriana y tres hongos fitopatógenos. A: antibiosis sobre Pss; B: antibiosis con hongos (grupo 1 de bacterias); C: antibiosis con hongos (grupo 2 de bacterias); +: control positivo; -: control negativo.

## Resultados

### Antibiosis sobre *Pseudomona syringae* pv. *syringae*

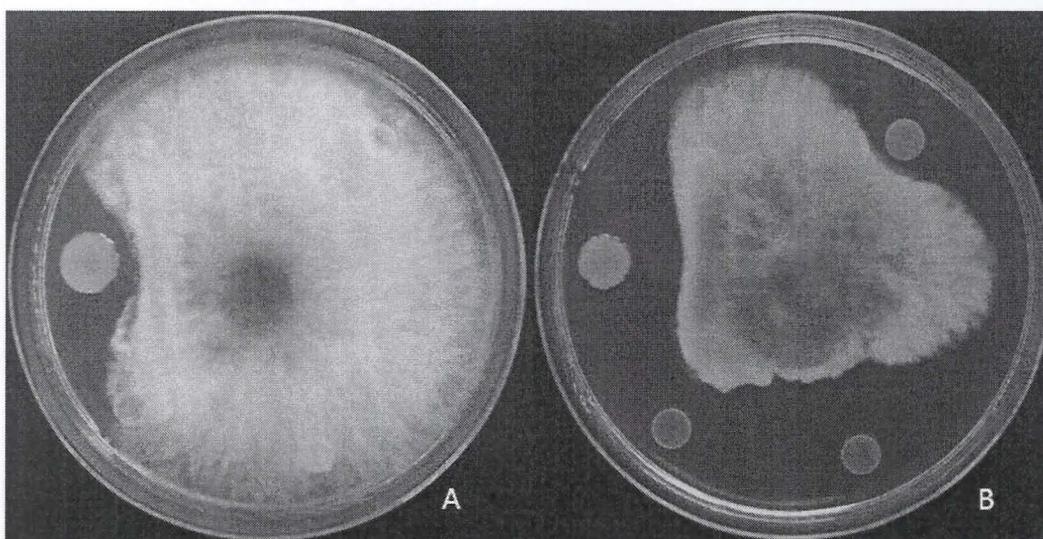
Las cepas lácticas CTUSS87, AB2RR, BNB, AB9, AB5B, AB4 y AB1B presentaron actividad antibiótica sobre *P. syringae*, ya que generaron halos de inhibición sobre el césped o tapiz bacteriano del fitopatógeno bacteriano (figura 2). De estas siete bacterias con actividad antagonica, aquellas que mostraron mejor efecto controlador fueron las bacterias CTUSS87, AB5B, AB4 y AB1B. La bacteria CLMUSS01 no presentó crecimiento sobre el medio APD y por lo tanto no generó inhibición sobre *P. syringae*.



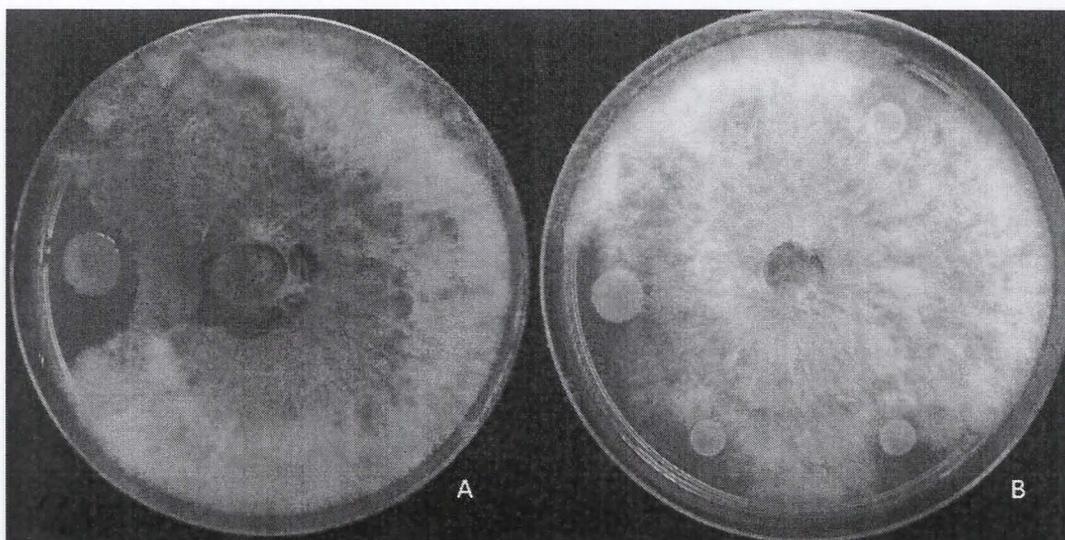
**Figura 2.** Interacción en placa del fitopatógeno *Pseudomona syringae* pv. *syringae*, agente causal del moho gris del arándano en medio APD contra bacterias ácido lácticas preseleccionadas.

### Antibiosis sobre hongos

La interacción en placas sobre hongos de importancia económica en medio APD mostró que las cepas lácticas CTUSS87, AB2RR, BNB, AB9, AB5B, AB4, AB1B y el control ChB7 presentaron la habilidad de desarrollarse en este medio de cultivo. La bacteria CLMUSS01 no creció en este medio, impidiendo así ensayar actividad antagónica, sin embargo se realizará una búsqueda de un medio más apropiado y así efectuar una determinación futura para esta cepa. El control *P. protegens* cepa ChB7 y las bacteria AB5B, AB4 y AB1B redujeron o detuvieron el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* (figura 3). En el caso de *Botryosphaeria* solo el control positivo *P. protegens* cepa ChB7 presentó un efecto de control, mientras que las bacterias del género *Lactobacillus* no redujeron el crecimiento micelial del hongo (figura 4).

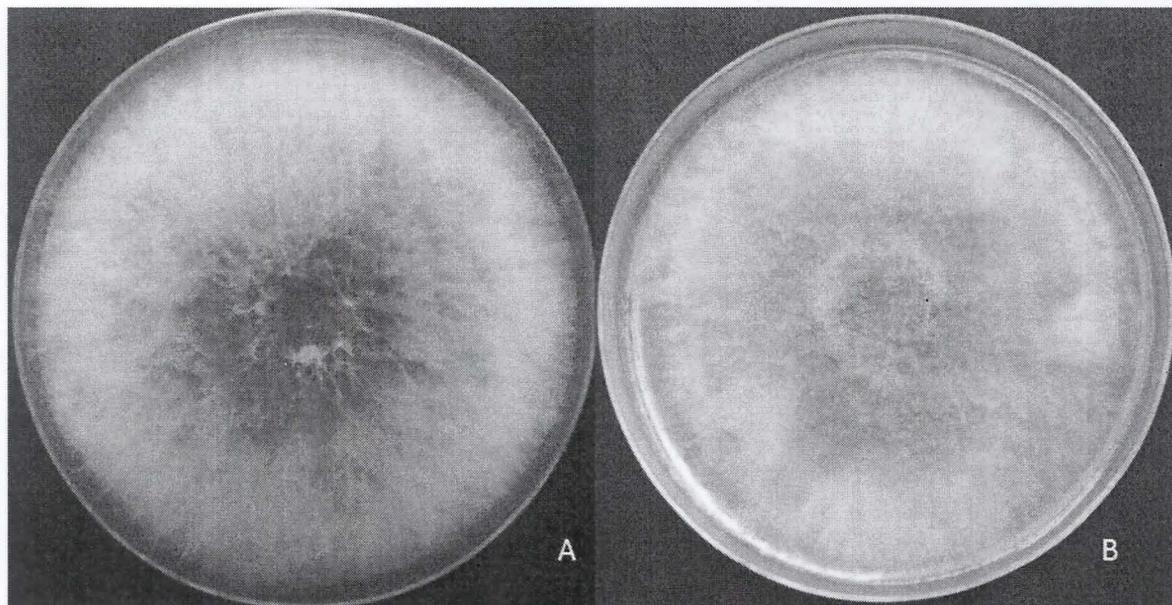


**Figura 3.** Interacción en placa del hongo *Botrytis cinerea*, agente causal del moho gris del arándano en medio APD contra grupos de bacterias ácido lácticas preseleccionadas. A: grupo 1; B: grupo 2.



**Figura 4.** Interacción en placa del hongo *Botryosphaeria* sp., agente causal de pudriciones de madera en arándano en medio APD contra grupos de bacterias ácido lácticas preseleccionadas. A: grupo 1; B: grupo 2.

Al realizar el ensayo de antibiosis en placas con medio PDA + ácido láctico sólo las bacterias CTUSS87, AB5B y en menor medida la cepa láctica AB2RR presentaron crecimiento sobre el medio, pero no presentaron control sobre ninguno de los hongos ensayados (figura 5).



**Figura 5.** Interacción en placa de los hongos A: *Botryosphaeria* sp., y *Botrytis cinerea* en medio APD (acidificado con ácido láctico) contra dos grupos de bacterias ácido lácticas preseleccionadas.

### Discusión.

Hongos fitopatógenos son causa de pérdidas devastadoras para el arándano y otros berries en todo el mundo (US Highbush Blueberry Council, 2015). En Chile, es el problema sanitario más recurrente y de difícil control. Existen especies fitopatógenas que afectan a la planta como *Chondrostereum purpureum*, agente de la enfermedad conocida como ‘plateado’, u otros como *Botrytis cinerea*, *Rhizopus* y *Alternaria spp.* que afectan al fruto ya cosechado.

El manejo de estos microorganismos se basa principalmente en el uso de fungicidas con una efectividad limitada, ya que se ha observado resistencia hacia los agroquímicos más empleados. El uso de estas sustancias tiene además un daño potencial en el medioambiente, el que cada día adquiere mayor relevancia. Es por esta problemática que el control de plagas en la industria frutícola mediante métodos ambientalmente seguros y amigables es una prioridad. Dentro de esta categoría, la formulación biotecnológica que se plantea en este proyecto basada en cepas ácido lácticas obtenidas desde insectos, bosque nativo y afines representa un potencial innovador, y con grandes proyecciones.

De acuerdo a lo anterior, se planteó el estudio de las capacidades antagónicas de 8 cepas lácticas preseleccionadas sobre importantes fitopatógenos para la industria del arándano.

En cuanto a la actividad inhibitoria del crecimiento de hongos fitopatógenos, las bacteria AB5B, AB4 y AB1B redujeron o detuvieron el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, agente causal del moho gris. *Botrytis cinerea*, es el patógeno de mayor importancia en el cultivo del arándano, ocasionando el tizón de la inflorescencia y ramillas, y pudrición en los frutos. Nuestros resultados

demostrarían que un subgrupo de cepas lácticas AB5B, AB4 y AB1B reducen significativamente el crecimiento de este hongo fitopatógeno. Normalmente, para el control biológico de *B. cinerea* se usa el microorganismo antagonista *Trichoderma* spp., pero aca se plantea el empleo de un microorganismo alternativo, con grandes potencialidades por su amplia acción, inocuidad y potencial biotecnológico.

Por otra parte se observó actividad antagónica sobre el fitopatógeno bacteriano *Pseudomonas syringae*, 4 cepas lácticas CTUSS87, AB5B, AB4 y AB1B, presentaron una alta actividad antagónica sobre el crecimiento de la bacteria *P. syringae*.

Existen variadas cepas de *Pseudomonas syringae* que ocasionan daños a los arándanos (Cáncer o Tizón bacteriano), lo cual hace más difícil su manejo. Las bacterias se encuentran presentes en casi todo el mundo y se diseminan con facilidad por medio del viento, la lluvia, y muchos otros medios. No existen otras alternativas al cobre para el manejo de la enfermedad que hayan sido probadas, sin embargo el cobre parece ser una débil alternativa, ya que variados estudios han probado la ineficiencia de aplicación de cobre a los campos de arándano para el control de *Pseudomonas syringae*, a pesar de esto, muchos productores continúan aplicándolo para controlar cepas producidas por esta enfermedad.

De acuerdo a los resultados obtenidos, existe un subconjunto de 3 cepas ácido lácticas, AB5B, AB4 y AB1B, que tienen el mayor potencial de control de fitopatógenos de importancia para la industria del arándano, como lo son la bacteria *Pseudomonas syringae* y el hongo *Botrytis cinerea*. Estos microorganismos tienen la capacidad de inhibir significativamente el crecimiento de los agentes fitopatógenos en ensayos in vitro. No obstante, el estudio de actividad antagónica frente a otros agentes fitopatógenos en los cuales no se observó actividad inhibitoria será reforzado mediante aplicación de técnicas combinadas y potenciadas, determinando además la naturaleza de las sustancias que causan el efecto antagónico vislumbrado.

#### **ANEXO 4.**

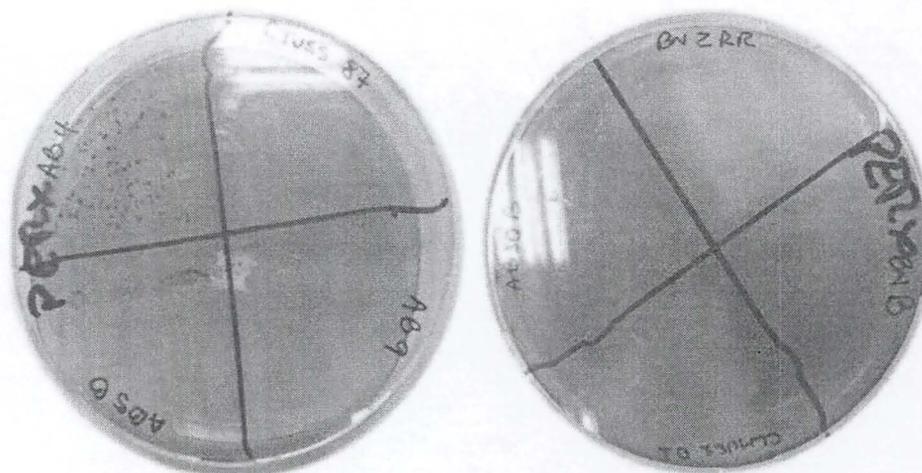
#### **PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.**

##### **Metodología.**

Se les determinó a las cepas seleccionadas y para ello se utilizó el protocolo descrito por Felten *et al.*, 1999. Las cepas de *Lactobacillus* sp. fueron sembradas sobre placas con 20 mL de agar MRS, suplementadas con 5mg de 3,3', 4,4'-tetrametilbenzidina (Sigma) y 0,2 mg de peroxidasa (horse radish, Sigma) incubadas en condiciones de anaerobiosis durante 48 horas. Posteriormente, las placas fueron expuestas al aire. La identificación de bacterias productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó después de la incubación y formación de pigmentos azules alrededor de las colonias, se consideró dos categorías: no productora y productora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

##### **Resultados**

Se encontró un bajo porcentaje de cepas ácido lácticas productoras de peróxido de hidrogeno (12.5%) correspondiente a 1 de las 8 cepas seleccionadas, lo que se observa en la figura 1, placa izquierda, recuadro superior izquierdo.



**Figura 1.** Placas MRS peróxido, a la izquierda cepas CTUSS-87, AB9, AB5B, AB4. En la imagen de la derecha, arriba, BN-2RR; derecha, BN-B; Abajo, CLMUSS-01; izquierda, AB-10B.

En la figura superior, el medio se ve teñido por efecto de la oxidación al exponerse a aire, sin embargo en la imagen de la izquierda, en el recuadro superior derecho, las colonias de la cepa AB-4 se puede apreciar un puntillado azul correspondiente a lo descrito en la literatura.

*Lactobacillus spp.*, tienen la capacidad de producir sustancias antimicrobianas, dentro de éstas encontramos peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que disminuyen el crecimiento de bacterias patógenas. Sin embargo, al analizar la capacidad de las cepas de inhibir el crecimiento de patógenos, hubo algunas que tenían esta propiedad sin ser productoras de peróxido, lo que hace extrapolar que otro tipo de sustancias antimicrobianas podría estar presente, tales como ácidos orgánicos (ácido láctico) y bacteriocinas que suprimen o disminuyen el crecimiento de bacterias patógenas o potencialmente patógenas (Ocaña, 2001).

## ANEXO 5.

### **PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA.**

#### **Introducción.**

Producto del extensivo empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) en variados alimentos y preparaciones alimenticias, es que éstos microorganismos han sido designados como inocuos o GRAS (*generally recognized as safe*) en inglés. En la práctica, esto significa que las BAL son consideradas organismos de grado alimenticio y no representan un riesgo a la salud de los consumidores o el medioambiente. Sin embargo, existen estudios que han documentado la presencia y expresión de genes de virulencia y/o genes de resistencia antibiótica en BAL asociadas a alimentación. Cuando la resistencia antibiótica se localiza en elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones, existe el riesgo que tal característica sea potencialmente transferida al ser humano, microbiota comensal o bacterias patógenas que habitan temporalmente en el hospedador. Por lo tanto, es de vital importancia verificar que probióticos y cepas de BAL a emplear con fines nutricionales, no posean propiedades de

resistencia antimicrobiana adquirida previo a considerarlas seguras para el consumo humano o animal.

El estudio de susceptibilidad de BAL puede ser realizado por medio de variados métodos, incluyendo difusión de discos, dilución en agar, dilución en caldo o kits E-test. En general, los métodos basados en dilución y E-test son preferibles en relación a pruebas de difusión donde zonas de inhibición son observadas. Las técnicas que permiten la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de antimicrobianos, entregan una indicación más clara en cuanto a la naturaleza de la resistencia, si es ésta intrínseca o adquirida. Sin embargo, variadas BAL presentan condiciones de crecimiento especiales en términos de acidez, suplementación de carbohidratos, medios convencionales como agar o caldo Muller-Hinton e Iso-sensitest (IST) a menudo no son apropiados para pruebas de susceptibilidad en BAL. Sin embargo, se ha reportado la formulación de un medio de cultivo líquido (LSM) para probar susceptibilidad en BAL para determinar CMI de agentes antibacterianos de los principales clases de antibióticos para *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Lactococcus*.

#### **Objetivo.**

Analizar la susceptibilidad antibiótica de cepas ácido-lácticas, con potencial de empleo en la industria del arándano, obtenidas desde insectos polinizadores y bosque nativo con el objeto de determinar potenciales propiedades de resistencia antibiótica a nivel fenotípico.

## Metodología.

### Cepas bacterianas.

Se analizó un total de 8 cepas ácido-lácticas aisladas desde insectos polinizadores y bosque nativo chileno, las cuales han sido seleccionadas por su potencial de aplicación en la industria del arándano.

### Ensayo de susceptibilidad

Se empleó el método E-test (ABBIODISK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Desde una suspensión con una densidad McFarland 1.0 en suero salino, se tomó una alícuota de cada cepa con una tórula estéril, y se diseminó en forma homogénea en placas con 20 ml de medio LSM (mezcla de caldo Iso-Sensitest al 90% (Oxoid)), caldo MRS al 10% (Merck) y 1,7 % de Agar-Agar (Merck), a un pH final de 6.7 (Klare *et al.* 2005). Luego se colocaron las tiras E-test sobre las placas, las que se incubaron por 48 horas a 37°C en microaerofilia. El punto de corte para cada antibiótico, fue definido como la menor concentración antibiótica para la cual no se observó desarrollo bacteriano. La susceptibilidad de una cepa a un antibiótico fue definida como la concentración mínima inhibitoria (CMI) en µg/ml.

### Resultados

La mayor parte de las cepas lácticas orales sometidas a ensayos fenotípicos mediante E-test, resultaron ser sensibles a los antibióticos probados. De ésta forma las 8 cepas lácticas fueron totalmente sensibles a 11 de los 18 agentes antimicrobianos: cloramfenicol, cefalotín, amoxicilina, eritromicina, rifampicina, tetraciclina, ampicilina, linezolid, amoxicilina/CLV 2/1, clindamicina y dalfopristin-quinupristin (tabla 1), y fueron totalmente resistentes a vancomicina y metronidazol.

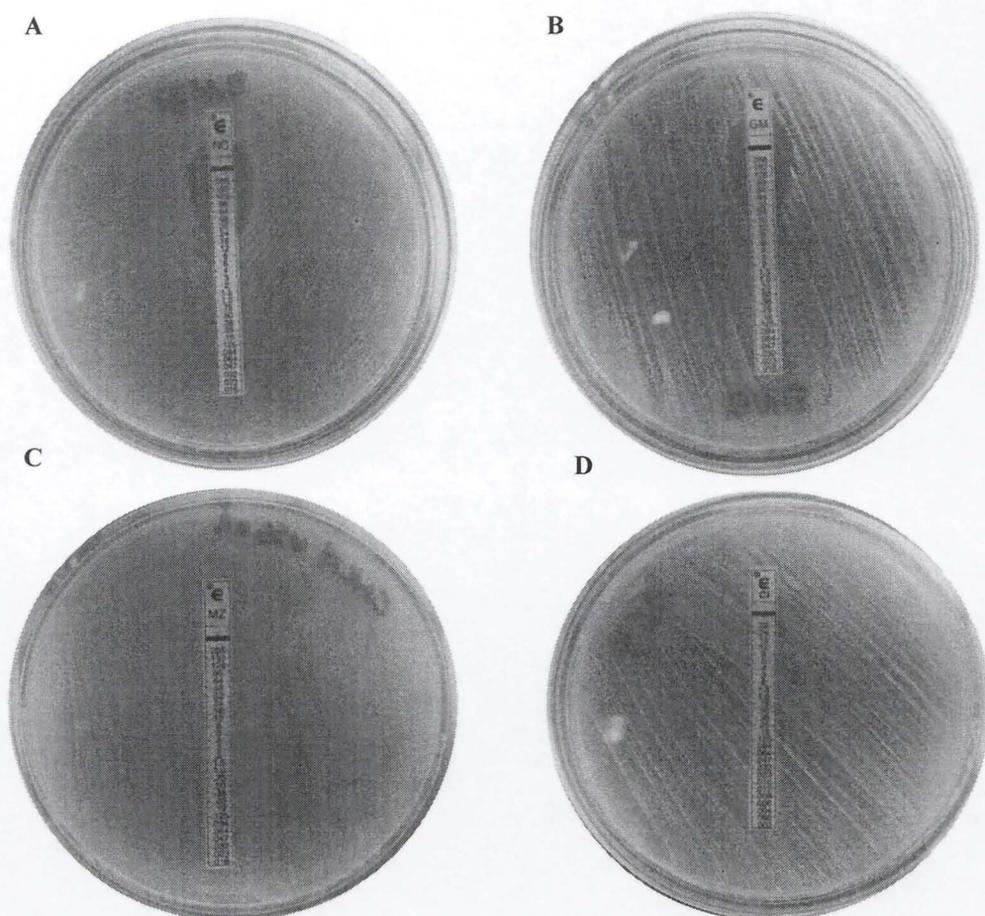
Se observó diferencias en la susceptibilidad entre las cepas lácticas a ciprofloxacino, gentamicina, netilmicina. Los valores resultantes para el aminoglicósido gentamicina mostró que la cepa BNB presentó niveles de resistencia por sobre el límite propuesto para este antibiótico, en el caso del aminoglicósido estreptomina nuevamente la cepa BNB presentó resistencia por sobre el valor propuesto, cuyo e-test marcó 256 µg/ml siendo el corte aceptable 64 µg/ml.

Para ciprofloxacino, 2 cepas LPT87 y AB9, fueron resistentes a altas concentraciones del antibiótico, sin embargo esta resistencia específica está referida como intrínseca, careciendo por lo tanto de potencialidad de transferencia genética.

**Tabla 1.** Valores de susceptibilidad CMI (µg/ml) frente a 20 antibióticos, utilizando el método E-test.

	Antibióticos																	
	CI	LZ	SM	CM	GM	RI	AK	EM	AC	VA	AM	NC	QDA	CE	CL	TC	XL	MZ
BN2RR	0,5	3	16	0,1	3	0	96	0,1	0,4	256	0,1	3	1,5	8	2	0	0	256
BNB	1,5	2	256	1	16	2	256	1	0,4	1,5	0,3	16	0,5	8	1	8	0	256
CHLMUSS01	0,75	0,8	64	0	3	1	32	0,2	0,1	256	0,2	3	0,19	0,38	2	6	0	256
LPT87	32	2	24	0,3	0,8	0	4	0,1	0,1	256	0	0,4	0,5	4	2	6	0	256
AB9	32	3	16	0	1,5	0	16	0,3	0,8	256	0,8	1	2	0,75	3	6	1	256
AB4	1,5	3	16	0,3	3	1	32	0,3	0,1	256	0,3	0,4	0,5	0,4	2	8	0	256
AB5B	0,5	2,2	24	0,3	3	1	16	0,2	0,1	256	0,3	1	0,19	0,4	2	7	0	256
AB1B	0,75	2,2	16	0,1	0,8	0	16	0,1	0,4	256	0,3	3	2	0,4	2	7	0	256

CL: Cloranfenicol; CE: Cefalotin; AC: Amoxicilina; NC: Netilmicina; CI: Ciprofloxacino; AK: Amikacina; EM: Eritromicina; RI: Rifampicina; SM: Streptomina; AM: Ampicilina; GM: Gentamicina; VA: Vancomicina; MZ: Metronidazol; TC: Tetraciclina; LZ: Linezolid; XL: Amoxicilina/CLV 2/1; CM: Clindamicina; QDA: Dalfopristin-quinupristin.



**Figura 1:** Ejemplos de método E-test en 3 cepas lácticas. A) Cepa BNB susceptible a netilmicina. B) Cepa BNB susceptible a gentamicina. C) Cepa CLMUSS01 resistente a metronidazol. D) Cepa AB9 resistente a ciprofloxacino.

#### Discusión.

Al principio de la década del noventa, Curragh y Collins (1992) informaron de una alta tasa de mutación espontánea de resistencia a kanamicina y estreptomycin en lactobacilos, y mencionaron que esta propiedad no es infrecuente en cepas BAL. En años subsiguientes la resistencia a aminoglicósidos ha sido informada por varios otros investigadores (Charteris *et al.* 1998). Pero esta resistencia en cepas BAL a aminoglicósidos se considera una propiedad intrínseca y atribuida a la ausencia de transporte de electrones mediada por citocromos, la cual media la captación del agente antibiótico (Danielsen y Wind, 2003). Una propiedad que se asocia a la seguridad en el uso del probiótico pues en muchos casos estas resistencias no son transferibles.

Los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado por Danielsen y Wind (2003) que informaron de niveles de resistencia a aminoglicósidos en cepas BAL. Los valores resultantes para el aminoglicósido gentamicina mostró que la cepa BNB presentó niveles de resistencia por sobre el límite propuesto para este antibiótico Klare *et al.*, (2007), quien define como resistente cuyo e-test sea mayor a 8 ug/ml, en el caso del aminoglicósido estreptomycin nuevamente la cepa BNB presentó resistencia por sobre el valor propuesto por Klare *et al.*, (2007), cuyo e-test marcó 256 ug/ml siendo el corte aceptable 64 ug/ml. De esta forma se plantea excluir la cepa BNB de futuros análisis o aplicaciones en la industria para la cual se dirige este proyecto y así evitar riesgos o efectos o deseados.

No se observó diferencias significativas en los niveles de resistencia para los antibióticos ampicilina, dalfopristin-quinupristin, eritromicina y linezolid, entre las cepas de este estudio y los informados por Klare *et al.*, (2007). Además los valores fueron menores a los puntos de corte propuesto por estos autores. No se debe dejar de mencionar el hecho de que las 46 cepas estudiadas por Klare *et al.*, (2007), fueron aisladas desde diversos sustratos (alimentos y humanos) y ninguna tenía un origen similar al de las cepas analizadas en nuestro estudio.

La resistencia bacteriana a vancomicina se debe a la síntesis de un nuevo tipo de peptidoglican, en el cual el residuo D-alanina terminal es reemplazado por D-lactato, resultando en una drástica reducción de la afinidad a vancomicina (Arthur *et al.*, 1992; Bugg *et al.*, 1991; Handwerger *et al.*, 1992; Messer y Reynolds, 1992). Dos enzimas VanH y VanA son indispensables para la síntesis de este precursor alternativo (Arthur *et al.*, 1993). Se ha demostrado en cepas de *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus casei* la exclusiva participación de D-lactato terminal en precursores pentapéptidos en la resistencia la acción de vancomicina (Billot-Klein *et al.*, 1994; Handwerger *et al.*, 1994). Además, se han descrito resistencia a vancomicina en cepas de *L. acidophilus* reportando la curación de resistencia a este antibiótico por remoción de plásmidos, lo cual indica una resistencia transferible (Vescovo *et al.*, 1982; Charteris *et al.*, 1998). En nuestro estudio se observó resistencia a este antibiótico en 7 de las 8 cepas analizadas, siendo solo la cepa BNB susceptible. Sin embargo, por la resistencia a los aminoglicósidos gentamicina y estreptomycin en esta cepa, se planteó la exclusión de su estudio y aplicaciones próximas.

La resistencia a vancomicina en algunas especies bacterianas es de tipo intrínseca, es decir codificada cromosomalmente y no transferible (Ruoff *et al.*, 1988; Swenson *et al.*, 1990; Handwerger *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1998). La resistencia o susceptibilidad a vancomicina ha

merecido una especial consideración en términos de clasificación de las bacterias lácticas. Hamilton y Shah (1998) han utilizado la susceptibilidad a la vancomicina como una ayuda para identificar especies de *Lactobacillus*. Simpson (1988) y Felten (1999) asociaron sensibilidad a la vancomicina con *Lactobacillus acidophilus*, originalmente llamadas "Thermobacteria" y la resistencia a vancomicina a bacterias lácticas que pertenecen al grupo de las "Betabacteria". Al igual que para trimetoprim, la resistencia a vancomicina en cepas de *L. acidophilus* se ha determinado como una resistencia transferible (Vescovo *et al.*, 1982; Charteris *et al.*, 1998). Pero la resistencia en cepas BAL a los aminoglicósidos se considera una propiedad intrínseca.

Para ciprofloxacino, 2 cepas LPT87 y AB9, fueron resistentes a altas concentraciones del antibiótico, sin embargo esta resistencia específica está referida como intrínseca (Danielsen *et al.*, 2003), careciendo por lo tanto de potencialidad de transferencia genética.

Un reducido perfil de resistencia se observó en las cepas estudiadas, entre las que se encuentran principalmente streptomina, vancomicina, metronidazol, y en menor grado para amikacina, ciprofloxacino y netilmicina. La mayor parte de la resistencia encontrada es considerada resistencia intrínseca y no móvil, sin embargo se planteó la exclusión del microorganismo BN-B por presentar resistencia exclusiva a algunos antibióticos y su selección para su aplicación podría eventualmente complicar los objetivos de este proyecto.

## **ANEXO 6**

### **Diseño del proceso productivo de biomasa de las cepas probióticas seleccionadas a escala de laboratorio.**

#### **Objetivo General**

Determinar condiciones óptimas de crecimiento que permitan un futuro escalamiento de su cultivo en medios más económicos. Para este estudio previo, se empleó dos cepas ácido lácticas que forman parte del cepario general de microorganismos de nuestro grupo de investigación. Posteriormente, se exponen los resultados cinéticos para las cepas de abeja y bosque nativo seleccionadas.

#### **Metodología**

Para la cepa CLMUSS-01, se analizó el crecimiento en medios de cultivos formulados en base a Permeado de Lactosuero con aditivos (ver Tabla 1), en comparación al medio comercial MRS (Merck), La temperatura de cultivo fue de 37°C, por tratarse de una cepa de origen humano.

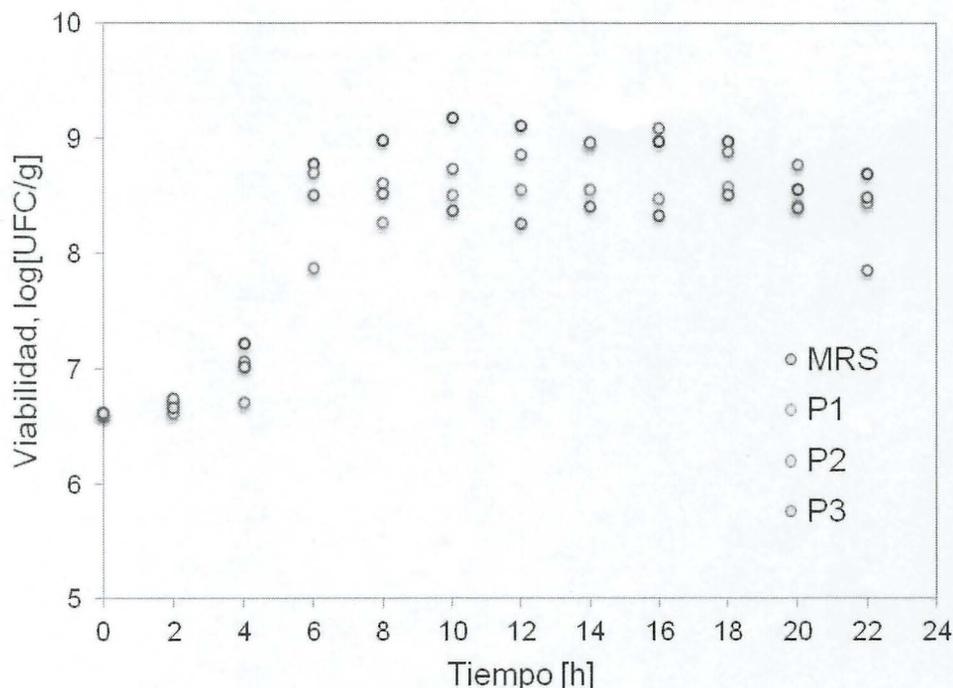
**Tabla 1. Medios de cultivo analizados**

<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Características</b>
<b>MRS</b>	Según Merck
<b>P1</b>	Permeado de Lactosuero hidrolizado, con aditivos y aumento en la concentración de acetato de sodio.
<b>P2</b>	Permeado de Lactosuero hidrolizado con aditivos, sales de Mg y Mn, reducción de concentración de acetato de sodio.
<b>P3</b>	Permeado de Lactosuero hidrolizado, sin aditivos.

Se tomaron muestras cada 2 horas, hasta completar un tiempo total de 24 horas; a las muestras obtenidas se les midió viabilidad, a través de la técnica de conteo en placas de MRS-Agar (Merck). El crecimiento bacteriano se ajustó al Modelo de Gompertz, de acuerdo a Zwietering, y otros (1990), cuyos parámetros se obtuvieron mediante MATLAB, y fueron utilizados para comparar el efecto de los medios de cultivos empleados en el desarrollo de este microorganismo.

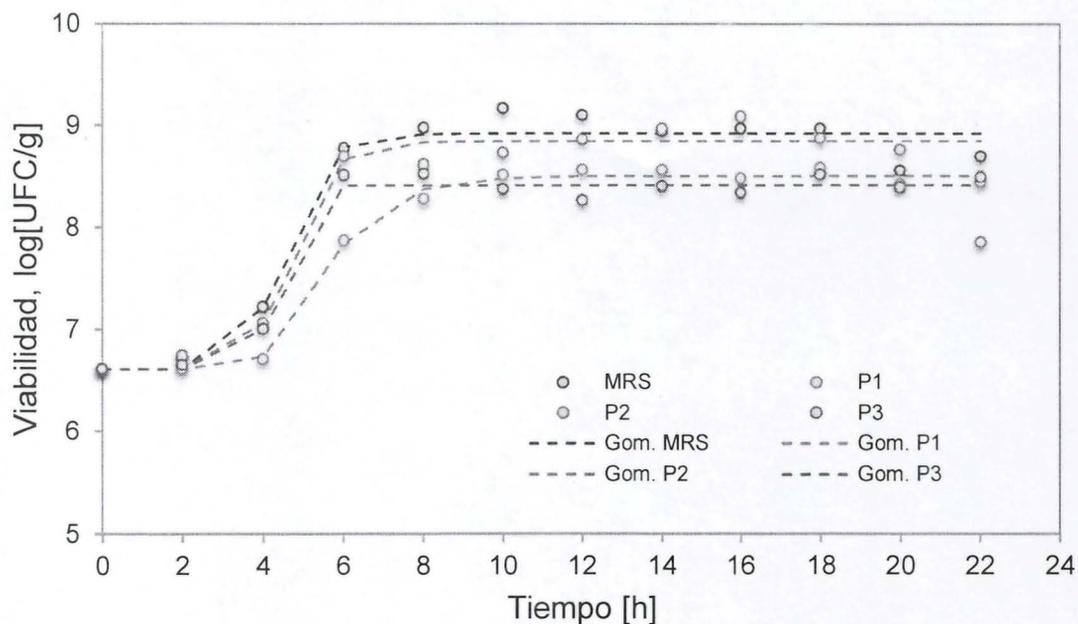
#### **Resultados.**

En la Figura 1 y 2, es posible apreciar que no hay mayores diferencias en el crecimiento de la cepa CLMUSS-1 en los medios ensayados, dado que la concentración máxima en todos los cultivos fue aproximadamente  $10^8$  UFC/ml. Sin embargo, es interesante notar que el medio P1 tiene un efecto importante en el retardo en el crecimiento, puesto que en el resto de los medios la fase estacionara comienza entre las 6 a 8 hrs, pero con P1 la fase estacionaria comienza entre las 8 a 10 hrs. Esta información es vital para efectos de escalamiento, dado que los cultivos, ya sean sistemas agitados en modo batch o feed batch, implican un costo energético alto, asociado principalmente a la propia agitación y al control de temperatura, variables directamente proporcionales al tiempo empleado en lograr una biomasa de alta concentración viable.



**Figura 1.** Curvas de crecimiento de la cepa CLMUSS-1 en los medios de cultivo ensayados.

Por otra parte, de la Tabla 2, es posible predecir la concentración máxima que alcanzará la biomasa de la cepa CLMUSS-1 cultivada en los distintos medios. Como ya se mencionó, este parámetro es similar en magnitud para MRS, P1, P2 y P3; sin embargo, los mejores resultados se logran con MRS y P2, donde las concentraciones en fase estacionaria fueron  $8.4 \times 10^8$  UFC/ml y  $7.02 \times 10^8$  UFC/ml, respectivamente. De hecho, tanto la duración de la fase *lag* es similar (3.54 horas para cultivo en MRS, y 3.64 horas para el cultivo en P2), como la velocidad específica de crecimiento ( $2.99 \text{ h}^{-1}$  para MRS versus  $2.77 \text{ h}^{-1}$  para P2), lo que indica claramente que P2 es el medio óptimo para cultivar esta cepa probiótica, y además, es mucho más barato que el medio comercial (927 \$/litro de P2 versus 4385 \$/litro de MRS). No obstante lo anterior, la concentración obtenida con el medio P3 se interesante, dado que este medio no contiene aditivos (ver Tabla 5), lo que es promisorio, considerando un ahorro importante en reactivos o sustancias nutritivas de grado microbiológico, disminuyendo aún más el costo de la preparación del medio de cultivo.

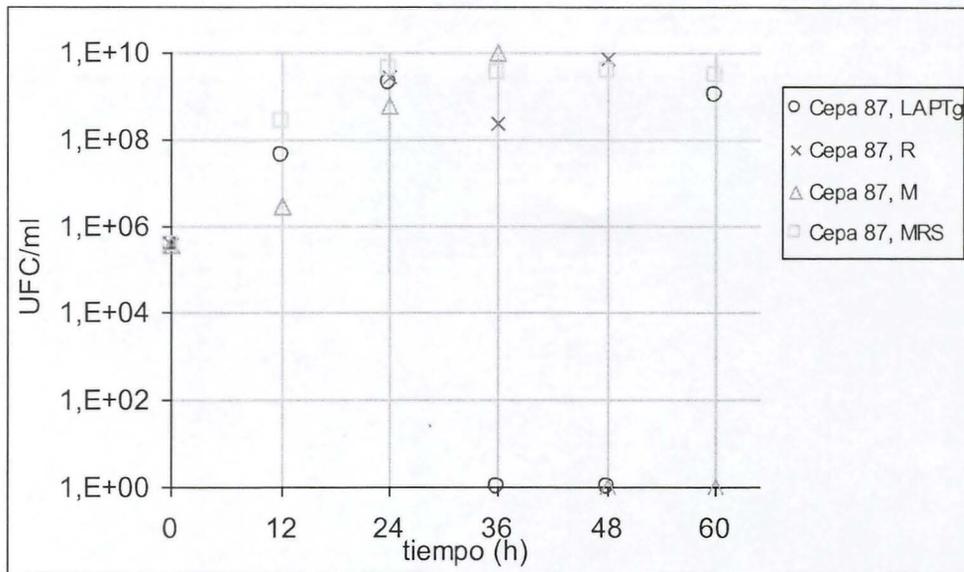


**Figura 2.** Curvas del Modelo de Gompertz ajustadas al crecimiento de la cepa CLMUSS-1 en los medios de cultivos ensayados.

**Tabla 2.** Parámetros de crecimiento de la cepa CLMUSS-1, según Modelo de Gompertz.

Parámetro	MRS	P1	P2	P3
A	5.33	4.35	5.15	4.13
$\lambda$ [h]	3.54	4.00	3.64	3.87
$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	2.99	1.46	2.77	6.64
R <sup>2</sup>	0.97	0.99	0.98	0.99
N <sub>máx</sub> [UFC/ml]	8.40x10 <sup>8</sup>	3.15x10 <sup>8</sup>	7.02x10 <sup>8</sup>	2.55x10 <sup>8</sup>

Para la cepa CLTUSS-87, se efectuaron cinéticas de crecimiento en los medios comerciales MRS y Rogosa (R), además del caldo LAPTg y del caldo en base a permeado de lactosuero (M). En la figura 3, se puede observar las tendencias obtenidas para la viabilidad de la cepa crecida en los diferentes caldos.



**Figura 3.** Viabilidad en función del tiempo, para cepa CLTUSS-87 (LAPTg, R, M, MRS, 20°C, 90rpm, pHo = 6.0)

Se observa que no existe un fuerte efecto del medio de cultivo sobre las cinéticas de viabilidad del microorganismo, lo que puede deberse a una carencia mínima de nutrientes. En base a estos resultados, se planificó un nuevo conjunto de experimentos, consistentes en la reformulación del medio M (en base a permeado de lactosuero), con el objetivo de lograr una producción de biomasa con microorganismos con alta actividad, capaces de resistir en mejor forma condiciones adversas impuestas por futuras operaciones unitarias (concentración, secado, formulación de del producto) y que pueda ejercer un rol preventivo como probiótico en la sanidad del cultivo del arándano.

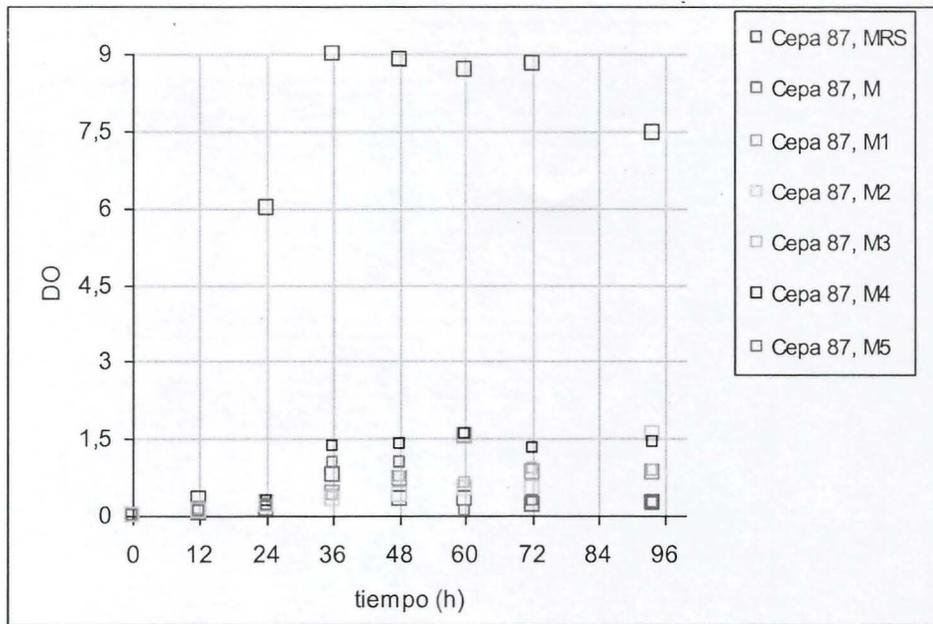
En esta etapa del trabajo se contempló la modificación en las concentraciones de peptona, extracto de levadura, extracto de carne y acetato de sodio. En la tabla 3, se pueden observar las modificaciones efectuadas para cada nuevo medio de cultivo:

**Tabla 3.** Nuevos medios de cultivo para el crecimiento de la cepa CLTUSS-87

	MRS	M	M1	M2	M3	M4	M5
Peptona Caseina	1	-	+	-	-	+	-
Extracto de carne	1	-	-	+	-	-	-
Extracto de levadura	0,4	-	-	-	+	+	-
D glucosa	2	-	-	-	-	-	-
D-Hidrog.-Fosf.-P.	0,2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Tween 80	0,1	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Acetato de sodio	0,5	+	+	+	+	-	-
Permeado de lactosuero	0	+	+	+	+	+	+
Enzima	0	+	+	+	+	+	+
Citrato	0,2	-	-	-	-	-	-
S. manganeso	0,001	-	-	-	-	-	-
S. mangnesio	0,02	-	-	-	-	-	-

Obs. + Indica un aumento de la concentración del reactivo con respecto al medio M  
 - Indica una disminución de la concentración del reactivo con respecto al medio M

En las figura 4, que resume los resultados de turbidez (540 nm) en función del medio de cultivo, se puede observar que, si bien existieron aumentos en las concentraciones de biomasa para los medios de cultivo M4 y M5, estos no son comparables todavía con el aumento experimentado en medio comercial MRS. La diferencia en producción de turbidez experimentada por los medios M4 y M5 no es sustancialmente diferente, a pesar de que el medio M4 sólo considera la reducción en la concentración de acetato y el medio M5 considera la reducción de esta sustancia y el aumento en la concentración de peptonas, extracto de carne y extracto de levadura. Diferentes autores han mencionado al acetato como inhibidor del crecimiento para otras cepas diferentes a *Lactobacillus spp.*, mientras que otros lo han reportado como potenciador en el crecimiento de estos microorganismos. A la luz de estos resultados, el acetato actúa como inhibidor en el crecimiento de estas cepas. Hay que recordar que los requerimientos nutricionales de los microorganismos son específicos para cada uno, al igual que la producción de metabolitos de reacción. En el caso de estas cepas, que pertenecen a grupos metabólicos heterofermentativos, excretan acetato como respuesta a sus procesos de vida, al igual que CO<sub>2</sub>.



**Figura 4.** Turbidez (540 nm) en función del tiempo, para la cepa CLTUSS-87 (MRS, M, M1, M2, M3, M4, M5, 20°C, 90rpm, pHo = 6.0)

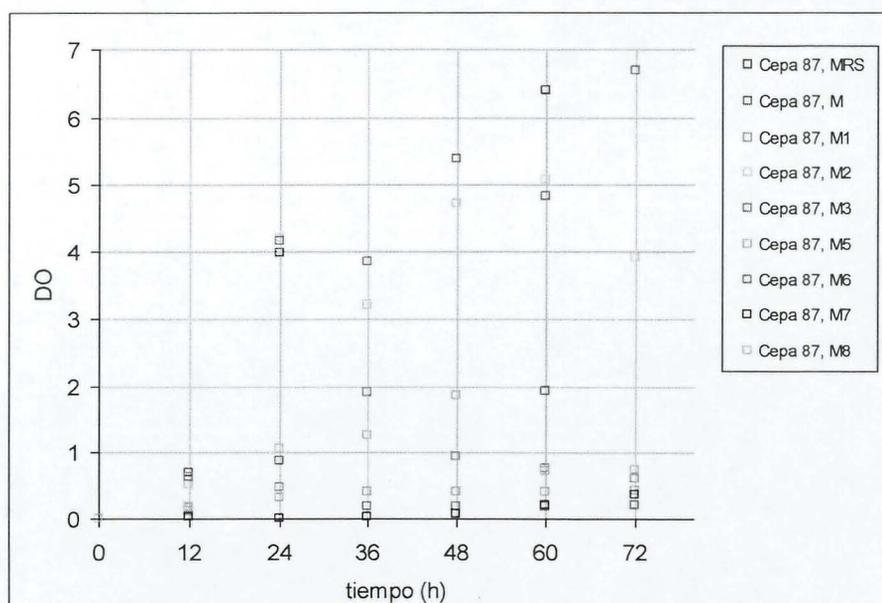
**Efecto de la incorporación de citrato, magnesio y manganeso sobre el crecimiento de las cepas probióticas.**

Se contempló la incorporación de citrato, magnesio y manganeso en cantidades muy pequeñas. El citrato actúa como cofactor de fermentación, junto con algún azúcar como glucosa, ribosa, galactosa, etc., aunque algunos autores lo han reportado como fuente energética sin la necesidad de presentar azúcares. Por otra parte, las sales de magnesio y manganeso han sido asociadas a la producción de enzimas relacionadas con los procesos de vida de los Lactobacilos (racemasa encargada de producir L-lactato y D-lactato, fermentación de azúcares, producción de otras moléculas de los microorganismos). La tabla 4, muestra el nuevo diseño experimental efectuado.

**Tabla 4.** Nuevos medios formulados para el crecimiento de cepas ácido lácticas.

	MRS	M	Con permeado				Con agua destilada			
			M1	M2	M3	M8	M5	M6	M7	
Peptona Caseína	1	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Extracto de carne	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto de levadura	0,4	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D glucosa	2	-	-	-	-	-	-	+	-	+
D-Hidrog.-Fosf.-P.	0,2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Tween 80	0,1	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Acetato de sodio	0,5	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Permeado de lactosuero	0	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Enzima	0	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Citrato	0,2	-	+	-	+	+	+	-	+	+
S. manganeso	0,001	-	-	+	+	+	-	-	-	-
S. mangnesio	0,02	-	-	+	+	+	-	-	-	-

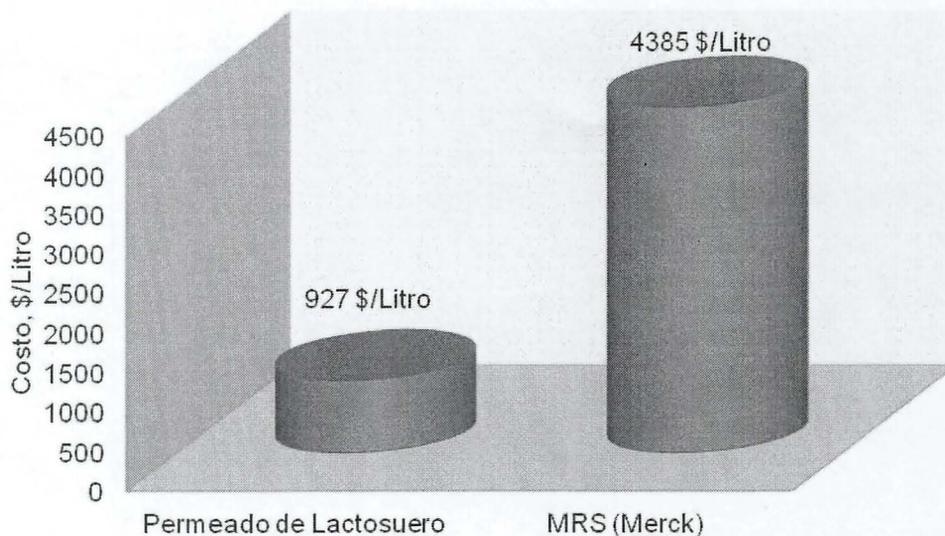
Obs. + Indica un aumento de la concentración del reactivo con respecto al medio M  
 - Indica una disminución de la concentración del reactivo con respecto al medio M



**Figura 5.** Turbidez (540 nm) en función del tiempo, para la cepa CLTUSS-87 (MRS, M, M1, M2, M3, M5, M6, M7, M8, 20°C, 90rpm, pHo = 6.0)

Se puede observar que la incorporación sólo de los minerales (MRS) ya permite un aumento en la producción de biomasa, cercano al experimentado en el medio comercial MRS (figura 5).

Con estos resultados es posible concluir que esta nueva cepa en estudio posee diferentes exigencias nutricionales que las cepas aisladas desde microbiota humana. El medio de cultivo M fue optimizado satisfactoriamente.



**Figura 6.** Comparación del costo de preparar un medio en base a Permeado de Lactosuero frente a un medio comercial (MRS, Merck)

### Conclusiones

- La concentración máxima en fase estacionaria de la cepa CLMUSS-1 en los distintos medios ensayados fue del orden de  $10^8$  UFC/ml.
- Un medio óptimo para cultivar la cepa CLMUSS-1 es P2, obteniéndose resultados similares al cultivo en caldo MRS, siendo la concentración máxima en fase estacionaria de  $7.02 \times 10^8$  UFC/ml.
- La fase estacionaria del cultivo de la cepa CLMUSS-1 en P2 comienza entre las 6 y 8 hrs, con lo que su cosecha se debe realizar a las 12 horas, como límite máximo (fase estacionaria en su periodo medio).
- El costo del medio P2 es de 927\$/litro y es mucho más barato que el costo del medio comercial MRS (4385 \$/litro) (figura 6).

### Estudios de crecimiento con cepas aisladas de abejas y bosque nativo.

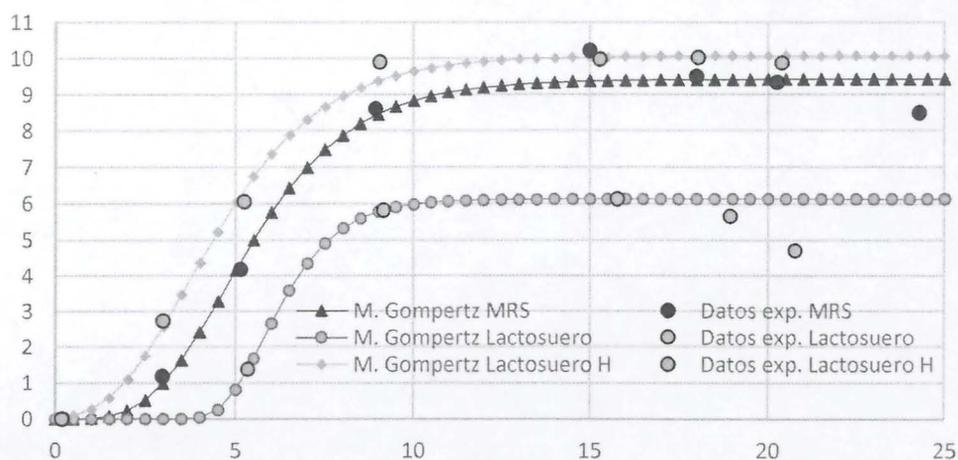
Una vez definido el medio de cultivo a emplear en el cultivo, se estudió la cinética de crecimiento de las cepas ácido lácticas AB-1B, AB-4, AB-5B y AB-9 en medio comercial MRS y en medio de cultivo a base de lactosuero, con y sin hidrolizar la lactosa, incubando a  $37^\circ\text{C}$  con agitación constante, a fin de establecer y evaluar el crecimiento de las cepas en los distintos medios. El MRS es un medio de cultivo que tiene un costo mayor al medio formulado si se piensa en una producción de biomasa a escala mayor.

Inicialmente las cepas, almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$ , fueron activadas tomando  $100 \mu\text{L}$  de cada una de ellas y depositadas en tubos con 4 mL de medio MRS estéril, llevando a la estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas, sin agitación. Transcurrido este tiempo, se realizó un traspaso, que consiste en tomar  $100 \mu\text{L}$  del primer tubo y depositarlos en un nuevo tubo con 4 mL de medio MRS; nuevamente llevando a la estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 12 horas, sin agitación. Para el caso de la cepa

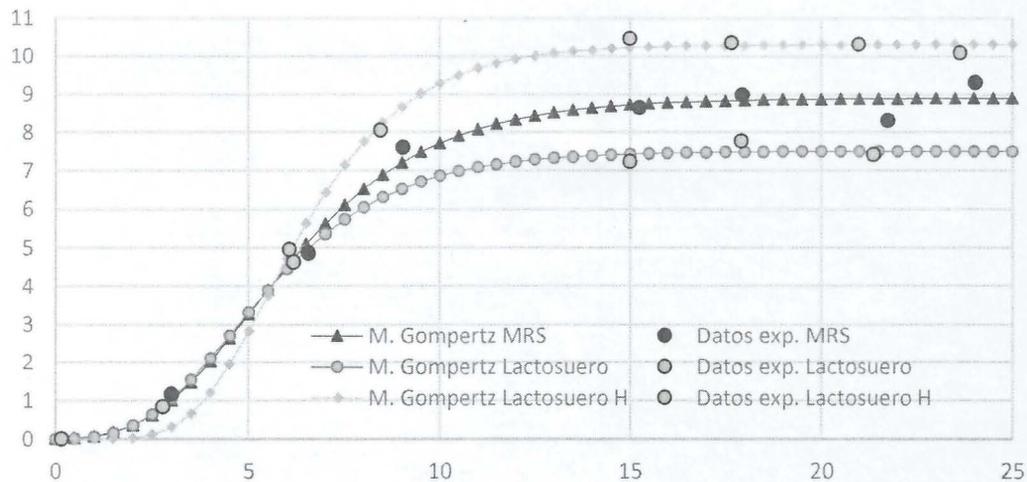
AB-1B, el proceso de activación resultó ser más lento, requiriendo 24 horas en vez de 12 ocurrido el traspaso.

Transcurridas las 12 horas desde el traspaso, el tubo es centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se obtiene un pellet, al cual se agregan 500  $\mu$ L de suero fisiológico. De esta suspensión se tomaron aproximadamente 75  $\mu$ L y se traspasaron a un tubo con 4 mL de suero fisiológico estéril. Se midió y ajustó la densidad óptica de este tubo a 625 nm hasta obtener una absorbancia entre 0,5 – 0,6. Este es el inóculo. Finalmente por cada 200 mL de medio, se agrega al medio esterilizado 350  $\mu$ L de inóculo. Aquí se inicia el proceso de cultivo de la cepa, llevando el matraz a la estufa a 37°C, con agitación constante. Se realizaron mediciones cada 3 horas hasta completar las 24 horas, registrando el pH y la viabilidad de la cepa.

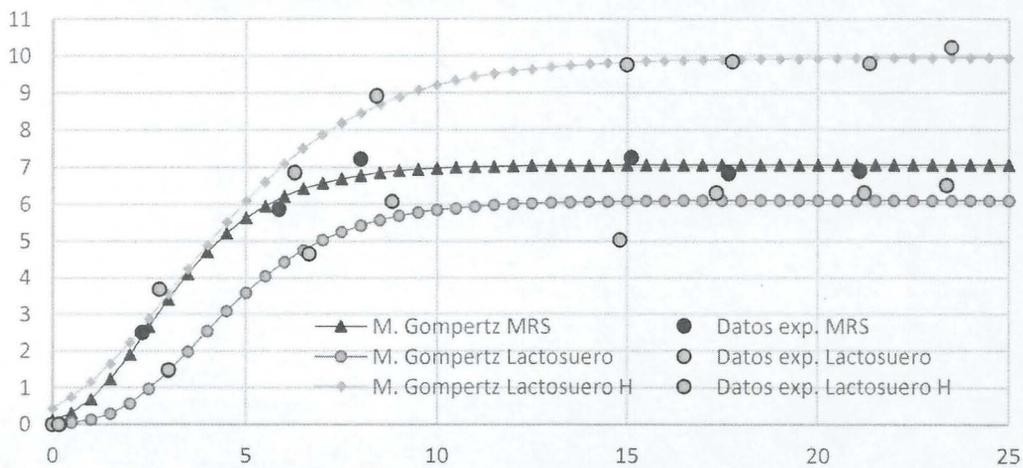
Las tablas 5 a 8 y figuras 7 a 10, se presentan los datos experimentales de pH y viabilidad obtenidos del estudio de las cinéticas de crecimiento de las cuatro cepas probióticas, utilizando el modelo cinético de Gompertz para modelar las fases de latencia, exponencial y estacionaria, entregando información de los valores máximos de viabilidad y el tiempo que demoran las bacterias en alcanzarlo.



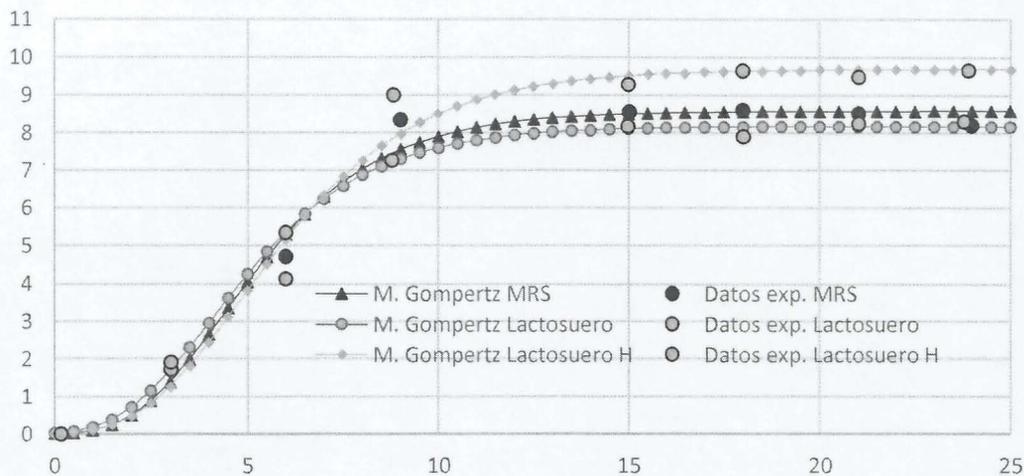
**Figura 7.** Cinética de crecimiento cepa AB-1B cultivada a 37°C.



**Figura 8.** Cinética de crecimiento cepa AB-4 cultivada a 37°C.



**Figura 9.** Cinética de crecimiento cepa AB-5B cultivada a 37°C.



**Figura 10.** Cinética de crecimiento cepa AB-9 cultivada a 37°C.

**Tabla 5.** Parámetros cinéticos cepa AB-1B obtenidos por el modelo de Gompertz para los distintos medios de cultivo.

	<b>Parámetro</b>	<b>MRS</b>	<b>Lactosuero</b>	<b>Lactosuero-H</b>
<b>AB-1B</b>	<b>A [ad]</b>	9,42	6,12	10,08
	<b><math>\mu_m</math> [1/h]</b>	1,76	2,00	1,82
	<b><math>\tau</math> [h]</b>	2,64	4,67	1,60
	<b><math>N_0</math> [UFC/mL]</b>	$7,40 \times 10^4$	$9,20 \times 10^4$	$5,60 \times 10^4$
	<b><math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math> [UFC/mL]</b>	$2,02 \times 10^9$	$4,20 \times 10^7$	$1,26 \times 10^9$
	<b><math>N_{m\acute{a}x\ G}</math> [UFC/mL]</b>	$9,11 \times 10^8$	$4,20 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7$
	<b>pH [<math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math>]</b>	4,54	5,46	4,11
	<b>t [h] [<math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math>]</b>	15	15	18

**Tabla 6.** Parámetros cinéticos cepa AB-4 obtenidos por el modelo de Gompertz para los distintos medios de cultivo.

	<b>Parámetro</b>	<b>MRS</b>	<b>Lactosuero</b>	<b>Lactosuero-H</b>
<b>AB-4</b>	<b>A [ad]</b>	8,90	7,50	10,31
	<b><math>\mu_m</math> [1/h]</b>	1,27	1,22	1,91
	<b><math>\tau</math> [h]</b>	2,43	2,28	3,53
	<b><math>N_0</math> [UFC/mL]</b>	$2,62 \times 10^5$	$2,42 \times 10^5$	$1,34 \times 10^5$
	<b><math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math> [UFC/mL]</b>	$2,08 \times 10^9$	$5,69 \times 10^8$	$4,72 \times 10^9$
	<b><math>N_{m\acute{a}x\ G}</math> [UFC/mL]</b>	$1,92 \times 10^9$	$4,39 \times 10^8$	$4,03 \times 10^9$
	<b>pH [<math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math>]</b>	3,97	5,53	3,95
	<b>t [h] [<math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math>]</b>	18	18	15

**Tabla 7.** Parámetros cinéticos cepa AB-5B obtenidos por el modelo de Gompertz para los distintos medios de cultivo.

	<b>Parámetro</b>	<b>MRS</b>	<b>Lactosuero</b>	<b>Lactosuero-H</b>
<b>AB-5B</b>	<b>A [ad]</b>	7,05	6,10	9,94
	<b><math>\mu_m</math> [1/h]</b>	1,52	1,12	1,35
	<b><math>\tau</math> [h]</b>	0,74	1,73	0,38
	<b><math>N_0</math> [UFC/mL]</b>	$4,28 \times 10^5$	$7,72 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5$
	<b><math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math> [UFC/mL]</b>	$6,00 \times 10^8$	$4,20 \times 10^8$	$2,78 \times 10^9$
	<b><math>N_{m\acute{a}x\ G}</math> [UFC/mL]</b>	$4,95 \times 10^8$	$3,45 \times 10^8$	$3,07 \times 10^9$
	<b>pH [<math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math>]</b>	4,21	5,63	3,86
	<b>t [h] [<math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math>]</b>	15	18	18

**Tabla 8.** *Parámetros cinéticos cepa AB-9 obtenidos por el modelo de Gompertz para los distintos medios de cultivo.*

	<b>Parámetro</b>	<b>MRS</b>	<b>Lactosuero</b>	<b>Lactosuero-H</b>
<b>AB-9</b>	<b>A [ad]</b>	8,58	8,18	9,69
	<b><math>\mu_m</math> [1/h]</b>	1,40	1,33	1,40
	<b><math>\tau</math> [h]</b>	2,11	1,77	2,27
	<b><math>N_0</math>[UFC/mL]</b>	$1,82 \times 10^5$	$1,64 \times 10^5$	$1,76 \times 10^5$
	<b><math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math>[UFC/mL]</b>	$9,80 \times 10^8$	$5,84 \times 10^8$	$2,72 \times 10^9$
	<b><math>N_{m\acute{a}x\ G}</math>[UFC/mL]</b>	$9,68 \times 10^8$	$5,84 \times 10^8$	$2,85 \times 10^9$
	<b>pH [<math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math>]</b>	4,02	5,64	3,88
	<b>t [h] [<math>N_{m\acute{a}x\ exp}</math>]</b>	18	15	18

## **ANEXO 7**

### **DESARROLLO DE UN PROCESO DE FABRICACIÓN DEL PREPARADO EN POLVO**

En esta etapa se estudió la técnica de secado por atomización para obtener un preparado en polvo mediante microencapsulación, dando lugar a cápsulas de tamaño micrométrico que pueden liberar su contenido, y mantener la estabilidad de los probióticos durante su almacenamiento en el tiempo.

La estabilidad se ve determinada por factores como la luz, el oxígeno, la temperatura y la humedad. La presencia de oxígeno influye directamente en la formación de radicales libres que pueden reaccionar oxidando ácidos grasos presentes en la membrana celular. Por otro lado, la deshidratación disminuye la disponibilidad de agua dentro de las células de tal manera que alcanzan un estado de latencia durante el cual se vuelve más lento el metabolismo, incluso llegando a detenerse, consiguiendo finalmente su almacenamiento en forma más estable.

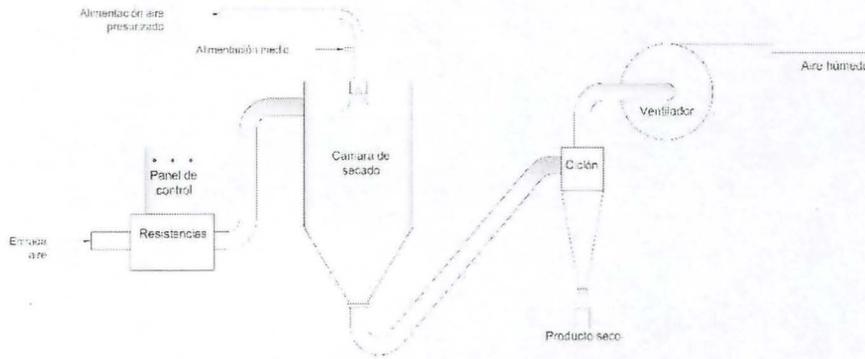
En el sistema de microencapsulación mediante secado por atomización, la cepa probiótica en el medio es atomizada, y al entrar en contacto con un flujo de aire caliente, evapora el líquido a baja temperatura, esto porque al ser un proceso rápido, evita que el núcleo de la microcápsula se caliente, no alterando la bacteria en su viabilidad y propiedades probióticas.

El proceso consta de 4 etapas principales:

- 1- Atomización de la alimentación al secador
- 2- Contacto entre la lluvia atomizada y el agente secante (aire caliente)
- 3- Secado de la lluvia atomizada (evaporación de la humedad/volátiles)

4- Separación del producto seco en polvo del aire en un ciclón.

Un esquema del equipo empleado se presenta a continuación.



**Figura 1.** Esquema de secador por atomización

Para proteger a las bacterias probióticas de las altas temperaturas durante el secado y/o estabilidad durante el almacenamiento se utilizaron tres medios encapsulantes: el primero, el medio protector tradicional (MPT) constituido por proteína de suero, glutamato monosódico, sorbitol, estearato y sacarosa; para el segundo se agregó extracto de fructo-oligosacáridos al MPT, y para el tercer medio protector se agregó harina de topinambur al MPT.

**Tabla 1:** Condiciones de operación del secador por atomización para cada cepa

	Secado 1	Secado 2	Secado 3
<b>Temperatura de entrada (°C)</b>	180	180	180
<b>Temperatura de salida (°C)</b>	70	70	70
<b>Presión de atomización (MPa)</b>	0,1	0,1	0,1
<b>% Sólidos</b>	25%p/v MPT	25%p/v MPT + 15%v/v FOS	25%p/v MPT + 5%(25%p/v MPT) Harina de Topinambur

Así, para los distintos medios protectores durante el secado por atomización se obtuvieron los siguientes rendimientos:

**Tabla 2.** Viabilidad y rendimientos obtenidos del secado por atomización para cada cepa y medio protector

		Gramos de sólidos en el medio (1L)	Gramos producto deshidratado (1L)	Rendimiento secado %	Viabilidad antes del secado (UFC/mL)	Viabilidad después del secado (UFC/g)	Humedad %
AB1B	SECADO 1	250	71,5	28,59	8,00x10 <sup>8</sup>	3,09x10 <sup>9</sup>	13,84%
	SECADO 2	250	90,5	36,20	1,20x10 <sup>9</sup>	2,80x10 <sup>9</sup>	10,09%
	SECADO 3	267,5	61,4	22,95	1,08x10 <sup>9</sup>	2,22x10 <sup>9</sup>	-
AB4	SECADO 1	250	90,05	36,02	1,20x10 <sup>9</sup>	1,20x10 <sup>9</sup>	12,90%
	SECADO 2	250	124,4	49,76	8,20x10 <sup>8</sup>	7,50x10 <sup>8</sup>	10,74%
	SECADO 3	267,5	122,3	45,72	1,22x10 <sup>9</sup>	7,20x10 <sup>8</sup>	11,61%
AB5B	SECADO 1	250	73,3	29,32	2,02x10 <sup>9</sup>	5,68x10 <sup>8</sup>	11,73%
	SECADO 2	250	90	36,00	7,00x10 <sup>8</sup>	1,29x10 <sup>9</sup>	9,21%
	SECADO 3	267,5	60,4	22,58	1,20x10 <sup>9</sup>	1,93x10 <sup>9</sup>	8,77%
AB9	SECADO 1	250	92,25	36,90	1,76x10 <sup>9</sup>	1,80x10 <sup>9</sup>	11,14%
	SECADO 2	250	107,2	42,88	1,70x10 <sup>9</sup>	3,60x10 <sup>8</sup>	13,91%
	SECADO 3	267,5	108,6	40,60	1,84x10 <sup>9</sup>	1,20x10 <sup>9</sup>	8,87%

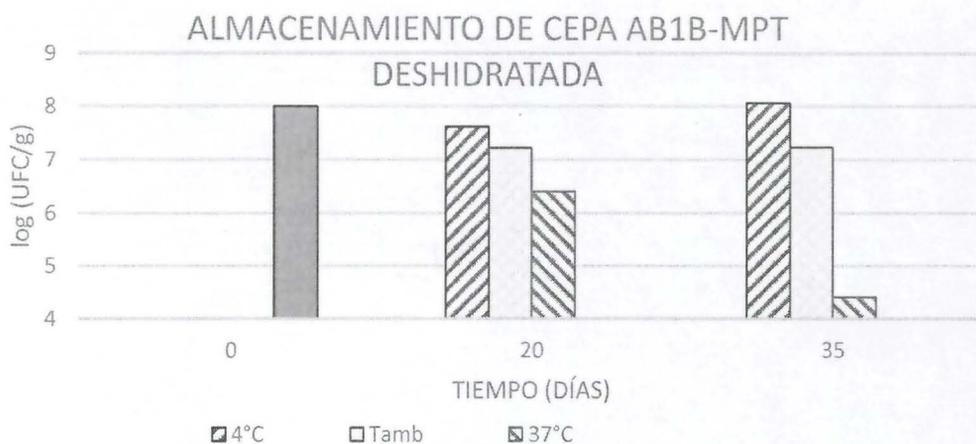
Se observa que el mayor rendimiento se obtiene para el secado con medio encapsulante tradicional (MPT) con extracto de fructo-oligosacáridos.

#### Evaluación de la viabilidad del producto probiótico formulado

Los productos secos fueron envasados al vacío y almacenados en bolsas trilaminadas a 4°C, temperatura ambiente (20°C) y 37°C, protegiéndolos así de la humedad, el oxígeno y la luz. Los resultados de viabilidad en el tiempo de almacenamiento del producto seco para las cepas AB1B, AB4, AB5B y AB9 se presentan en las siguientes tablas y figuras:

**Tabla 3.** Viabilidad en el tiempo de producto seco cepa AB1B con MPT

AB1B -MPT	DÍAS	4°C		Tambiente		37°C	
		HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)
	0	9,41%	1,00x10 <sup>8</sup>	9,41%	1,00x10 <sup>8</sup>	9,41%	1,00x10 <sup>8</sup>
	20	6,88%	4,10x10 <sup>7</sup>	7,62%	1,68x10 <sup>7</sup>	10,79%	2,54x10 <sup>6</sup>
	35	-	1,14x10 <sup>8</sup>	-	1,71x10 <sup>7</sup>	13,26%	2,52x10 <sup>4</sup>

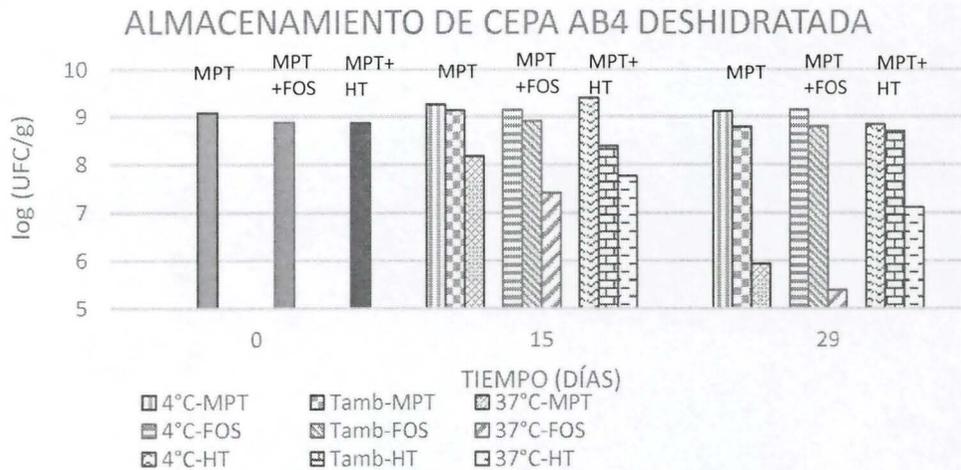


**Figura 2.** Viabilidad en ciclos logarítmicos (UFC/g) v/s tiempo de almacenamiento de cepa AB1B con MPT deshidratada.

**Tabla 4.** Viabilidad en el tiempo de cepa AB4 deshidratada.

	DÍAS	4°C		Tambiente		37°C	
		HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)
<b>AB4 -MPT</b>	0	12,90%	1,20x10 <sup>9</sup>	12,90%	1,20x10 <sup>9</sup>	12,90%	1,20x10 <sup>9</sup>
	15	-	-	-	-	12,55%	1,48x10 <sup>8</sup>
	17	8,42%	1,83x10 <sup>9</sup>	9,33%	1,36x10 <sup>9</sup>	-	-
	29	9,56%	1,30x10 <sup>9</sup>	9,58%	6,11x10 <sup>8</sup>	8,68%	8,51x10 <sup>5</sup>
<b>AB4 -MPT + FOS</b>	DÍAS	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)
	0	10,74%	7,50x10 <sup>8</sup>	10,74%	7,50x10 <sup>8</sup>	10,74%	7,50x10 <sup>8</sup>
	15	-	-	-	-	11,44%	2,54x10 <sup>7</sup>
	17	8,05%	1,41x10 <sup>9</sup>	6,61%	8,17x10 <sup>8</sup>	-	-
	29	7,89%	1,40x10 <sup>9</sup>	5,70%	6,30x10 <sup>8</sup>	7,79%	2,44x10 <sup>5</sup>

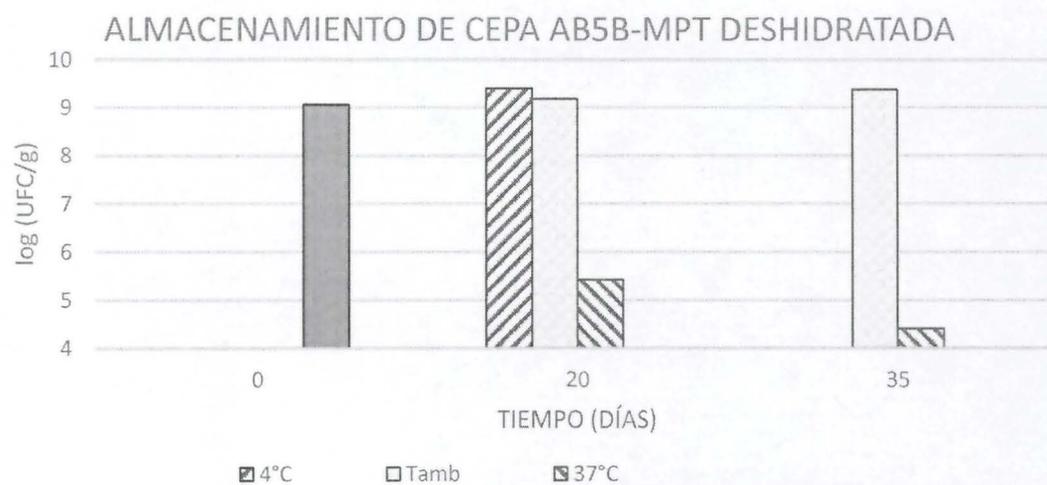
AB4 -MPT + HP	DÍAS	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)
	0	11,61%	7,20x10 <sup>8</sup>	11,61%	7,20x10 <sup>8</sup>	11,61%	7,20x10 <sup>8</sup>
	15	-	-	-	-	13,06%	5,75x10 <sup>7</sup>
	17	11,61%	2,46x10 <sup>9</sup>	8,99%	2,43x10 <sup>8</sup>	-	-
	29	9,20%	6,87x10 <sup>8</sup>	5,40%	4,93x10 <sup>8</sup>	9,68%	1,29x10 <sup>7</sup>



**Figura 3.** Viabilidad en ciclos logarítmicos (UFC/g) v/s tiempo de almacenamiento de cepa AB4 deshidratada.

**Tabla 5.** Viabilidad en el tiempo de cepa AB5B con MPT deshidratada.

AB5B -MPT	DÍAS	4°C		Tambiente		37°C	
		HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)
	0	11,45%	1,13x10 <sup>9</sup>	11,45%	1,13x10 <sup>9</sup>	11,45%	1,13x10 <sup>9</sup>
20	-	2,45x10 <sup>9</sup>	11,31%	1,52x10 <sup>9</sup>	9,82%	2,66x10 <sup>6</sup>	
35	-	-	0,102	2,33x10 <sup>9</sup>	10,72%	2,49x10 <sup>4</sup>	



**Figura 4.** Viabilidad en ciclos logarítmicos (UFC/g) v/s tiempo de almacenamiento de cepa AB5B con MPT deshidratada.

Tabla 6. Viabilidad en el tiempo de cepa AB9 deshidratada.

		4°C		T° ambiente		37°C	
AB9 -MPT	DÍAS	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)
	0	11,14%	1,80x10 <sup>9</sup>	11,14%	1,80x10 <sup>9</sup>	11,14%	1,80x10 <sup>9</sup>
	15	7,44%	2,73x10 <sup>9</sup>	13,63%	1,36x10 <sup>9</sup>	9,44%	8,71x10 <sup>8</sup>
	29	5,01%	1,03x10 <sup>9</sup>	9,06%	8,11x10 <sup>8</sup>	6,27%	1,42x10 <sup>8</sup>
AB9 -MPT + FOS	DÍAS	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)
	0	13,91%	3,60x10 <sup>8</sup>	13,91%	3,60x10 <sup>8</sup>	13,91%	3,60x10 <sup>8</sup>
	15	7,47%	2,43x10 <sup>9</sup>	13,65%	1,97x10 <sup>9</sup>	11,52%	9,84x10 <sup>8</sup>
	29	-	-	8,73%	1,58x10 <sup>9</sup>	8,61%	9,29x10 <sup>7</sup>
	32	4,11%	1,33x10 <sup>9</sup>	-	-	-	-
AB9 -MPT + HP	DÍAS	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)	HUMEDAD	VIABILIDAD (UFC/g)
	0	8,87%	1,20x10 <sup>9</sup>	8,87%	1,20x10 <sup>9</sup>	8,87%	1,20x10 <sup>9</sup>
	15	13,26%	6,87x10 <sup>8</sup>	12,63%	1,28x10 <sup>9</sup>	13,42%	2,93x10 <sup>8</sup>
	29	-	-	8,11%	1,56x10 <sup>9</sup>	7,15%	3,52x10 <sup>6</sup>
	32	4,62%	6,19x10 <sup>8</sup>	-	-	-	-

### ALMACENAMIENTO DE CEPA AB9 DESHIDRATADA

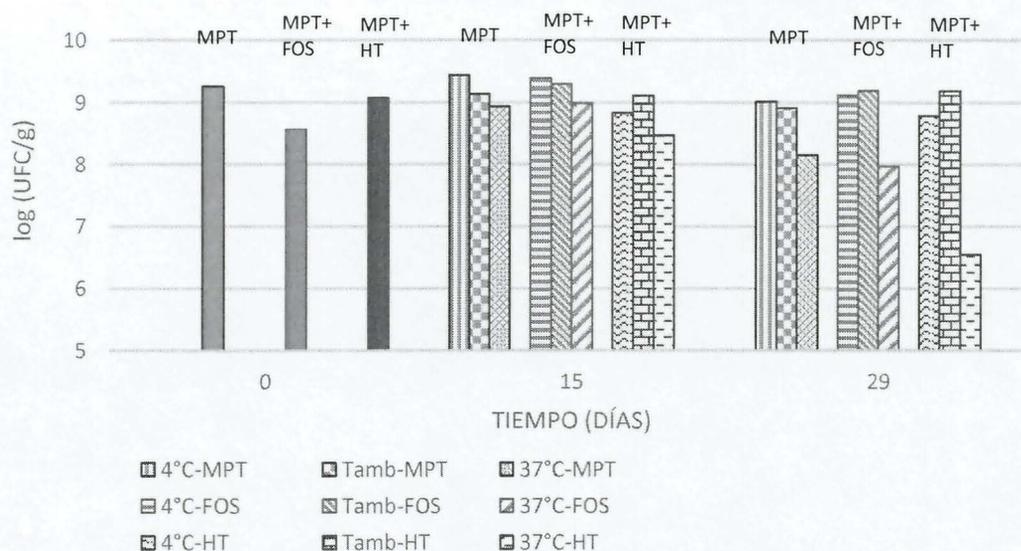


Figura 5. Viabilidad en ciclos logarítmicos (UFC/g) v/s tiempo de almacenamiento de cepa AB9 deshidratada.

De las tablas y figuras anteriores se observa que a los 30 días de almacenamiento los productos secos correspondientes a las cepas AB1B, AB4, AB5B y AB9, a las temperaturas

de 4°C y a temperatura ambiente mantienen en forma estable su viabilidad, independiente del medio encapsulante utilizado, no así para el producto almacenado a 37°C, donde la viabilidad disminuye sólo 1 ciclo logarítmico a los 15 días, para después de los 30 días aumentar en más ciclos logarítmicos.

Los resultados anteriores están indicando que las cepas probióticas en estudio no presentarían pérdida de viabilidad por tiempos prolongados, como sería el caso de los 90 días, si son almacenadas a 4°C, incluso las pérdidas serían mínimas si el almacenamiento se efectúa a temperatura ambiente (alrededor de 20°C). Lo anterior queda confirmado por el ensayo de almacenamiento a 37°C, ensayo acelerado, en el cual se logra también un buen grado de estabilidad de las cepas.

## **ANEXO 8.**

### **EVALUACIÓN DE INOCUIDAD *IN VIVO* DEL PROTOTIPO MEDIANTE UN MODELO MURINO.**

#### **Introducción**

Un probiótico son bacterias vivas que, cuando se ingiere en cantidades suficientes, ejerce beneficios para la salud de los consumidores". A lo largo del tiempo los probióticos se han utilizado con éxito para controlar las enfermedades gastrointestinales. También parecen aliviar los síntomas de la alergia y las enfermedades con la patología inmunológicas (Kalliomäki *et al.*, 2001; Vanderhoof & Young, 2003). Los probióticos ejercen sus beneficios a través de varios mecanismos, evitan la colonización, la adhesión celular y la invasión por organismos patógenos, que tienen actividad antimicrobiana directa y que modulan la respuesta inmune del huésped (Doron & Gorbach, 2006). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que no todas las especies bacterianas tienen actividades iguales en su acción al momento de ser ingeridos (Rath *et al.*, 1996; García-Lafuente *et al.*, 1997; Rath *et al.*, 1999; Verdu *et al.*, 2000).

No obstante, muchos de estos ensayos terapéuticos hacen asignaciones limitadas en cuanto (i) la frecuencia y la vía de administración de probióticos óptima, (ii) selección racional de cepas bacterianas, (iii) posibles efectos adversos, y (iv) los efectos inmunes *in vivo* de los probióticos. Por lo tanto, la selección de nuevas cepas probióticas debería tener en cuenta los puntos mencionados anteriormente (Pavan *et al.*, 2003).

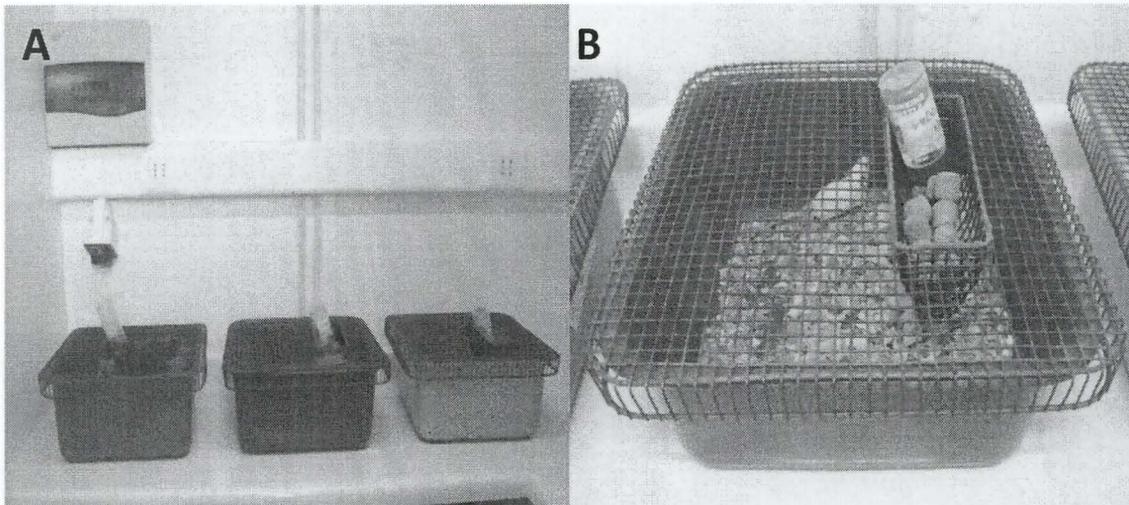
Estudios experimentales *in vivo* usando ratones Balb/c, muestran escasos signos de inflamación intestinal como aquella observada en humanos (Santos *et al.*, 2001; Wallis & Galyov, 2000), lo cual los hace aptos para recibir dosis de bacterias que quieran evaluarse. Los ratones balb/c son utilizados ampliamente a nivel mundial para ensayos murinos de todo tipo de investigación ya que, al tratarse de un mamífero, una gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre, tienen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los bioterios, lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones. Además, es una de las especies de mamífero mejor estudiadas desde el punto de vista genético (Benavides & GuEnet, 2001).

La presente actividad tuvo como objetivo de investigación evaluar la respuesta que entregan los ejemplares Balb/c en un modelo murino, después de la administración de cepas probióticas AB1B-AB5B-AB9 durante 7 días.

## Metodología.

### Diseño experimental

Para este modelo se utilizaron ratones hembras cepa BALB/c, las que se mantuvieron en jaulas y bajo condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ), fotoperiodo 12:12 y alimentación *ad-libitum* (Ver figura 1). El cronograma de actividades efectuadas se muestra en la tabla 1.



**Figura 1.** Mantenimiento de ratones en bioterio.

Los animales fueron divididos formando 4 grupos de 6 ratones cada uno. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

**Grupo 1.** Corresponde a los animales que fueron alimentados con pellet comercial e hidratados mediante agua por todo el experimento.

**Grupo 2.** Corresponde a los animales que fueron alimentados con pellet comercial e hidratados con agua más la cepa AB-1B en concentración  $1 \times 10^8$  UFC/mL durante 7 días

**Grupo 3.** Corresponde a los animales que fueron alimentados con pellet comercial e hidratados con agua más la cepa AB-5B en concentración  $1 \times 10^8$  UFC/mL durante 7 días

**Grupo 4.** Corresponde a los animales que fueron alimentados con pellet comercial e hidratados con agua más la cepa AB-9 en concentración  $1 \times 10^8$  UFC/mL durante 7 días

Las cepas probióticas: AB1B / AB5B / AB9 fueron producidas en el laboratorio de Bio-procesos en el cual se escaló hasta obtener biomasa deshidratada por spray.

**Tabla 1.** Cronograma de las actividades realizadas durante todo el ensayo

Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo	Lunes
Inicio de tratamientos G1, 2, 3, 4	Tratamientos y evaluación general de los animales	Fin de tratamientos G1, 2, 3, 4					
Pesar animales			Pesar animales				Pesar animales
Muestra basal Sangre, bazo y Ganglios linfáticos mesentéricos							Muestra de Sangre, bazo y Ganglios linfáticos mesentéricos
Microbiológico de deposiciones MRS y McConkey							Microbiológico de deposiciones MRS y McConkey

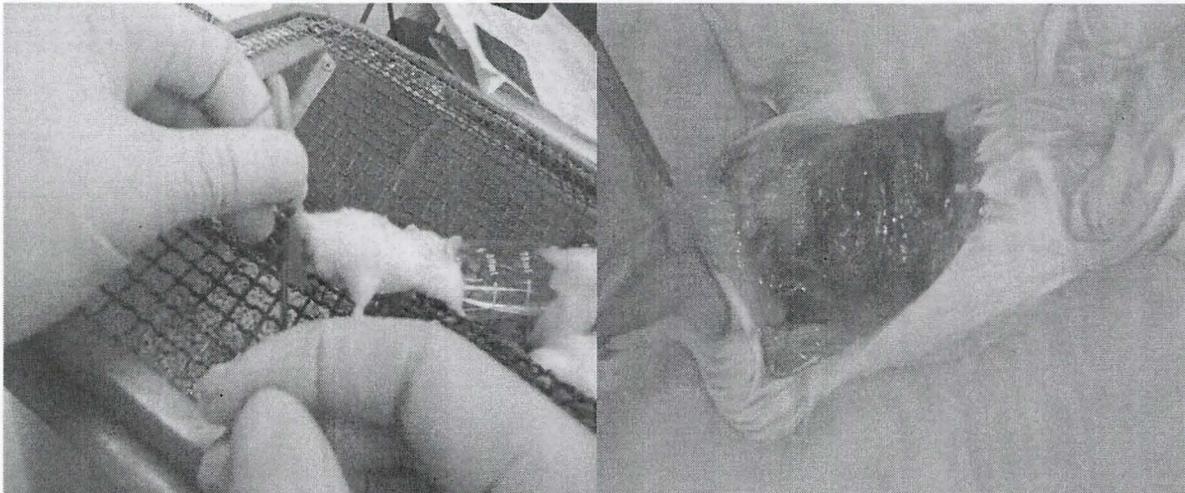
**Signos clínicos generales.** Se evaluaron y registraron signos clínicos asociados a la patología inducida experimentalmente tales como: diarrea, letargia, control de peso. Además se registró la sobrevivencia de cada tratamiento.

**Coprocultivos.** Muestras de heces obtenidas desde ratones de cada grupo experimental, fueron homogenizadas en solución fisiológica y sembradas en medios MRS (cepas lácticas) y en agar MacConkey.

**Hematológicos e inmunológicos.** Quantificación del Hematocrito: a cada ratón se le realiza un corte en la vena caudal (figura 7A), del cual se llenan 2- 4 tubos de microhematocrito. Estos tubos son centrifugados y mediante una regla normalizada (Heraeus Christ) se procede a leer el hematocrito. Posteriormente, desde estos tubos se obtiene plasma, en el cual se cuantificará IL-6 e IL-10. Para realizar el recuento leucocitario porcentual, una gota de sangre de vena caudal, fue colocada y extendida en portaobjetos, el cual fue teñido con May Grünwald-Giemsa. Se observó en el microscopio convencional y se informa las distintas poblaciones de leucocitos en forma porcentual (figura 2).

Bazo (Bz) y ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) (figura 7B) fueron homogeneizados en RPMI 1640. La suspensión celular fue centrifugada durante 10min a 320g a 4°C y el sobrenadante separado en alícuotas en el cual se cuantificará IL-6 e IL-10

Quantificación de citoquinas: IL-6 e IL-10 fueron cuantificadas en el sobrenadante obtenido de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos, mediante ELISA sándwich. Se informa la concentración en [pg/mL]

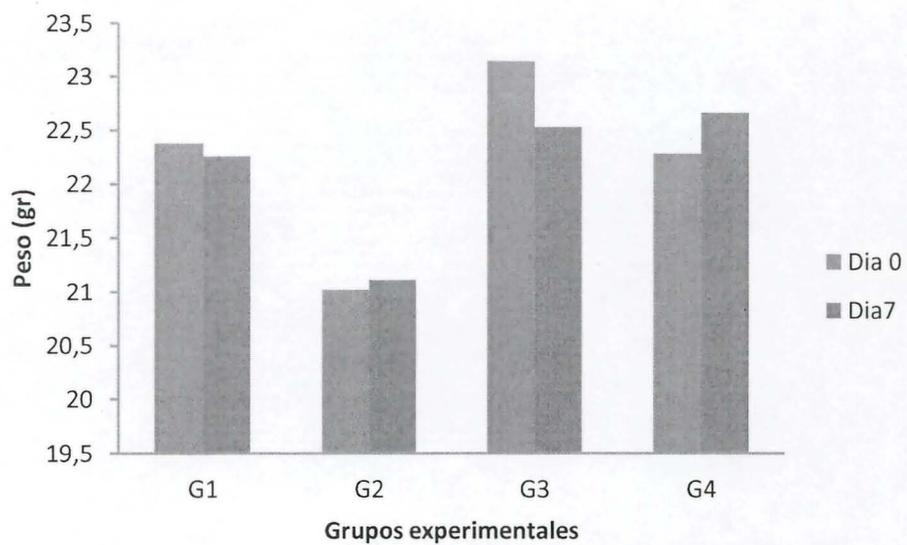


**Figura 2.** Obtención de sangre periférica por porque en la vena caudal. Disección de ratón para a obtención de tejidos.

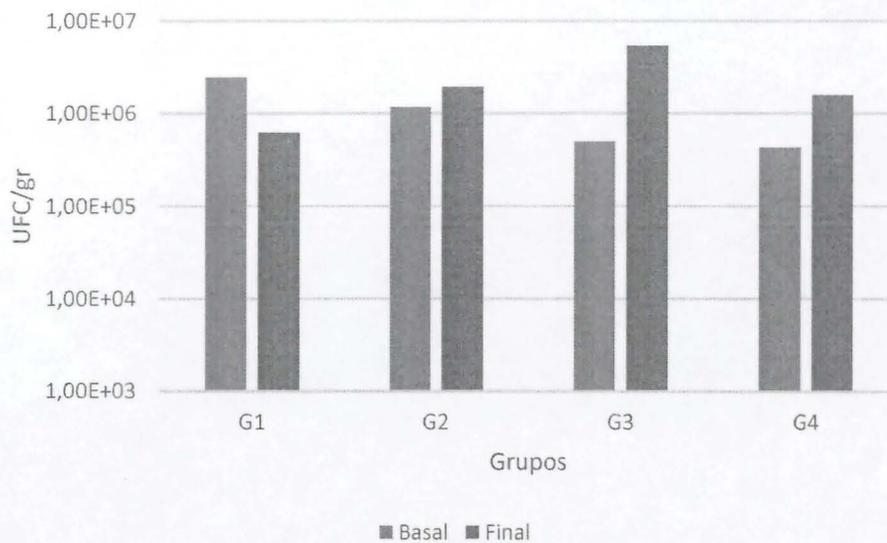
## RESULTADOS

**Signos clínicos generales.** En los animales estudiados no hubo presencia de diarrea, ni sangre en las deposiciones en ninguno de los animales en estudio.

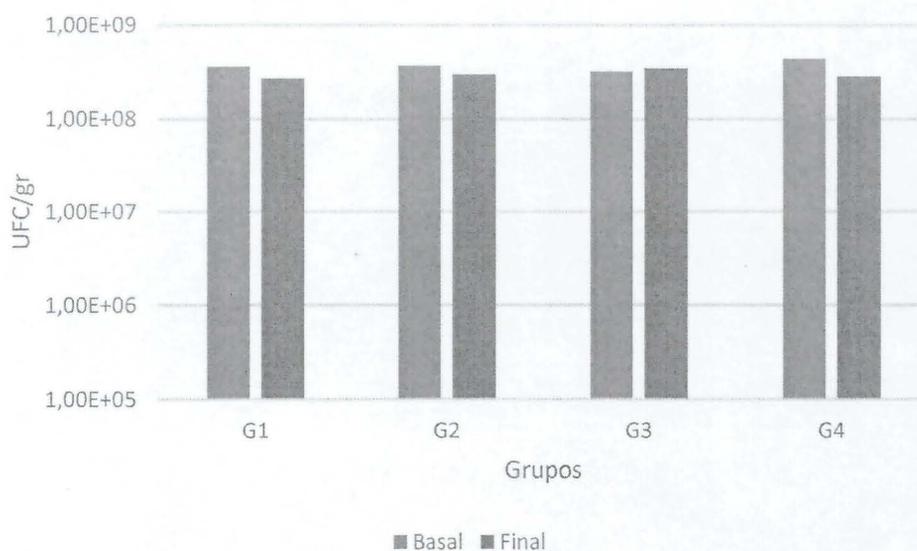
De acuerdo a lo que se puede apreciar en el figura 3, no se observaron variaciones de peso significativas en los promedio de peso de los animales por grupo durante la administración de los distintos tratamientos. Respecto a los cambios en la microbiota evidenciados en los recuentos a partir de deposiciones de los ratones, se aprecia una tendencia de incremento de los recuentos de bacterias gram negativas (figura 4) en los grupos tratados con las cepas, con respecto a la microbiota ácido láctica (figura 5) se pudo apreciar que no hubo cambios y se mantuvo estable durante el desarrollo del estudio.



**Figura 3.** Variación de peso de animales al inicio y fin de la administración de los productos.



**Figura 4.** Recuento microbiota Gram negativa en medio McConkey.



**Figura 5.** Recuento microbiota ácido láctica en medio MRS.

#### Resultados Inmunológicos hematológicos.

En la tabla 8 se observa que el hematocrito no varió al administrar las distintas cepas, siéndolos valores similares al Control PBS ( $48,9 \pm 1,5$ ).

No se obtuvo IL-6 e IL-10 en el suero, con valor 0 [pg/mL], tanto para el suero de los ratones control PBS, como para los 3 grupos en estudio. (Tabla 3)

En relación al recuento porcentual, (Tabla 4), no se observó diferencias en los 4 grupos en estudio.

Para IL-6, solo se obtuvo esta citoquina en los ganglios linfáticos mesentéricos en los grupos experimentales, para el control PBS no se detectó esta citoquina. En grupos experimentales no hay diferencial en los grupos tratados en cepas AB1B, AB5B y AB9. (Tabla 5) En el bazo, la concentración fue 0 [pg/mL]. Al contrario, la IL-10, está presente tanto en los ganglios linfáticos mesentéricos como en el bazo. En ambos casos no hay diferencias entre los 4 grupos en estudio (Tabla 6).

**Tabla 2.** Hematocrito (%) obtenido en los 4 grupos en estudio.

Grupo PBS (control)	Grupo AB1B	AB5B	AB9
48,9 ± 1,5	49,5 ± 0,6	49,4 ± 1,1	51 ± 1,7

**Tabla 3.** IL-6 sérica [pg/mL] en los grupos en estudio

Grupo PBS (control)	Grupo AB1B	AB5B	AB9
0	0	0	0

**Tabla 4.** Recuento relativo (%) de la fórmula leucocitaria en los grupos en estudio.

Grupo	Basófilos	Eosinófilos	Segmentados Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos
Control PBS	0	2 ± 1	29 ± 3	63,7 ± 3,8	5,3 ± 0,6
AB1B	0	2,7 ± 0,6	24 ± 5,3	66,3 ± 3,8	7 ± 1,7
AB5B	0	2 ± 1	30,3 ± 6,7	57,9 ± 4,6	8 ± 2
AB9	0	2 ± 0	25 ± 3,5	66,5 ± 3,5	6,5 ± 7,1

**Tabla 5.** Concentración de IL-6 [pg/mL] en sobrenadante obtenido de Bazo y Ganglios Linfáticos Mesentérico

Grupo	Bazo	GLM
Control PBS	0	0
AB1B	0	25,1 ± 35,5
AB5B	0	14,7 ± 17,7
AB9	0	16,6 ± 23,6

**Tabla 6.** Concentración de IL-10 [pg/mL] en sobrenadante obtenido de Bazo y Ganglios Linfáticos Mesentérico

Grupo	Bazo	GLM
Control PBS	141,4 ± 78,8	185,6 ± 144,6
AB1B	163,9 ± 10,1	224,8 ± 96,1
AB5B	66,4 ± 39,9	227,3 ± 46,3
AB9	146,3 ± 3,6	315,6 ± 137,6

Frente a una infección bacteriana aguda, los mecanismos de defensa involucran leucocitosis y el aumento relativo (%) y absoluto de neutrófilos. En este experimento no se observó lisis de glóbulos rojos ni aumento de neutrófilos, característicos de una infección bacteriana. Además, al administrar las distintas cepas no se encontró aumento en el porcentaje de eosinófilos, característica de reacciones alérgicas.

La interleuquina 6 es una citoquina proinflamatoria con un rol fundamental en la respuesta inmune natural. Es secretada, entre otras células, por los macrófagos M1 como parte de respuesta inflamatoria normal contra infecciones e injuria. La IL-6 solo estaría presente en los ganglios cercanos y drenantes a la vía de administración de las 3 cepas. (Vía oral) La interleuquina 10 es una citoquina antiinflamatoria y regulatoria secretada principalmente por linfocitos T reguladores. Sin embargo llama la atención la presencia de esta citoquina (aunque a nivel bajo) tanto en el control PBS como en los 3 grupos en estudio.

En conclusión, la administración vía oral de las tres cepas no induce cambios en el hematocrito. Tampoco provocaría infección como una bacteria patógena. Ni tampoco genera inflamación local ni sistémica.

#### **Estudio de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica.**

En cultivo de células mononucleares se evaluó el perfil de citoquinas en las cepas probióticas y sus hidrolizados.

Se utilizó las 3 cepas de *Lactobacillus* con características probióticas las cuales fueron cultivadas en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) por 24 horas a 37°C.

#### **Obtención de homogenizado proteico soluble.**

El cultivo de cada una de estas tres cepas bacterianas fue centrifugado a 6000g por 8 minutos en centrifuga Eppendorf 5810R, el pellets fue resuspendido en Buffer fosfato salino (PBS) 10mM; pH 7,4, con ayuda de pipeta Pasteur, luego de 3 lavados, se llevó a volumen final de 35 mL, para someterlas a rompimiento mecánico en prensa FRENCH (1000 psi). Una vez obtenido el homogenizado, éste fue centrifugado a 10000g por 15 minutos a 4°C,

en centrífuga Eppendorf 5403, guardando el sobrenadante a -20°C. Este sobrenadante que contiene lisado bacteriano fue denominado homogenizado proteico soluble (HPS).

### **Cuantificación proteínas de homogenizado soluble de *Lactobacillus spp.***

La cuantificación de proteínas totales en el HPS se realizó mediante el método de Bradford, utilizando BSA como estándar y lectura a de 595 nm de longitud de onda.

### **Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMN)**

Se obtuvo sangre venosa de personas aparentemente normales, n= 10, edad entre 22 y 28 años, la sangre fue colocada en tubos Falcon de 50 mL estériles, previamente preparados con heparina 50 U/mL y PBS 10 mM pH 7,4 (PBSH).

La separación de las CMN se realizó mediante gradiente de densidad con reactivo Histopaque®-1077 según protocolo estándar. La suspensión de sangre/PBSH/Histopaque fue centrifugada a 400g por 30 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el anillo de la interfase que corresponde a las CMN, el cual fue lavado con PBSH por dos veces. Un tercer lavado se efectuó con medio RPMI 1640 Hy Clone® + 25mM HEPES, + L-glutamina. El pellet celular fue resuspendido en medio RPMI 1640 a temperatura ambiente. Se procede a cuantificar el número de CMN y la viabilidad celular.

### **Cultivo de células mononucleares de sangre periférica**

En placas de cultivo se sembró 100 µL de CMN en concentración  $5 \times 10^5$  CMN/mL y se dejaron reposar en medio RPMI 1640 suplementado con 25mM Hepes y 2mM L-glutamina, antibiótico y antimicótico en solución 1x (10,000 U/mL Penicilina, 10,000 µg/mL Estreptomina, 25µg/mL Amfotericina B), 2 mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M a 37,0°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% humedad durante 6 horas.

Posteriormente se extrajo 50µL de sobrenadante y se agregó 50µL de medio de cultivo suplementado y con las distintos HPS según corresponda. Todos los cultivos fueron realizados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% humedad.

### **Cuantificación de Citoquinas**

A las 72 horas aproximadamente de iniciado el cultivo se extrajeron los sobrenadantes de cada pocillo, los cuales fueron centrifugados a 410 g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue guardado a -20°C. Todas las citoquinas fueron cuantificadas mediante ELISA Sandwich.

## RESULTADOS

**Tabla 7.** Efecto de homogenizado proteico soluble de *Lactobacillus* AB-1B en la producción de IL-10 e IL-1 por células mononucleares de sangre periférica humana, *in vitro*.

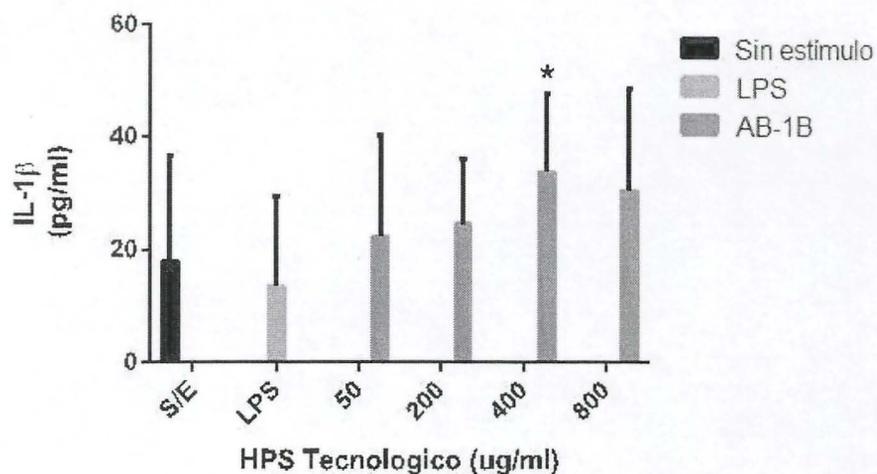
Concentración de HPS (µg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-1β	Razón IL-10/IL-1β
0	11,9 ± 2,4	11,9 ± 2,4	
50	568 ± 181	49,6 ± 10,5	11,5
100	978 ± 169	184 ± 78	5,3
150	952 ± 262	134 ± 13	7,1
200	880 ± 214	210 ± 80	4,2

Se informa promedio ± error estándar

En las diferentes concentraciones utilizadas, el homogenizado proteico soluble de *Lactobacillus* AB1B induce producción de IL-10 (citoquina antiinflamatoria) por CMN. También induce producción de la citoquina proinflamatoria IL-1β. La razón CK antiinflamatoria/Ck pro inflamatoria, se obtuvo que en el rango de concentración estudiada hay mayor anti-inflamación. Por lo tanto el lisado obtenido de *Lactobacillus* AB1B podría inducir un estado anti inflamatorio.

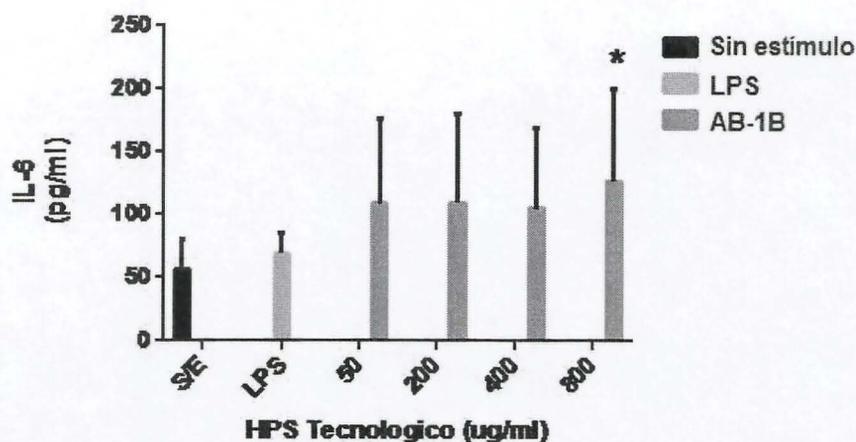
Se presentan los resultados de la cuantificación de citoquinas al estimular con el HPS tecnológico (HPS-TEC) de la cepa AB 1B.

En la determinación de concentración de la citoquina IL-1β se obtuvo que el HPS-TEC AB1B indujo un aumento estadísticamente significativo al administrar, en el cultivo, una concentración de 400 ug/ml de HPS tecnológico en comparación al control sin estímulo (S/E) y con LPS (figura 6).



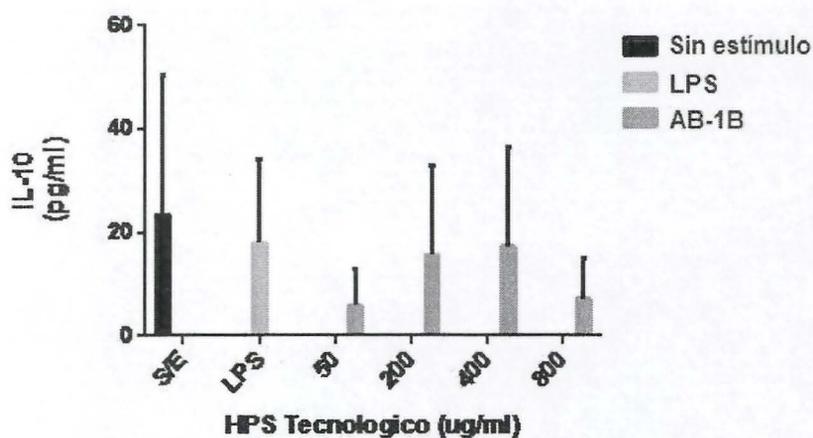
**Figura 6.** Concentración de IL-1 $\beta$  (pg/ml) determinada en sobrenadante de cultivo de células PBMC tratadas, sin estímulo (S/E), LPS (10ng/ml) y Homogeneizado proteico soluble (HPS) Tecnológico durante 72 horas.

En la determinación de la citoquina IL-6 se obtuvo que el HPS-TEC AB1B a la concentración de 800 ug/ml induce un aumento estadísticamente significativo (figura 7).



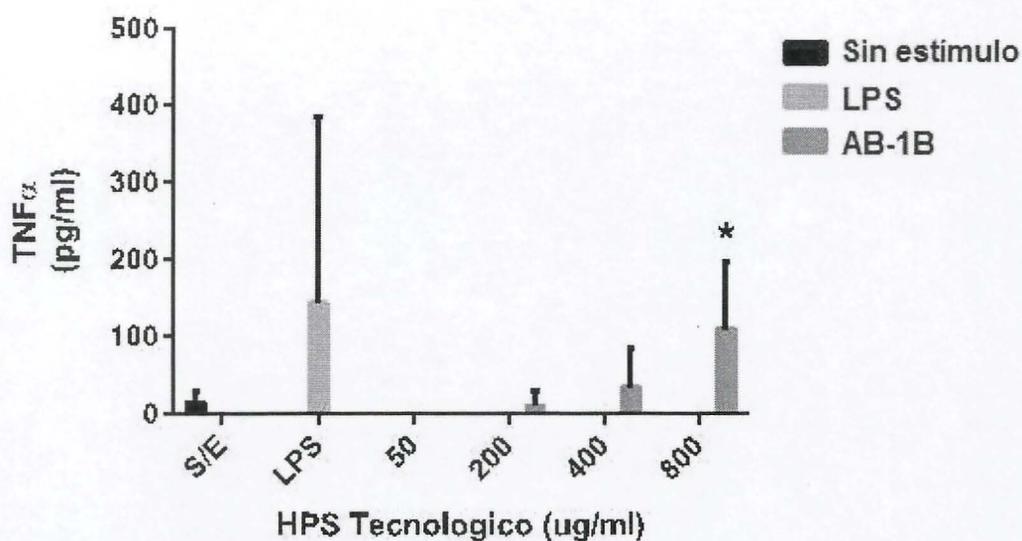
**Figura 7.** Concentración de IL-6 (pg/ml) determinada en sobrenadante de cultivo de células PBMC tratadas sin estímulo (S/E), LPS (10ng/ml) y Homogeneizado proteico soluble (HPS) Tecnológico durante 72 horas. (\* p<0,05)

En el caso de la IL-10 no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas al estimular el cultivo con el Homogeneizado proteico soluble tecnológico (figura 8).



**Figura 8.** Concentración de IL-10 (pg/ml) determinada en sobrenadante de cultivo de células PBMC tratadas sin estímulo (S/E), LPS (10ng/ml) y Homogeneizado proteico soluble (HPS) Tecnológico durante 72horas.

En el caso de TNF- $\alpha$  se obtuvo que el HPS-TEC AB1B induce un aumento estadísticamente significativo de esta citoquina en la concentración de 800 ug/ml en comparación al control sin estímulo (S/E), sin embargo, no se encontró diferencia con respecto al control LPS (figura 9).



**Figura 9.** Concentración de TNF- $\alpha$  (pg/ml) determinada en sobrenadante de cultivo de células PBMC tratadas sin estímulo (S/E), LPS (10ng/ml) y Homogeneizado proteico soluble (HPS) Tecnológico durante 72horas. (\*p<0,05)

## CONCLUSIÓN

En conclusión, el homogeneizado proteico soluble induce producción de las cuatro citoquinas en estudio, particularmente en concentraciones elevadas tales como, 400 y 800 ug/ml. Siendo TNF- $\alpha$  e IL-6 las citoquinas inflamatorias que presentan una mayor concentración. Sin embargo, dado que la respuesta es individual y esto conlleva una desviación estándar alta, es necesario aumentar el número de muestra para poder obtener conclusiones estadísticas más completas y robustas. También hay que considerar que la condición sin estimular solo contiene el medio de cultivo y es necesario detectar la presencia de LPS en ese medio de cultivo, dado que la concentración obtenida de algunas citoquinas es similar al estimular con LPS (10ng/ml). Además, sería recomendable estimular con LPS obtenido de otras cepas bacterianas. El trabajo con las cepas AB-5B y AB-9 está en desarrollo aún, por lo que serán informados en el próximo informe.

## ANEXO 9

### **Estudio microbiológico de suelo tratado con prototipo biotecnológico.**

El estudio microbiológico de suelo, se efectuó mediante muestras de suelo obtenidas desde el huerto perteneciente al fundo "San Florencio" en Monteáguila y huerto "Los Nogales" en San Ignacio.

En Monteáguila, se determinó la viabilidad, estabilidad y modulación de la microbiota de suelo tratado con el prototipo de la formulación biotecnológica en relación a tratamientos antifúngicos comúnmente empleados en la industria, así como tratamiento control negativo. Cada uno de los tratamientos fueron suspendidos o diluidos en un volumen final de 6 litros de agua, y aplicados vía foliar con nebulizadora en una proporción aproximada de 1500L/ha de formulación.

Los tratamientos fueron:

- T1 control: agua
- T2 cepa AB1B: Suspensión de 5 g de biomasa deshidratada de la bacteria AB1B en 6 L de agua, en una concentración de  $10^8$ - $10^9$  UFC/ml.
- T3 cepa AB9: Suspensión de 5 g de biomasa deshidratada de la bacteria AB9 en 6 L de agua, en una concentración de  $10^8$ - $10^9$  UFC/ml.
- T4 cepa AB5B: Suspensión de 5 g de biomasa deshidratada de la bacteria AB5B en 6 L de agua, en una concentración de  $10^8$ - $10^9$  UFC/ml.
- T5 fungicida orgánico: formulación antifúngica orgánica basada en quitina, 27 ml disueltos en 6 L de agua (0.45% v/v).
- T6 fungicida químico: Formulación fungicida comercial Bellis®, ingredientes activos boscalid 25,2% y piraclostrobin 12.8%. basada en cobre, 6 gramos de producto disueltos en 6 L de agua.

En cada zona dispuesta aleatoriamente se aplicó el correspondiente tratamiento, se hicieron cuatro repeticiones en un diseño de bloques al azar.

X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	T3	T6	X	T1	T4	X	T5	T4	X	T2	T3	X
X	T2	T5	X	T6	T2	X	T3	T1	X	T4	T5	X
X	T1	T4	X	T3	T5	X	T2	T6	X	T6	T1	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

**Figura 1.** Esquema de disposición de los 6 tratamientos en huerto de arándanos tratado.

Las muestras fueron recogidas directamente desde el suelo empelando un frasco esteril, para luego realizar recuentos microbiológicos luego de la aplicación y 9 días posteriores a la aplicación. El análisis de las muestras consistió en pesar un gramo de sedimento y suspenderlo en suero fisiológico estéril. De esta muestra se efectuaron diluciones seriadas de las cuales se sembró 50 ul en medio agarizado. Se incubó las placas a 37°C por 24-48 horas. Bacterias lácticas serán cuantificadas en agar MRS, Gram negativos serán

cuantificados en agar tripticasa de soya, hongos serán cuantificados en agar Sabouraud provisto de cloranfenicol.

Con el propósito de corroborar la presencia de cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* sp en muestras de suelo, frutos secos en la planta y flores, colonias bacterianas crecidas en agar MRS obtenidas desde éstas muestras fueron analizadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

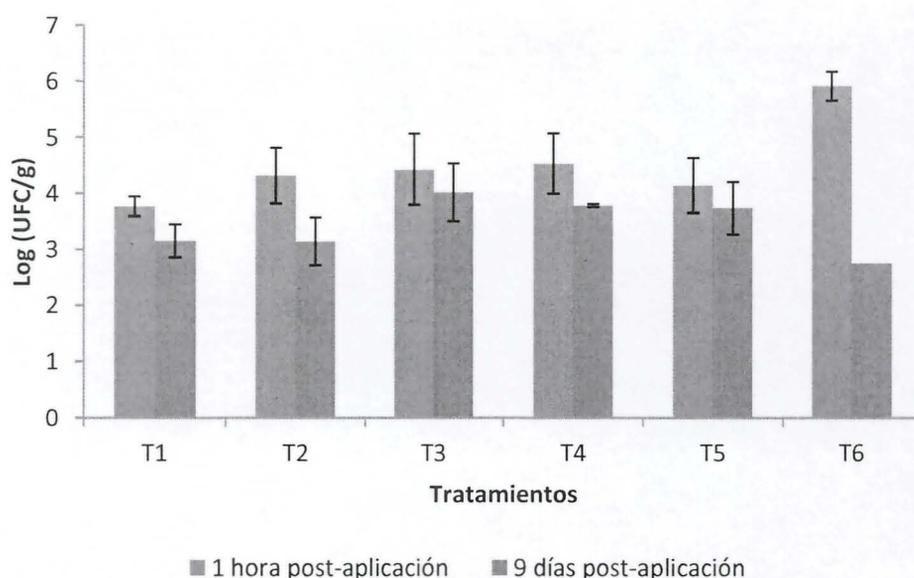
Extracción de ADN: Se realizó con el producto comercial InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories), para obtener ADN genómico y ADN episomal de alta pureza. Para esto se utilizó el sedimento bacteriano de cada una de las cepas, previamente cultivadas en 4 ml de caldo MRS en condiciones de microaerofilia, el sedimento se obtuvo mediante centrifugación a 3.500 rpm durante 5 min., el que luego se resuspendió en 400  $\mu$ l de agua libre de nucleasas estéril, posteriormente se centrifugó por 2 min a 11.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El pellet bacteriano fue resuspendido en 200  $\mu$ l de InstaGene Matrix, se incubó a 56 °C por 30 min y finalmente se sometió a un nuevo proceso de calentamiento a 100 °C durante 8 minutos. Se enfrió, agitó fuertemente y centrifugo a 12.000 rpm por 3 min. El ADN obtenido se congeló a -20°C en el mismo tubo con la matriz. Cuando se ocuparon las muestras se centrifugó y se tomó de la fase superior como ADN molde.

Detección molecular: Se realizó un ensayo PCR con cebadores específicos para identificar la pertenencia al género *Lactobacillus* de cada una de las cepas. La detección molecular se realizó mediante la amplificación de ADN cromosomal bacteriano, utilizando los partidores R16-1(16S) (5'-CTTGTACACACCGCCCGTCA-3') y LbLMA1-rev (ITS) (5'-CTCAAAACTAAACAAAGTTTC-3'). Se preparó una mezcla maestra de PCR calculada para 25  $\mu$ l de reacción que consistió en: buffer PCR 1X; MgCl<sub>2</sub> 4mM; dNTP 0.2mM; Primer A 1  $\mu$ M; Primer B 1  $\mu$ M; Taq 0.25 U; 10,75  $\mu$ l H<sub>2</sub>O y 5  $\mu$ l de ADN. El programa PCR consistió en 1 ciclo a 95°C por 5 min, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, seguidos por 2 min a 55°C y 2 min a 72°C, con un ciclo de elongación final a 72°C por 7 min Para la visualización de los resultados, los productos PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% pre teñido con GelRed® Nucleic Acid Stain (Biotium) durante 90 min a 80 volts.

## Resultados.

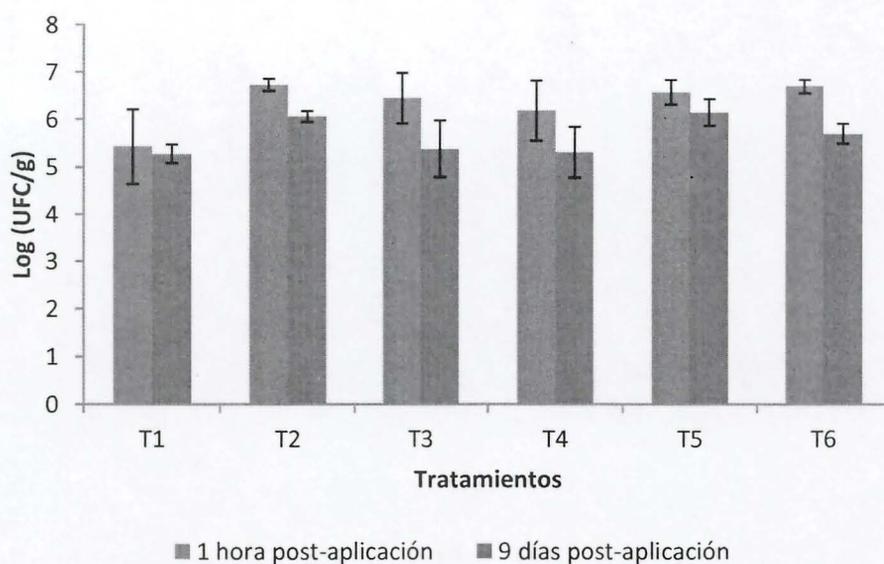
El recuento microbiológico de bacterias lácticas se muestra en la figura 2. Podemos observar que luego de transcurrida una hora desde la aplicación, el recuento de cepas lácticas es abundante en todos los tratamientos, alrededor de 10<sup>4</sup> UFC/g de suelo, el grupo control, tratado con agua, como es de esperar, mostró los menores recuentos. Sin embargo, llama la atención el alto recuento obtenido en T6, tratado con producto comercial Bellis, donde se cuantificó sobre 10<sup>5</sup> UFC/g de suelo. Esto puede deberse a que el producto comercial favorece la presencia de cepas lácticas limitando el crecimiento de otras, o simplemente debido a deriva de los tratamientos.

El siguiente monitoreo, que fue realizado 9 días después de la aplicación, mostró predominancia en los recuentos hechos en T3, tratado con cepa ácido láctica AB9, manteniéndose un recuento aún mayor a 10<sup>4</sup> UFC/g de suelo. Todos los demás tratamientos mostraron una disminución de bacterias lácticas, sin embargo, estas logran permanecer viables disminuyendo aproximadamente un ciclo logarítmico, lo cual demuestra una gran capacidad de colonización y resistencia de las bacterias hacia las condiciones abióticas y bióticas del microhábitat, como exposición solar, humedad, y factores microecológicos.



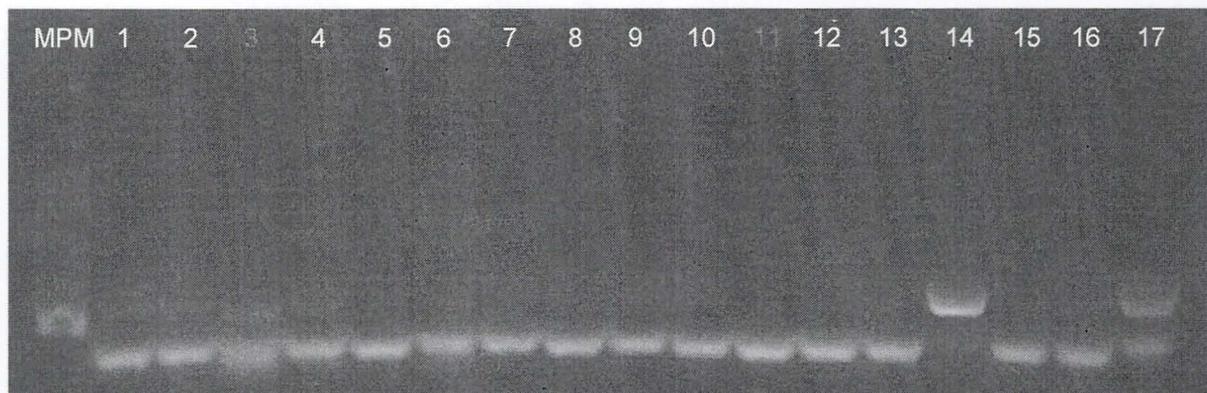
**Figura 2.** Recuento de bacterias lácticas en suelo tratado con formulaciones experimentales.

Los recuentos de bacterias Gram negativas totales luego de 1 hora post-aplicación alcanzaron entre  $10^5 - 10^6$  UFC/g de suelo (figura 3). Al efectuar un segundo recuento al día 9 post-aplicación, se observó una disminución de casi un orden de magnitud en todos los tratamientos, exceptuando el suelo control, tratado solo con agua, donde la diferencia fue mínima. La disminución en el recuento de bacterias Gram negativas luego de 9 días de aplicación, podría deberse a factores de competencia entre estas bacterias y bacterias lácticas incorporadas, potenciando así un efecto modulador de la microbiota presente.



**Figura 3.** Recuento de bacterias Gram negativas totales en suelo tratado con formulaciones experimentales.

La figura 4, indica y corrobora la presencia de cepas bacterianas pertenecientes al género *Lactobacillus* desde muestras de suelo, flores y frutos en los diferentes tiempos de muestreo. Los resultados se evidencian por los amplicones de aproximadamente 250pb visualizados en geles de agarosa obtenidos por electroforesis. El código T corresponde al tratamiento y , R a la replica.

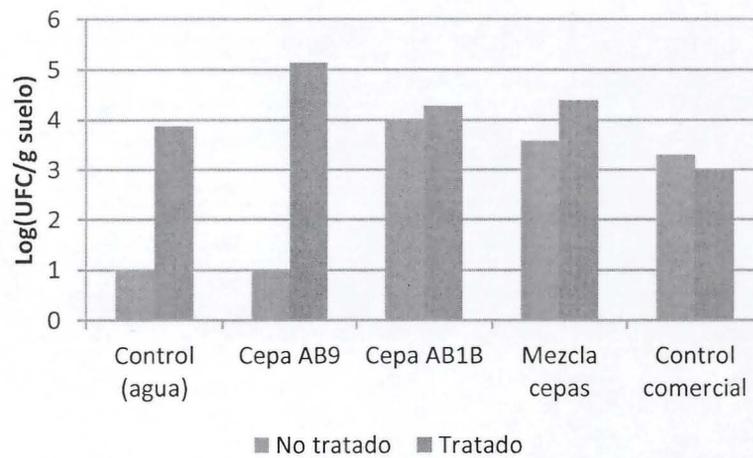


**Figura 4.** Resultados PCR de cepas con primers específicos para la genero *Lactobacillus*. Carriles: marcador de peso molecular (Kapa Universal DNA Ladder); 1 -2.- Suelo T4R1; 3.- Control positivo *Lactobacillus* -; 4 a 8.- frutos Secos en plantas; 9.- flor basal; 10.- suelo basal T2 R3; 11.- Control negativo; 12 a 14 suelo T3R1; 15.- suelo T1; 16.- flor T2; 17.- suelo T6.

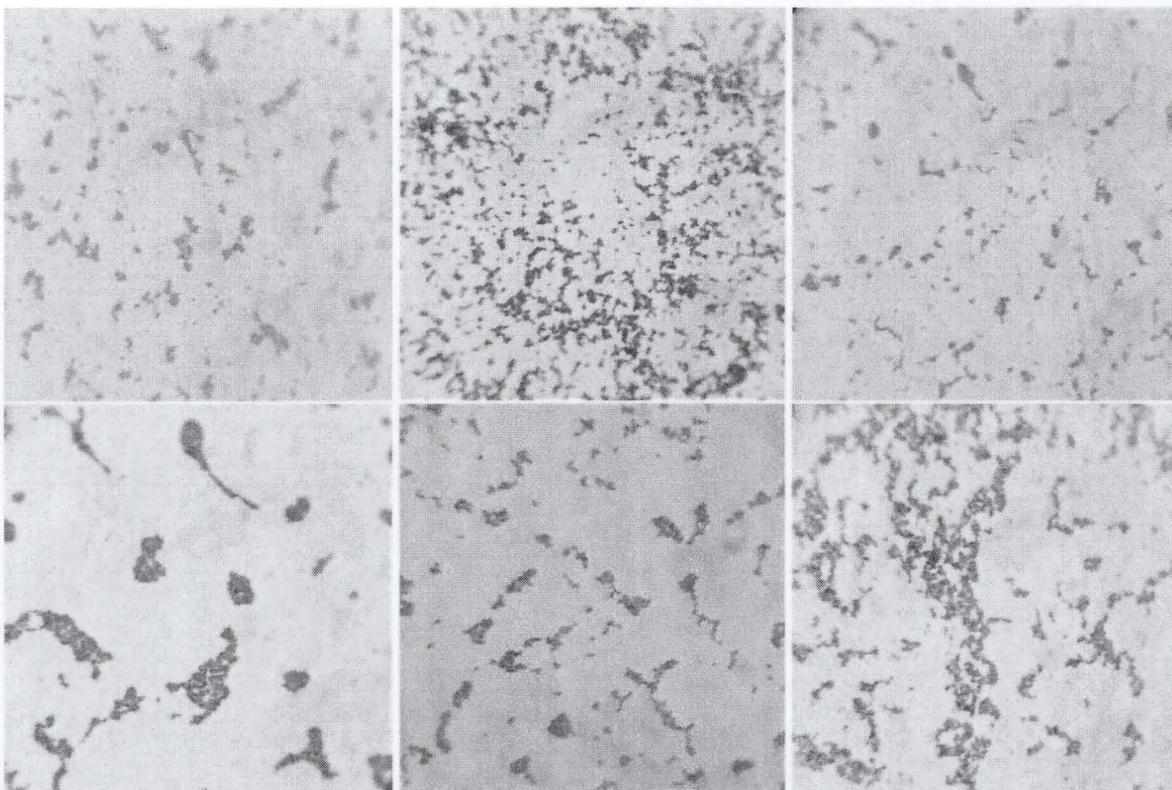
A su vez, en el huerto “Los Nogales”, se efectuó una toma de muestras de suelos no tratados subyacentes a la zona de aplicación de cada uno de los tratamientos experimentales, resultados que fueron comparados a los obtenidos en recuentos microbiológicos realizados en suelos tratados con cada uno de los siguientes tratamientos: Tratamiento 1: Control (agua), Tratamiento 2: Cepa AB9, Tratamiento 3: Cepa AB1B, Tratamiento 4: Mezcla de cepas, Tratamiento 5: Control comercial en base a microalgas.

Los resultados que se resumen en la figura 5, indican que la aplicación de cada uno de los tratamientos basados en cepas ácido lácticas, se manifiestan en un aumento significativo de recuento de bacterias ácido lácticas totales. Además se observó que en el tratamiento control (agua), también existe un aumento de la cantidad de microbiota ácido láctica, lo cual pudo deberse a deriva al momento de la aplicación o lo que podría ser más interesante, una ampliación de la zona de colonización microbiológica por éste tipo de bacteria. Es importante notar además, que el tratamiento control comercial, fue el único que mostró un descenso en el recuento de bacterias ácido láctico posterior a la aplicación de éstas, lo cual puede deberse a efectos inhibitorios ocasionados por algún componente de esta formulación.

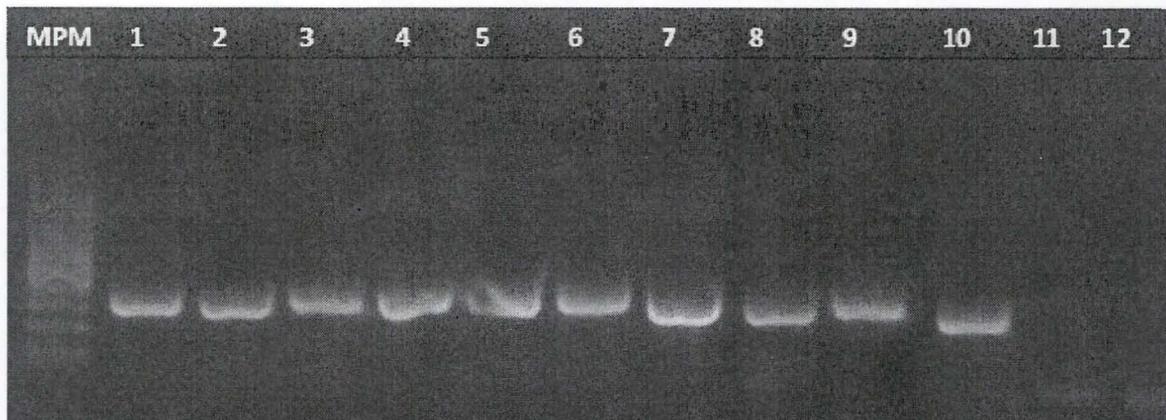
Se realizaron pruebas básicas de tinción gram y catalasa a las cepas aisladas en placas de agar MRS adicionado con cicloheximida 2.5 mc/ml para inhibir el crecimiento de hongos. Se encontró que todas las cepas aisladas son catalasa negativo. La tinción gram se encontró 6/8 aislados gram positivo. Morfológicamente todos fueron cocobacilos (Figura 6).



**Figura 5.** Recuento de bacterias ácido lácticas en suelos tratados y no tratados con formulaciones experimentales en el huerto “Los Nogales” San Ignacio.



**Figura 6.** Tinción gram de los aislados bacterianos obtenidos desde muestras de suelo.



Resultados PCR de cepas aisladas de suelo con primers específicos para género *Lactobacillus*. Carriles: marcador de peso molecular (Kapa Universal DNA Ladder); 1.- Control positivo *Lactobacillus*; 2.- Basal AB 9; 3.- Basal mezcla AB9 +AB1B; 4.- Control Agua basal; 5.- T1 mezcla AB9 +AB1B; 6.- T1 AB 1B; 7.- Basal control comercial; 8.- T1 AB9; 9.- T1 Control Agua; 10.- T1 control comercial; 11.- Basal AB 1B; 12.- Control negativo.

### Conclusión.

De este análisis se puede concluir que existe un efecto modulador de las cepas lácticas con las cuales fue tratado cada uno de los suelos, observado mayores recuentos luego de una hora post-aplicación, pero manteniéndose un efecto modulador por 9 días, tiempo que fue examinado en el estudio. Mediante análisis moleculares se puede corroborar que las cepas encontradas pertenecen al género bacteriano *Lactobacillus*. Además se puede determinar que la aplicación de las formulaciones basadas en cepas ácido lácticas se relaciona con un mayor recuento de microorganismos luego de la aplicación, incluso en zonas control solo tratadas con agua, pero no así en zonas donde se aplicó tratamiento comercial basado en microalgas, formulación que es probable inhibe la colonización de bacterias ácido lácticas, probablemente por algún componente de la formulación.

## ANEXO 10.

### EFFECTO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE POLINIZACION DE ARANDANOS

Para poner a prueba el efecto de los tratamientos sobre la visita de polinizadores, se realizaron 3 salidas a terrenos, donde por periodos de 20 minutos se contabilizó y registró el número de visitas de polinizadores (abejas y abejorros) a 12 plantas de arándano por tratamiento por vez.

Los tratamientos aplicados:

Tratamiento 1: AB9

Tratamiento 2: AB1B

Tratamiento 3: Agua

Tratamiento 4: Mezcla de cepas

Tratamiento 5: Químico comercial.

**Los resultados son:** Se observa que el efecto del tratamiento varía dependiendo del tiempo de aplicación, en la primera medición, no se observa un efecto significativo de los tratamientos sobre el número de visitas de abejas ni de abejorros (Tabla 1).

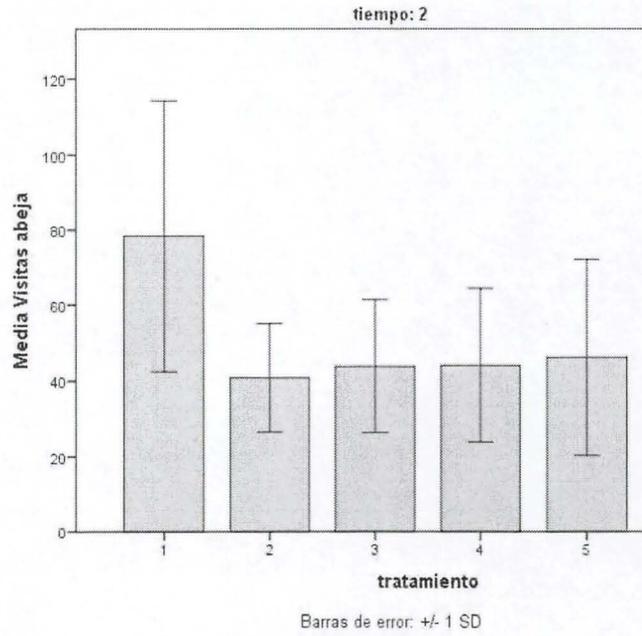
**Tabla 1.** Prueba de Kruskal-Wallis entre tratamientos para el tiempo 1

	Visitas abeja	Visitas abejorro
Chi-cuadrado	9,646	6,900
gl	5	5
Sig. asintótica	,086	,228

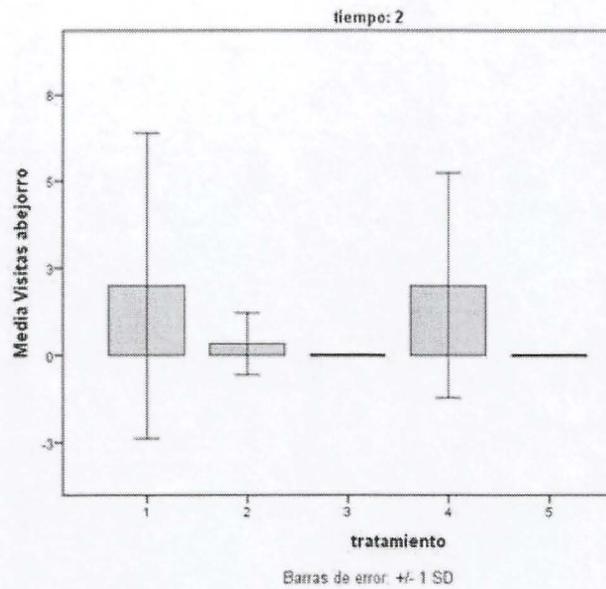
**Tabla 2.** Prueba de Kruskal-Wallis entre tratamientos para el tiempo 2

	Visitas abeja	Visitas abejorro
Chi-cuadrado	14,162	17,249
gl	5	5
Sig. asintótica	,015	,004

En la segunda medición, se observa un efecto significativo del tratamiento sobre el número de visitas de abejas y el número de visitas de abejorros (Tabla 2). El número de visitas de abejas es significativamente mayor en el tratamiento AB9 que en los tratamientos AB1B ( $Z = -2,918$ ;  $v-p = 0,004$ ), Agua ( $Z = -2,686$ ;  $v-p = 0,007$ ), Mezcla de cepas ( $Z = -2,657$ ;  $v-p = 0,008$ ), Químico comercial ( $Z = -2,108$ ;  $v-p = 0,035$ ) y 6 ( $Z = -3,294$ ;  $v-p = 0,001$ ) (figura 2). El número de visitas de abejorros es significativamente mayor en el tratamiento AB9 que en los tratamientos Agua ( $Z = -2,134$ ;  $v-p = 0,033$ ) y Químico comercial ( $Z = -2,134$ ;  $v-p = 0,033$ ). Adicionalmente, el número de visitas de abejorros es significativamente mayor en el tratamiento Mezcla de cepas que en los tratamientos AB1B ( $Z = -2,064$ ;  $v-p = 0,039$ ), Agua ( $Z = -3,023$ ;  $v-p = 0,003$ ) y Químico comercial ( $Z = -3,023$ ;  $v-p = 0,003$ ) (figura 3).



**Figura 2.** Polinización, expresada como visitas de abejas en cada tratamiento, en la segunda medición efectuada.

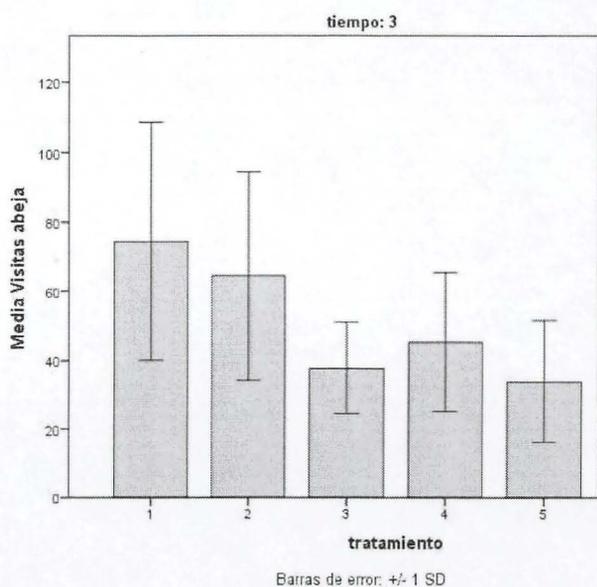


**Figura 3.** Polinización, expresada como visitas de abejorros en cada tratamiento, en la segunda medición efectuada.

En la tercera medición, se observa un efecto significativo del tratamiento únicamente sobre el número de visitas de abejas (Tabla 3). El número de visitas de abejas en el tratamiento AB9 es significativamente mayor que en los tratamientos Agua ( $Z = -2,685$ ;  $v-p=0,007$ ), Mezcla de cepas ( $Z = -2,195$ ;  $v-p=0,028$ ), y químico comercial ( $Z = -2,916$ ;  $v-p=0,002$ ). Por otra parte, el número de visitas de abejas en el tratamiento AB1B es significativamente mayor que en los tratamientos agua ( $Z = -2,626$ ;  $v-p=0,009$ ), Químico comercial ( $Z = -2,830$ ;  $v-p=0,005$ ) (Fig. 4).

**Tabla 3.** Prueba de Kruskal-Wallis entre tratamientos para el tiempo 3.

	Visitas abeja	Visitas abejorro
Chi-cuadrado	17,986	10,941
gl	5	5
Sig. asintótica	,003	,053



**Figura 4.** Polinización, expresada como visitas de abejas en cada tratamiento, en la tercera medición efectuada.

Por lo tanto, podemos concluir que la aplicación de la cepa AB9 mejora significativamente la atracción de los polinizadores en las plantas de arándano.

## ANEXO 11.

### EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN ARÁNDANOS CV. O'NEAL COSECHADOS EN HUERTO SAN FLORENCIO, MONTEÁGUILA.

#### Introducción

Se evaluó el crecimiento de arándanos cv. O'Neal cosechados en el Huertos San Florencio, en la comuna de Monteáguala, Octava región.

Los frutos fueron tratados con los diversos tratamientos mediante aspersión efectuada con moto bomba, estos se definen a continuación:

- T1 control: agua
- T2 cepa AB1B: Suspensión de biomasa deshidratada de la bacteria AB1B en una concentración de  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml.
- T3 cepa AB9: Suspensión de biomasa deshidratada de la bacteria AB9 en una concentración de  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml.
- T4 cepa AB5B: Suspensión de biomasa deshidratada de la bacteria AB5B en una concentración de  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml.
- T5 fungicida orgánico: formulación antifúngica orgánica basada en quitina (0.45% v/v).
- T6 fungicida químico: Formulación fungicida comercial Bellis®, ingredientes activos boscalid 25,2% y piraclostrobin 12.8%. basada en cobre, (0.1% p/v).

En cada zona dispuesta aleatoriamente, se aplicó el correspondiente tratamiento, se hicieron cuatro repeticiones en un diseño de bloques al azar.

X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	T3	T6	X	T1	T4	X	T5	T4	X	T2	T3	X
X	T2	T5	X	T6	T2	X	T3	T1	X	T4	T5	X
X	T1	T4	X	T3	T5	X	T2	T6	X	T6	T1	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

**Figura 1.** Esquema de disposición de los 6 tratamientos en huerto de arándanos tratado.

### **Evaluación de parámetros productivos.**

Muestras de frutos fueron recolectados y llevados al laboratorio en refrigeración para su posterior análisis.

### **Evaluación de calibre.**

La evaluación del efecto del producto tecnológico y tratamientos convencionales, se efectuó tomando 30 unidades de frutos por hilera, correspondientes a 120 frutos por tratamiento, determinando el calibre de los frutos siguiendo las directrices de Protocolos de Exportación empleando un caliper Vernier manual.

### **Evaluación de firmeza.**

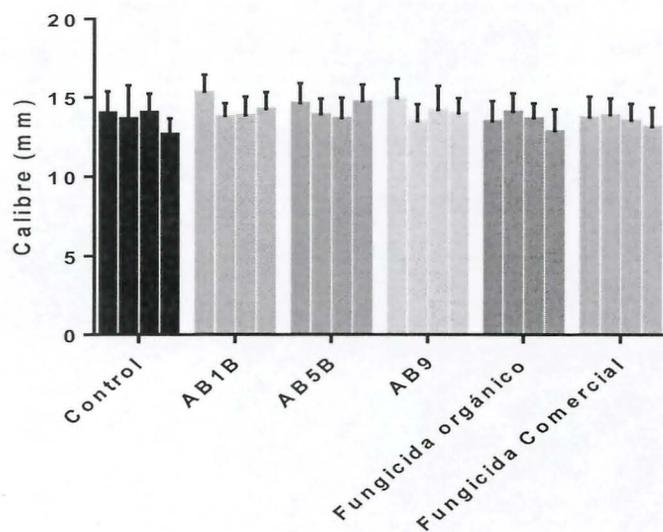
La evaluación de la firmeza de los frutos se efectuó tomando 30 unidades de frutos por hilera, correspondientes a 120 frutos por tratamiento, determinando la firmeza de los frutos siguiendo las directrices de Protocolos de Exportación empleando un penetrómetro manual.

### **Evaluación de capacidad antioxidante en arándanos tratados con formulación basada en cepas ácido lácticas.**

Mediante pruebas colorimétricas se analizó el contenido de antioxidantes en frutos. Se analizaron muestras de frutos frescos de arándanos, los cuales en período de precosecha fueron aplicados al menos dos veces con los siguientes tratamientos: T1 control agua, T2 Formulación cepa AB1BUSS en una concentración de  $10^5$  - $10^6$  UFC/ml., T3 Formulación cepa AB9USS en una concentración de  $10^5$  - $10^6$  UFC/ml., T4 formulación antifúngica orgánica basada en quitina (0.45% 10 v/v).

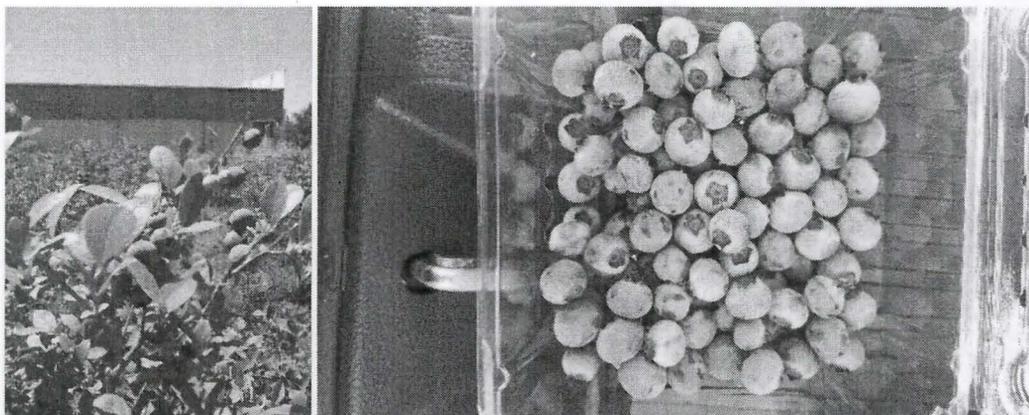
### **Resultados**

La medición de calibre efectuada el día 06 de diciembre, demostró que todas las formulaciones basadas en cepas lácticas, tratamientos AB1B, AB5B y AB9 alcanzaron significativamente mayor calibre que los frutos tratados con suspensión control, e incluso un calibre significativamente mayor a los frutos tratados con fungicida orgánico basado en quitosano y fungicida comercial (figuras 2 y 3).

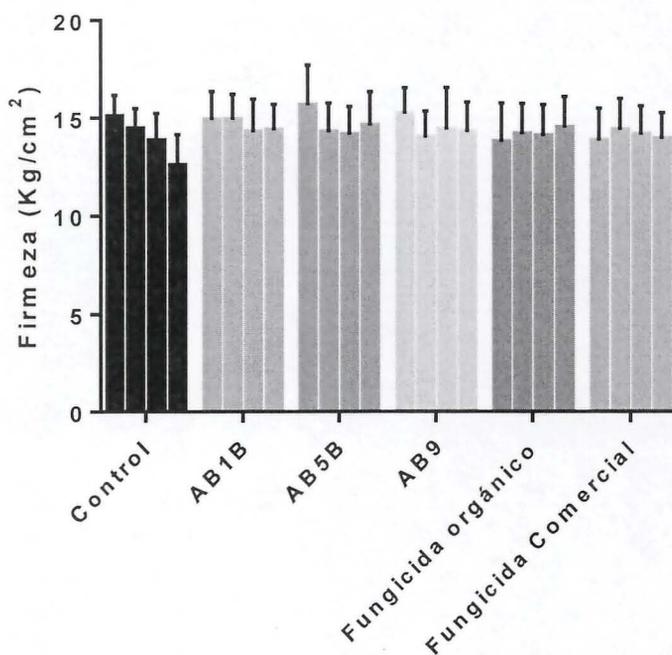


**Figura 2.** Calibre medido en mms de arándanos colectados el 06 de Diciembre 2017 y tratados con las distintas formulaciones.

Al transcurrir 9 días de ensayo, correspondiente a la medición de calibre efectuada el día 15 de Diciembre, se observó que las formulaciones basadas en las cepas AB1B y AB9 aplicadas a los frutos, presentaron aun un calibre significativamente mayor que los frutos empleados como control y tratados con agua. Adicionalmente, la formulación basada en la cepa AB5B logró calibres significativamente mayores que la formulación fungicida comercial.



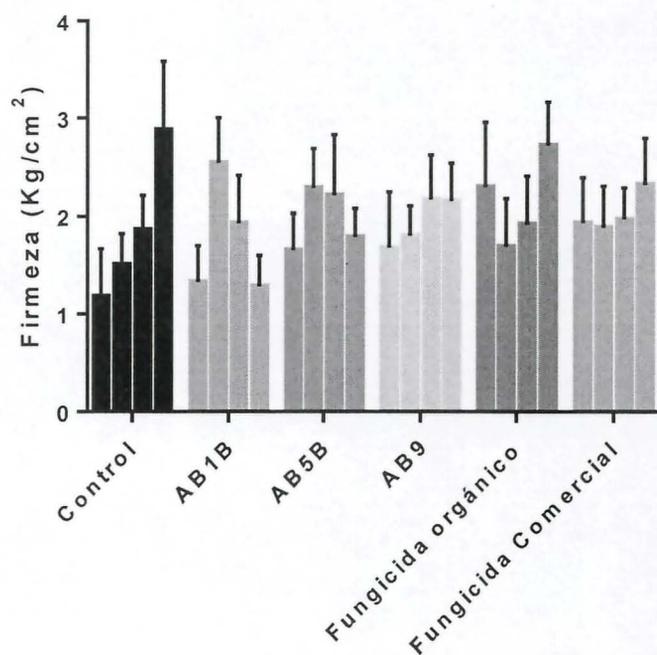
**Figura 3.** Frutos de arándanos tratados con cepa AB1B (tratamiento 2).



**Figura 4.** Calibre medido en mms de arándanos colectados el 15 de Diciembre 2017 y tratados con las distintas formulaciones.

### Firmeza

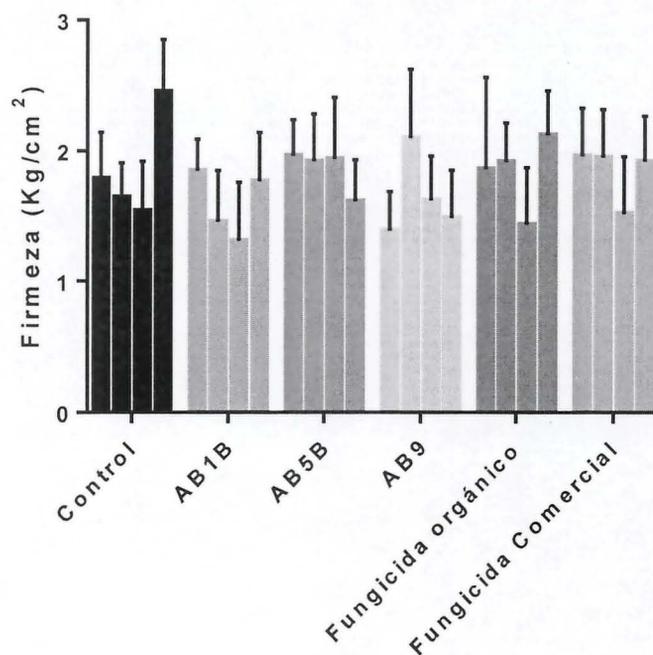
En cuanto a la determinación de firmeza en los frutos el día 06 de diciembre, se pudo determinar que la aplicación de las formulaciones basadas en cepas lácticas resultaron en frutos cuya firmeza fue semejante a la registrada para los frutos del grupo control solo tratado con agua. Si se observó un desempeño mejorado en los frutos tratados con fungicida orgánico basado en quitina. Este mostró significativamente mejor desempeño que el grupo control negativo tratado con agua y que las tres formulaciones basadas en cepas lácticas. Si bien la aplicación de la cepa AB1B resultó en frutos con una firmeza semejante a los pertenecientes al grupo control, la aplicación de ésta, resultó en frutos significativamente menos firmes que aquellos tratados con las otras dos formulaciones basadas en cepa ácido lácticas (frutos tratados con formulación AB5B y AB9), y menor firmeza se obtuvo con esta cepa en relación a los frutos tratados con las formulación fúngica orgánica y comercial. Las formulaciones basadas en las cepas AB5 y AB9, presentaron frutos significativamente menos firmes que aquellos tratados con la formulación fungicida orgánica.



**Figura 5.** Firmeza medida determinada mediante un penetrometro en arándanos colectados el 15 de Diciembre 2017 y tratados con las distintas formulaciones.

Al transcurrir 9 días de ensayo, correspondiente a la medición de firmeza efectuada el día 15 de Diciembre, se pudo observar, que a modo general las tendencias se mantuvieron. Sin embargo la formulación basada en fungicida orgánico disminuyó su desempeño, resultando frutos significativamente más firmes solo en relación a la aplicación de la formulación basada en la cepa AB1B.

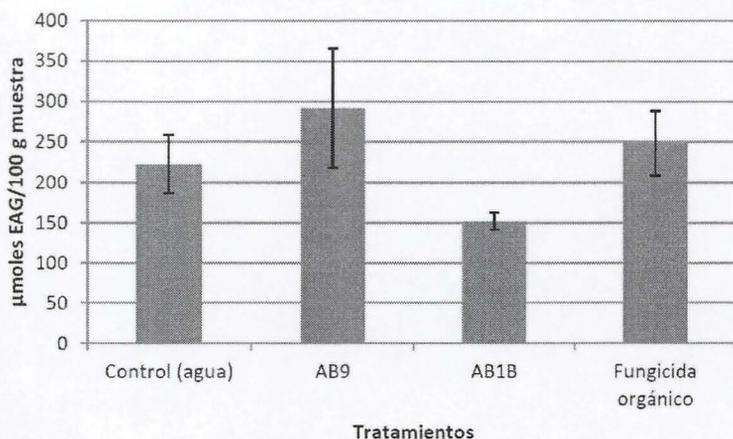
La aplicación de las formulaciones basadas en las cepas lácticas AB1B y AB9, resultó en frutos significativamente menos firmes que aquellos del grupo control.



**Figura 6.** Firmeza medida determinada mediante un penetrometro en arándanos colectados el 15 de Diciembre 2017 y tratados con las distintas formulaciones.

### Capacidad antioxidante.

Los resultados indicaron que los frutos tratados con la formulación con la cepa AB9USS presentaron mayor producción de polifenoles totales en relación a los cultivos de arándano control tratados solo con agua. La mayor producción de polifenoles totales en frutos tratados con la formulación basada en la cepa AB9USS, se relaciona con mayores aportes de antioxidantes en la dieta de los potenciales consumidores de estos frutos.



**Figura 7.** Producción de antioxidantes en arándanos tratados con las distintas formulaciones.

## **Conclusiones.**

En relación a la medición de calibres, el análisis efectuado el día 06 de diciembre, demostró que todas las formulaciones basadas en cepas lácticas, tratamientos AB1B, AB5B y AB9 alcanzaron significativamente mayor calibre que los frutos tratados con suspensión control, e incluso un calibre significativamente mayor a los frutos tratados con fungicida orgánico basado en quitosano y fungicida comercial, resultado que muy significativo para este tipo de industria.

En cuanto a la determinación de firmeza en los frutos el día 06 de diciembre, se pudo determinar que la aplicación de las formulaciones basadas en cepas lácticas resultaron en frutos cuya firmeza fue semejante a la registrada para los frutos del grupo control solo tratado con agua. Si se observó un desempeño mejorado en los frutos tratados con fungicida orgánico basado en quitina. Este mostró significativamente mejor desempeño que el grupo control negativo tratado con agua y que las tres formulaciones basadas en cepas lácticas.

## **ANEXO 12.**

### **EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN PLANTARES DE ARÁNDANOS VARIEDAD DIUC EN HUERTO “LOS NOGALES” SAN IGNACIO.**

#### **Preámbulo.**

La intervención que se explica a continuación, corresponde a un ensayo efectuado en el huerto “Los Nogales” propiedad de don Sergio Sepúlveda, quien nos permitió realizar experimentación en sus cultivos dado el alcance que podría tener este nuevo producto.

#### **Diseño experimental.**

En Septiembre del 2018, se efectuó la primera aplicación de tratamientos, con el fin de efectuar un seguimiento de cultivares de arándano de la variedad Diuc, desde etapa de floración hasta post cosecha. El principal objetivo fue calcular parámetros productivos en frutos cosechados en relación la aplicación de productos comerciales, se evaluó las distintas formulaciones diseñadas en un contexto productivo regular, cuyas aplicaciones se ajustarán al plan de manejo determinado en conjunto con el productor.

Las aplicaciones efectuadas fueron hechas mediante aspersion con bomba manual de los sgtes tratamientos, las cuales fueron repetidas periódicamente.

- T1 control: agua
- T2 cepa A: Suspensión de biomasa deshidratada de la bacteria A en una concentración de  $10^6$  -  $10^7$  UFC/ml.
- T3 cepa B: Suspensión de biomasa deshidratada de la bacteria B en una concentración de  $10^6$  -  $10^7$  UFC/ml.
- T4 mezcla de cepa A y B: Suspensión de biomasa deshidratada de las bacterias A y B en una concentración final de  $10^6$  -  $10^7$  UFC/ml.

- T5 Control comercial de referencia, Victoria X, Bioestimulante natural.

En cada zona dispuesta aleatoriamente se aplicó el correspondiente tratamiento, se hicieron tres repeticiones en un diseño de bloques al azar.

### **Evaluación de parámetros productivos.**

Muestras de frutos serán recolectados y llevados al laboratorio en refrigeración para su posterior análisis.

### **Evaluación de calibre.**

La evaluación del efecto de las formulaciones diseñadas y tratamientos convencionales, se efectuará tomando 30 unidades de frutos por hilera, correspondientes a 90 frutos por tratamiento, determinando el calibre de los frutos siguiendo las directrices de Protocolos de Exportación empleando un caliper Vernier manual.

### **Evaluación de firmeza.**

La evaluación de la firmeza de los frutos se efectuará tomando 30 unidades de frutos por hilera, correspondientes a 90 frutos por tratamiento, determinando la firmeza de estos, siguiendo las directrices de Protocolos de Exportación empleando un caliper penetrómetro manual.

### **Resultados**

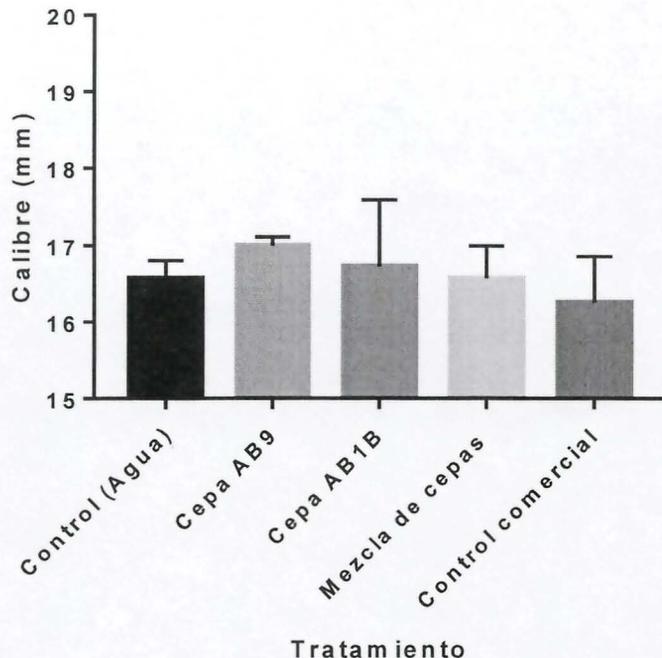
Los resultados obtenidos en los monitoreos de calibre de los frutos tratados con las distintas formulaciones en una primera cosecha, demostraron que la aplicación de las cepas lácticas por separado se relaciona con un mayor calibre en los frutos cosechados con respecto a plantas tratadas solo con agua, sin embargo estos datos no fueron estadísticamente significativos (figura 1). Sí se observó diferencias estadísticamente significativas al comparar el efecto en el calibre de los frutos tratados con las formulaciones basadas en las cepas AB9 y AB1B, en relación a la aplicación del tratamiento comercial basado en microalgas. Pudimos además evidenciar en estas muestras que la cepa AB9 se asocia con los mayores calibres en relación al grupo control tratado con agua ( $p=0.0553$ ) y control comercial ( $p<0,0001$ ). En una segunda cosecha efectuada, no se observaron diferencias con relevancia estadística al aplicar las diversas formulaciones en relación a los grupos control (figura 2).

Podríamos concluir que la aplicación de la cepa AB9 se relaciona significativamente con mayor calibre de frutos cosechados, especialmente al comparar con la aplicación de un producto comercial.

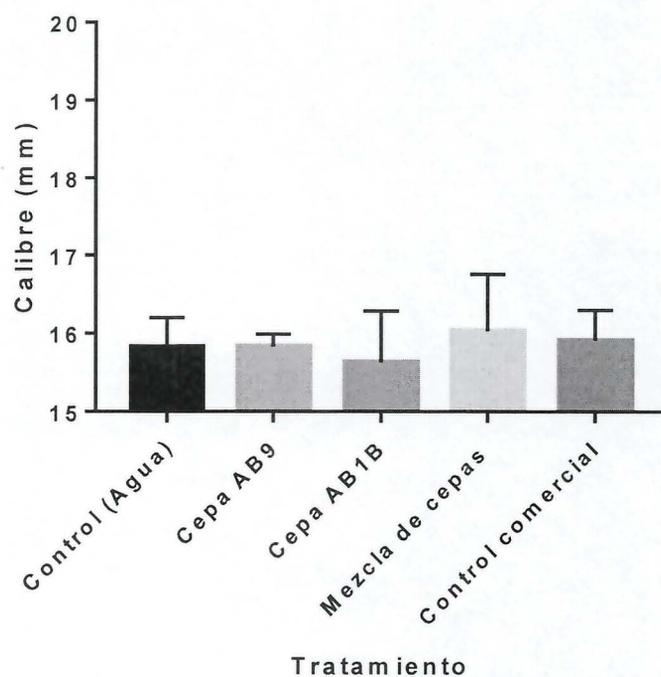
Los análisis de firmeza en la primera cosecha efectuada, relacionando el concepto a un fruto de mayor calidad y estable en el tiempo, demostró que los frutos tratados con la cepa AB1B

fueron más firmes (figura 3). Los frutos tratados con esta bacteria fueron estadísticamente más firmes que aquellos tratados con la cepa AB9, mezcla de cepas y ambos controles. La aplicación de la mezcla de cepas AB9 y AB1B de la misma forma mostró resultados promisorios en los frutos analizados, existiendo diferencias con significancia estadística al comparar la aplicación de la mezcla en relación al control negativo, no así al control comercial que mostró resultados bastante satisfactorios pero inferiores a la aplicación de la cepa AB1B y mezcla de bacterias lácticas. En la segunda cosecha efectuada, no se observaron las mismas tendencias, encontradas en las muestras iniciales, lo cual pudo deberse a una excesiva maduración de los frutos (figura 4).

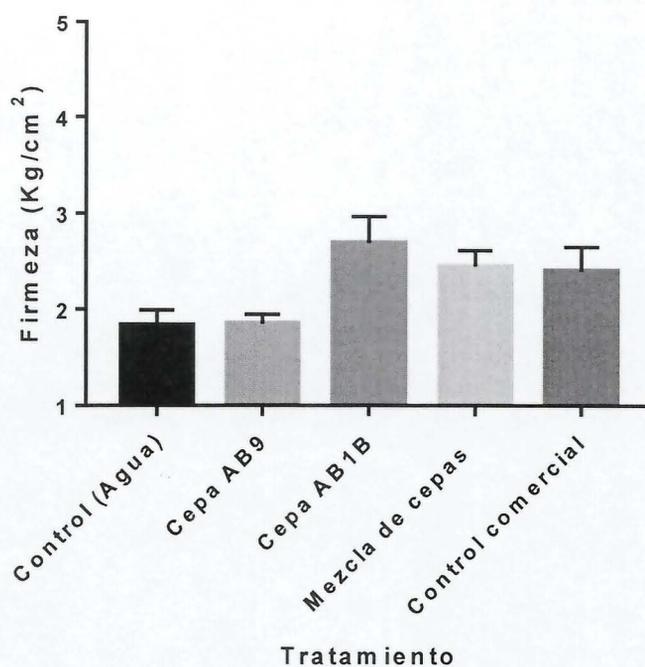
A modo de conclusión, podemos comentar que la aplicación de la cepa AB1B otorga claramente cualidades apetecidas en sistemas de producción frutal, al ser la firmeza un indicador de calidad y estabilidad en los frutos, lo cual asegura una conservación más adecuada del producto. Sin embargo, es importante definir con exactitud la fecha de cosecha, dado que es un periodo acotado que de no ser considerado genera producción de frutos excesivamente maduros, situación que puede enmascarar efectos atribuibles a la aplicación de la formulación microbiológica.



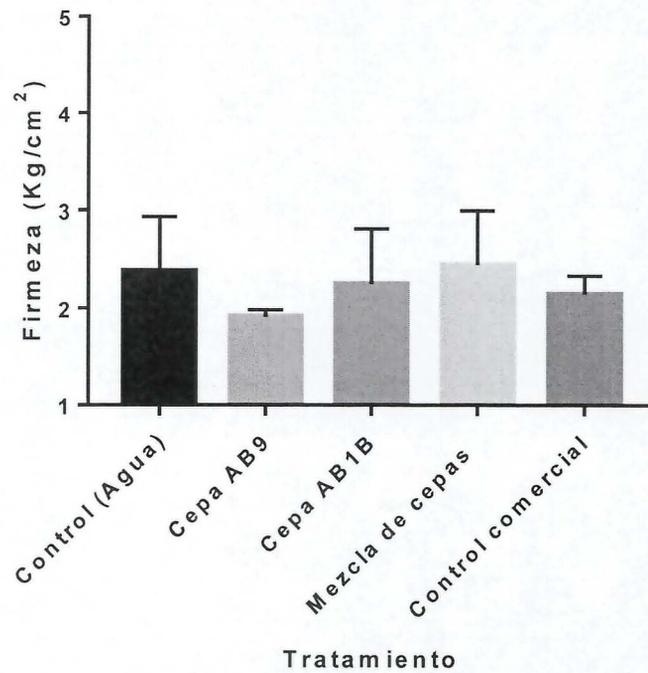
**Figura 1.** Calibre de frutos obtenidos en cosecha inicial de frutos de arándano en predio San Ignacio el 29 de Noviembre 2018.



**Figura 2.** Calibre de frutos obtenidos en cosecha inicial de frutos de arándano en predio San Ignacio el 07 de Diciembre 2018.



**Figura 3.** Firmeza de frutos obtenidos en cosecha inicial de frutos de arándano en predio San Ignacio, el 29 de Noviembre 2018.



**Figura 4.** Firmeza de frutos obtenidos en cosecha inicial de frutos de arándano en predio San Ignacio, el 07 de Septiembre del 2018.

### ANEXO 13.

#### **ENSAYOS EN FLORACIÓN DE ARÁNDANOS Y EVALUACIÓN DE BOTRITIS EN TERRENO EN FUNDO “SAN FLORENCIO”, MONTEAGUILA.**

Se efectuó un ensayo en el fundo “San Florencio” en la Comuna de Monteágula. Muestras de flores fueron puestas en cámara húmeda (figura 1), y evaluadas luego de 7 días.

El primer muestreo realizado el día Miércoles 02 Agosto se realizó como muestra compuesta de cada repetición, es decir, se tomaron flores de cada repetición sin diferenciar entre tratamientos, ya que los tratamientos aún no habían sido aplicados.

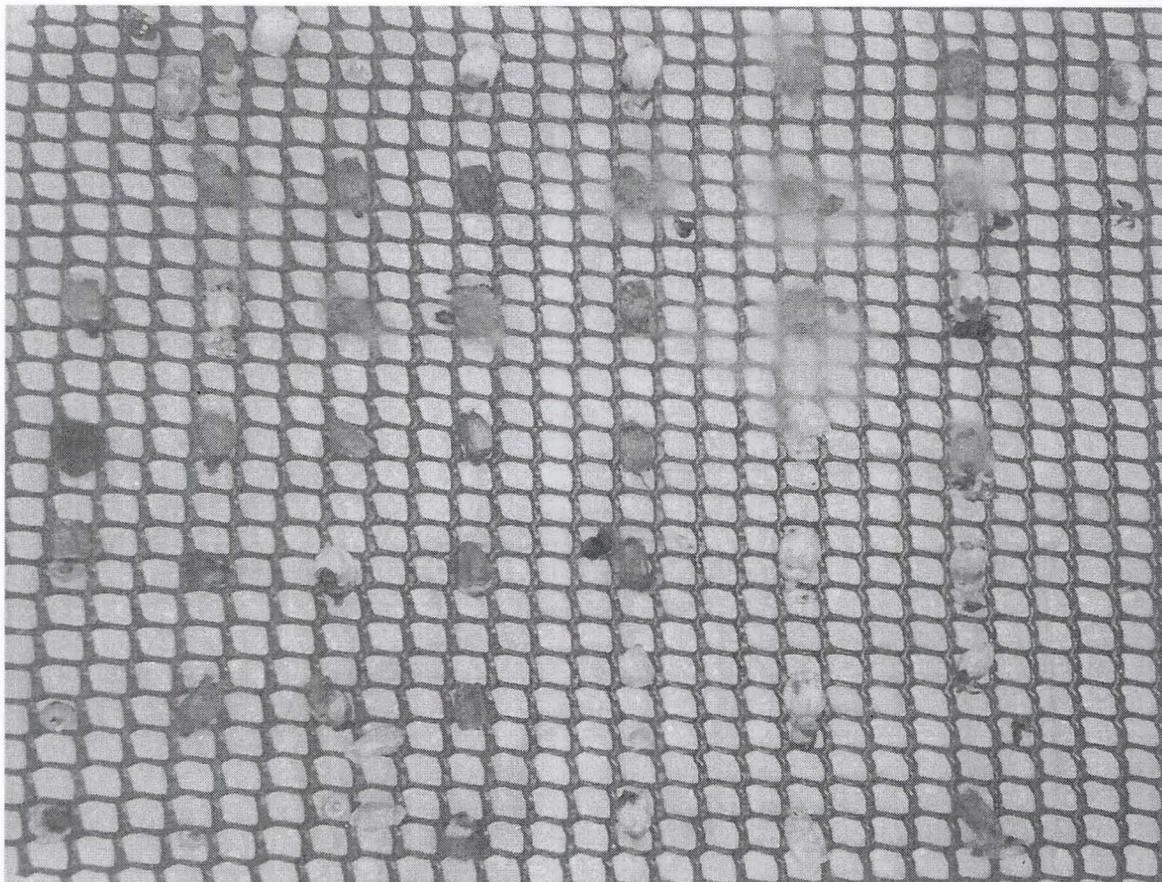
El segundo muestreo realizado el día Lunes 28 Agosto se realizó diferenciando entre tratamientos y sus respectivas repeticiones, tomando 15 flores por repetición.

#### **RESULTADOS**

La tabla 1 y 2, muestran la presencia de los principales hongos desarrollados en cada muestreo. Durante la evaluación del primer muestreo se encontró principalmente *Alternaria* y en menor cantidad *Botrytis*, también se identificaron otros hongos como *Cladosporium*, *Penicillium* y otros que no pudieron ser identificados por ser micelio estéril. Flores necróticas fueron observadas, pero sin presencia de micelio en 9,9% de las muestras.

**Tabla 1.** Incidencia por repetición del experimento en Monte Águila asociado al muestreo previo a realizar la primera aplicación (02 de agosto de 2017)

Repetición	Total Flores	Total Sanas	<i>Alternaria</i>	<i>Botrytis</i>	Otros hongos
1	50	10	18	10	10
2	50	6	37	2	0
3	41	16	18	3	1
4	40	4	22	3	3
Total	181	36	95	18	14
Porcentaje	100%	19,9%	52,5%	10,0%	7,7%



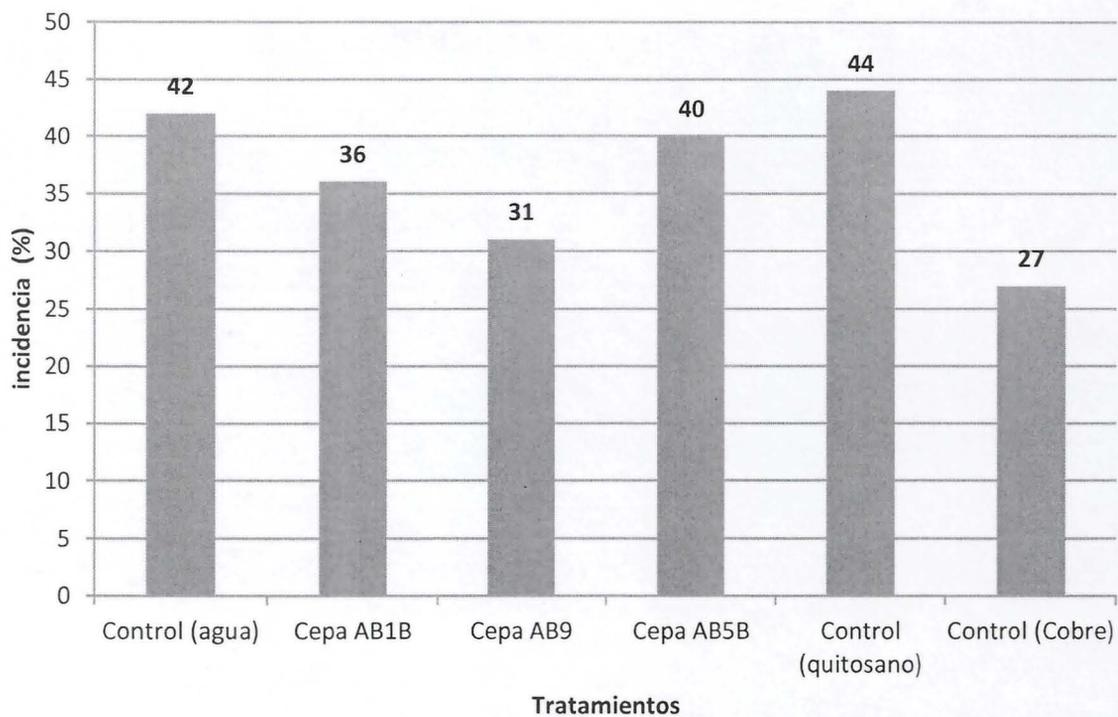
**Figura 1.** Evaluación cámara húmeda de la repetición uno (R1), después de 7 días del primer muestreo realizado el 02 de agosto de 2017.

Un aumento en la presencia de *B. cinérea* se ve reflejado en la evaluación del segundo muestreo, donde en promedio alcanzó un 36,7% de las flores, seguido por *Alternaria* (23% de las flores) y sólo un 10% de flores sanas (tabla 2). Otros hongos que aparecieron en menor cantidad como *Cladosporium* y *Penicillium* fueron observadas en 10% de las flores y un 21% de flores necróticas fueron observadas, pero sin presencia de micelio (figura 3).

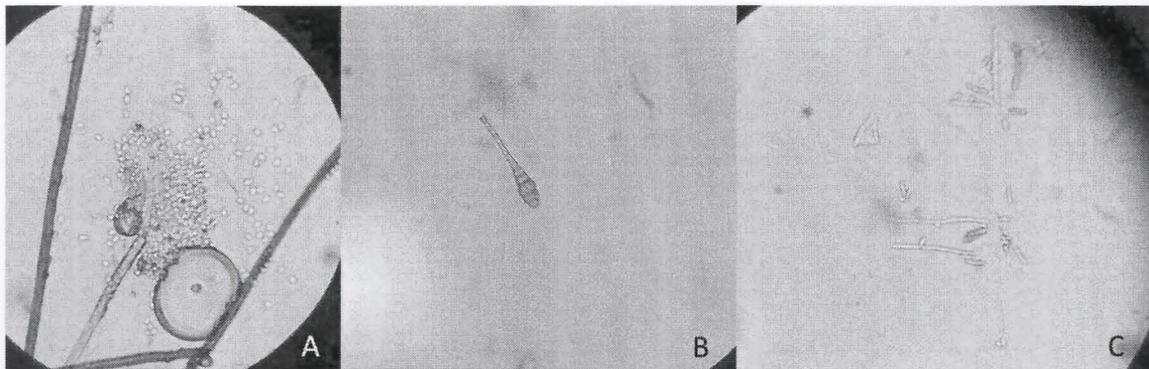
Del total de las 45 flores muestreadas de cada tratamiento se encontró menor incidencia de *B. cinerea* en los tratamientos 2,3 y 6 (tratamiento con cepa AB1B, AB9 y fungicida químico "Bellis®" (figura 2).

**Tabla 2.** Resultados en flores extraídas en segundo muestreo.

Tratamiento	Repetición	Total Flores	Total Sanas	<i>Alternaria</i>	<i>Botrytis</i>
Control (agua)	1	15	2	4	6
Control (agua)	2	15	3	4	3
Control (agua)	3	15	1	3	10
Cepa AB1B	1	15	2	2	6
Cepa AB1B	2	15	0	3	6
Cepa AB1B	3	15	0	3	4
Cepa AB9	1	15	2	4	5
Cepa AB9	2	15	2	9	3
Cepa AB9	3	15	3	1	6
Cepa AB5B	1	15	0	5	4
Cepa AB5B	2	15	1	3	6
Cepa AB5B	3	15	0	3	8
Control (Quitosano)	1	15	0	2	7
Control (Quitosano)	2	15	0	3	9
Control (Quitosano)	3	15	2	3	4
Control (Cobre)	1	15	4	5	0
Control (Cobre)	2	15	1	4	4
Control (Cobre)	3	15	4	2	8
<b>Total</b>		<b>270</b>	<b>10%</b>	<b>23,3%</b>	<b>36,6%</b>



**Figura 2.** Incidencia promedio de *Botrytis cinerea* observada por tratamiento.



**Figura 3.** Hongos encontrados sobre las flores de arándano. A: *Botrytis*; B: *Cladosporium*; C: *Alternaria*.

## ANEXO 14.

### EFFECTO CONTROL DE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS Y QUÍMICO SOBRE LA INCIDENCIA DE *Botrytis* EN FLORES DE ARÁNDANOS EN HUERTO ORGÁNICO.

**Objetivo:** Evaluar el efecto control de bacterias lácticas, *Pseudomonas* y agrocopper sobre la incidencia natural de *Botrytis cinerea*.

#### METODOLOGÍA

El experimento se realizó en un huerto productivo de arándanos orgánico, variedad O'Neal, perteneciente a la Universidad de Concepción, Campus Chillán. Se establecieron cinco tratamientos (Tabla 1) con un diseño de bloques completo al azar, cada bloque fue representado por la hilera donde fueron establecidos los siete tratamientos. La unidad experimental consistió en 5 plantas de arándano.

**Tabla 1.** Tratamientos y concentraciones durante las aplicaciones.

Tratamiento	Producto	Concentración aplicación 1	Concentración aplicación 2
T1	Agua	-	-
T2	AB9	4,9 X 10 <sup>8</sup>	2,6 X 10 <sup>8</sup>
T3	AB1B	Sin crecimiento	1,5 X 10 <sup>8</sup>
T4	AB9 + AB1B	1,6 X 10 <sup>8</sup>	2 X 10 <sup>8</sup>
T5	Agrocopper	1 gr L <sup>-1</sup>	1 gr L <sup>-1</sup>

La concentración bacteriana se expresó en u.f.c. mL<sup>-1</sup>

Los tratamientos fueron aplicados sobre la planta utilizando un volumen de 1 L por tratamiento, es decir, 250 mL por unidad experimental. La aplicación de los tratamientos fue realizada en dos ocasiones, 10 de septiembre y 14 septiembre de 2018, utilizando un atomizador manual de 1 L (Figura 1).

**Figura 1.** Aplicación de tratamientos sobre flores de arándano



### **EVALUACIÓN**

Se realizaron dos muestreos de flores, el primero de ellos 4 días después de la primera aplicación (14 de septiembre de 2019) y el segundo muestreo se llevó a cabo 10 días después de la segunda aplicación (24 de septiembre de 2019). Sesenta flores fueron puestas dentro de cámara húmeda con el objetivo de estimular el crecimiento de los hongos presentes en la flor. La cámara húmeda consistió en una bandeja de plástico conteniendo papel humedecido esterilizado y una malla plástica desinfectada sobre la cual se dejaron las flores para finalmente tapar la bandeja. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 10 días para luego ser evaluadas.

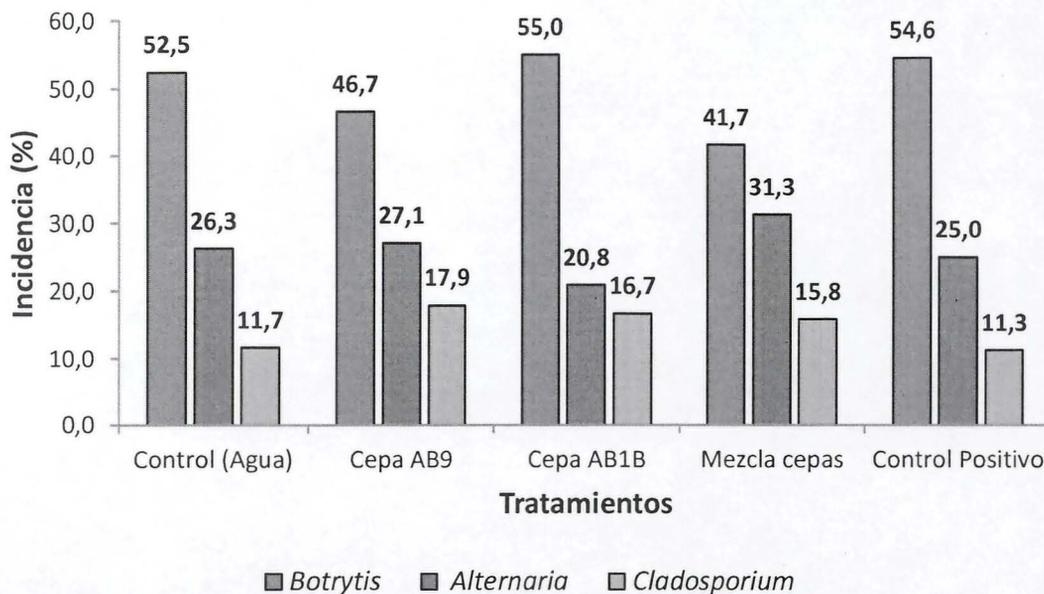
Se evaluó la incidencia de hongos sobre las estructuras de la flor.

Las mediciones del porcentaje de incidencia de *Botrytis* fueron sometidas a un análisis de varianza y se realizó una comparación de medias mediante la prueba de diferencia mínima significativa LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ).

### **RESULTADOS.**

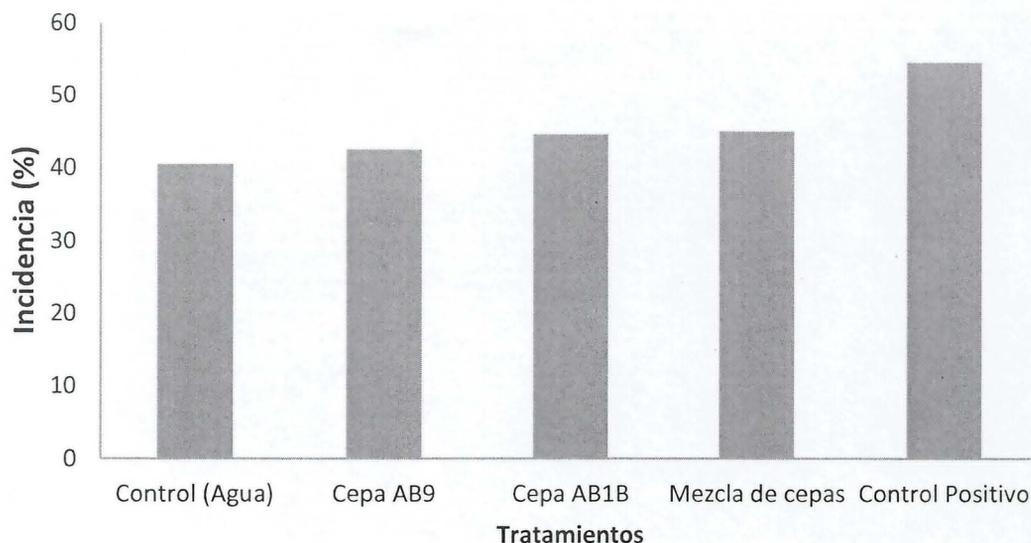
Las flores del primer muestreo (14 de septiembre de 2019), mostraron que la incidencia de *Botrytis* no fue significativamente diferente entre los tratamientos ( $P > 0,05$ ). Pese a que no existieron diferencias significativas entre tratamientos se observó una tendencia de la cepa AB9 (T2) y de la mezcla de AB9 y AB1B (T4) a disminuir la presencia de *Botrytis* sobre las flores comparada con el tratamiento control. Los tratamientos con la cepa AB1B (T3) y Agropopper® (T7) no fueron diferentes del control (T1), aunque presentaron un leve mayor porcentaje de *Botrytis* (Figura 2). La cepa AB1B (T3) presentó el menor efecto de control, esto se puede asociar a que el liofilizado de la bacteria presentó bajos recuentos

microbiológicos. En la Figura 2 se muestra que el hongo más recurrente fue *Botrytis*, seguido de *Alternaria* y *Cladosporium*, los cuales no mostraron diferencias entre los tratamientos. De acuerdo al establecimiento de los hongos sobre la flor, se pudo observar que *B. cinerea* se estableció y afectó todas las estructuras de la flor; *Alternaria*, por su parte, afectó principalmente sépalos y pétalos, mientras que los *Cladosporium* se limitaron a estructuras internas de la flor tales como estambres y estigma, sin presentar, en la mayoría de los casos, algún síntoma de necrosis sobre los sépalos de la flor.



**Figura 2.** Incidencia de los principales géneros de hongos observados en flores de arándano cv. O’Neal, obtenidos de un muestreo realizado el 14 de septiembre de 2018 en un huerto orgánico en Chillán, Región de Ñuble.

Con las muestras obtenidas en el segundo muestreo, realizado el 24 de septiembre, el porcentaje de flores con *B. cinerea* presentó diferencias significativas entre los tratamientos ( $P = 0,022$ ; Figura 3). Los tratamientos con las cepas ácido lácticas, AB9 (T2), AB1B (T3), fueron similares entre sí, y similares al tratamiento control (T1), que correspondió al control absoluto. La cepa AB9 (T2) mostró una menor incidencia de Pudrición gris. Los tratamientos con Agrocopper® (T5) y la mezcla de AB9 + AB1B (T4) fueron diferentes a los tratamientos antes mencionados y presentaron los mayores porcentajes de incidencia por *B. cinerea*.



**Figura 3.** Incidencia de *Botrytis cinerea* observada en flores de arándano cv. O'Neal, obtenidos de un muestreo realizado el 24 de septiembre de 2018 en un huerto orgánico en Chillán, Región de Ñuble. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes según prueba de diferencias mínimas significativas de Fischer (LSD) a un nivel alfa = 0,05.

### **CONCLUSIONES**

La cepa de *Lactobacillus* AB9 (T2), aunque no diferente del control sólo tratado con agua (T1), tuvo una mayor reducción de la incidencia de *Botrytis* en flores de arándano cuando fue comparado con un control convencional en base de sulfato de cobre pentahidratado (T7; Agrocopper®), en el experimento realizado en un huerto orgánico en Chillán.

## ANEXO 15

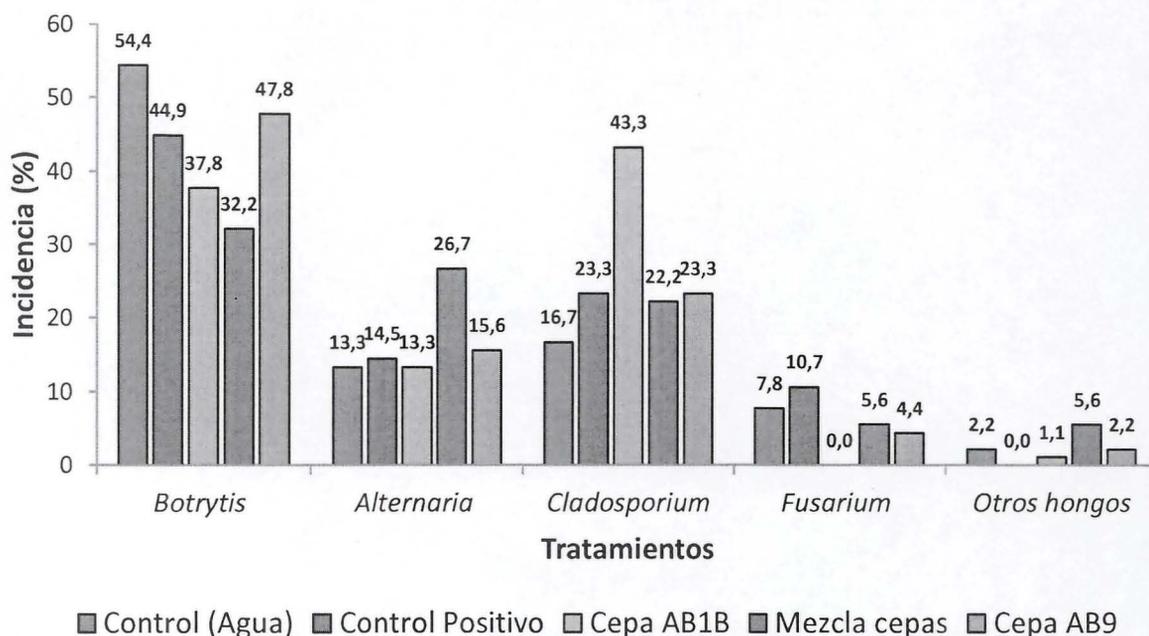
### EVALUACIÓN FORMULACIONES BASADAS EN CEPAS ÁCIDO LÁCTICAS SOBRE FLORES DE ARÁNDANOS EN HUERTO LOS NOGALES, COMUNA DE SAN IGNACIO.

La evaluación del efecto de los tratamientos biológicos a base de cepas de *Lactobacillus* sobre flores de arándano se repitió en un huerto convencional de arándanos ubicado en la comuna de San Ignacio, Región de Ñuble, para determinar la eficacia de estas cepas en el control de *Botrytis cinerea*. Los tratamientos fueron: Control (agua), formulaciones basadas en las cepa ácido lácticas AB1B, AB9 y mezcla de éstas, así como un control comparativo que consistió en Agrocooper. La evaluación de las flores se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Concepción, en base a un sistema ciego de tratamientos que fue definido por colores. Los muestreos se realizaron el 01 de octubre y el 03 de octubre de 2018, en consideración a que se aplicaron los tratamientos posterior a una lluvia entre el 29 y 30 de septiembre, y se colectó un día previo a un temporal importante que ocurrió a partir del 04 de octubre, a fin de determinar la carga de inóculo antes de una lluvia que dejaron los tratamientos biológicos sobre flores de arándano. Del mismo modo, dado que quedaba poca floración se hicieron dos muestreos de 30 flores por repetición y a fin de tener una muestra más representativa se hicieron dos set de incubación en cámara húmeda.

Las muestras de flores que fueron recibidas el 01 de octubre no presentaron diferencias significativas entre tratamientos para la incidencia de *B. cinerea* ( $P = 0,599$ ; C.V. = 21,5; Figura 4), así tampoco para los otros hongos de los géneros recurrentes que fueron identificados, como fueron *Alternaria* ( $P = 0,317$ ; C.V. = 24,5), *Cladosporium* ( $P = 0,451$ ; C.V. = 37,2) y *Fusarium* ( $P = 0,778$ ; C.V. = 102,8) [Figura 4]. También se identificaron otros hongos que en promedio para el experimento no superaron la infección del 2,2% de las flores (Rango 0,0-5,6%; Figura 4). El hongo más recurrente fue *Botrytis cinerea*, que en el experimento se observó en el 43,4% de las flores, seguido de *Cladosporium* spp. en el 25,8%, *Alternaria* en el 16,7% y *Fusarium* en el 5,7% de las flores.

En cuanto a los tratamientos, aunque no hubo diferencias entre ellos, la mezcla de cepas lácticas, tuvo el menor nivel de *B. cinerea* con 22,2 unidades porcentuales promedio menos que el tratamiento control absoluto (agua), que tuvo la mayor expresión de este hongo (54,4% de incidencia). La cepa AB1B, mostró 16,6 unidades porcentuales menos que el tratamiento control, sin embargo la aplicación de esta cepa, favoreció notoriamente el

desarrollo de *Cladosporium* en las flores en esta medición, ya que fue alrededor de 20 unidades porcentuales mayor a el resto de los tratamientos; mientras el Naranja incremento en alrededor a 10 unidades porcentuales la frecuencia de *Alternaria*.

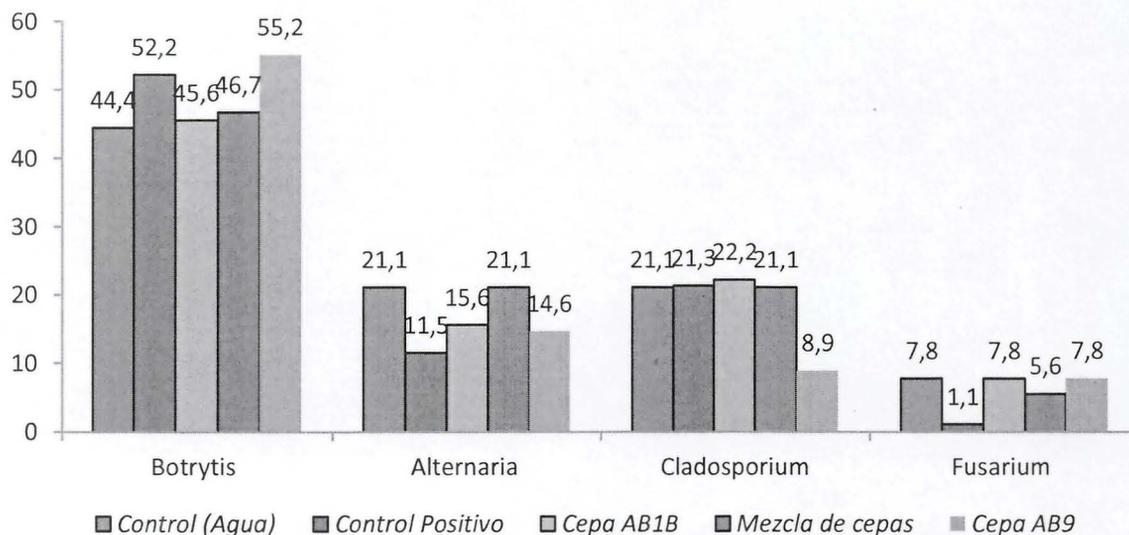


**Figura 4.** Incidencia de los principales géneros de hongos observados en flores de arándano, obtenidos de un muestreo realizado el 01 de octubre de 2018 en un huerto convencional en San Ignacio, Región de Ñuble.

En la evaluación del segundo muestreo, realizado el 03 de octubre tampoco se observaron diferencias entre tratamientos para la incidencia de *B. cinerea* ( $P = 0,743$ ; C.V. = 11,8; Figura 5), y lo mismo fue observado para los otros hongos de los géneros recurrentes que fueron identificados, como *Alternaria* ( $P = 0,557$ ; C.V. = 23,1), *Cladosporium* ( $P = 0,167$ ; C.V. = 21,0) y *Fusarium* ( $P = 0,120$ ; C.V. = 34,2) [Figura 5]. Otros hongos se mantuvieron a un nivel bajo no superando el 2,4% de las flores del experimento (Figura 5).

En el caso de *B. cinerea* hubo un incremento en el nivel de infección de este fitopatógeno de 5,4 unidades porcentuales con respecto a la evaluación anterior, afectando al 48,8% de las flores, mientras las infestaciones por *Cladosporium* bajaron en 6,9 unidades porcentuales, y las infecciones por *Alternaria* y *Fusarium* se mantuvieron estables. En cuanto a los tratamientos, el Tratamiento control (agua), mostró el menor nivel de infección por *B. cinerea*, pero en general hubo en promedio una muy baja variación entre los tratamientos que en la evaluación anterior (Figura 5). Por su parte, el tratamiento basado en la cepa AB9, presentó alrededor de 10 unidades porcentuales menos de infección por

*Cladosporium* spp., que el resto de los tratamientos, pero a su vez presentó una mayor infección por *B. cinerea*.



**Figura 5.** Incidencia de los principales géneros de hongos observados en flores de arándano, obtenidos de un muestreo realizado el 03 de octubre de 2018 en un huerto convencional en San Ignacio, Región de Ñuble.

En conclusión, este estudio realizado en un huerto de arándanos en San Ignacio, mostró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en evaluación para reducir la infección por *B. cinerea* u otros hongos fitopatógenos identificados en este análisis. Esto pudo estar dado porque las condiciones meteorológicas de la primavera entre los meses de septiembre y octubre, caracterizada por lluvias recurrentes y temperaturas moderadas, fueron muy favorables para el ataque de hongos; lo cual explica la alta tasa de incidencia de *B. cinerea* observada en los tres experimentos durante floración, que fue en general sobre el 40% de las flores evaluadas. Por lo anterior la evaluación de frutos podría ayudar a definir la eficacia de los tratamientos con *Lactobacillus*.

## **ANEXO 16.**

### **EFFECTOS DE APLICACIÓN DIRECTA DE FORMULACIONES BASADAS EN CEPAS LÁCTICAS SOBRE ENFERMEDADES DE LA MADERA O TALLO.**

Dentro de las patologías asociadas al cultivo del arándano, además de aquellas que afectan las flores y frutos, también existen otras que debilitan la planta afectando la madera o tallo. Por este motivo, planificamos la realización de dos ensayos, enfocados en demostrar efectos de remisión de enfermedad en tallo.

#### **Ensayo 1. Efectuado en Fundo San Florencio Monteágula, temporada 2017-2018.**

##### **Metodología.**

A 5 g de biomasa de las cepas AB1B, AB5B y AB9 en concentración  $10^9$  UFC/g, se le adicionó 3 ml de solución fisiológica, para conformar una pasta. Un total de 3 aplicaciones de cada una de las pastas se efectuaron empleando pinceles, se aplicó principalmente en zonas afectadas por cancro y subyacentes (figura 1). Cada pasta fue aplicada a 4 plantas con evidentes signos de lesión, se marcaron ramillas tratadas y control.

La evaluación del efecto en esta ocasión solo se determinó mediante registro fotográfico.



**Figura 1.** Aplicación de pastas basadas en biomasa de las cepas ácido lácticas en plantas de arándano con signos de enfermedad en madera o tallo.

## Resultados.

Como se comentó previamente, el ensayo se efectuó en base a seguimiento de las plantas por registro fotográfico. Fue algo complejo evidenciar lesiones y remisión de canchros, sin embargo pudimos notar que en dos plantas, aquellas remillas que fueron inoculadas con pasta bacteriana, mostraron diferencia.

La figura 2, muestra los resultados en planta donde fue aplicada la pasta basada en la cepa AB5B, podemos notar una disminución clara en la profundidad de la lesión, no así en la superficie comprometida. El centro de la lesión en el estado inicial, presentó un aspecto de pudredumbre, el cual no se aprecia luego de transcurridas las 3 aplicaciones.



**Figura 2.** Comparación de planta tratada con cepa AB5B luego de 3 aplicaciones durante un mes.

La figura 3, muestra el efecto de la aplicación de la pasta basada en la cepa AB1B. En este caso, se aprecia una disminución de pudredumbre en el tallo, lo cual podría ser relacionado a control de hongos y una potencial regeneración de tejido.



**Figura 3.** Comparación de planta tratada con cepa AB1B luego de 3 aplicaciones durante un mes

## Ensayo 2. Efectuado en Fundo San Florencio Monteáguila, temporada 2018-2019.

Se determinó efectos en la reversión de lesiones causadas por el hongo *Chondrostereum purpureum* (plateado), en madera de arándanos por efecto de formulaciones probióticas.

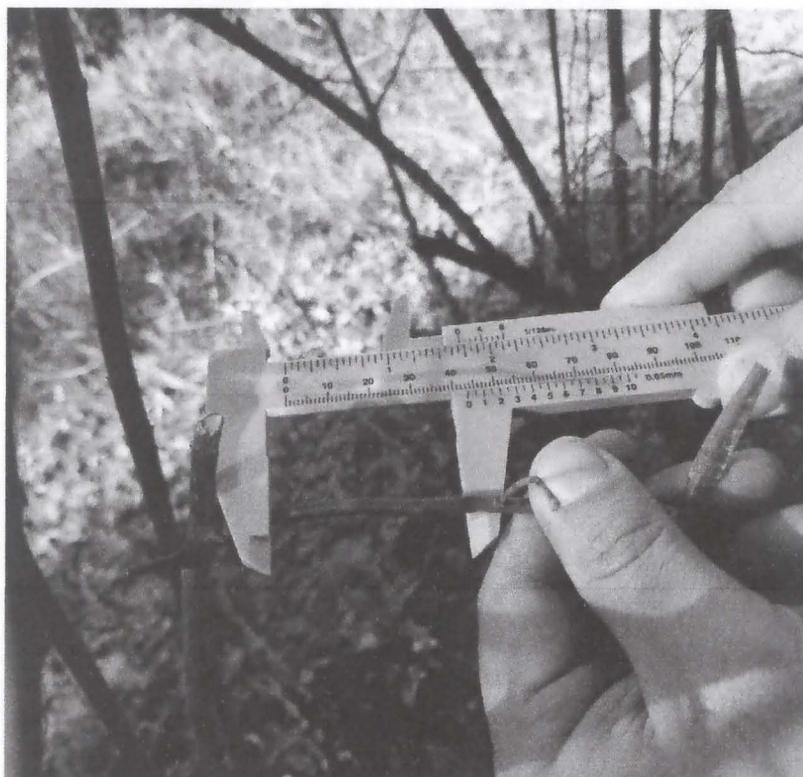
### Metodología.

El ensayo se efectuó en el huerto de arándanos del fundo "San Florencio", en la temporada 2018-2019, en ese momento, el predio se encontraba sin manejo agronómico, en el cual existía presencia del hongo *Chondrostereum purpureum*. El cultivar correspondió a la variedad *Rabbiteye*. Las formulaciones basadas en las cepas lácticas AB1B, AB5B y AB9 fueron suspendidas en agua alcanzando concentración de  $10^9$  UFC/ml. Adicionalmente se aplicó un tratamiento control negativo consistente en agua y un control positivo comparativo consistente en el antifúngico comercial Bellis ®. La unidad experimental consistió en 3 plantas para cada tratamiento y se establecieron 3 repeticiones, en un modelo de bloques al azar. Las formulaciones fueron aplicadas con bomba de espalda semanalmente por 12 semanas (figura 4).

Se efectuó registro inicial y final de las lesiones marcadas en cada planta empleando un pie de metro (figura 5). Adicionalmente, se efectuó un registro fotográfico de algunas lesiones encontradas.



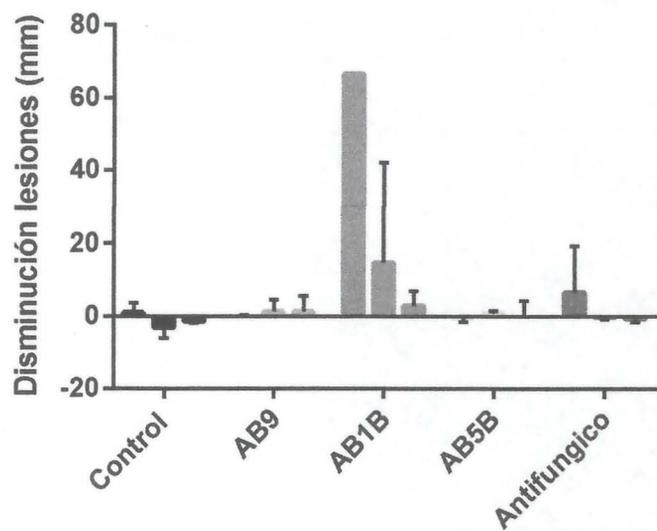
**Figura 4.** Aplicación de las formulaciones en arándanos variedad Rabbiteye con presencia de plateado.



**Figura 5.** Registro de lesiones en plantas tratadas.

### **Resultados.**

Se comparó los registro de las lesiones obtenidas en el inicio del experimento y luego de transcurridas las 12 semanas de experimento. El análisis estadístico correspondiente a ANOVA de dos vías, demostró que existen diferencias significativas en el tamaño de las lesiones al aplicar la formulación basada en la bacteria AB1B en relación a todos los otros tratamientos. Esta formulación demostró disminuir significativamente las lesiones ocasionadas por el agente fúngico (figura 6 y 7).



**Figura 6.** Disminución de lesiones en plantas tratadas con los 5 tratamientos experimentales.



**Figura 7.** Ejemplo de tallo infestado con plateado y tratado experimentalmente.

## Conclusión

En el experimento realizado en la temporada 2017-2018, la aplicación de dos preparaciones en pasta, basadas en biomasa de las cepas AB1B y AB5B logran disminuir la severidad de enfermedades que afectan la madera o tallo en plantas de arándanos. Si bien este ensayo fue piloto, en futuros informes se efectuará nuevas aplicaciones procurando la obtención de datos cuantitativos que permita demostrar efectos significativos.

Los resultados del ensayo efectuado en la temporada 2018-2019, demostraron un efecto curativo de lesiones causadas por el fitopatógeno de madera *Chondrostereum purpureum* en plantas de arándanos de la variedad Rabbiteye, al ser tratadas con una suspensión de la formulación basada en la cepa *L. kunkeii* AB1B.

## **ANEXO 17**

### **EVALUACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN FRUTOS DE ARÁNDANOS CV. O'NEAL COSECHADOS EN HUERTO SAN FLORENCIO, MONTEÁGUILA.**

#### **Introducción**

Las frutas y las hortalizas son productos altamente perecederos. Comúnmente, hasta un 23 por ciento de las frutas y las hortalizas más perecederos se pierden debido a deterioros microbiológicos y fisiológicos, pérdida de agua, daño mecánico durante la cosecha, envasado y transporte, o a las inadecuadas condiciones de traslado. Estas pérdidas ascienden a más del 40-50 por ciento en las regiones tropicales y subtropicales (FAO, 1995a; FAO, 1995b). Las pérdidas también ocurren durante la vida útil y la preparación en el hogar y en los servicios de comida. Más aún, en muchos países en desarrollo la producción de productos frutihortícolas para el mercado local o la exportación es limitada debido a la falta de maquinaria y de infraestructura. La reducción de las altas pérdidas de frutas y hortalizas requiere la adopción de varias medidas durante la cosecha, la manipulación, el almacenamiento, el envasado y el procesamiento de frutas y hortalizas frescas para obtener productos adecuados con mejores propiedades de almacenamiento.

Dada la importancia del almacenamiento post cosecha, se planteó determinar la influencia de las distintas formulaciones, aquellas basadas en cepas lácticas y fungicidas, comercial y orgánico, en la conservación post cosecha, con énfasis en la aparición de hongos fitopatógenos.

Los frutos fueron tratados con los diversos tratamientos mediante aspersión efectuada con moto bomba, estos se definen a continuación:

- T1 control: agua
- T2 cepa AB1B: Suspensión de biomasa deshidratada de la bacteria AB1B en una concentración de  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml.
- T3 cepa AB9: Suspensión de biomasa deshidratada de la bacteria AB9 en una concentración de  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml.
- T4 cepa AB5B: Suspensión de biomasa deshidratada de la bacteria AB5B en una concentración de  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml.
- T5 fungicida orgánico: formulación antifúngica orgánica basada en quitina (0.45% v/v).
- T6 fungicida químico: Formulación fungicida comercial Bellis®, ingredientes activos boscalid 25,2% y piraclostrobin 12.8%. basada en cobre, (0.1% p/v).

En cada zona dispuesta aleatoriamente se aplicó el correspondiente tratamiento, se hicieron cuatro repeticiones en un diseño de bloques al azar (figura 1).

X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	T3	T6	X	T1	T4	X	T5	T4	X	T2	T3	X
X	T2	T5	X	T6	T2	X	T3	T1	X	T4	T5	X
X	T1	T4	X	T3	T5	X	T2	T6	X	T6	T1	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

**Figura 1.** Esquema de disposición de los 6 tratamientos en huerto de arándanos tratado.

### Evaluación de hongos fitopatógenos.

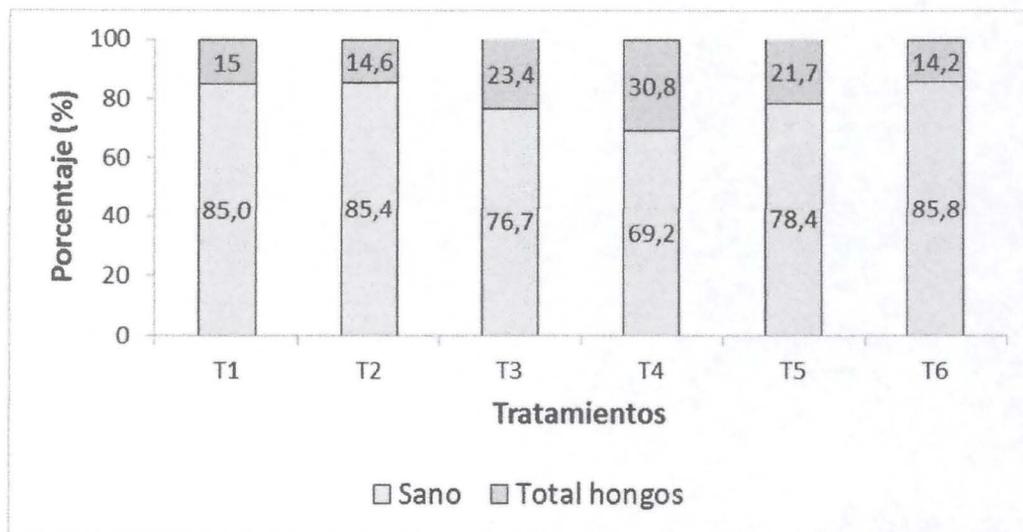
El primer muestreo en frutos fue realizado el día 28 de noviembre de 2017, lo cuales fueron inmediatamente analizados fitopatológicamente, para tener antecedentes del nivel encontrado en los frutos al inicio de la maduración de frutos. Estos frutos fueron evaluados después de 16 días bajo incubación en cámara húmeda. Una segunda colecta de frutos desde los tratamientos se realizó el día 15 de diciembre de 2017, y en este caso, los frutos fueron mantenidos bajo almacenamiento en frío a 0°C por 20 días, momento en que se tomó una muestra para análisis fitopatológico (04 de enero de 2018), y los restantes se colocaron nuevamente en frío para un análisis después de 45 días en almacenamiento en frío (24 de enero de 2018). La mantención en frío por 20 días buscó simular un viaje de exportación a los Estados Unidos de América, mientras que la mantención por 45 días bajo almacenamiento buscó simular un viaje en barco a China. Las muestras de frutos en cada caso fueron puestas en cámara húmeda, y en la evaluación posterior a los 20 días de almacenamiento se incubó por 11 días. A partir de estos resultados se determinó el porcentaje de incidencia de hongos para cada tratamiento.

## RESULTADOS

El análisis de los frutos que fueron cosechados y sometidos a incubación en cámara húmeda mostraron que no hubo mayor infestación por patógenos en el huerto, ya que en promedio el 80% de los frutos no tuvieron signos de algún hongo fitopatógeno y no hubo diferencias entre tratamientos para el número de frutos sanos ni para el total de frutos infestados con algún micelio de alguna especie de hongo, que alcanzó en promedio el 20% de infestación con el tratamiento T4 (formulación basada en cepa AB9), mostrando el mayor número de frutos con algún signo de hongo, seguido de T5 y T3, fungicida orgánico y formulación basada en cepa AB5B respectivamente (figura 2). El tratamiento T2 (formulación basada en cepa AB1B), se infestó de forma similar a los frutos del Control no tratado (T1) y del control comercial con fungicida (T6).

En cuanto a las especies de hongos identificados el hongo que prevaleció fueron del género *Cladosporium* (13,7% de las muestras), seguido de miembros del género *Alternaria* (2,9%) y *Penicillium* (2,7%). Cabe hacer notar que los aislados de *Cladosporium* y *Alternaria* crecían como saprófitos sobre los frutos en la zona apical del fruto no causando pudrición

en los frutos. *Botrytis cinerea*, especie altamente patógena en frutos, fue observada en muy baja prevalencia, con un expresión del 0,63% del total de frutos evaluados (n = 1440 frutos), siendo identificada en algunas repeticiones del Tratamiento T2, T3 y T5 solamente (tabla 2).



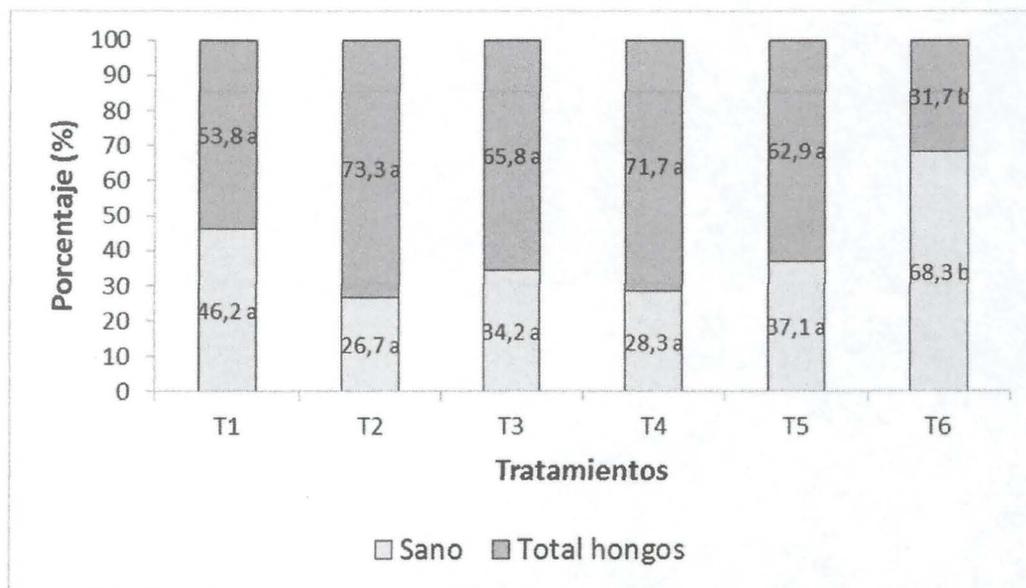
**Figura 2.** Porcentaje de frutos sano y con signos de algún hongo observados en frutos cosechados de arándano cv. O'Neal, que fueron obtenidos en un muestreo realizado el 28 de noviembre de 2017, y que fueron incubados por 16 días en cámara húmeda.

**Tabla 2.** Proporción (%) de hongos fitopatógenos en frutos de arándano cv. O'Neal, que fueron obtenidos en un muestreo realizado el 28 de noviembre de 2017, y que fueron incubados por 16 días en cámara húmeda.

Tratamiento	Número de flores	<i>Alternaria</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>
Control (Agua)	240	3,33	0,00	10,4	1,25
Cepa AB1B	240	3,75	1,25	9,2	0,43
Cepa AB9	240	3,33	0,85	15,4	3,75
Cepa AB5B	240	2,93	0,00	21,3	6,65
Control (Quitosano)	240	2,93	1,68	14,2	2,93
Control (cobre)	240	1,25	0,00	11,7	1,25
<b>Total</b>	<b>1440</b>	<b>2,92%</b>	<b>0,63%</b>	<b>13,7%</b>	<b>2,71%</b>
CV		54,3	51,0	56,5	61,2
P-value		0,865	0,345	0,938	0,343

En el caso de las muestras de frutos de arándanos utilizados en el segundo muestreo, que se sometieron por 20 días a almacenaje en frío a 0°C. Previo a realizar el análisis fitopatológico, se observó un incremento marcado en la aparición de hongos sobre los frutos,

observándose en 59,9% de los frutos y viéndose reducido notoriamente la expresión de frutos sanos, donde se observaron diferencias entre tratamientos ( $P = 0,027$ ; Figura 2), con el Tratamiento T6 (fungicida comercial), siendo diferente del resto de los tratamientos ya que logró un 68,3% de frutos sanos, lo cual implica un control de frutos afectados por hongos de un 47,8% comparado al control no tratado (T1). El resto de los tratamientos no fueron distintos del Control (T1) y en general aumentaron la incidencia de signos sobre los frutos en un 31,7% en promedio y variando estos incrementos entre 42,2% para T2 y 19,7% para T5.



**Figura 2.** Porcentaje de frutos sano y con signos de algún hongo observados en frutos cosechados de arándano cv. O'Neal, que fueron obtenidos en un muestreo realizado el 15 de diciembre de 2017 y almacenados en frío a 0°C por 20 días, previo a su incubación por 11 días en cámara húmeda. Letras distintas dentro de la columna de igual color indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de diferencias mínimas significativas (LSD) a un nivel de confianza del 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

En cuanto a las especies de hongos identificados no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0,05$ ; Tabla 2), aunque se observó un incremento notorio con respecto a la evaluación anterior de las poblaciones saprófitas de *Alternaria* y *Cladosporium*, que fueron identificadas en el 24,8 y 28,7% de los frutos de arándanos analizados afectados por estos hongos ( $n = 1440$  frutos), respectivamente. *Penicillium* spp, también se vieron aumentadas en su incidencia, subiendo de 2,7% en la evaluación anterior a 4,1% de los frutos afectados por este patógeno de poscosecha después de los 20 días de almacenaje. *B. cinerea* también vio incrementada su presencia en 2,7 veces con respecto a la primera evaluación, afectando al 1,67% de los frutos analizados. El hongo *B. cinerea*, en esta evaluación, fue observado en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento 6 (Control fungicida comercial) donde no fue identificado. El uso del control químico comercial, basado en el uso del fungicida a base de Ciprodinilo y Fludioxanilo (Switch® 62,5 WG, Syngenta S.A.) también permitió la no presencia de *Penicillium* en los frutos y mostró una

tendencia a reducir *Alternaria* y *Cladosporium* en un 28,2 y 33,3% con respecto al control no tratado (T1). A pesar de no haber diferencias ente tratamientos, los tratamientos T3 y T4 (basados en las cepas AB5B y AB9), mostraron una tendencia a reducir en un 66,8% la presencia de *B. cinerea* con respecto al control no tratado (T1)

**Tabla 2.** Proporción (%) de hongos fitopatógenos observados en frutos cosechados de arándano cv. O'Neal, que fueron obtenidos en un muestreo realizado el 15 de diciembre de 2017 y almacenados en frío a 0°C por 20 días, previo a su incubación por 11 días en cámara húmeda.

Tratamiento	Número de flores	<i>Alternaria</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>
1	240	16,3	2,50	30,0	5,00
2	240	33,3	3,35	32,5	4,20
3	240	28,8	0,83	30,4	5,83
4	240	32,5	0,83	32,9	5,43
5	240	26,3	2,50	26,3	7,90
6	240	11,7	0,00	20,0	0,00
Total	1440	24,8%	1,67%	28,7%	4,73%
CV		45,3	68,5	11,7	55,9
P-value		0,502	0,656	0,085	0,282

### Otras consideraciones

Los resultados obtenidos en los análisis fitopatológicos conducidos con los frutos cosechados de sitio experimental en Monteaguila, Región del Biobío muestran que en general los tratamientos no redujeron marcadamente los niveles de infestación por hongos fitopatógenos, excepto por el uso del fungicida a base de Ciprodinilo y Fludioxanilo (Switch® 62,5 WG, Syngenta S.A.), que tuvo un mayor porcentaje de frutos sanos y mostró no desarrollo de *B. cinerea* en ambas evaluaciones con frutos. El almacenaje en frío aumento la presencia de hongos fitopatógenos después de 20 días, por lo cual es esperable que los resultados obtenidos después de 45 días de almacenaje en frío arrojen un dato más definitorio de la efectividad delos tratamientos. Los tratamientos en base a bacterias *Lactobacillus* no mostraron mayores diferencias en el control de hongos y tendieron a aumentar en algunos casos la presencia de la presencia de saprófitos como *Alternaria* y *Cladosporium*. De igual modo, el tratamiento T4 (basado en la cepa AB9), tendió a mostrar menor presencia de *B. cinerea*, lo cual hace suponer que sería adecuado seguir su desarrollo como un fungicidas con potencial de control sobre el hongo causante de la pudrición gris del arándano.

### Conclusiones.

En lo que refiere a los análisis fitopatológicos, el análisis de los frutos que fueron cosechados y sometidos a incubación en cámara húmeda, no evidenciaron mayor infestación fúngica. Si se logró identificar especímenes mayoritariamente del género *Cladosporium* (13,7% de las muestras), seguido de miembros del género *Alternaria* (2,9%) y *Penicillium* (2,7%). *Botrytis cinerea*, fue observada en muy baja prevalencia, con un expresión del 0,63% del total de frutos evaluados (n = 1440 frutos).

En el caso de las muestras que se sometieron por 20 días a almacenaje en frío a 0°C. Previo a realizar el análisis fitopatológico, se observó un incremento marcado en la aparición de hongos sobre los frutos, observándose infestación en 59,9% de los frutos y viéndose reducido notoriamente la expresión de frutos sanos. El tratamiento que mostró mayor efectividad en el control fúngico en estas condiciones fue el tratamiento antifúngico químico comercial, que presentó resultados significativos con respecto al grupo control. Interesante de mencionar, es que a pesar de no haber diferencias ente tratamientos, los tratamientos T3 y T4 (basados en las cepas AB5B y AB9), mostraron una tendencia a reducir en un 66,8% la presencia de *B. cinerea* con respecto al control no tratado (T1).

## ANEXO 18.

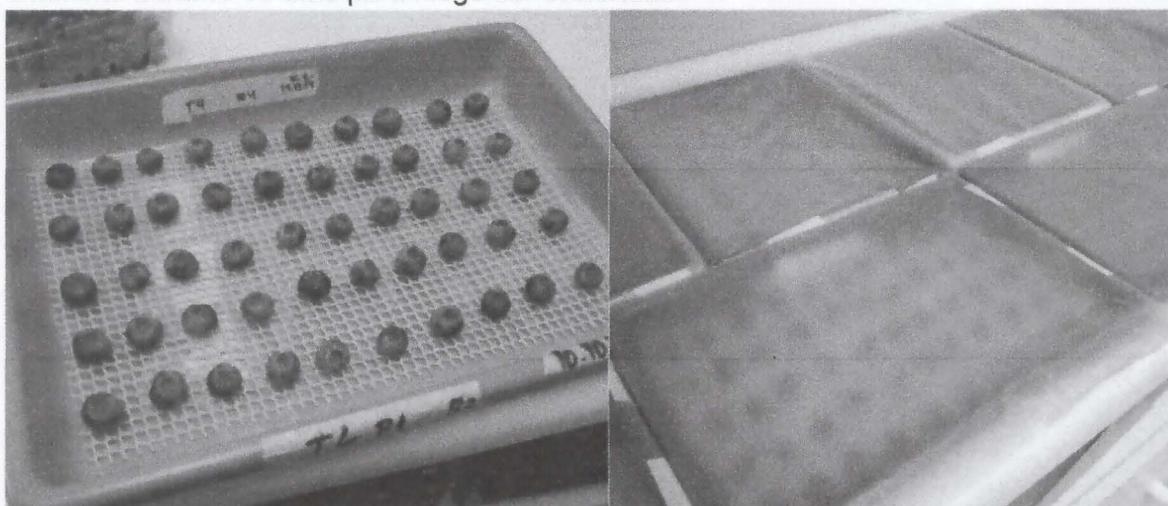
### EFFECTO CONTROL DE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS SOBRE LA INCIDENCIA DE *Botrytis* EN FRUTOS DE ARÁNDANOS EN FUNDO LOS NOGALES, SAN IGNACIO.

**Objetivo:** Evaluar el efecto control de bacterias lácticas sobre la incidencia natural de *Botrytis cinerea* sobre frutos de arándano en un experimento realizado en San Ignacio, Región de Ñuble.

#### METODOLOGÍA

Se recolectó un set de frutos de arándano maduros, que fueron tratados con los distintos tratamientos, Control absoluto (agua), Control positivo (fungicida basado en cobre), cepa AB1B, cepa AB9, mezcla de cepas AB1B y AB9. Un set de muestras de frutos de arándano correspondió a un experimento conformado por cinco tratamientos con tres repeticiones el cual fue recibido para análisis fitopatológico. Los frutos fueron recibidos en 'clamshell' etiquetados el día 7 de diciembre de 2018 y no presentaban algún síntoma asociado a alguna anomalía, la mayoría de las muestras se encontraban bien hidratados y de apariencia sana. Los frutos fueron mantenidos en una cámara de frío a 0°C por 20 días en dependencias de la facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, a fin de simular el tiempo que transcurre en un viaje a los Estados Unidos de América.

El día 28 de diciembre, sesenta frutos ( $n = 60$ ) de cada tratamiento y repetición fueron puestos dentro de cámara húmeda con el objetivo de estimular el crecimiento de los hongos presentes en el fruto. La cámara húmeda consistió en una bandeja de plástico conteniendo papel humedecido esterilizado y una malla plástica desinfectada sobre la cual se dejaron los frutos para finalmente tapar la bandeja (Figura 1). Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 10 días para luego ser evaluadas.



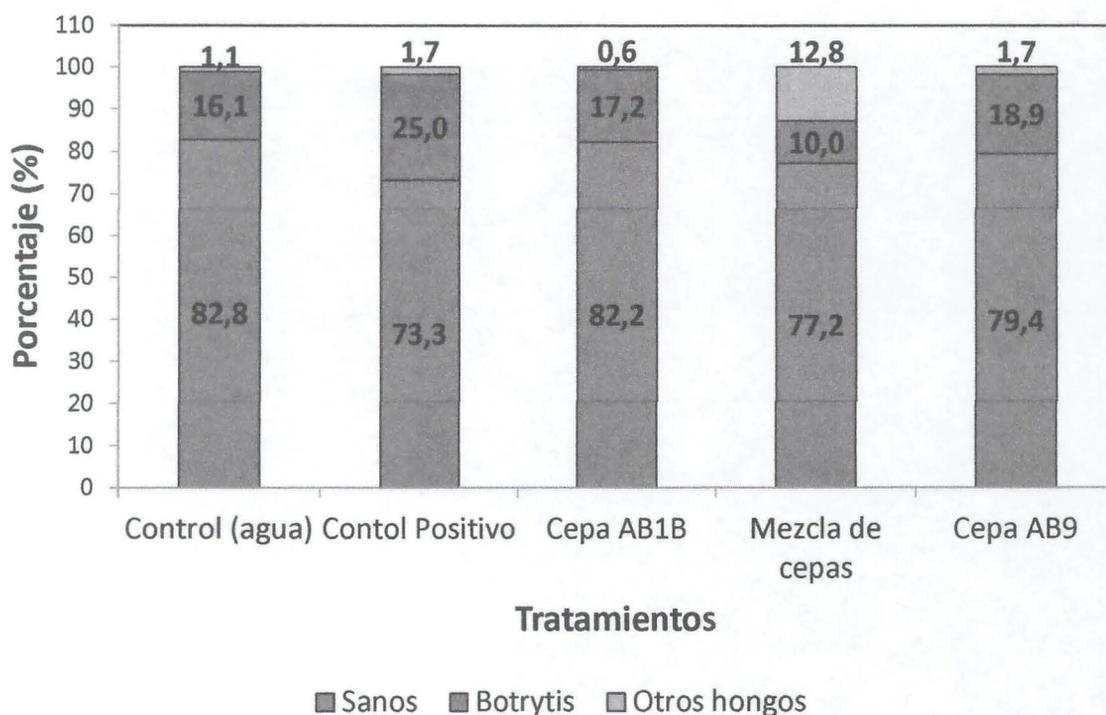
**Figura 1.** Bandejas preparadas como cámara húmeda para evaluar presencia de microorganismos en muestras de frutos de arándano.

La evaluación consistió en determinar la incidencia de hongos sobre las estructuras del fruto (número de frutos con alguna especie de hongo del total de frutos colectados). Las mediciones del porcentaje de incidencia de frutos sanos y las poblaciones de los distintos géneros de hongos identificados fueron sometidas a un análisis de varianza para ver diferencias entre tratamientos ( $\alpha=0,05$ ). Previamente a ellos los datos fueron transformados a la raíz del valor porcentual más 0,5 para cumplir con los supuestos del análisis de varianza. De encontrarse diferencias entre tratamientos, se realizó una comparación de medias mediante la prueba de diferencia mínima significativa LSD de Fisher ( $\alpha=0,05$ ), considerando un diseño completo al azar. Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa estadístico SAS, versión 8.

## **RESULTADOS**

La evaluación de frutos después de un almacenaje de poscosecha de 20 días en frío, no arrojó diferencias estadísticas entre tratamientos para los frutos sanos ( $P = 0,83$ ;  $CV = 7,42$ ) ni para aquellos infestados por *Botrytis cinerea* ( $P = 0,588$ ;  $CV = 31,5$ ). El daño por *B. cinerea* en los frutos alcanzó promedio para el experimento un 17,4% de los frutos y la presencia de este hongo fue similar para todos los tratamientos, a pesar de que el tratamiento consistente en la mezcla de cepas AB9-AB1B, tuvo 15 unidades porcentuales menos que el tratamiento Control positivo (agroquímico) (Figura 2). *Botrytis cinerea* se presentó en un rango de 3 a 24 frutos infectados de los 60 frutos colocados en cámara húmeda, lo cual supone un porcentaje elevado de daño por este importante agente fitopatógeno que causa la Pudrición gris en arándanos y que afecta brotes jóvenes, flores y frutos de arándano. De los tratamientos el menor número de frutos con daños se observó en el tratamiento mezcla de cepas ácido lácticas AB9-AB1B (12,8% de incidencia; Rango 3 -11 frutos), mientras la mayor incidencia se dio en el tratamiento Control positivo (25% de incidencia; Rango 5 - 24 frutos).

Algunos pocos frutos presentaron el desarrollo de hongos de los géneros *Alternaria* y *Penicillium*, lo cual no superó el 12,8% de los frutos evaluados, correspondiendo a tener entre 1 a 3 frutos con alguno de estos agentes fitopatógenos de poscosecha; siendo el tratamiento basado en la mezcla de las cepas AB9 y AB1B el que presentó el mayor valor, mientras el tratamiento AB1B, sólo alcanzó una incidencia del 0.6%. En promedio los frutos de experimento tuvieron una incidencia del 3,6% de otros géneros de hongos afectando los frutos.



**Figura 1.** Porcentaje de incidencia de frutos sano o infectadas por *Botrytis cinerea* u otros hongos de poscosecha en arándano tratados con biofungicidas a base de lactobacillus frente a la infección natural presente en el huerto de muestras entregadas el 07 de diciembre de 2018, y después de 20 días de almacenaje en frío a 0°C y 10 días de incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente.

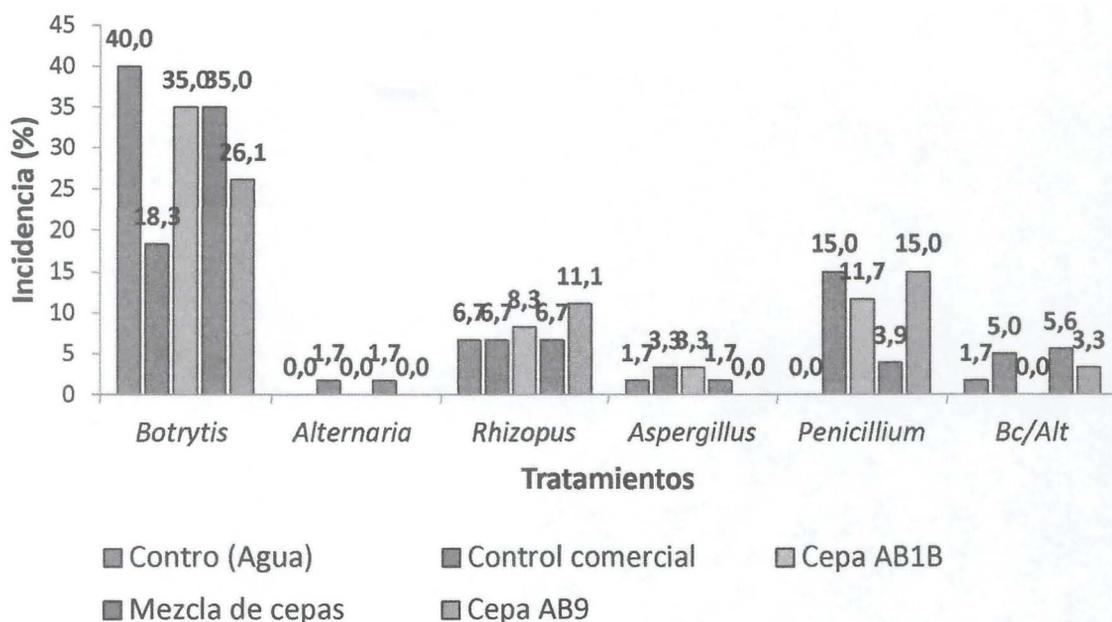
## EFFECTO CONTROL DE TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS SOBRE LA INCIDENCIA DE *Botrytis* EN FRUTILLAS

**Objetivo:** Evaluar el efecto control de bacterias lácticas sobre la incidencia natural de *Botrytis cinerea* sobre frutos de frutilla traídas de un huerto de en San Ignacio, Región de Ñuble.

### METODOLOGÍA

Un set de 15 a 20 frutillas maduras, que habían sido tratadas con los distintos tratamientos, Control absoluto (agua), Control positivo (fungicida basado en cobre), cepa AB1B, cepa AB9, mezcla de cepas AB1B y AB9, y que contaba con tres repeticiones fueron llevadas al Laboratorio de Fitopatología el día 21 de diciembre de 2018. Las frutillas fueron colocadas en cámara húmeda y evaluadas después de 7 días de incubación a temperatura ambiente para observar las especies de fitopatógenos que se pudieron desarrollar a partir del tejido.

El análisis mostró que no hubo diferencia entre los tratamientos para ninguno de los hongos identificados ( $p > 0,05$ ), y en promedio en el 53,7% de las frutillas se desarrolló un hongo fitopatógeno (Figura 2). Sin embargo en el caso de *B. cinerea*, el cual fue el hongo más recurrente observándose en el 30,9% de las frutillas del ensayo, hubo una tendencia del tratamiento Control positivo, en reducir la infección por este patógeno, reduciendo en promedio en 21,7 unidades porcentuales la infección con respecto que alcanzó la incidencia más lata que fue el tratamiento Control absoluto (agua), con 40% de los frutos con ataque de este hongo (Figura 2). Los tratamientos basados en las cepas lácticas AB1B, mezcla de cepas y cepa AB9, tuvieron entre 5 y 13,9 unidades porcentuales menos que el tratamiento control absoluto (agua). El segundo género de hongos de poscosecha con mayor frecuencia fue *Penicillium*, el cual se observó en el 9,1% de las muestras del experimento, siendo más recurrente en los tratamiento AB9, Control positivo y cepa AB1B. Le siguió en importancia hongos de la orden Zigomiceto del género *Rhizopus* que afectó al 7,9% de las muestras y fue más recurrente en el tratamiento basado en el cepa AB9. Los Deuteromycetos de los géneros *Alternaria* y *Aspergillus* fueron identificados, pero en promedio no superaron el 2% de los frutos de frutilla, y en el caso de *Alternaria* fue observado en infecciones conjuntas con *B. cinerea* (Bc/Alt) en el 3,1% de las muestras.



**Figura 2.** Frecuencia de frutillas infectadas por *Botrytis cinerea* u otros hongos de poscosecha en frutillas tratados con biofungicidas a base de *Lactobacillus* frente a la infección natural presente en el huerto de muestras entregadas el 21 de diciembre de 2018, y después de 7 días de incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente.

## CONCLUSIONES

- No se observaron diferencias entre tratamientos en el control de la incidencia de *Botrytis cinerea* y de otros hongos fitopatógenos de poscosecha en frutilla.

## ANEXO 20.

### PROTECCIÓN DE LOS RESULTADOS. ENVÍO DE MICROORGANISMOS SELECCIONADOS A CEPARIO INTERNACIONAL DSMZ CON FINES DE PATENTAMIENTO.

Como requisito prioritario en el proceso de redacción de la patente de invención comprometida en este proyecto, se hizo depósito de los microorganismos *Lactobacillus kunkeei* AB1BUSS (DSM32669) y *Pediococcus acidilactici* AB9USS (DSM32954) en el cepario internacional DSMZ de Alemania. Las bacterias fueron depositadas en la modalidad “Depósito con fines de patentamiento”, de acuerdo al Tratado de Budapest (figuras 1 y 2).

De forma conjunta, la Oficina de Transferencia y Licenciamiento (OTL) y el Departamento de patentes del Estudio de Abogados Silva, efectuaron la búsqueda en bases de datos de invenciones relacionadas a la formulación resultante de nuestra investigación. De esta forma se logró la redacción completa del escrito de la patente, la cual fue enviada electrónicamente al INAPI para su evaluación el día 27 de marzo del 2019 (figura 3).

Leibniz-Institut  
DSMZ-Deutsche Sammlung von  
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



Leibniz-Institut DSMZ GmbH · Inhoffenstr. 7 B · 38124 Braunschweig  
Universidad San Sebastian  
Mr. Jaime Cofré

Inhoffenstr. 7 B  
38124 Braunschweig  
GERMANY

Tel.: +49(0)531 26 16-0  
Fax: +49(0)531 26 16-118  
E-mail: [export@dsMZ.de](mailto:export@dsMZ.de)  
Internet: [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)

Mr. Zeichen/Number

Order Zeichen/Order

+49 (0)531-2616-

Status/Date

P 01816

254  
[vav@dsMZ.de](mailto:vav@dsMZ.de)

2018-01-31

**Deposit of microorganisms according to the Budapest Treaty**

Dear Sir or Madam,

enclosed please find our Statements of Receipt and Viability for the strain

***Lactobacillus kunkeei* AB1BUSS - DSM 32669**

Sincerely yours,

Dr. Vera Bussas

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung  
von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

*Further notes: After preservation of the strain samples will be sent for identity checking.*

P.S.: Please guard against loss of the cultures at your institution to be prepared to submit replacement cultures to the DSMZ if necessary.

Geschäftsführer/  
Managing Director:  
Prof. Dr. Jörg Overmann  
Aufsichtsratsvorsitzender/Head of  
Managing Board: HD Dr. David Schwabers

Braunschweigische Landesoperen  
(NORD/LE) AG-Nr./Account: 2 039 220  
BLZ/Bank Code: 310 500 00  
IBAN DE22 2505 0000 0000 0392 00  
Kont. T (BIC) MO: AOL 211

Landesregister/  
Commercial Register:  
Amtsgericht Braunschweig  
HRG 2570  
Steuer-Nr. 13/20024030



**Figura 1.** Certificado de incorporación cepario internacional DSMZ cepa *Lactobacillus kunkeei* AB1BUSS DSM32669.

Leibniz-Institut  
DSMZ-Deutsche Sammlung von  
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Leibniz Institut DSMZ GmbH · Imhoffstraße 7b · 38124 Braunschweig

Universidad San Sebastian  
Mr. Jaime Cofré



Imhoffstraße 7 B  
38124 Braunschweig  
GERMANY

Tel: +49(0)531 26 15-0  
Fax: +49(0)531 26 15-418  
E-mail: [contact@dsmz.de](mailto:contact@dsmz.de)  
Internet: [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)



Ihre Zeichnung/Your ref:

Unser Zeichen/Our ref:

+49 (0)531-2615-

Datum/Date:

P 30318

254  
[vew@dsmz.de](mailto:vew@dsmz.de)

2018-11-20

***Deposit of microorganisms according to the Budapest Treaty***

Dear Sir or Madam,

enclosed please find our Statements of Receipt and Viability for the strains

***Pediococcus acidilactici* AB9USS**

**DSM 32954**

Sincerely yours,

Dr. Vera Bussas

Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung  
von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

*Further notes: After preservation of the strains samples will be sent to your attention for identity checking.*

P. S.: Please guard against loss of the cultures at your institution to be prepared to submit replacement cultures to the DSMZ if necessary.

First Address/Übersetzung/Directress:  
Prof. Dr. Jürg Untermann; Bettino Fischer  
Aufsichtsratsvorsitzender/Head of  
Management Board: NH Dr. David Schindler

Eintragungsjahr/Incorporation Year:  
[EINTRA] 28.05.2012/Account: 2.030.230  
BIC/Bank Code: 25120000  
IBAN DE 24 2502 0002 0002 0002 00  
SWIFT (BIC): 25120000

Handlungsleiter/  
Centralised Register:  
Eintragungsjahr/Incorporation Year: 1988/25.10  
Steuer-Nr./Tax No.: 13/200/04030



**Figura 2.** Certificado de incorporación cepario internacional DSMZ cepa *Lactobacillus acidilactici* AB9USS DSM32954.



## Acuse de recibo de la presentación electrónica

La Oficina receptora (RO/CL) acusa recibo de una solicitud internacional PCT presentada mediante ePCT-Filing. Se han asignado automáticamente un número de solicitud y una fecha de recepción ( Instrucciones administrativas, Parte 7).

Número de envío:	050023	
Número de solicitud:	PCT/CL2019/050023	
Fecha de recepción:	27 marzo 2019	
Oficina receptora:	Instituto Nacional de Propiedad Industrial (INAPI) (Chile)	
Su referencia:	P01827	
Solicitante:	UNIVERSIDAD SAN SEBASTIÁN	
Número de solicitantes:	1	
Título:	BIOESTIMULANTE Y BIOPROTECTOR, PROCESO DE FABRICACIÓN Y SUS USOS EN AGRICULTURA	
Documentos enviados:		
	P01827-appb-000001.pdf (Memoria.pdf)	522653
	P01827-appb-000002.pdf (reivindicaciones.pdf)	900342
	P01827-appb-000003.pdf (resumen.pdf)	900198
	P01827-appb-000004.pdf (figuras.pdf)	900979
	P01827-appb.xml	863
	P01827-decl.xml	5153
	P01827-fees.xml	1994
	P01827-poa-000001.pdf (poder.pdf)	486828
	P01827-requ.xml	9294
	P01827-vlog.xml	1969
Enviada/o por:	ESTUDIO SILVA DEPARTAMENTO DE PATENTES (Identificador de cliente:	
Sello de tiempo de recepción:	27 marzo 2019 19:29 UTC-3 (CLST)	
Compendio oficial de envío:	98:8D:A4:A8:8A:F1:51:41:2D:B9:08:3E:B2:5A:9B:8E:81:BE:E3:5C	

/RO/CL/

**Figura 3.** Comprobante de presentación electrónica de patente titulada: "Bioestimulante y Bioprotector, Proceso de fabricación y sus usos en agricultura" asociada al proyecto.

**ANEXO 21. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.**

**Efecto del empleo de un preparado a base de bacterias ácido lácticas sobre la polinización del arándano por *Apis mellifera***

**Maria José Parra**, Constanza Quiroz, Jaime Cofre, María Jose Aguayo and Erica Castro.  
Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián. Lientur 1457, Concepción,  
Chile.

Dirigir Correspondencia: Maria Jose Parra

## Abstract

**Maria José Parra, Constanza Quiroz, Jaime Cofre, María Jose Aguayo and Erica Castro.**

Effect of the use of a preparation based on lactic acid bacteria on blueberry pollination by

*Apis mellifera*

The blueberry (*Vaccinium corymbosum*) has become an economically important fruit crop in Chile, especially in the last decade. This berry is produced by a shrub that requires insects for pollination. In crops, most pollination is carried out by the common bee (*Apis mellifera*). However, the unsynchronized weather, and pollution due to phytosanitary products have negatively affected these beneficial insects. Moreover, the flowers of the blueberry are not very attractive to bees. Thus, elements and practices that result in an increase in floral attractiveness can be useful tools to increase fruit yield. The goal of this study is to evaluate the effect of a solution based on lactic acid bacteria on blueberry pollination by common bees. The application of the solution significantly increased bee visits to flowers, more so than a commercial product commonly used in blueberry for this end. The increased visits could be related to the fact that the bacteria used in the solution were isolated from the intestinal tract of common bees. These bacteria allow bees to process pollen into edible food for the larvae in the hive. The exogenous application of these bacteria may initiate this process in the pollen located at the anthers in the flowers, besides increasing the bacterial load of beneficial microorganisms in the pollen that is taken to the hive.

Keywords: Lactic acid, pollen, reward.

## Resumen.

El arándano (*Vaccinium corymbosum*) se ha convertido en un cultivo de fruta económicamente muy importante para Chile durante los últimos diez años. El arándano es un arbusto frutal que requiere polinización entomófila, el uso de abejas (*Apis mellifera*) se estima es la responsable de gran parte de la polinización de los cultivos, lamentablemente el clima desincronizado, las contaminaciones por productos fitosanitarios han afectado significativamente a estos insectos benéficos. Por otra parte, es importante destacar que la floración del arándano no es altamente atractiva para las abejas, de esta manera resulta importante considerar elementos que las vuelvan atrayentes para estos organismos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un preparado a base de bacterias ácido lácticas sobre la polinización de arándanos por *Apis mellifera*. La aplicación foliar del preparado generó un aumento significativo en el número de visitas de abeja a flores de arándano, por sobre el producto comercial habitualmente utilizado en estos predios. Una de las posibles explicaciones para esta preferencia podría deberse a que las bacterias utilizadas en los tratamientos provienen de aislados del tracto intestinal de *A. mellifera*, bacterias ácido lácticas que permiten el procesamiento del polen en la colmena para su transformación en alimento de larvas, por tanto, la aplicación de estas bacterias de manera exógena podría estar iniciando este procesamiento desde el polen en la flor, además de aumentar la carga bacteriana benéfica de la recompensa que se lleva al panal.

Palabras claves: Polén, ácido láctico, recompensa.

### Introducción.

El arándano (*Vaccinium corymbosum*) se ha convertido en un cultivo de fruta económicamente muy importante para Chile, ya que la industria de arándanos ha crecido de manera notable durante los últimos diez años, con más de un centenar de empresas elaboradas y exportadoras, cuya rentabilidad le ha conferido liderazgo y posicionamiento internacional. Dentro de los berries, el arándano es el fruto de mayor impacto económico, situándonos como el principal proveedor del Hemisferio Sur con 81% de la oferta. Durante 2013/14 se exportó 71 mil toneladas y la superficie cultivada de arándanos ha aumentado constantemente, llegando alrededor de 15.320 hectáreas plantadas al 2013. Su producción se concentra en las regiones del Maule y Bio-Bío, con cerca de 57% de la superficie nacional (8.746Ha).

El arándano es un arbusto frutal que requiere polinización entomófila, el uso de abejas (*Apis mellifera*) se estima es la responsable de gran parte de la polinización de los cultivos entomófilos. Lamentablemente el clima desincronizado, la contaminación por el abuso y manejo inadecuados de los productos fitosanitarios han afectado significativamente a estos insectos benéficos (Undurraga, P. & S. Vargas, 2013). *Apis mellifera*, requiere de ciertos compuestos nutricionales, obtenidos del polen necesarios para su funcionamiento vital y para la fabricación y secreción de otros productos, siendo asimilados únicamente después de una serie de procesos bioquímicos sucedidos en el interior de una célula; producto de una fermentación ácido láctica desarrollada por bacterias y por levaduras. Este tipo de producto contiene aproximadamente seis veces más la cantidad de ácido láctico comparado con el polen fresco, ventaja que le provee mayor preservación y conservación de los nutrientes que se encuentran disponibles (Gilliam, 1980). Estas cargas son llevadas por las abejas a la colmena, donde las almacenan y maduran, para producir el pan de abejas, alimento esencial para el desarrollo y sostenimiento de sus colonias, especialmente para las crías (Keller et al., 2005). El polen no es consumido directamente por las abejas, la producción del alimento

está ligado al almacenamiento de los granos por la abeja en la celda, la obrera que regresa del campo los deposita en el alvéolo, al momento otra abeja los incorpora dentro de la masa, y el conjunto es pulido con las mandíbulas y la lengua (García *et al.* 2016). *Apis mellifera* ha hecho uso de los procesos de fermentación para la obtención de su alimento preservándolo por más tiempo haciéndolo biodisponible. La presencia en el estómago de BAL y de sustancias antimicrobianas en el pan de abejas también sugiere una posible función en la defensa contra las enfermedades de la abeja de la miel, ya que el pan de abejas es consumido por adultos y larvas de abejas (Vásquez & Olofsson, 2009).

Es importante destacar que la floración del arándano no es altamente atractiva para las abejas, por ende, existe competencia con la flora externa al predio (Undurraga, P. & S. Vargas, 2013), de esta manera resulta importante considerar elementos que las vuelvan atractivos para estos organismos. Por tanto, considerando la relación entre el ácido láctico y la recompensa que obtienen las abejas, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un preparado a base de bacterias ácido lácticas sobre la polinización de arándanos por *Apis mellifera*.

## **Materiales y Métodos.**

*Sitio de estudio:* Huerto Los Nogales en la localidad de San Ignacio, Ñuble, Chile. En este predio se utilizaron 3 hileras de arándanos separadas de 2 metros entre sí, cada hilera tenía dispuestos aleatoriamente los tratamientos con 10 plantas cada uno.

*Tratamientos:* T1 control agua; T2 Formulación cepa AB9USS en una concentración de 105 -106 UFC/ml.; T3 Formulación cepa AB1BUSS en una concentración de 105 -106 UFC/ml.; T4 Formulación cepa AB9USS más AB1BUSS en una concentración de 105 -106 UFC/ml; T5 Químico comercial.

La cepa AB1B corresponde a *Lactobacillus kunkeii*, y la cepa AB9 fue identificada como *Pediococcus acidilactici*.

Estos tratamientos fueron aplicados por aspersión al follaje y flores de las plantas.

*Actividad de polinizadores:* Las observaciones de polinizadores (*Apis mellifera*) en cada tratamiento fueron efectuadas siguiendo el procedimiento adaptado del descrito en Utelli & Roy (2000). Este consistió en 6 períodos diarios de 20 minutos de observación, efectuados simultáneamente por 5 observadores en tratamientos distintos (5). Este procedimiento se repitió durante tres días, de manera que en cada tratamiento se completó un total de 18 periodos de observación de 20 min cada uno.

*Análisis estadísticos:* La comparación entre los distintos tratamientos se realizó a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En caso de encontrar diferencias significativas, se aplicaron pruebas de Mann-Whitney para realizar comparaciones pareadas entre los tratamientos. Todos lo análisis fueron realizados con el programa IBM SPSS Statistics 19.

## Resultados y Discusión.

De las observaciones realizadas en campo se pueden apreciar que, en el segundo día de medición, existe un efecto significativo del tratamiento sobre el número de visitas de abejas ( $\chi^2 = 14,162$ ;  $v-p=0,015$ ). El número de visitas de abejas es significativamente mayor en el tratamiento de AB9USS que en los tratamientos AB1BUSS ( $Z= -2,918$ ;  $v-p = 0,004$ ), agua ( $Z= -2,686$ ;  $v-p=0,007$ ), AB1BUSS más AB9USS ( $Z= -2,657$ ;  $v-p=0,008$ ), y que el químico comercial ( $Z= -2,108$ ;  $v-p=0,035$ ) (Fig. 1). En la tercera medición, se observa un efecto significativo del tratamiento sobre el número de visitas de abejas ( $\chi^2 = 17,986$ ;  $v-p=0,003$ ). El número de visitas de abejas en el tratamiento AB9USS es significativamente mayor que en los tratamientos agua ( $Z= -2,685$ ;  $v-p=0,007$ ), AB1BUSS más AB9USS ( $Z= -2,195$ ;  $v-p=0,028$ ), y químico comercial ( $Z= -2,916$ ;  $v-p=0,002$ ). Por otra parte, el número de visitas de abejas en el tratamiento AB1BUSS es significativamente mayor que en los tratamientos agua ( $Z= -2,626$ ;  $v-p=0,009$ ) y químico comercial ( $Z= -2,830$ ;  $v-p=0,005$ ) (Fig. 3).

Este efecto positivo de la presencia de cepas ácido lácticas en el aumento de visitas de abejas podría estar relacionado directamente con el ácido láctico o lactato, principal producto de fermentación de estas cepas. La cepa AB1BUSS exhibió una producción de 12,52 mg/ml; en la cepa AB9USS se cuantificó un máximo de 15,02 mg/ml ambas medidas a las 16 horas de cultivo de fermentación en medio MRS (datos sin publicar).

Una posible importancia del ácido láctico en la manipulación del polen posterior a la visita a la flor, es que para la alimentación de sus crías y antes de convertirlo en alimento larval, *A. mellifera* se ve obligada a tratar el polen antes de consumirlo para eliminar compuestos nocivos y debido al almacenaje que realizan en las celdas de la colmena, es muy probable que estos compuestos se degraden por acción de microorganismos, ya sean ambientales, transportados con el polen recolectado o provenientes del tracto intestinal de la abeja, ya que el alimento suministrado a las larvas es una mezcla de polen, miel y secreciones del buche de las abejas nodrizas (García et al. 2006). En esta misma línea las bacterias

utilizadas en los tratamientos provienen de aislados del tracto intestinal de *A. mellifera*, por tanto, podría estar iniciando este procesamiento desde el polen en la flor, además de aumentar la carga bacteriana benéfica de la recompensa que se lleva al panal. La cantidad de ácido láctico generado en la colmena (aproximadamente seis veces mayor que en el polen), provee funciones de conservación y preservación del producto, por mucho tiempo, además conserva los nutrientes provenientes del polen, siendo más digerible y apetecido por las abejas adultas para la fabricación y secreción de otros productos (Araneda et al. 2014).

De esta manera se propone una relación positiva entre la aplicación del preparado a base de bacterias ácido lácticas AB9USS y AB1BUSS y el aumento de las visitas efectivas de abejas a los cultivos de arándanos. No existe evidencia directa del efecto de del ácido láctico en el aumento la visita, por lo que esta sería su primer reporte.

## REFERENCIAS

- Araneda, X.; Velásquez, Carmen, Morales, Daniza, & Martínez, Isabel. 2014. Producción de pan de abejas (*Apis mellifera* L.) bajo condiciones de laboratorio. *Idesia (Arica)*, 32(4), 63-69.
- García, D; Rojas, M; Sánchez, J. 2006. Contenido Microbiológico Cultivable del Tracto Intestinal y Polen Almacenado de *Apis mellifera* (Himenoptera: Apidae). *Acta Biológica Colombiana* 11(1):123-129.
- Gilliam, M. 1980. Biochemistry and Microbiology of Pollen Collected by Honey Bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *prunus dulcis*. II protein, amino acids and enzymes. *Apidologie*.11(2): 163-171.
- Keller, I., Fluri, P., & Imdorf, A. 2005. Pollen nutrition and colony development in honey bees: part I. *Bee World*, 86 (1), 3-10.
- Undurraga, P., y Vargas, S. (eds.) 2013. Manual del arándano. Boletín INIA N° 263. 120 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.
- Utelli AB & BA Roy. 2000. Pollinator abundance and behaviour on *Aconitum lycoctonum* (Ranunculaceae): an analysis of the quantity and quality components of pollination. *Oikos* 89: 461- 470.
- Vásquez, A. & T. Olofsson. 2009. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread, *Journal of Apicultural Research*, 48:3, 189-195.

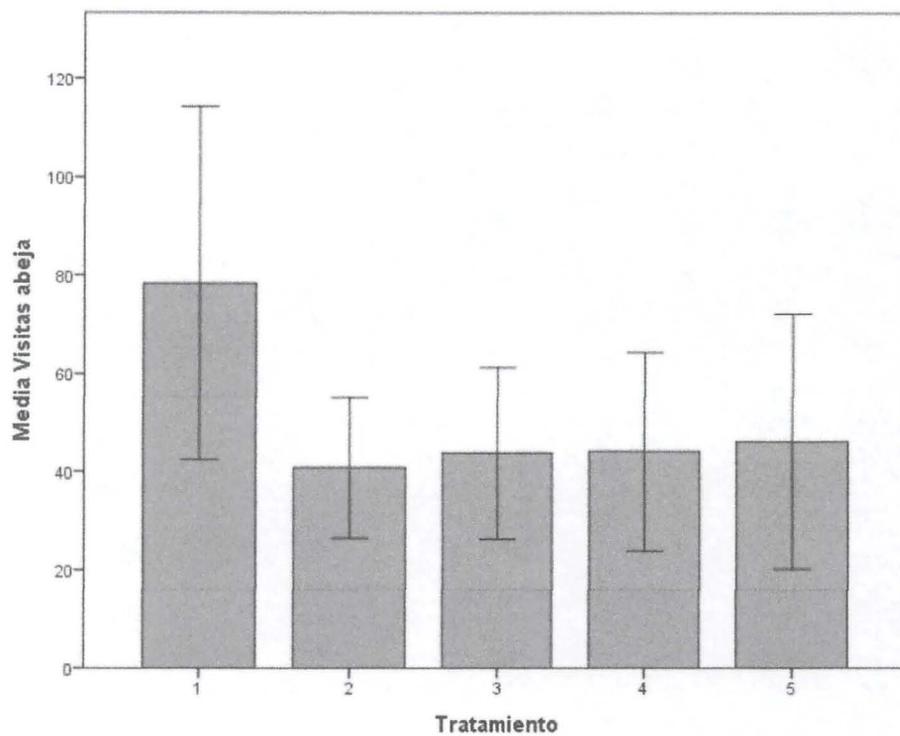


Fig. 1- Cantidad de visitas de abejas (media  $\pm$  1 DE) en los distintos tratamientos, durante la segunda medición. T1: AB9USS >106 UFC/ml; T2: AB1BUSS >106 UFC/ml; T3: Agua; T4: AB1BUSS más AB9USS >106 UFC/ml; T5: Químico comercial (fungicida).

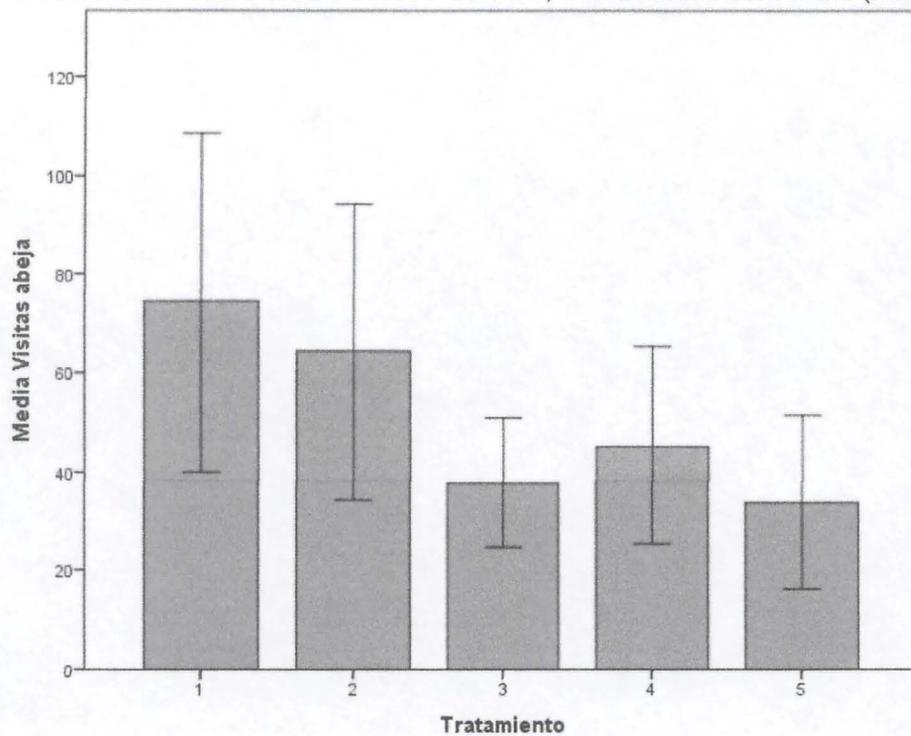


Fig. 2- Cantidad de visitas de abejorros (media  $\pm$  1 DE) en los distintos tratamientos, durante la segunda medición. T1: AB9USS >106 UFC/ml; T2: AB1BUSS >106 UFC/ml; T3: Agua; T4: AB1BUSS más AB9USS >106 UFC/ml; T5: Químico comercial (fungicida).

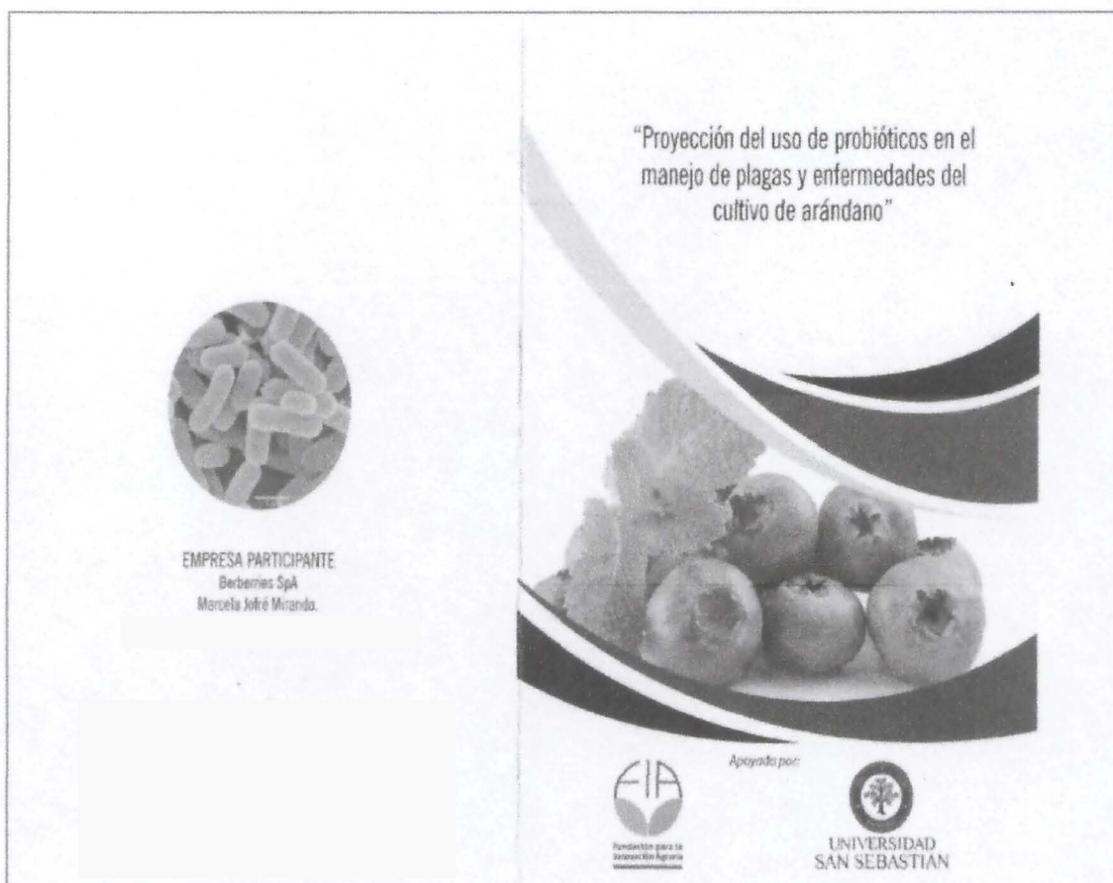
## ANEXO 22.

### EVENTOS EN TERRENO. DÍAS DE CAMPO.

#### DÍA DE CAMPO 1. YUMBEL. 28 DICIEMBRE 2016

Se efectuó una actividad de difusión en la modalidad "Día de Campo" en la localidad de Yumbel. En la ocasión, la Directora de Proyecto, Dra. Erica Castro Inostroza, presentó ante los asistentes la charla titulada: "Proyección del uso de probióticos en el manejo de plagas y enfermedades en el cultivo del arándano". El evento contó con la presencia de 18 asistentes del rubro agrícola, Gobierno Regional, y profesionales ligados al quehacer de la investigación universitaria. La ocasión principalmente logró introducir antecedentes del empleo de *microorganismos benéficos en el rubro agrícola*, dio a conocer avances en los objetivos planteados en el Plan operativo, se compartieron interesantes ideas y sugerencias que fueron recogidas por los profesionales ejecutantes del proyecto.

A continuación se muestra algo del material impreso y visual empleado en la presentación (figuras 1-3), así como la nómina de asistentes (tabla 1).



**Figura 1.** Portada díptico entregado a los asistentes en el día de campo efectuado en Yumbel.



## PROYECTO FIA PYT-2016-0066



Día de Campo “Proyección del uso de probióticos en el manejo de plagas y enfermedades del cultivo de arándano”.

**Yumbel, diciembre 28 de 2016.**

**Figura 2.** Portada presentación coordinadora principal del proyecto en Día de Campo 1 efectuado en Yumbel.

**Tabla 1.** Lista de asistentes al Día de Campo 1 efectuado en Yumbel.

Día de Campo - PYT-2016-0066 - 28 de Diciembre de 2016

N°	Nombre	Institución	Correo electrónico
1	Alberto Luna U	UPEL	
2	Guillermo Rivas U	FLORENTIN CHAZA UPEL	
3	José Luis	Ortiz	
4	Alfonso Flores	Universidad San Carlos	
5	Rodrigo González	SRM Agricultura	
6	María Muñoz P	USS	
7	Marcos Jaime M.	BERBERONES SPA	
8	José Luis Daroch N	USS	
9	Alexandra Rojas G	USS	
10	Olivero Obispo A	USS	
11	Ronald Cejudo Alarcón	Berberones SpA	
12	Heber Cuchumayo		
13	Samuel Roberto	USS	
14	Margarita Aguayo Amador	USS	
15	La Talla Mollado Loren	USS	
16	Cristina Aguayo	USS	
17	ERNESTO MOYA ELIZONDO	UDEL - CHILLAN	
18	Juan San Martín	Agronomo Udel	
19			
20			



**Figura 3.** Registro fotográfico de la actividad de Día de Campo 1 efectuado en Yumbel.

**Día de campo 2. San Ignacio. 29 Agosto 2018.**

El día de campo 2, se efectuó en la localidad de San Ignacio, Región de Ñuble, este seminario en terreno contó con la participación de 45 personas, principalmente ligadas al fomento, producción agrícola e investigación universitaria. Destacando la participación de una delegación de Prodesal, productores locales de berries y comunidad de la zona.

A continuación se muestra algo del material impreso y visual empleado en la presentación (figuras 4-6), así como la nómina de asistentes (tabla 2).



**Figura 4.** Díptico elaborado y presentado en el segundo día de campo 2, San Ignacio. En éste se muestra una proyección del uso de próbioticos en el manejo del cultivo de arándano.



CHILE LO  
HACEMOS  
TODOS



**PROYECTO FIA PYT-2016-0066**



Día de Campo  
"Proyección del uso de probióticos en el  
manejo del cultivo de arándano"

**San Ignacio, agosto 29 de 2018.**

**Figura 5.** Portada presentación coordinadora principal del proyecto en Día de Campo 2 efectuado en San Ignacio.

**Tabla 2.**

LISTA DE ASISTENCIA A SEGUNDO DIA DE CAMPO REALIZADO EL DIA 29 DE AGOSTO DE 2018

ASISTENCIA SEGUNDO DIA DE CAMPO 29 DE AGOSTO DE 2018  
 PROYECTO PYT-2016-0066

N°	NOMBRE	INSTITUCION	CONTACTO
1	Geiel Baeza Baeza	Prodesal	
2	Pedro Reyes U.	Prodesal	
3	Maria Lora Oss.	Prodesal	
4	Ricardo Rosa Aedo.	Prodesal	
5	Maria Angélica Riquelme M	Prodesal	
6	maria Tonce	prodesal	
7	Eva Maria Obregon	Universidad	
8	Karina Oyarce Merino	USS	
9	Eneida Orias Lopez	Prodesal	
10	Victoria Baeza M	Prodesal	
11	Maria Angélica González Sotomayor	Comercial Inkote	
12	José Ben Avilán	Agricultor	
13	Maria Angélica Rodríguez Canales	Líder Benin	
14	David Rodríguez Tora	Agricultor	
15	Franisco Gary Morales	Prodesal San Isidro	
16	José Zumbado P	U. de Concepción	
17	Yessica Vega Orrego	U. de Concepción	
18	Estela Torales	agropecuaria	
19	Alexandra Rojas Gilvez	U. de Concepción	
20	José Luis Daroch N.	U. de Concepción	

ASISTENCIA SEGUNDO DIA DE CAMPO 29 DE AGOSTO DE 2018

PROYECTO PYT-2016-0066

N°	NOMBRE	INSTITUCION	CONTACTO
21	Elizabeth Monsalvez Macaya	USS	
22	Diana Veraza Ravelne	USS	
23	Cristina Ortiz	PRODESAL S.I.	
24	Jennifer Cruzota Houerque	EMPRESA ETICOVAL	
25	Aurora Cardenas M.		
26	Gonzalo Rueda	FIA	
27	Fernando Gonzalez R.	AGRICULTORA 1950	
28	Maria José Aquayo Amuña	USS	
29	Saimi Lora R.	USS	
30	Carlos Catedral Ariza	USS	
31	Maria José Poma Morán	USS	
32	Josefina Salgado Paris	USS	
33	Ana Maria Ojeda	USS	
34	Karina Oyarce Medina	USS	
35	Alejandra Piedra M	USS	
36	DANAE MUÑOZ PENA	BERBERRIES	
37	MARCELA JOFRE M.	BERBERRIES	
38	ERICA CASTRO I	USS	
39	Pa. Zaida Alvar	USS	
40	Pablo Traverso Pedraza	Prodesal	
41	Diego González P.	PRODESAL	
42	Felipe Muñoz Zapata	PRODESAL	
43	Juan Pablo Roman S.	Prodesal	
44	Aracely Salgado Gokorece	Prodesal	
45	Joaquín M. H. de Linares	USS	

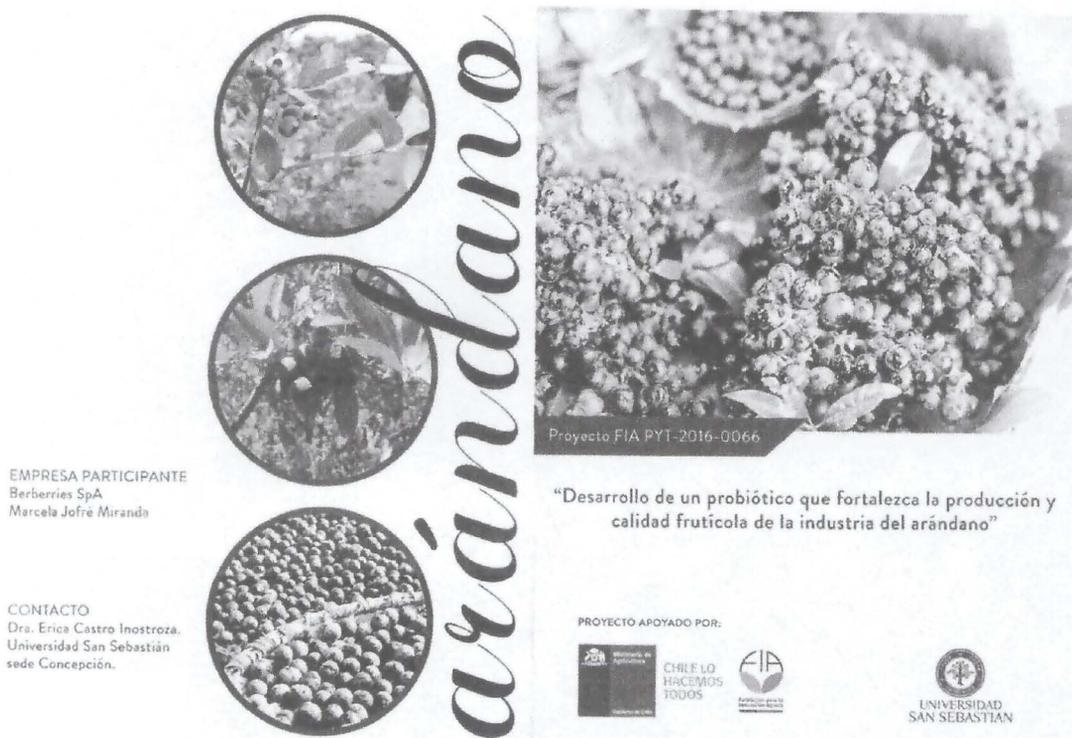


**Figura 6.** Fotografía, visita a Huerto Los Nogales, en el marco del día de Campo 2 efectuado en San Ignacio.

### **Seminario de Cierre. Contulmo. 28 marzo 2019.**

El Seminario de cierre de proyecto, se efectuó en la localidad de Contulmo, Región del Biobío, este seminario en terreno contó con la participación de 36 personas, principalmente ligadas al fomento, producción agrícola e investigación universitaria. Destacando la participación de una delegación de Prodesal, INIA, INDAP, SAG, productores locales de berries, académicos y comunidad de la zona.

A continuación se muestra algo del material impreso y visual empleado en la presentación (figuras 7 y 8), la nómina de asistentes (tabla 3), así como fotografías de los expositores y evento en general (figuras 9-13)



**Figura 7.** Díptico elaborado y presentado en el seminario de cierre, Contulmo. En éste se muestra nuestros resultados y una proyección del uso de probióticos en el manejo del cultivo de arándano.

Universidad de Concepción

Facultad de Agronomía

CAMPUS CHILLÁN - CAMPUS CONCEPCIÓN

www.agronomiaudec.cl

**Alternativas ecológicas para el control de enfermedades en arándano**

**Ernesto A. Moya Elizondo**

Profesor asociado, Universidad de Concepción  
Ph.D., Montana State University  
Magíster Ciencias Vegetales, P. Universidad Católica de Chile  
Ingeniero Agrónomo, P. Universidad Católica de Chile

Charla USS  
Contulmo, 28 marzo 2019

**Figura 8.** Presentación Fitopatólogo, Asesor del proyecto, en seminario de cierre realizado en Contulmo.

**Tabla 3.** Lista de asistencia a Seminario de Cierre realizado el 28 de marzo de 2019.

LISTA ASISTENCIA SEMINARIO DE CIERRE PROYECTO FIA PYT 2016-0066

28 DE MARZO DE 2019

N°	NOMBRE	INSTITUCIÓN	CONTACTO
1	María Soledad Torres	INIA	
2	Abigail Chávez Opazo	INIA	
3	Luis Pineda Beniquez	Arandano	
4	Carolina Beniquez N	Fruittilla	
5	Olga Luqueño Ramos	Fruittilla	
6	Tatle Ramos	frutícola y ortícola	
7	NELSON MARIN C	frutícola ortícola	
8	MIRIAM GONZALES	FRUTICOLA ORTICOLA	
9	Miguel Ángel Meza	Agricultura, ganadería	
10	Fredy Benítez	Agricultura Mafel	
11	Diego Sobro Susperregui	USS	
12	RAFAEL LEÓN	SAG	
13	Solange López Landaeche	SAG	
14	Gonzalo Frede	FIA	
1	Juan Altamirano	Municipalidad	
2	Jorge Luis Salgado	USS	
3	María José Aguiar	USS	
4	Costa Viter	Udec	
5	Erica Castro Justoza	USS	
6	Ernesto Moya	Udec	
7	Juan Pablo Mellado Leiva	USS	
8			
9			

1	MARCELA TORRE	BERBERRIES	
2	Franklin A. Licenaro Ruiz	Unep.	
3	Veriana Sepúlveda	Sergio Sepúlveda V.	
4	Andrea Urbane F	U.S.S.	
5	Alexandra Rozas Galvez	UDEC	
6	Yuxia Arde Carrasco	Munip de Centulaco	
7	GABRIEL DURAN SAEZ	Municipalidad de Casapuma	
8	Rodrigo Pedraza Garcia	Prodesd T. Mado	
9	RODRIGO BORQUET	UDEC	
10	Cestian Villar Mejias	UNEC	
11	Valentina Logan	USS	
12	Mami Jobi Pamy	USS	
13	Catalina Casanova C	Municipalidad de Casapuma	
14	Pedro Guzman P.	Municipalidad de Casapuma	



**Figura 9.** Presentación de Marcela Jofré Miranda, CEO de Berberries SpA, empresa asociada al proyecto.



**Figura 10.** Fotografía de los participantes del seminario de cierre.



**Figura 11.** Presentación de Erica Castro Inostroza, Docente de la USS y directora de proyecto.



**Figura 12.** Productor local contando su experiencia en la utilización del biocontrolador.



**Figura 13.** Presentación de Ernesto Moya Elizondo, fitopatólogo, docente de UdeC y asesor de proyecto.

## ANEXO 22.

### ACTIVIDADES DE CAPACITACIÓN.

#### Capacitación 1. Universidad San Sebastián.

Se adjunta lista de asistencia de los participantes de la capacitación realizada por el Dr. Ernesto Moya Elizondo, fitopatólogo y docente de la Universidad de Concepción de Chillán (tabla 1-3).

Se realizó una nota periodística de ésta actividad, que fue publicada en la página web de la Universidad San Sebastián (figura 1), se incluye portada de la presentación efectuada (figura 2).

Admisión

Matrícula Anticipada Admisión 2017

Carreras

## USS realiza curso sobre enfermedades del arándano apoyado por FIA

03 de enero de 2017

Se trata de favorecer a un núcleo formado por investigadores, estudiantes y empresarios, a través de un proyecto que la Universidad San Sebastián ejecuta desde marzo de este año.



**Figura 1.** Nota periodística realizada y publicada por Universidad San Sebastián en capacitación dirigida por el Dr. Ernesto Moya.

Departamento de Producción Vegetal  
Facultad de Agronomía – Universidad de Concepción

---



## **Enfermedades del arándano en Chile**

**Ernesto A. Moya Elizondo**  
Profesor Asistente – Universidad de Concepción

Ph.D., Montana State University  
Magister Ciencias Vegetales, P. Universidad Católica de Chile  
Ingeniero Agrónomo, P. Universidad Católica de Chile

22 de diciembre de 2016

**Figura 2.** Portada presentación Profesor Ernesto Moya en capacitación 1.

**Tabla 1.** Listado de asistentes a la capacitación efectuada el 21 de Diciembre 2016. Jornada mañana.

**"MODELAMIENTO DE ENSAYOS PARA EVALUACIÓN DE VARIABLES  
FITOSANITARIAS EN EL CULTIVO DE LOS ARÁNDANOS"**

LISTA ASISTENCIA DIA 21 DE DICIEMBRE JORNADA A.M.

N°	NOMBRE	E-MAIL	FIRMA
1	Kissi Rubio Huendelcán		
2	Ronald Gajardo Alarcón		
3	MARCELA SOPHO		
4	Jaime Cabe R.		
5	Maria José Aguayo A.		
6	Juan Pablo Mallea L.		
7	Vojtech A. Solomst A.		
8	Rodrigo Cáceres C.		
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

**Tabla 2.** Listado de asistentes a la capacitación efectuada el 21 de Diciembre 2016. Jornada tarde.

**"MODELAMIENTO DE ENSAYOS PARA EVALUACIÓN DE VARIABLES  
FITOSANITARIAS EN EL CULTIVO DE LOS ARÁNDANOS"**

LISTA ASISTENCIA DIA 21 DE DICIEMBRE JORNADA P.M.

N°	NOMBRE	E-MAIL	FIRMA
1	Ronald Gijardo Alarcón		
2	MARCELA JORAE		
3	Jaime Cobo R.		
4	Juan Pablo Mallado L.		
5	Kissi Rubio Huantel. con		
6	Maria José Aguayo Acuña		
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

**Tabla 3.** Listado de asistentes a la capacitación efectuada el 22 de Diciembre 2016. Jornada mañana.

**"MODELAMIENTO DE ENSAYOS PARA EVALUACIÓN DE VARIABLES  
FITOSANITARIAS EN EL CULTIVO DE LOS ARÁNDANOS"**

LISTA ASISTENCIA DIA 22 DE DICIEMBRE JORNADA A.M.

N°	NOMBRE	E-MAIL	FIRMA
1	Rodrigo Cuevas L.		
2	Juan Pablo Mellizo L.		
3	Jaime León Robles		
4	Maria José Aguayo Acuña		
5	Kissu Rubia Huelbecán		
6	Ronald Gajardo Abreu		
7	MARCELA TORRES		
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

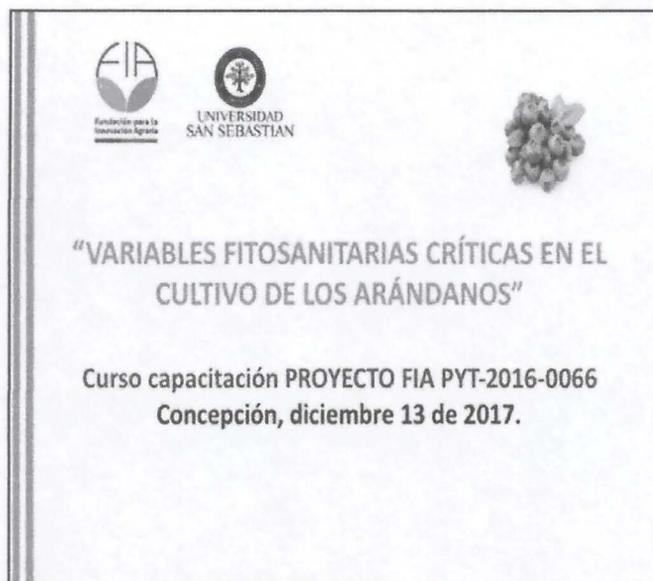
## Capacitación 2. Universidad San Sebastián.

Se adjunta lista de asistencia de los participantes de la capacitación realizada por los Profesores Bernardo Latorre, Ernesto Moya Elizondo y Erica Castro Inostroza (tabla 4 y 5).

A continuación se muestra algo del material impreso y fotografías de los expositores y evento en general (figuras 3 y 4)



**Figura 3.** Fotografía de la actividad de capacitación efectuada en Diciembre 2017.



**Figura 4.** Portada presentación Profesor Ernesto Moya en capacitación 1.

**Tabla 4.** Listado de asistentes a la capacitación efectuada el 13 de Diciembre 2017. Jornada mañana.

LISTA ASISTENCIA SEMINARIO CAPACITACION FIA PYT-2016-0066

"VARIABLES FITOSANITARIAS CRÍTICAS EN EL CULTIVO DE LOS ARÁNDANOS"

MAÑANA

N°	NOMBRE	E-MAIL	FIRMA
1	Alexandra Rojas Galvez		
2	Brenda Carreras Trija		
3	Valeria Cepeda Vergara		
4	Jose Luis Daroch Neira		
5	Jeon Venegas Medina		
6	Maria José Aguayo Azuña		
7	Seime Lotre Rubio		
8	MARCELA JUFRE MIRANDA		
9	DANAL MUÑOZ PLÑA		
10	JUAN SAN MARTIN		
11	KARINA POJAS DURAN		
12	Juan Pablo Mellado Lario		
13	Bernardo Rubone		
14	Ernesto Moya Elizalde		
15	Erica Costo J.		
16			
17			
18			
19			
20			

**Tabla 5.** Listado de asistentes a la capacitación efectuada el 13 de Diciembre 2017. Jornada tarde.

LISTA ASISTENCIA SEMINARIO CAPACITACION FIA PYT-2016-0066

"VARIABLES FITOSANITARIAS CRÍTICAS EN EL CULTIVO DE LOS ARÁNDANOS"

TARDE

N°	NOMBRE	E-MAIL	FIRMA
1	Alexandra Rojas Galvez		
2	José Luis Daroch Neira		
3	Bernardo Ratorre		
4	Ernesto Vilayo Elizardo		
5	Jean Venegas Medina		
6	Manuela J. J.		
7	Juan San Martín		
8	KARINA ROJAS DURÁN		
9	Jaime Lohu P.		
10	Bertha Castro Tap		
11	Valeria Cerpa Vergara		
12	Mano José Parra		
13	Mano José Aguayo		
14	Erica Castro I		
15			
16			
17			
18			
19			
20			

## ANEXO 23. MODELO DE NEGOCIO PARA EL PROYECTO DESARROLLADO

Se aplica el Modelo de Negocios Canvas, desarrollado por Alexander Osterwalder que se trata de una herramienta que permite detectar constantemente los elementos que generan valor al negocio y que son aquellos que los clientes quieren, entendiendo las necesidades de éstos. Dentro de este paradigma, la única regla fija que hay es la de no autoinhibirse y acoger todas las ideas que emanen del proceso; una guía práctica sobre innovación empresarial, útil para visionarios y promotores de la eficacia y la mejora continua.

Por ese motivo, la empresa BerBerries aplica el Modelo Canvas, revisando permanentemente su eficiencia, disposiciones a innovaciones y nuevas oportunidades comerciales.

BerBerries SpA, dedicada a la producción y exportación de arándanos desde el año 2003, incorpora en su cadena productiva a otros productores, a quienes abastece además de plantas. Estos proveedores deben ser supervisados y asistidos técnicamente por la empresa. La empresa BerBerries está permanentemente incorporando nuevas líneas de negocio, dentro de su ámbito productivo y comercial, alimentos saludables en base a berries, otros frutos y hortalizas.

El Modelo Canvas consiste en dividir el proyecto en nueve módulos básicos que explican el proceso de cómo una empresa genera ingresos. Estos nueve bloques interactúan entre sí para obtener como resultado diferentes formas de hacer rentable la empresa. Como resultado de lo anterior, se clarifican los canales de distribución y las relaciones entre las partes, se determinan los beneficios e ingresos y especifican los recursos y actividades esenciales que determinan los costos más importantes. Finalmente, se pueden determinar las alianzas necesarias para operar.

### Los nueve módulos.

La metodología Canvas parte de la idea de la existencia de una propuesta de valor, la cual debe ser comunicada a los potenciales clientes.

Esto conllevará la necesaria disponibilidad de recursos y obligará a establecer relaciones con agentes externos e internos. Así, después, se desarrollan cada uno de los nueve módulos desarrollados por Osterwalder, que son los siguientes:

1. Segmentos de clientes. El objetivo es de agrupar a los clientes con características homogéneas en segmentos definidos y describir sus necesidades, averiguar información geográfica y demográfica, gustos, etc. Después, uno se puede ocupar de ubicar a los clientes actuales en los diferentes segmentos para finalmente tener alguna estadística y crecimiento potencial de cada grupo.

En el caso de este proyecto, y a la vista de los resultados, hemos definido que la captura de valor se hará entre tres principales segmentos de clientes, quienes, a su vez, capturan el valor que está dispuesto a pagar el beneficiario final, el consumidor de la fruta. Este usuario final además favorecerá un producto de mejor calidad y obtenido en forma más bio-amigable que las tradicionales. Estos clientes por lo tanto son aquellos que utilizarán el probiótico a comercializar, que fortalecerá la producción y la calidad del arándano. En este grupo se distingue productores de diferente tamaño e intereses, por lo que el mensaje y formas de relacionarse con ellos, debe ser diferente.

- 1) Productores de tamaño industrial
  - 2) Pequeños productores
  - 3) Mercado Hobby, principalmente extranjero
2. Propuestas de valor. El objetivo es de definir el valor creado para cada Segmento de clientes describiendo los productos y servicios que se ofrecen a cada uno. Para cada propuesta de valor hay que añadir el producto o servicio más importante y el nivel de servicio. Estas primeras dos partes son el núcleo del modelo de negocio.

La propuesta de valor es:

Desarrollo de un probiótico que fortalecerá el crecimiento de la planta de arándano y mejorará la calidad del fruto, con un producto inocuo para el ser humano y el ecosistema.

3. Canales. Se resuelve la manera en que se establece contacto con los clientes. Se consideran variables como la información, evaluación, compra, entrega y postventa. Para cada producto o servicio que identificado en el paso anterior hay que definir el canal de su distribución adecuado, añadiendo como información el ratio de éxito del canal y la eficiencia de su costo.

Los Canales, según los clientes, son:

- 1) Contacto directo con productores (Días de Campo, Asesorías a través del encadenamiento productivo, en Chile y el extranjero, Publicación revistas especializadas, Canales Online
  - 2) Contacto directo con productores (Días de Campo, Asesorías a través del encadenamiento productivo.
  - 3) Canales Online, Redes sociales
4. Relación con el cliente. Aquí se identifican cuáles recursos de tiempo y monetarios se utiliza para mantenerse en contacto con los clientes. Por lo general, si un producto o servicio tiene un costo alto, entonces los clientes esperan tener una relación más cercana con nuestra empresa.

Con Clientes – Se realizará permanentemente nuevas investigaciones acerca de nuevos beneficios, las que se informarán:

- 1) y 2) A través de visitas periódicas,
  - 3) Informando por Redes sociales
5. Fuentes de ingresos. Este paso tiene como objetivo identificar que aportación monetaria hace cada grupo y saber de dónde vienen las entradas (ventas, comisiones, licencias, etc.). Así se podrá tener una visión global de cuáles grupos son más rentables y cuáles no.

Las fuentes de ingresos son:

Ingresos por venta de producto (probiótico)

El cliente (productor) estará dispuesto a pagar por el producto, de acuerdo al aumento en sus ingresos, que a su vez, estará sujeto a la mejora de los siguientes parámetros.

Aumento de producción:

1. Mayor producción
  - 10% más de producto por aumento de calibre;
  - 10% más de producción por aumento en la polinización
  - Disminución pérdidas por *Botrytis cinerea* (10,8%)
2. Conservación del huerto (valor residual del proyecto)
  - Conservación del huerto sano, enfermedades de la madera (5% de plantas más sanas);
3. Aumento en parámetros de calidad de producto
  - Calibre: Aumento de calibre (valor real del producto (10% más))
  - Firmeza:
    - 10% mayor valor real de la fruta
    - 20% menos de ataques de hongos post cosecha
  - Ataques fúngicos: 15% menos de ataques por *Botrytis* en frutos durante la postcosecha

Valores estimados de acuerdo a resultados del primer ensayo, sujetos a verificación posterior.

6. Recursos clave. Después de haber trabajado con los clientes, hay que centrarse en la empresa. Para ello, hay que utilizar los datos obtenidos anteriormente, seleccionar la propuesta de valor más importante y la relacionarse con el segmento de clientes, los canales de distribución, las relaciones con los clientes, y los flujos de ingreso. Así, saber cuáles son los recursos clave que intervienen para que la empresa tenga la capacidad de entregar su oferta o propuesta de valor.

Los recursos claves son:

- Capacidad de llevar los resultados de los ensayos a valores económicos y transmisibles al cliente
- Capacidad de recibir la capacitación en el interior de la empresa y los agentes de venta
- Capacidad de desarrollar estrategia comunicacional de las ventajas del producto

7. Actividades clave. En esta etapa es fundamental saber qué es lo más importante a realizar para que el modelo de negocios funcione. Utilizando la propuesta de valor más importante, los canales de distribución y las relaciones con los clientes, se definen las actividades necesarias para entregar la oferta.

Las actividades claves son:

1. Definición de necesidades de la industria del arándano para la obtención de un probiótico para su cultivo
2. Transformación de los resultados técnicos a valor económico
  - 1.1. Evaluaciones que afectan la producción
    - a. Aumento en polinización y aumento de calibre
    - b. Aumento de polinización y aumento de frutos cuajados
    - c. Disminución de enfermedades en fruto y la correlación con disminución de pérdidas
  - 1.2. Evaluaciones que afectan calidad de la fruta y traducirlo a valor económico
    - a. Calibre del fruto y su valor comercial
    - b. Firmeza del fruto y su valor comercial
    - c. Firmeza del fruto y su riesgo de infección por hongos
    - d. Estado fitosanitario en post cosecha, y disminución de pérdidas por rechazos en:
      - Origen
      - Control fitosanitario SAG
      - Destino
  - 1.3. Evaluaciones que afectan el estado sanitario del huerto y su valor sobre el patrimonio como activo fijo del productor
    - a. Estado fitosanitario de la planta (enfermedades de la madera y de raíces;
    - b. Estado nutricional de la planta (evaluación microbiota suelo nivel radicular)
2. Determinar la inocuidad del fruto para el ser humano
3. Capacitar a la empresa, agentes de transferencia tecnológica y de venta
4. Desarrollo estrategia comercial

8. Asociaciones claves. Fundamental es realizar alianzas estratégicas entre empresas, Joint Ventures, gobierno, proveedores, etc. En este apartado se describe a los proveedores, socios, y asociados con quienes se trabaja para que la empresa funcione. ¿Qué tan importantes son? ¿se pueden reemplazar? ¿pueden convertir en competidores?

Los socios claves del proyecto son:

- a. Proveedor de Cepa probiótica
- b. Centro de I+D para posteriores investigaciones
- c. Revistas especializadas para publicaciones, reportajes y/o marketing
- d. Proveedores de productos especializados manejo arándanos y profesionales asesores
- e. MINSAL, SAG y USDA y/u otros, de acuerdo al mercado, que registren probióticos y productos para el uso como bioestimulantes o antibióticos en cultivo de arándanos y otros cultivos.

9. **Estructura de costos.** Aquí se especifican los costos de la empresa empezando con el más alto (marketing, R&D, CRM, producción, etc.). Luego se relaciona cada costo con los bloques definidos anteriormente, evitando generar demasiada complejidad. Posiblemente, se intente seguir el rastro de cada costo en relación con cada segmento de cliente para analizar las ganancias

- a. Tratamientos (valor del producto, más mano de obra de aplicador, más equipo y combustible a utilizar)
- b. Costos comercialización producto (visitas a clientes, Días de campo, encargo y publicación de investigaciones, misiones comerciales, manejo de redes sociales, logística)
- c. I+D (permanente)

**CANVAS**

Socios Claves	Actividades Claves	Propuesta de Valor	Relación con Clientes	Segmentos de Clientes
<p>Los socios claves del proyecto son:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Proveedor de Cepa probiótica</li> <li>b. Centro de I+D para posteriores investigaciones y marketing</li> <li>c. Revistas especializadas para publicaciones, reportajes y marketing</li> <li>d. Proveedores de productos especializados manejo arándanos y profesionales asesores</li> <li>e. MINSAL, SAG y USDA y/u otros, de acuerdo al mercado que registren probióticos y productos para el uso con bioestimulantes o antibióticos en cultivo de arándanos otros cultivos.</li> </ul>	<p>1. Definición de necesidades de la industria del arándano para la obtención de un probiótico para su cultivo</p> <p>2. Transformación de los resultados técnicos a valor económico</p> <p>1.1. Evaluaciones que afectan la producción</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Aumento en polinización y aumento de calibre</li> <li>b. Aumento de polinización y aumento de frutos cuajados</li> <li>c. Disminución de enfermedades en fruta y la correlación con disminución de pérdidas</li> </ul> <p>1.2. Evaluaciones que afectan calidad de la fruta y traducirlo a valor económico</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Calibre del fruto y su valor comercial</li> <li>b. Firmeza del fruto y su valor comercial</li> <li>c. Firmesa del fruto y su riesgo de infección por hongos</li> <li>d. Estado fitosanitario en post cosecha, y disminución de pérdidas por roturas en:             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Origen</li> <li>• Control fitosanitario SAG</li> <li>• Envase</li> </ul> </li> </ul> <p>1.3. Evaluaciones que afectan el estado sanitario del huerto y su valor sobre el patrimonio como activo fijo del productor</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Estado fitosanitario de la planta (enfermedades de la madera y de raíces;</li> <li>b. Estado nutricional de la planta (evaluación microbiana suelo nivel radicular)</li> </ul> <p>2. Determinar la inocuidad del fruto para el ser humano</p> <p>3. Capacitar a la empresa, agentes de transferencia tecnológica y de venta</p> <p>4. Desarrollo estrategia comercial</p> <p><b>Recursos Claves:</b></p> <p>Los recursos claves son:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad de llevar los resultados de los ensayos a valores económicos transferibles al cliente</li> <li>• Capacidad de recibir la capacitación en el interior de la empresa y agentes de venta</li> <li>• Capacidad de desarrollar estrategia comunicacional de las ventajas producto</li> </ul>	<p>Desarrollo de un probiótico que fortalecerá el crecimiento de la planta de arándano y mejorará la calidad del fruto, con un producto inocuo para el ser humano y el ecosistema</p>	<p>Se realizará permanentemente nuevas investigaciones acerca de nuevos beneficios, las que se informarán:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>1) y 2) A través de visitas periódicas,</li> <li>3) Informando por Redes sociales</li> </ul>	<p>1) Productores de tamaño industrial</p> <p>Productores de menor tamaño</p> <p>Mercado Hobby</p>
		<b>Canales</b>		
		<p>1) Contacto directo con productores (Días de Campo, Asesorías a través de asesoramiento productivo, en Chile y el extranjero, Publicación revistas especializadas, Canales Online</p> <p>2) Contacto directo con productores (Días de Campo, Asesorías a través de asesoramiento productivo.</p> <p>3) Canales Online, Redes sociales</p>		
<b>Estructura de Costos</b>		<b>Puentes de Ingresos</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Tratamientos (valor del producto, más mano de obra de aplicador, más equipo y combustible a utilizar)</li> <li>b. Costos comercialización producto (visitas a clientes, Días de campo, encargo y publicación de investigaciones, misiones comerciales, manejo de redes sociales)</li> <li>c. I+D (permanente)</li> </ul>		<p>El cliente (productor) estará dispuesto a pagar por el producto, de acuerdo al aumento en sus ingresos, que a su vez, estará sujeto a la mejora de los parámetros.</p> <p><b>Aumento de producción:</b></p> <p>1. Mayor producción</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10% más de producto por aumento de calibre;</li> <li>• 10% más de producción por aumento en la polinización</li> <li>• Disminución pérdidas por Botrytis cinerea (10.8%), 22.2%</li> </ul> <p>2. Conservación del huerto (valor residual del proyecto)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Conservación del huerto sano, enfermedades de la madera (5% de plantas más sanas);</li> </ul> <p>3. Aumento en parámetros de calidad de producto</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Calibre: Aumento de calibre (valor real del producto (10% más))             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Firmeza:                 <ul style="list-style-type: none"> <li>o 10% mayor valor real de la fruta</li> <li>o 20% menos de ataques de hongos post cosecha</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>• Ataques fúngicos: 15% menos de ataques por Botrytis en frutos durante la postcosecha, estimados de acuerdo a resultados del primer ensayo, sujetos a verificación posterior.</li> </ul>		

## Relación Costo / Beneficio

Si bien, hay beneficios intangibles, como la construcción y consolidación de Marca en el mercado, La relación entre los Costos y los Ingresos muestra de muy buena forma la relación Costos/Beneficios.

Las tablas a continuación muestran en cada caso, según evaluaciones, la forma en que se obtendrá esta relación, según simulación.

Se hace presente que para todos los efectos de cálculo de beneficios, se considera un valor constante de Retorno al Productor, costos de cosecha y de packing, así como un valor del dólar, según se indica:

**TABLA N° 1: VALORACIÓN FRUTA (USD/Kg)**

<b>Utilidad Kg fruta</b>	
<b>USD/Kg</b>	<b>2,41</b>
Retorno	3,50
Cosecha	0,69
Packing	0,40
Dólar \$	630

Así mismo, los costos de cada evaluación se calculan en base a \$/Kg de fruta producido.

**TABLA N° 2: PRODUCCIÓN PROBIÓTICO**

PRODUCCIÓN PROBIÓTICO										
COSTO TRATAMIENTO \$/Kg fruta										
PRODUCTO	PRECIO \$/Kg o L o un	dosis	Repeticiones	dosis (Kg o l/planta)	Valor Mano de Obra aplicador \$	Valor uso de equipo de aplicación \$	Densidad plantas	\$/planta	Producción estimada Kg/Planta (control sin tratamiento)	Costo producto \$ /Kg fruta
Cobre SL	5.346	0,4 l/ha	7	0,0008	**	**	3.333	4	5	22
Cu Quitosano	7.000	20 l/54000 plantas	2	0,0007	**	**	3.333	5	5	26
Probiótico	*	*	*	*	**	**	3.333	*	5	*

Producto	Precio \$/kg	Dosis	Repeticiones	Dosis (kg o L/Planta)	Densidad plantas	\$/Planta	Producción estimada	Costo producto/ kg fruta	Pérdidas por Botrytis	VALOR Pérdida \$/Planta	Valor pérdida	Costo Producto	Benef. Al usar
Cobre SL	5346	0,4 L/ha 20 L/54000	7	0,00084	3,333	4,49109	5	22,4554455	1%	0,1203862	\$ 260.807	\$ 74.844	\$ 1.852.963
Cu Quitosano	7000	Plantas	2	0,00074	3,333	5,18519	5	25,9259259	0,5%	0,06019231	\$ 130.404	\$ 86.411	\$ 43.993
Probiótico	29994	1 g/L	3	0,1	3,333	2,9994	5	37,8037	1%	0,1203	\$ 260.807	\$ 126.000	\$ 134.807

TABLA N° 3: CONTROL BOTRYTIS

COSTO / BENEFICIO TRATAMIENTO \$/Kg fruta							
PRODUCTO	Producción estimada Kg/Planta (control sin tratamiento)	Costo producto \$/Kg fruta	Pérdidas por Botrytis ( a la espera de resultados)	VALOR Pérdida \$/Planta	VALOR PERDIDA \$/ha	COSTO PRODUCTO \$/ha	Beneficio al usar el producto \$/ha
Cobre SL	5	22	0	0	252.782	74.844	177.938
Cu Quitosano	5	26	0	0	126.391	86.411	39.980
Probiótico	5	*	*	*	*	*	*

TABLA N° 4: CONTROL MICROBIOTA DEL SUELO COSTO / BENEFICIO TRATAMIENTO \$/Kg fruta

**COSTO / BENEFICIO TRATAMIENTO \$/Kg fruta**

PRODUCTO	Producción estimada Kg/Planta (control sin tratamiento)	Costo producto \$/Kg fruta	Pérdidas por Hongos de suelo ( a la espera de resultados)	VALOR Pérdida \$/Planta	VALOR PERDIDA \$/ha	COSTO PRODUCTO \$/ha	Beneficio al usar el producto \$/ha
Probiótico	5	8	*	*	*	80.000	*
Bellis	5	*	*	*	*	*	*

TABLA N° 5: AUMENTO DE CALIBRE VISITAS POLINIZANTES COSTO / BENEFICIO TRATAMIENTO \$/Kg fruta

VISITAS POLINIZANTES							
COSTO / BENEFICIO TRATAMIENTO \$/Kg fruta							
PRODUCTO	Producción estimada Kg/Planta (control sin tratamiento)	Costo producto \$/Kg fruta	Aumento de calibre % (a la espera de resultados)	VALOR Pérdida \$/Planta	VALOR PERDIDA \$/ha	COSTO PRODUCTO \$/ha	Beneficio al usar el producto \$/ha
Cobre SL	5	22	0	0	-	74.844	-74.844
Cu Quitosano	5	26	0	0	-	86.411	-86.411
Probiótico	5	*	*	*	*	*	*

TABLA 6. COSTO DE PRODUCCION DE PROBIOTICOS

Costo producción probióticos		De 1L de medio de cultivo se obtienen aprox. 22,5g (cantidad de leche descremada)			
<b>A considerar:</b>					
Medio de cultivo				Insumos:	Insumos + equipos:
Estufa con agitación				1 gramos	1 gramos
Centrífuga					
Agua destilada				\$ 90	\$ 591
Leche descremada					
Liofilizador					
bomba vacío					
<b>Insumos:</b>					
<b>Medio de cultivo:</b>					
				<b>Precio por L</b>	
Suero de queso	20 g/L	1000 g	\$ 600	\$ 12	(L&E - Precio puesto en planta) (25K)
Peptona de caseína	6 g/L	1000 g	\$ 165.000	\$ 990	<a href="http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Peptone-from-casein-Tryptic">http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Peptone-from-casein-Tryptic</a>
Extracto de levadura	3 g/L	1000 g	\$ 84.300	\$ 253	<a href="http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Yeast-extract,MDA_CHEM-11">http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Yeast-extract,MDA_CHEM-11</a>
Potasio dihidrógeno fosfato	2 g/L	1000 g	\$ 27.500	\$ 55	<a href="http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Potassium-dihydrogen-phos">http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Potassium-dihydrogen-phos</a>
Acetato de sodio	5 g/L	1000 g	\$ 50.800	\$ 254	<a href="http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Sodium-acetate,MDA_CHEM">http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Sodium-acetate,MDA_CHEM</a>
Tween 80	1 ml/L	1000 mL	\$ 69.700	\$ 70	<a href="http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Tween-80,MDA_CHEM-8221">http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Tween-80,MDA_CHEM-8221</a>
Sulfato de magnesio	0,4 g/L	1000 g	\$ 43.300	\$ 17	<a href="http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Magnesium-sulfate-heptahy">http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Magnesium-sulfate-heptahy</a>
Sulfato de manganeso	0,01 g/L	1000 g	\$ 83.000	\$ 1	<a href="http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/ManganeseII-sulfate-tetrahy">http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/ManganeseII-sulfate-tetrahy</a>
Citrato de amonio	2 g/L	500 g	\$ 55.800	\$ 223	<a href="http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/di-Ammonium-hydrogen-ct">http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/di-Ammonium-hydrogen-ct</a>
	38,41			<b>\$ 1.875</b>	
<b>Crioprotector:</b>					
Leche descremada	22,5 g/L	600 g	\$ 3.740	<b>\$ 140</b>	<a href="https://www2.jumbo.cl/leche-descremada-colun-bolsa-600-g-en-polvo-2/p">https://www2.jumbo.cl/leche-descremada-colun-bolsa-600-g-en-polvo-2/p</a>
<b>Equipos:</b>					
				<b>100 \$/kWh</b>	
Estufa con agitación	15 h	0,5 KW	7,50	\$ 750	
Centrífuga	3 h	0,72 KW	2,16	\$ 216	
Liofilizador	48 h	1,6 KW	76,80	\$ 7.680	
bomba vacío	48 h	0,55 KW	26,40	\$ 2.640	
				<b>\$ 11.286</b>	

El costo de producción de cepa probiotica es aproximadamente \$200.000 el kilogramo con concentración de 1E09 UFC/g. El costo por hectárea de producto probiotico nos da \$ 80.000 utilizándose 0,4 kilogramos. Para un kilogramo de fruta se utilizarían 0,04 gramos de producto probiotico con un costo de \$ 8 para un kilogramo de fruta.

16-04-2019

lactofort – Apertura Próximamente

ENTRAR USANDO CONTRASEÑA →

# **lactofort**

## **PRÓXIMAMENTE**

**Entérate de nuestros lanzamientos antes que los demás.**

Una frase corta que describe lo que las personas recibirán al suscribirse

Dirección de correo electrónico

NOTIFICARME

**Riega la voz**



COMPARTIR



TUITEAR



HACER PIN

Esta tienda contará con tecnología Shopify [Shopify](#).

ANEXO 24. CONVENIO DE ADJUDICACIÓN DE LA INICIATIVA FORTALECIMIENTO DE LA PRODUCCION IMPIA Y APLICACIÓN DE INTERVENCIONES INNOVADAS AMIGABLES CON EL AMBIENTE, EN LA PRODUCCION AGROPECUARIA Y AGROALIMENTARIA DE LA REGION DEL BIOBIO

## 17. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Arthur, M., C. Molinas, T. D. H. Bugg, G. D. Wright, C. T. Walsh, and P. Courvalin. 1992. Evidence for in vivo incorporation of D-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:867–869.
- Arthur, M., C. Molinas, F. Depardieu, and P. Courvalin. 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* 175:117–127.
- Billot-Klein, D., L. Gutmann, S. Sable', E. Guittet, and J. van Heijenoort. 1994. Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type enterococcus D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J. Bacteriol.* 176:2398–2405.
- Boyd MA, Antonio MA, Hillier SL: Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. *J Clin Microbiol* 2005, 43(10):5309-5311
- Bugg, T. D. H., G. D. Wright, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, and C. T. Walsh. 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* 30: 10408– 10415.
- Chandok H<sup>1</sup>, Shah P, Akare UR, Hindala M, Bhadoriya SS, Ravi GV, Sharma V, Bandaru S, Rathore P, Nayarisseri A. Screening, isolation and identification of Probiotic producing *Lactobacillus acidophilus* strains EMBS081 & EMBS082 by 16S rRNA gene sequencing. *Interdiscip Sci.* 2014: 6:1-6.
- Charteris W P, Kelly P M, Morelli L, Collins J K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* 61 pp. 1636-1643
- Curragh H. and Collins M. A.1992. High levels of spontaneous drug resistance in *Lactobacillus*. *Journal of Applied Bacteriology* . Vol. 73, 31-36
- Danielsen M.and Wind A. A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 82: 1-11.
- FAO. 1995a. Fruit and vegetable processing Agricultural Services Bulletin 119, Rome.
- FAO. 1995b. Small scale post-harvest handling practices – A manual for horticulture crops , 3<sup>rd</sup> Edition, Series No. 8, Rome.
- Felis GE, Dellaglio F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr Issues Intest Microbiol* 2007; 8:44-61

Felten A, Barreau C, Bizet C, Lagrange PH, Philippon A. 1999. *Lactobacillus* species identification, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(3):729–733.

Hamilton-Miller JMT, Shah S. 1998. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Letters in Applied Microbiology*. 26(2):153–154.

Handwerger, S., M. J. Pucci, K. J. Volk, J. Liu, and M. S. Lee. 1992. The cytoplasmic peptidoglycan precursor of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* terminates in lactate. *J. Bacteriol.* 174:5982–5984.

Handwerger, S., M. J. Pucci, K. J. Volk, J. Liu, and M. S. Lee. 1994. Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J. Bacteriol.* 176:260–264.

Klare, C. Konstabel, G. Werner, G. Huys, V. Vankerckhoven, G. Kahlmeter, B. Hildebrandt, S. Müller-Bertling, W. Witte and H. Goossens. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother.* Vol 59, 900–912

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 41, 103– 105.

Koll-Klais, P, Mandar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarstrom L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20:354–361.

Messer, J., and P. E. Reynolds. 1992. Modified peptidoglycan precursors produced by glycopeptide-resistant enterococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 94: 195–200.

Morgulis, A., George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schäffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.

Ocaña, V. 2001. Efecto protector de los lactobacilos en el tracto vaginal. Tesis para optar al grado de Doctor en Bioquímica. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. 241 pp.

Riveros, Bernardo. *Secado por atomización de bacterias probióticas*. Informe de Memoria de Título para Optar al Título de Ingeniero Civil Químico, Concepción: Universidad de Concepción, 2007.

Ruoff, K.L., Kuritzkes, D.R., Wolfson, J.S., Ferraro, M.J., 1988. Vancomycin-resistant Gram-positive bacteria isolated from human sources. *Journal of Clinical Microbiology* 26, 2064–2068.

Simpson WJ, Hammond JRM, Miller RB. 1988. Avoparcin and vancomycin: useful antibiotics for the isolation of brewery lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 64(4):299–309.

Suazo, Diego. *Secado y estabilidad al almacenamiento prolongado de cepas probióticas*. Informe de Memoria de Título para Optar al Título de Ingeniero Civil Químico, Concepción: Universidad de Concepción, 2010.

Stiles, M.E. and W.H. Holzapfel, 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 1997:36: 1-29.

Swenson, J. M., R. R. Facklam, and C. Thornsberry. 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:543-547

US Highbush Blueberry Council. Where blueberries grow. Available online: <http://www.blueberrycouncil.org/blueberry-facts/where-blueberries-grow/> (accessed on 15 May 2015).

Vescovo M, Morelli L and Bottazzi V.1982. Drug resistance plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Environ. Microbiol.*(43). 50–56

Wieme, A., Cleenwerck, I., Van Landschoot, A., & Vandamme, P. (2012). *Pediococcus lolii* DSM 19927T and JCM 15055T are strains of *Pediococcus acidilactici*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(12), 3105-3108.

Zhang, Z., Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

Zwietering, M. H, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, y K. Van't Riet. «Modeling of the Bacterial Growth Curve.» *Applied and Environmental Microbiology* 56, nº 6 (June 1990): 1875-1881.