



CONVOCATORIA NACIONAL 2015-2016

ESTUDIOS Y PROYECTOS DE INNOVACIÓN EN AGRICULTURA SUSTENTABLE

PLAN OPERATIVO

Nombre iniciativa:	Desarrollo de un probiótico que fortalezca la producción y calidad frutícola de la industria del arándano
Ejecutor:	Universidad San Sebastián
Código:	PYT-2016-0066
Fecha:	24.05.2016



Tabla de contenidos

Tabla de contenidos	2
I. Plan de trabajo.....	3
1. Resumen de la iniciativa	3
2. Configuración técnica de la iniciativa.....	5
3. Costos totales consolidados	32
4. Anexos.....	33
II. Detalle administrativo (Completado por FIA).....	43

107

I. Plan de trabajo

1. Antecedentes generales de la iniciativa

1.1. Nombre de la iniciativa

Desarrollo de un probiótico que fortalezca la producción y calidad frutícola de la industria del Arándano.

1.2. Sector, subsector, rubro y especie principal (si aplica), en que se enmarca la iniciativa

Sector	Agrícola
Subsector	Frutales menores
Rubro	Berries
Especie (si aplica)	

1.3. Período de ejecución de la iniciativa

Fecha inicio	01 de Marzo 2016
Fecha término	28 de Febrero 2019
Duración (meses)	36

1.4. Lugar en el que se llevará a cabo la iniciativa

Región(es)	Región del Biobío
Provincia(s)	Provincia de Concepción
Comuna(s)	Concepción

1.5. Identificación del ejecutor (completar Anexo 1).

Nombre completo o razón social	Universidad San Sebastián
Giro	Educación
Rut	
Nombre completo representante legal	Hugo Sebastián Lavados Montes



1.6. Identificación del o los asociados (completar Anexo 2 para cada asociado).

Asociado 1	
Nombre completo o razón social	BerBerries SpA
Giro	Agroindustria y exportaciones
Rut	
Nombre completo representante legal	Marcela Jofré Miranda

1.7. Identificación del coordinador del proyecto (completar Anexo 3).

Nombre completo	Érica Eliana Castro Inostroza
Teléfono	
E-mail	



2. Configuración técnica de la iniciativa

2.1. Resumen ejecutivo de la iniciativa

Sintetizar con claridad el problema y/u oportunidad, la solución innovadora iniciativa, los objetivos, resultados esperados, beneficiarios e impactos que se alcanzará en el sector productivo y territorio donde se llevará a cabo la iniciativa.

América del norte (EEUU y Canadá) es la mayor productora mundial de arándanos cultivados, con 223 millones de kg sobre una superficie de casi 44.000 ha. Chile está situado en segundo lugar, con algo más de 13.000 ha y una producción en torno a los 50 millones de kg, que representa el 90% de la producción de América del sur, cuya actividad se concentra en las regiones del Maule y Biobío, representando en conjunto, cerca de 57% de la superficie nacional (8.746 ha).

A pesar de las promisorias cifras económicas, variables no contraladas relacionadas al cultivo de este fruto pueden afectar significativamente eventos claves en su génesis y crecimiento. Particularmente, la proliferación de hongos patógenos es causa de pérdidas devastadoras para el arándano y otros berries. La contaminación fúngica de frutas afecta el cultivo, cosecha, manejo, transporte y almacenamiento posterior de los productos. Variadas medidas de manejo para controlar la pudrición por microorganismos se emplean de forma habitual en la industria. Sin embargo, el uso de altas concentraciones de insecticidas y otros agro-químicos es lo habitual. Si bien esta práctica es eficiente en controlar plagas, contaminaciones y enfermedades, conllevan efectos nocivos sobre el producto, el mercado, recurso humano y el medio ambiente. Particularmente el ecosistema es alterado afectando aquellas especies de insectos que proveen el servicio de polinización en la agricultura.

El uso indiscriminado de predios para actividades humanas y empleo de agro-químicos han sido señalados como las dos razones claves de la presión hacia los polinizadores. La producción global de pesticidas se ha incrementado durante varias décadas y se predice un aumento al doble para el año 2050, cercano a 10 millones de toneladas métricas. La polinización es vital en la mantención de especies vegetales y la vida humana, con una valorización de billones de dólares al año, la cual se ha visto perjudicada por la desaparición a nivel mundial de abejas y otros polinizadores con repercusiones ecológicas y económicas. El abejorro, principal polinizador de arándanos en nuestro país, no es una excepción y su población se encuentra sometida a una fuerte presión, lo cual incide directamente en la producción y calidad del fruto.

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 actividad anti fúngica contra fitopatógenos que afectan la industria del arándano, ej. *Botrytis cinerea*. 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 pecoreadores 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 agrarios, el contar con microorganismos que puedan incrementar la tasa de polinización en arándanos, es un beneficio importante a considerar.

BAL, y específicamente *Lactobacillus* spp. han sido asociados con la industria alimenticia debido a la acción preservante del ácido láctico, aumento de sabor, textura y nutrición, así como agente biocontrolador de microorganismos perjudiciales en frutos en etapa post-cosecha. Es así que planteamos que la formulación propuesta, presentaría un efecto biocontrolador post-cosecha, tal efecto se debería a residuos del producto sobre los frutos, los cuales ejercerían un rol protector contra hongos y bacterias a un bajo costo. Nuestro equipo de investigación

propone el desarrollo de un probiótico a base de *Lactobacillus* spp. aislados de insectos polinizadores y entorno silvestre, cuya implementación favorecerá la industria frutícola del arándano, incrementando la tasa de polinización, previniendo enfermedades en plantaciones y frutos, asegurando una mayor calidad y estabilidad post-cosecha de este berry.

El desarrollo de la propuesta se contempla en la Región del Biobío, cuyos estudios de campo se efectuarán en Monte Águila, provincia de Biobío. Los beneficios del empleo de este producto impactarán tanto al sector industrial como a la pequeña y mediana empresa, propiciando la obtención de un producto ambientalmente amigable, cuyas propiedades fomentarán una mejora integral de la industria desde la génesis del fruto hasta la etapa post-cosecha. Así, su desarrollo impactará en el desarrollo biotecnológico e la Región del Biobío y fortalecerá el vínculo universidad/empresa.

2.2. Objetivos de la iniciativa

Los objetivos propuestos deben estar alineados con el problema y/u oportunidad planteado. A continuación indique cuál es el objetivo general y los objetivos específicos de la iniciativa.

2.2.1. Objetivo general¹

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

2.2.2. Objetivos específicos²

Nº	Objetivos Específicos (OE)
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.
2	Producir tecnológicamente a escala piloto, un prototipo probiótico con potencial comercial en la industria del arándano.
3	Validar en ensayos de campo el impacto del prototipo diseñado sobre aspectos productivos y fitosanitarios del cultivo del arándano.
4	Diseñar las bases del modelo de escalamiento y de transferencia del proceso productivo y resultados obtenidos.

¹ El objetivo general debe dar respuesta a lo que se quiere lograr con la iniciativa. Se expresa con un verbo que da cuenta de lo que se va a realizar.

² Los objetivos específicos constituyen los distintos aspectos que se deben abordar conjuntamente para alcanzar el objetivo general de la iniciativa. Cada objetivo específico debe conducir a uno o varios resultados. Se expresan con un verbo que da cuenta de lo que se va a realizar.

2.3. Resultados esperados e indicadores

Indique los resultados esperados y sus indicadores para cada objetivo específico de acuerdo a la siguiente tabla.

N° OE	N° RE	Resultado Esperado ³ (RE)	Indicador de Resultados (IR) ⁴				
			Nombre del indicador ⁵	Fórmula de cálculo ⁶	Línea base del indicador ⁷ (situación actual)	Meta del indicador ⁸ (situación final)	Fecha alcance meta ⁹
1	1	Obtención de cepas con potencial rol biotecnológico	Lactobacilo con resistencia y/o tolerancia a condiciones medioambientales.	N° cepas seleccionadas/ total de cepas investigadas	0	3	30.07.16
	2	Pool de lactobacilos con rol probiótico en arándanos.	Lactobacilo con acción sobre un fitopatógeno prevalente del arándano.	N° cepas con capacidad antipatógena/ fitopatógenos ensayados	0	1	30.07.16
	3	Cepa probiótica para arándanos con estándares europeos	Lactobacilo con estándares internacionales de resistencia antibiótica	N° lactobacilos con rango UE/total cepas investigadas	0	1	30.07.16

³Considerar que el conjunto de resultados esperados debe dar cuenta del logro del objetivo general de la iniciativa.

⁴Los indicadores son una medida de control y demuestran que efectivamente se obtuvieron los resultados. Pueden ser tangibles o intangibles. Siempre deben ser: cuantificables, verificables, relevantes, concretos y asociados a un plazo.

⁵Indicar el nombre del indicador en forma sintética.

⁶Expresar el indicador con una fórmula matemática.

⁷Completar con el valor que tiene el indicador al inicio de la iniciativa.

⁸Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar en la iniciativa.

⁹Indicar la fecha en la cual se alcanzará la meta del indicador de resultado.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado ³ (RE)	Indicador de Resultados (IR) ⁴				
			Nombre del indicador ⁵	Fórmula de cálculo ⁶	Línea base del indicador ⁷ (situación actual)	Meta del indicador ⁸ (situación final)	Fecha alcance meta ⁹
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 ⁸ UFC/gr	30.03.17
	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	0 UFC/gr	10 ⁸ UFC/gr	30.09.17
	3	Impregnación del suelo por la cepa probiótica.	Índice de colonización del suelo por la cepa probiótica	UFC/m ²	10 ¹ UFC/m ²	10 ⁴ UFC/m ²	30.10.17
3	1	Polinización aumentada en sembrados con probiótico	Índice de polinización	Nº flores visitadas por polinizadores x minuto una vez a la semana/período floración arándano	3	5	30.01.19
	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
	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

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado ³ (RE)	Indicador de Resultados (IR) ⁴				
			Nombre del indicador ⁵	Fórmula de cálculo ⁶	Línea base del indicador ⁷ (situación actual)	Meta del indicador ⁸ (situación final)	Fecha alcance meta ⁹
	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
4	1	Protección de los resultados	Patente de invención	Nº patente ingresada INAPI	0	1	28.02.19
	2	Producción científica.	Publicación en Corriente internacional.	Nº publicaciones	0	1	28.2.19
	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	01.12.16 22.03.18 23.01.19
	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
	5		Postulación a proyecto de empaquetamiento tecnológico	Código proyecto ingresado	0	1	28.02.19

2.4. Indicar los hitos críticos para la iniciativa

Un hito crítico representa un logro o resultado importante en la evaluación del cumplimiento de distintas etapas y fases de la iniciativa, que son determinantes para la continuidad de ésta y el aseguramiento de la obtención de resultados esperados

Hitos críticos ¹⁰	Resultado Esperado ¹¹ (RE)	Fecha de cumplimiento (mes y año)
Cepa resistente a las condiciones de cultivo del arándano.	Obtención de cepas con potencial rol biotecnológico	15.12.2017
Cepa con dos propiedades probióticas para el cultivo del arándano.	Pool de lactobacilos con rol probiótico en arándanos	30.09.2017
Cepa con perfil de resistencia a antibióticos autorizado por la UE	Cepa probiótica para arándanos con estándares europeos.	01.10.2016
Biomasa probiótica que conserve concentración 10E8 UFC/gr y las propiedades de la cepa in vitro.	Producción de biomasa estable que conserve sus propiedades originales.	28.03.2018
Modelo Costo Beneficio del uso del producto diseñado	Proyección económica del costo beneficio del uso del producto tecnológico	30.04.2017
Lote de producto estable a 90 días y con propiedades probióticas activas.	Partida productiva a escala piloto de probiótico para arándano.	30.09.2017
Recuperación de la cepa probiótica en un modelo de laboratorio de siembra de arándano en índice de 10E4 x m2.	Impregnación del suelo por la cepa probiótica.	30.10.2017
Incremento de 30% de la polinización en sembrados de arándano con probiótico	Polinización aumentada en sembrados con probiótico	31.01.2019
Incremento de 10% de la producción de arándano respecto al control en un ensayo de campo empleando probiótico.	Incremento en la producción de arándanos tratados con probióticos	31.01.2019
Menos % arándanos infectados planta en sembrados de arándano	Disminución de índice de afecciones fitosanitarias	31.10.2018
Una patente ingresada en el INAPI	Protección de los resultados	15.02.2019

¹⁰Un hito representa haber conseguido un logro importante en la iniciativa, por lo que deben estar asociados a los resultados de éste. El hecho de que el hito suceda, permite que otras tareas puedan llevarse a cabo.

¹¹Un hito puede estar asociado a uno o más resultados esperados y/o a resultados intermedios.



Una publicación recepcionada por una revista de corriente internacional	Producción científica.	28.02.2018
Un proyecto de empaquetamiento tecnológico esbozado para postular a fondos de TT.	Modelo de TT para este proyecto.	01.10.2016

2.5. Método

A continuación describa los procedimientos, técnicas de trabajo y tecnologías que se utilizarán para alcanzar cada uno de los objetivos específicos definidos en la iniciativa. Adicionalmente, debe describir las metodologías y actividades iniciativas para difundir los resultados a los actores vinculados a la temática de la iniciativa (máximo 8.000 caracteres para cada uno).

- 2.5.1. Identifique y describa detalladamente los procedimientos, técnicas de trabajo y tecnologías que se utilizarán para alcanzar cada uno de los objetivos específicos definidos en la iniciativa

Método objetivo 1:

Trabajo adelantado: Nuestro equipo de investigación ya dispone 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. Las bacterias han sido identificadas molecularmente mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para ello 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 InstaGeneMatrix (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 re suspendido en 200 μ l de InstaGeneMatrix 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 μ l de reacción que consistió en: buffer PCR 1X; MgCl₂ 4mM; dNTP 0.2mM; PrimerA 1 μ M; PrimerB 1 μ M; Taq 0.25U; 9.25 μ l H₂O y 1 μ l 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® NucleicAcidStain (Biotium), durante 90 min a 80 volts.

De las 21 cepas sometidas a éste estudio (AB=6 y BN=15), todas pertenecen al género *Lactobacillus*. A su vez, 5/15 aislados de bosque nativo son parte de este género bacteriano de acuerdo a las prueba de identificación molecular efectuadas, los resultados se evidencian por los amplicones de aproximadamente 250pb visualizados en geles de agarosa obtenidos por electroforesis.

Pruebas de antagonismo y antibacterianas: Se determinará propiedades antagonistas de sobrenadantes de 21 cepas lácticas sobre micelios fúngicos de fitopatógenos importantes para la industria mediante el método de difusión en agar. Entre estos *Botrytis cinerea*, causante de botritis, *Fusicoccum putrefaciens* agente etiológico de cancro, *Chondrostereum purpureum* agente etiológico de plateado y *Phytophthora spp.* Sobrenadantes de cada cepa láctica será obtenido cultivando cada cepa en caldo MRS e incubando por 24 h a 37°C, la suspensión microbiana será luego centrifugada a 4500 rpm por 10 minutos y filtrada por medio de membranas de 0.2 micras. Para la interacción, medio PDA fundido y tibio será inoculado con las cepas fúngicas. Una vez solidificado el agar, a cada placa se le generará un bocado en el centro de 6 mm en el cual se

depositará sobrenadantes de cada cepa láctica. Las placas (duplicado) serán luego incubadas a 27°C por 2 a 6 días, el crecimiento del micelio será medido en mm en placas tratadas y controles y así cuantificar el efecto antagónico.

Producción cuantitativa de ácido láctico: La propagación de las bacterias lácticas se llevará a cabo en cultivo estático a 37 °C durante 10–12 horas, luego de ello se inoculará en el biorreactor. El inóculo se preparará en dos matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo en cada uno 100 mL de medio de cultivo MRS (52,2 g/L). El biorreactor conteniendo dos litros de medio de cultivo se inoculará asépticamente con 200 mL de inóculo y 2000 ml de medio de cultivo. Para cuantificación de ácido láctico se determinará la concentración de lactato mediante HPLC, las muestras se colectarán cada 2 horas, el volumen mínimo de muestra será de 10 ml. Para la realización del ensayo es necesario que las muestras colectadas sean filtradas a 0,2 micras. El equipo HPLC estará provisto de un detector de índice de refracción y conectado a una computadora para la adquisición de datos. Las concentraciones de lactato se calcularán finalmente empleando curvas de calibración determinadas previamente.

Adherencia de las cepas lácticas: Se investigará la hidrofobicidad de la superficie bacteriana de las BAL empleando el método de partición en hidrocarburos descrito por Rosenberg et al. , y modificado por Geertsema et al. . Se utilizarán tres diferentes disolventes hidrófobos: hexadecano, xileno, y tolueno. De acuerdo a las características hidrófobas de la superficie bacteriana, las cepas se clasificarán en tres categorías: alta (71-100 %), medio (36-70 %) y baja (0-35 %). Además se investigará la auto-agregación, donde se utilizarán cultivos de las cepas seleccionadas incubadas a 37°C por 12 horas en caldo MRS Merck®, se centrifugarán a 3700 rpm por 5 minutos y se descartará el sobrenadante. Posteriormente, la cepa será lavada 2 veces con buffer PBS estéril, luego se ajustará la densidad óptica a $0,6 \pm 0,05$ DO en 3 ml de PBS estéril en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570nm. Se medirá la DO inicial, luego se incubará a 37°C sin agitación y se realizarán mediciones durante 4 horas con intervalos de 1 hora; el índice de auto-agregación (IC) se determinará con la siguiente fórmula: $IC = [1 - (DO \text{ final} / DO \text{ inicial})] \times 100$. La misma escala descrita en el ensayo del método de partición de solventes orgánicos (MATH) se utilizará para determinar el grado de auto-agregación.

Adhesión a proteínas de matriz extracelular es un requisito fundamental que cepas probióticas puedan adherirse a sustratos, para poder así colonizar y poder modular la microbiota del hospedador, para luego expresar aquellas propiedades que le dan el atributo de microorganismos benéficos o probióticos. La lignina es un componente proteico principal en células vegetales, constituyente predominante en estructuras foliares, tallo y frutos. Esta proteína de matriz extracelular se estudiará como sustrato base de un modelo de estudio de adhesión y colonización bacteriana in vitro. Por éste motivo, se propone el estudio de adherencia de las cepas lácticas aisladas a matrices de lignina de acuerdo a la metodología descrita por Styriak&Ljungh (3). Para esto, un volumen de 100 µl de solución de proteína de matriz extracelular (100 µg en 1 ml de solvente Ácido Acético 0,01 M), se sembrarán en pocillos de placas de microtitulación y serán incubadas toda la noche a 4°C, las soluciones proteicas serán removidas y los pocillos serán lavados tres veces con PBS. Se agregará 200 µl de albúmina suero de bovino (BSA) al 2 % en PBS (previene unión bacteriana no específica) a cada pocillo. Se incubará por toda la noche a 4° C, removerá el BSA y lavará dos veces con PBS. Se agregará a cada pocillo 10µl de una solución bacteriana de 109 UFC/ml (0.11 a 0.12 625nm) se llevará a agitación orbital por 2 horas a 37°C. Las bacterias no adheridas serán eliminadas lavando tres veces con PBS. Las bacterias unidas serán fijadas incubando por 20 min a 60°C y serán teñidas con 95 µl de cristal violeta, se dejará reposar por 45 min a temperatura ambiente. Luego, se lavará los pocillos 6 veces con 200 µl de PBS, se agregará 100 µl de buffer citrato pH 4.3 (libera bacterias adheridas). Se dejará reposar 45 min a temperatura ambiente y se leerá en Lector ELISA a 570 nm y se calcularán los promedios de 3 mediciones. Las cepas serán clasificadas como fuertemente adherente si (A570

nm > 0,3), medianamente adherente ($0,1 \leq A_{570} \text{ nm} \leq 0,3$) o no adherente ($A_{570} \text{ nm} < 0,1$) (Stryiak et al., 2003).

Identificación genética de las cepas ácido lácticas seleccionadas a nivel de especie. La identificación de las cepas lácticas aisladas respecto a género ya está realizada. De acuerdo al perfil de resultados de estas cepas en los ensayos realizados, éstas se identificarán hasta nivel de especie mediante secuenciación de gran parte del gen que codifica para la subunidad 16S Ribosomal. Para esto, se efectuará la amplificación con partidores universales para el gen 16S Ribosomal para realizar la secuenciación del amplificado y su posterior estudio bioinformático para definir la especie de la cepa aislada. Las cepas almacenadas en cepario serán incubadas en caldo MRS e incubados a 37°C por 12 horas, posteriormente se centrifugarán a 3600 rpm por 4 minutos y el pellet celular se procesará en una solución de lisis para extraer el ADN bacteriano. Luego se procederá a preparar una master mix que contendrá: 2 µl de muestra, 2,5 µl de Buffer PCR, 1 µl de MgCl₂, 5 µl de dNTPs 1 mM, 1,25 µl de cada primer y 0,1 unidades de Taq en 11,5 µl de agua libre de nucleasas. La amplificación se llevará a cabo en un termociclador con los siguientes programas Género Lactobacillus sp.: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de 1 minuto a 95°C; 30 segundos a 55°C; 1 minutos a 72°C; 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. Gen 16s Ribosomal: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de 1 minuto a 95°C; 1 minuto a 48,5 °C; 1 minutos a 72°C; 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. Electroforesis en gel de agarosa: 10 µl obtenido del producto PCR se sembrará en gel de agarosa al 2%, preparado con buffer TAE 1X y 10mg por litro de bromuro de etidio; se aplicará una corriente de 80 voltios en una cubeta para electroforesis durante 1 hora, luego el gel se fotografiará bajo luz UV. A partir de la electroforesis de la amplificación del gen 16s Ribosomal se procederá a purificar el ADN y enviar una porción del amplificado a secuenciación masiva de ADN, una vez obtenidos los resultados utilizando herramientas bioinformáticas se realizará la corroboración e identificación a nivel de especie de los aislados.

Producción de peróxido de hidrogeno. Para la determinación de peróxido de hidrógeno de las BAL (bacterias ácido lácticas) se utilizará el protocolo descrito por Felten et al., 1999(1). Las cepas lácticas serán 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 (Sigma). Luego, serán incubadas en condiciones de microaerofilia durante 48 horas. Posteriormente, las placas serán expuestas al aire. La identificación de bacterias productoras de H₂O₂ se realizará después de la incubación, lo que se evidenciará por la formación de pigmentos azules alrededor de las colonias, se considerarán dos categorías: no productora y productora de H₂O₂. Para determinar la naturaleza de la inhibición, las cepas lácticas que presenten acción inhibitoria sobre los patógenos evaluados, serán sometidas a neutralización del ácido láctico y peróxido de hidrogeno. Para esto, las cepas lácticas serán centrifugadas y el sobrenadante será filtrado con un filtro 0.2µm, Minisart. Posteriormente, se adicionará NaOH 8M y así neutralizar el contenido ácido, ajustando a pH 7 y se adicionará catalasa para neutralizar el contenido de peróxido de hidrógeno presente en la muestra. De ésta forma, de persistir la actividad antagónica de las cepas lácticas se deduce que la sustancia antimicrobiana es de tipo proteica, específicamente una bacteriocina.

Pruebas de Tolerancia de las cepas lácticas. Se investigará la tolerancia a pH, evaluando el comportamiento frente a diferentes lecturas de pH (3.0, 4.0, 5.0 y 7.0) en 3 ml de caldo MRS, mediante la adición de HCl 1N y lectura por medio de potenciómetro. Los caldos estériles, serán inoculados con un cultivo axénico y fresco de cada uno de las cepas aisladas, hasta conseguir una turbidez del 0.5 de la escala de Mc Farland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml). Los caldos se incubarán a 37°C, por 2h y 4h, se realizarán siembras sobre agar MRS, que serán incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Las cepas resistentes al pH 3.0 por 4h, se les realizará un recuento en superficie para cuantificar las UFC/ml. Pruebas de susceptibilidad antibiótica. Se utilizará el método E-test (ABBIodisk) de acuerdo a las instrucciones del fabricante para así evaluar la

susceptibilidad antibiótica de las cepas ácido lácticas seleccionadas para el proyecto. Desde una suspensión bacteriana con una densidad McFarland 1.0 en solución salina al 0,9%, se tomará una alícuota de cada cepa con una tórula estéril, y se diseminará 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), a pH final de 6.7 (Klare et al. 2005). Luego se colocarán las tiras E-test sobre las placas, las que se incubarán por 48 horas a 37°C en microaerofilia. El punto de corte para cada antibiótico, se definirá como la menor concentración antibiótica para la cual no se observe desarrollo bacteriano. La susceptibilidad de una cepa a un antibiótico será definida como la concentración mínima inhibitoria (CMI) en µg/ml.

Método objetivo 2:

Diseño del proceso productivo de biomasa de las cepas probióticas seleccionadas a escala de laboratorio. Se desarrollarán estudios cinéticos del crecimiento de las 21 cepas ácido lácticas previamente seleccionadas bajo distintas condiciones operativas, seleccionando y caracterizando el sustrato más adecuado para su producción. Se considera iniciar el estudio empleando un medio de cultivo a base de derivados desuero de queso desarrollado en un proyecto FONDEF cuya patente ingresada fue la N°1940-2005, que tiene la gran ventaja de tener un precio equivalente a la décima parte de un medio comercial especialmente formulado para *Lactobacillus* sp. (Medio LBS). Se tiene prevista la utilización de un medio de cultivo a base de derivados de suero de queso (Patente ingresada N°1940-2005) para los estudios cinéticos de la o las bacterias seleccionadas. Una vez optimizada la etapa de producción de las cepas ácido lácticas, se desarrollarán ensayos de concentración del producto utilizando centrifugación y membranas de microfiltración, analizando las variables de proceso que permitan optimizar el desempeño del equipo (presión transmembrana, temperatura, pH, velocidad tangencial) y secado (spray / fluidizado/rotatorio a vacío/ liofilización) de productos a escala de laboratorio con la finalidad de obtener la máxima concentración de bacterias por gramo de producto seco. Se evaluará además la alternativa de concentrar el producto mediante evaporación al vacío, analizando también las variables de proceso que permitan optimizar el desempeño del equipo (temperatura y presión de vacío, grado de agitación del producto). Los resultados obtenidos a escala de laboratorio constituirán la base para realizar el escalamiento del proceso productivo.

Desarrollo de un proceso de fabricación del preparado en polvo: Se ensayarán distintas técnicas de secado de tal forma de evaluar con cuál de éstas se obtiene la mejor estabilidad y por consiguiente un producto o prototipo más estable. Se considera el estudio de distintas formas de secado tales como: secado por atomización, secado por fluidización y secado rotatorio a vacío, evaluando y seleccionando la alternativa técnica-económica más factible que asegure la mayor concentración y viabilidad de las células en el tiempo, sin perder sus características probióticas originales (estudio de variables de proceso tales como temperatura de secado, presión de operación, campos de velocidades, distribuciones de tamaños, tipo de agente secante, entre otras).

Evaluación de la viabilidad del prototipo formulado: Una vez evaluado el secado de la cepa con diferentes medio de protección (ST = secado con medio protector tradicional, SH = secado con medio protector con harina de topinambur y SFOS = secado con medio protector con extracto de fructo-oligosacáridos), los productos se cosecharán en bolsas selladas al vacío, rotulados y almacenados a 4°C, temperatura ambiente y 37°C, ya que la temperatura juega un papel importante en la viabilidad de la biomasa, así como las características bioquímicas de la cepa para verificar que no han sido alteradas. Estos ensayos se realizarán a tiempo 0, 30, 60 y 90 días.

Estas actividades se realizarán en la USS, ya que se encuentran las capacidades técnicas.

Evaluación in vivo del potencial de acción del formulado probiótico sobre aspectos productivos y fitosanitarios del arándano:

1.- **Evaluación de inocuidad in vivo del prototipo.** Dado que los frutos tratados con el probiótico serán consumidos finalmente por humanos, se encargará el **estudio de inocuidad** de la cepa seleccionada. **Efecto de la cepa seleccionada sobre producción de citoquinas producidas por células mononucleares de sangre periférica humana.** La evaluación de inocuidad es vital para validar y conseguir aprobación de ingreso a mercados extranjeros quienes velan por la seguridad alimentaria de la población. Si se logra demostrar un beneficio para el consumidor final sería un plus a la producción nacional, principalmente para mercados como el europeo en el cual aprecian bastante los productos funcionales. **Obtención de homogenizado proteico soluble.** El cultivo bacteriano (10^9 ufc/ml) será centrifugado a 6000g por 8 minutos en centrifuga Eppendorf 5810R, el pellets será resuspendido en Buffer fosfato salino (PBS) 10mM; pH 7,4, luego de 3 lavados, se llevará a volumen final de 35 mL, para someterlas a ruptura mecánica en prensa FRENCH (1000 psi). Una vez obtenido el homogenizado, éste será centrifugado a 10000g por 15 minutos a 4°C, en centrifuga Eppendorf 5403, guardando el sobrenadante a -20°C. Para determinar qué fracción proteica es la involucrada en los efectos concentrados (trabajo adelantado), el HPS será sometido a fraccionamiento mediante concentradores Amicon y purificación parcial por método AFPL (Fastliquidproteinchromatography). **Cuantificación de proteínas de homogenizado soluble de Lactobacillus spp.** La cuantificación de proteínas totales en se realizará mediante el método de Bradford (BioRad®). La curva estándar será realizada con BSA 200 µg/mL a una longitud de onda de 595 nm. **Obtención separación de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP).** Se obtendrá sangre de pacientes (n = 20) con índice de masa dentro de lo normal, desde vena periférica y se colocará en tubos Falcon de 50 mL estériles, previamente preparados con heparina 50 U/mL y PBS 10 mM pH 7,4 (PBSh). La separación se realizará con reactivo Histopaque®-1077 (Sigma) en cámara de flujo laminar. La suspensión de sangre/PBSh/Histopaque será centrifugada a 400g por 30 minutos a temperatura ambiente. Se extraerá el anillo de la interfase que corresponde a las CMNSP. Para eliminar el exceso de Histopaque®-1077, las células serán lavadas con PBS heparinizado estéril a 1800 rpm por 5 minutos. El tercer lavado se efectuará con medio RPMI 1640 Hy Clone® + 25mM HEPES, + L-glutamina; centrifugando 400g por 5 minutos y luego se eliminará todo el sobrenadante para posteriormente resuspender en aproximadamente 3 a 5 mL de medio RPMI 1640 a temperatura ambiente. Se procederá al recuento y viabilidad celular, tomando una muestra de las CMNSP y colorante azul de tripán. **Cultivo de células mononucleares de sangre periférica.** Se sembrarán 100 µL por pocillo, en placas de cultivo, a una concentración de 500.000 células/mL y se dejarán reposar en medio RPMI 1640 (con 25mM Hepes y 2mM L-glutamina, HyClone), en condiciones de 37,0°C, 5% CO₂ y 95% humedad. A las 18 horas de sembradas se quitará sobrenadante (50µL) y se adicionará HPS de *L. salivarius* ampliando el rango de concentración de la (desde 200 hasta 500 µg/mL). Se completará a volumen (100 µL/pocillo) con medio RPMI 1640, complementado con antibiótico y antimicótico en solución 1x (10,000 U/mL Penicilina, 10,000 µg/mL Estreptomina, 25µg/mL Amfotericina B), 2 mercaptoetanol 0,001 µL y Suero fetal de ternera inactivado a 56°C por 30 minutos. Todos los cultivos se realizarán a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad. **Cuantificación de citoquinas.** A las 70 horas aproximadamente de iniciado el cultivo se extraerán los sobrenadantes de cada pocillo, los cuales se centrifugarán a 410 g por 10 minutos a 4°C y serán guardados a -20°C. Mediante ELISA Sandwich (eBioscience), se obtendrá la concentración de las citoquinas proinflamatorias IL-6, TNF-α, IL-1β y la citoquina IL-10. Además, se desarrollará un **modelo animal con ratones BALB/c** sanos, para determinar la existencia o ausencia de interacciones adversas en el hospedador. También se evaluará la permanencia de la cepa en el tracto digestivo, su capacidad de inmunomodulación y seguridad para los animales. Se seguirán los protocolos empleados en el marco del Proyecto Innova Chile 09CAVC- 6955.

Estas actividades se desarrollarán en dependencias de la USS y apoyados por la asesoría técnica de la Prof. Margarita González del Laboratorio de Bioquímica Clínica de la Universidad de Concepción, con quien se han desarrollado todos los proyectos I&D en el área de probióticos adjudicados por este equipo de investigación.

2.- Estudio microbiológico de suelo tratado con prototipo biotecnológico. Se determinará la viabilidad, estabilidad y modulación de la microbiota de suelo tratado con el prototipo de la formulación biotecnológica en relación a una superficie control. Biomasa bacteriana del prototipo biotecnológico en concentraciones de 107, 108, y 109 UFC/g, serán suspendidas en 1L de agua a una concentración del 5% (p/v). Luego cada suspensión será nuevamente mezclada en agua para obtener una concentración final de 103, 104 y 105 UFC/ml. Las distintas suspensiones serán inmediatamente aplicadas con nebulizadora en la superficie (1m²) de suelo empleado para plantación de arándanos en triplicado, junto con un control triplicado solo nebulizado con agua. Posteriormente se realizarán recuentos microbiológicos a tiempo 0 (monitoreo basal), al día 1, 3, 5, 8, 12 y 16. Para esto, en condiciones estériles (trabajar en campana de flujo laminar), se adicionará 1 g del suelo a un matraz con tapa rosca con 99 ml de solución salina isotónica estéril. La muestra de suelo será segregada y homogeneizada con agitación vigorosa empleando vórtex. Se tomará 1 ml de la suspensión, el cual será transferirlo a un tubo con 9 ml de solución salina para diluir seriadamente, se sembrará 50 ul en cada medio agarizado. Se incubará las placas a 30°C en ausencia de luz por 3 a 7 días. Bacterias lácticas serán cuantificadas en agar MRS, Gram negativos serán cuantificados en agar tripticosa de soya, hongos serán cuantificados en agar Sabouraud provisto de cloranfenicol. Se medirá pH, conductividad eléctrica y contenido materia orgánica.

Protección de frutos sobre la incidencia de fitopatógenos fúngicos en etapa post-cosecha. **Cepas fúngicas fitopatógenas** (*Botrytis cinerea*, causante de botritis, *Fusicoccum putrefaciens* agente etiológico de cancro, *Chondrostereum purpureum* agente etiológico de plateado y *Phytophthora spp.*). Serán reconstituidas en caldo y agar PDA, conidias de estos serán producidas en agar V-8, cultivando a 24 horas por 7 a 10 días, se obtendrá una suspensión de 104 conidias (esporas), por medio de lectura de densidad óptica. Arándanos serán obtenidos desde la empresa Berberries y almacenados temporalmente en atmósfera no controlada. El **producto biotecnológico** será suspendido en agua de acuerdo a especificaciones definidas experimentalmente que forman parte de las etapas previas de este proyecto. En el laboratorio, los frutos serán desinfectados por inmersión en solución desinfectante al 10%, (5% hipoclorito de sodio y 0,01% tween 20), por 20 minutos y enjuagados en agua destilada estéril por 4 minutos. Los frutos previamente desinfectados secos, serán perforados con agujas estériles (5 mm diámetro y 5 mm de profundidad) y depositados en bandejas de plumavit y recubiertas temporalmente con una película plástica. **Suspensiones de conidias** (20 ul) serán inoculadas en las perforaciones, el producto tecnológico será aplicado por aspersion directa sobre los frutos en cultivo y en etapa post-cosecha. De esta forma se conformarán los siguientes grupos experimentales.

- A) Frutos desinfectados, perforados, inoculados con fitopatógenos y tratados con producto tecnológico en etapa post-cosecha.
- B) Frutos desinfectados, perforados, inoculados con fitopatógenos y tratados solo con agua en etapa post-cosecha.
- C) Frutos desinfectados, inoculados con fitopatógenos y tratados con producto tecnológico en etapa post-cosecha.

D) Frutos desinfectados, inoculados con fitopatógenos y tratados solo con agua en etapa post- cosecha.

El experimento será llevado a cabo de acuerdo a un esquema aleatorio con tres replicas, 5 frutos (3 perforaciones) serán aplicadas. Una vez tratados los frutos serán incubados a 22-24°C con un 85% de humedad relativa. La incidencia de enfermedad se determinará como % de frutos con indicios de pudrición. Las evaluaciones se realizarán al día 0, 10, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 días, considerando que al mercado chino se estima al menos 33 días de viaje de las partidas.

Método objetivo 3: Validar en ensayos de campo el impacto del prototipo diseñado sobre aspectos

Los ensayos en terreno evaluarán el efecto del preparado biotecnológico en aspectos productivos asociados al cultivo del arándano. El ensayo se realizará en un huerto de arándano de la empresa Agrícola Berberrie, ubicado Camino La Mancha, Km 2, Monte Águila, Región del Biobío. Los ensayos se realizarán en las variedades *Brightwell*, *Rabbiteye Blueberries*, *Tifblue* y *O'Neal*. Se ha considerado el apoyo del especialista en patología vegetal, Ingeniero Agrónomo, PhD en el área, Dr. Ernesto Moya Elizondo, y los análisis de las muestras se realizarán en el Laboratorio de Citopatología Vegetal de la UdeC.

Efectividad de aplicaciones foliares del producto biotecnológico formulado sobre la atracción de polinizadores en flor arándano. (Efecto en polinización). La formulación tecnológica con una concentración de 109 UFC/g será suspendida en un volumen de 10L a una concentración 5% (p/v). Se aplicará vía foliar con nebulizadora, cuya aplicación será de 1500 L/ha de solución. La superficie total se dividirá en dos sectores, un sector tratado con el formulado tecnológico y otro sector control. En cuanto a la aplicación, se efectuará una primera aplicación del formulado biotecnológico en dosis de 7 L/ha en estado fenológico de botón hinchado y una repetición 2 días después con la misma cantidad de producto. La evaluación del ensayo consistirá en determinar el número de visitas de los insectos a las flores, calibre de los frutos, producción de frutos, rendimiento por hectárea. Se calcularán pruebas estadísticas para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Para evaluar la polinización, se ocuparán *Bombus terrestris* y se instalará una familia de esta especie en cada sector. Además, para evaluar objetivamente las veces que los insectos se acercarán a las flores, se instalará una cámara vigilante para realizar el recuento. Se medirá el efecto de la polinización en el calibre del fruto. Para esto se tomarán 50 frutos en cada tratamiento señalado ya sea, tratado con producto tecnológico o control y se medirán de acuerdo al protocolo de exportación señaladas por el Comité de Arándano. Las pruebas se realizarán desde el inicio del período de floración hasta que finalice este período, el que en general alcanza a los 45 días, pero con el cambio climático observado e los últimos años, ésta ha presentado algunas variaciones tendientes a prolongarse en los últimos años. El ensayo se realizará en cada variedad señalada anteriormente desde las plantaciones de 2016. Los datos se vaciarán a una planilla tipo. Se realizarán tres repeticiones.

Efecto protector de aplicaciones foliares del producto biotecnológico formulado frente a enfermedades de la madera o tallo del arándano. La formulación tecnológica con una concentración de 109 UFC/g será suspendida en un volumen de 10L a una concentración 5% (p/v). Se aplicará vía foliar con nebulizadora, cuya aplicación será de 1500 L/ha de solución. La superficie total se dividirá en dos sectores, un sector tratado con el formulado tecnológico y otro sector control. En cuanto a la aplicación, se efectuará una primera aplicación del formulado biotecnológico en dosis de 7 L/ha en estado fenológico de botón hinchado y una repetición 2 días después con la misma cantidad de producto. La evaluación del ensayo consistirá en evaluar el efecto protector del preparado biotecnológico en la aparición de tallos enfermos. Primeramente se comparará el efecto del producto biotecnológico en plantas enfermas y vecinas durante la etapa previa a la caída de hojas y poda, así como en plantas que presenten yemas hinchadas en primavera en relación a un fungicida/bactericida comercial compuesto por: quitosano 1.8% p/v;

nitrógeno 0.5% p/v; ion cuprico 500 ppm y grupo control negativo. La aplicación de los distintos tratamientos se efectuará en T1, una vez y en T2 por 3 veces. Además se evaluará y comparará el efecto del producto probiótico en plantas enfermas y vecinas durante la etapa de caída de hojas y en plantas con yemas hinchadas en primavera en relación al producto Cuprodul (Oxido Cuproso 600g/Kg). La aplicación de los distintos tratamientos se efectuará en T1, una vez y en T2 por tres veces.

En cuanto a la **evaluación de los efectos de todos los tratamientos**, se debe tener en cuenta que el control fitosanitario de estas enfermedades, constará de varias etapas. "Los primeros síntomas se detectan generalmente en el verano, momento en que se debe dimensionar y cuantificar la magnitud del ataque. Se debe marcar de alguna forma la planta para tener una idea del grado de evolución de la enfermedad. La respuesta de si el control es efectivo o no la tendremos la temporada siguiente, cuando se realice nuevamente el recuento de las plantas enfermas. La evaluación en terreno consistirá en hacer recuentos de ramillas infectadas durante el verano. Los parámetros de evaluación a considerar serán:

Calidad del fruto. Se evaluará la calidad del fruto obtenido y tratado con el producto biotecnológico en relación a la aplicación de métodos de fertilización foliar convencional por aspersión, en parámetros productivos de relevancia para la industria:

a. **Evaluación de calibre.** En una primera instancia se comparará el efecto del fertilizante A compuesto por: quitosano 1.8% p/v; quitina 0.2% p/v; ión Calcio 1.2% p/v; Ion Potasio 1.0% p/v; Magnesio 0.6% p/v; Fósforo 1.8% p/v; nitrógeno 14.0% p/v, durante inicio de brotación, repitiendo la aplicación durante la cuaja del fruto. Y un fertilizante B, Solubor + BasfoliarKelp SL (Dosis PC/ha-Kg/L: 0,6 - 0,75 1,5 - 2), aplicado durante el inicio de floración a plena floración por aspersión. La evaluación del efecto del productotecnológico y tratamientos convencionales, se efectuará tomando 50 frutos en cada caso, midiendo diámetro de los frutos de acuerdo a Protocolo de Exportación.

b. **Evaluación de firmeza.** Se comparará el efecto del fertilizante A, compuesto por quitosano 1.8% p/v; quitina 0.2% p/v; ión Calcio 1.2% p/v; Ion Potasio 1.0% p/v; Magnesio 0.6% p/v; Fósforo 1.8% p/v; nitrógeno 14.0% p/v, durante inicio de brotación, repitiendo la aplicación durante la cuaja del fruto. Y un fertilizante B Defender calcio (378 g/ha/aplicación; 2 Lt/ha), aplicado durante el inicio de floración a plena floración por aspersión. La evaluación del efecto del producto tecnológico y tratamientos convencionales, se efectuará tomando 50 frutos en cada caso, midiendo resistencia a presión por medio de un presionómetro en una muestra estadísticamente representativa, durante la etapa de cosecha.

c. **Evaluación de peso.** Se comparará el efecto del fertilizante A, compuesto por quitosano 1.8% p/v; quitina 0.2% p/v; ión Calcio 1.2% p/v; Ion Potasio 1.0% p/v; Magnesio 0.6% p/v; Fósforo 1.8% p/v; nitrógeno 14.0% p/v, durante inicio de brotación, repitiendo la aplicación durante la cuaja del fruto. Y un fertilizante B, BORO CAL (143 g/ha), aplicado durante el inicio de floración a plena floración por aspersión. La evaluación del efecto del producto tecnológico y tratamientos convencionales, se efectuará tomando 50 frutos en cada caso, determinando el peso en gramos y promedios en una muestra estadísticamente representativa, durante la etapa de cosecha.

d. **Evaluación de sólidos solubles totales.** Se comparará el efecto del fertilizante A, compuesto por quitosano 1.8% p/v; quitina 0.2% p/v; ión Calcio 1.2% p/v; Ion Potasio 1.0% p/v; Magnesio 0.6% p/v; Fósforo 1.8% p/v; nitrógeno 14.0% p/v, durante inicio de brotación, repitiendo

la aplicación durante la cuaja del fruto. Y un fertilizante B, DEFENDER CALCIO (378 g/ha/aplicación; 2 Lt/ha), aplicado durante el inicio de floración a plena floración por aspersión. La evaluación del efecto del producto tecnológico y tratamientos convencionales, se efectuará tomando 50 frutos en cada caso, determinando el Contenido de Sólidos solubles totales en una muestra estadísticamente representativa, durante la etapa de cosecha. Se considera la evaluación de un Especialista Fitopatólogo para definir las plantas a tratar y a evaluar (dos veces, en diciembre 2016 y diciembre 2017).

Protección de Botrytis en campo. Se comparará el efecto protector del preparado biotecnológico sobre la acción patogénica de *Botrytis* en arándano, en relación al producto comercial fungicida/bactericida compuesto por: quitosano 1.8% p/v; nitrógeno 0.5% p/v; ion cuprico 500 ppm cuya aplicación se realizará al inicio de la floración y a los 15 días. El efecto del preparado biotecnológico será también comparado con otros fungicidas cuyas alternativas son: cyprodinil&fludioxonil, fludioxonil, fenhexamid, iprodione y boscalid. La aplicación de los tratamientos en este caso, se efectuará de acuerdo a indicaciones de la Plataforma de apoyo para la toma de decisiones para el control de *Botrytis* del Comité de Arándanos o cada vez que llueva durante floración y se den las condiciones para ataque (Temperaturas altas y falta de ventilación); y durante Fruto pintón a maduro. Se realizarán tres repeticiones de este ensayo.

La evaluación en laboratorio se llevará a cabo llevando muestras de frutos tratados con los diferentes productos y evaluando la presencia de *Botrytis*. Una parte de la muestra será destinada a evaluar la presencia de *Botrytis* endógena, para ello los frutos serán desinfectados con solución de hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos, luego de los cuales serán sacados mediante un colador y serán enjuagados 3 veces con agua estéril para posteriormente ser distribuidos en placas petri y depositadas éstas en cámaras húmedas. Las muestras se mantendrán en incubación a 23°C por 10 días, una vez cumplido ese periodo, se evaluará la presencia del hongo en los frutos tratados previamente con producto tecnológico o comercial. La evaluación se realizará, contando las bayas focos de infección y el total de bayas infectadas. Se considerará bayas infectadas aquellas que presenten conidióforos y conidias características del fitopatógeno, según protocolo de experto.

Protección de Botrytis durante almacenamiento. Se evaluará la protección post cosecha de frutos almacenados a diferentes temperaturas y tratados con producto tecnológico en relación a técnicas convencionales. Para esto, frutos serán recolectados y sometidos a los tratamientos definidos como: a) frutos almacenados a 0, 10 y 25°C; b) frutos almacenados a 0, 10 y 25°C y tratados con ozono; c) frutos almacenados a 0, 10 y 25°C y tratados con producto biotecnológico. La evaluación del efecto protector conferido por cada tratamiento se realizará a tiempo 0, 15 y 35 días, comparando peso, calibre, firmeza y sólidos solubles totales, según metodología descrita anteriormente. Las pruebas se harán en triplicado.

Mejora en condiciones del suelo. Se evaluará la mejora en el suelo tratado con el producto biotecnológico en relación a la aplicación de productos convencionales, en la calidad de las raíces mediante aplicación por goteo. Se comparará el efecto del fertilizante A, compuesto por quitosano 1.8% p/v; quitina 0.2% p/v; ión Calcio 1.2% p/v; Ion Potasio 1.0% p/v; Magnesio 0.6% p/v; Fósforo 1.8% p/v; nitrógeno 14.0% p/v, durante el Inicio brotación y se repite cuaja fruto. Y un fertilizante compuesto por Urea, Fósforo y Potasio, Aplicación de Ácido Fosfórico, de acuerdo a indicación de Nutriólogo y análisis de suelo previo a temporada, con aplicación diaria durante la fertilización. Se evaluará la calidad de las raíces en una muestra estadísticamente representativa, considerando pérdida de raíces en las plantas, cantidad de humedad, presencia de larvas, insectos o nematodos, concentración de sales, temperatura en las raíces, perfil de nutrientes, nivel de acidificación, según protocolo aportado por experto. Los ensayos se realizarán en triplicado.

Mejoras en nutrición. Se evaluará la mejora en el estado nutricional de plantas y frutos tratados con el producto biotecnológico en relación a la aplicación de productos convencionales. Para esto se comparará el efecto del fertilizante A, compuesto por quitosano 1.8% p/v; quitina 0.2% p/v; ión Calcio 1.2% p/v; Ion Potasio 1.0% p/v; Magnesio 0.6% p/v; Fósforo 1.8% p/v; nitrógeno 14.0% p/v, durante el Inicio brotación y se repite cuaja fruto. Y un fertilizante compuesto por Urea, Fósforo y Potasio, Aplicación de Ácido Fosfórico, de acuerdo a indicación de Nutriólogo y análisis de suelo previo a temporada, con aplicación diaria durante la fertilización. Se realizará análisis foliar, en Febrero, en laboratorio especializado. Las muestras se tomarán de acuerdo a indicaciones del Laboratorio. Luego se comparará con tablas de referencia, donde se considera % de frutos inmaduros, falta de Bloom (<33%), bajo calibre (<10%), restos florales, cicatrices – Russet (hasta 10% de superficie), restos de pedicelo, pudrición (piel suelta), deshidratada. El suelo se evaluará el contenido de Minerales, macro y micro elementos durante febrero para el caso de las muestras filiales y durante cosecha para el caso de los frutos.

Costo/beneficio. desconocemos los costos reales productivos por Hectárea o Ton de fruta ya que dependen desde el regadío hasta plagas endémicas del lugar a explotar. Así, en el marco de este proyecto, se llevará una bitácora de registros con sus planillas que apoyen el cálculo del costo de la implementación del proyecto. Realizar una proyección, sin disponer de al menos algunos ensayos experimentales, ya que se debe recordar que no existen antecedentes previos. De esta forma, finalizado al menos el primer año, se podrá estimar el precio tentativo del producto mano de obra por hectárea, equipamiento, veces de aplicación por temporada. Así, se determinará el valor que genera el uso del producto: relación costo beneficio, es decir, el costo del producto y aplicación versus la producción que genera en cuanto a cantidad y calidad de fruta. Se ha incorporado un hito a abril de 2017, donde se incorporará obtener este modelo de costo - beneficio. Ver Tabla de Hitos críticos para la iniciativa (Punto 2.4).

En los análisis revisados, una hipótesis es que si en promedio asumimos una pérdida (entre menor porcentaje de exportación y rechazos pre embarque) del 20%, esto significa 16.560 toneladas (considerando las cifras producidas en la temporada 2010-11). Esto involucra a la industria frutícola una pérdida de unos 82,8 millones de dólares. Si se asume que el 60% de la producción que hoy no es exportada por problema de pudriciones, con el resultado de este proyecto se podrán exportar 9.936 toneladas más, mejorando así la competitividad del productor y de las empresas exportadoras. El monto involucrado en ese volumen de toneladas corresponde a aproximadamente 49,7 millones de dólares.

De ahí, que se ha incluido un hito crítico de estimación de costos/beneficios del potencial producto a abril de 2017.

Método objetivo 4: Diseñar las bases del modelo de escalamiento y de transferencia del proceso

Patentamiento, transferencia tecnológica y difusión de resultados. Esta etapa se contempla difundir los resultados y proyecciones obtenidas durante el periodo de investigación en una gira tecnológica. Por otra parte, se presupone la protección de los resultados a través una patente de invención. De acuerdo a la búsqueda podría ser un secreto industrial. Se proyecta en esta etapa publicar un artículo en una revista científica. De acuerdo a los hallazgos y desarrollo científico tecnológico obtenido, se procederá a diseñar las bases modelo de empaquetamiento del prototipo obtenido a través del desarrollo de un paquete tecnológico, donde la primera prioridad la ocupa la empresa asociada participante.

- 2.5.2. Describa las metodologías y actividades iniciativas para difundir los resultados (intermedios y finales) del proyecto a los actores vinculados a la temática de la iniciativa, identificando el perfil, tipo de actividad, lugares y fechas. (Incluir las actividades a realizar en la carta GANTT de la iniciativa).

Este proyecto contempla fundamentalmente actividades de difusión situadas en el último semestre del proyecto. Como las expectativas de patentamiento son altas, se mantendrán los resguardos. Además de la realización de tres días de campo en los cuales se mostrará a productores del rubro, los resultados obtenidos durante el desarrollo de nuestro proyecto y demostrar el beneficio de la utilización del producto que desarrollaremos. El seminario de cierre será una instancia para difundir los resultados obtenidos en este proyecto y se tiene proyectado para el mes 35 de la ejecución.

Para los días de campo, se organizará una actividad en terreno, donde tanto desde la empresa como desde la universidad se realizarán invitaciones tanto a productores del rubro, autoridades de entidades de control agropecuario y de FIA. Se contempla la difusión de resultados técnicos y visita en terreno de evidencias que van observando respecto a la temática del proyecto: calidad de las plantaciones, calidad del fruto cuando corresponda.

Estas actividades se contemplan con una duración de cuatro horas promedio y a realizarse en dependencias del predio de la empresaria o lugar cercano. Es deseable que en el día de campo 2, pueda asistir un experto invitado que pueda socializar sobre los avances en el cultivo y manejo del arándano. Se espera una asistencia mínima de veinte personas en cada evento.

Por otra parte, en el marco de este proyecto se desarrollarán dos capacitaciones. La primera, contempla el modelamiento de ensayos para evaluar la respuesta a la aplicación de nuevos productos, en un curso de 21 horas pedagógicas, dirigido por el Sr. Ernesto Moya Elizondo Ph.D., M.Cv., Ing. Agrónomo; Profesor Asistente; Departamento de Producción Vegetal; Facultad de Agronomía; Universidad de Concepción, experto en fitopatógenos, con una vasta experiencia en el área, colaborando y dirigiendo proyectos de investigación, innovación y transferencia, en el área del manejo integrado de enfermedades en cultivos y frutales, así como biocontroladores. La fecha estimada es realizarla durante el mes ocho del proyecto. Previo a la segunda aplicación del producto probiótico.

La segunda capacitación, estará a cargo del Dr. Moya, acompañado del Sr. Jaime Auger S., MS. PhD, Ingeniero agrónomo de la Universidad de Chile, quien posee numerosas publicaciones científicas relacionadas a los fitopatógenos y a cultivo de arándanos. Ésta capacitación se centrará en "Variables fitosanitarias críticas en el cultivo de los arándanos", la que tiene por objetivo aplicar el conocimiento adquirido en los estudios finales de prueba del producto, por ello, se estima conveniente realizar ésta capacitación el mes 20 del proyecto, de acuerdo a las fechas comprometidas para el logro de los hitos del proyecto.

Respecto al seminario de cierre, se contempla una actividad más bien de tipo académico en uno de los auditorium de la USS. Se espera despliegue periodístico, asistencia de autoridades académicas, de FIA, productores. Se proyecta realizarla unas semanas antes del cierre del proyecto, con dos horas de duración, donde la Dirección del proyecto mostrará los logros alcanzados con el desarrollo de este proyecto.

2.6. Carta Gantt

Indicar la secuencia cronológica para el desarrollo de las actividades señaladas anteriormente de acuerdo a la siguiente tabla:

OE	Nº RE	Actividades	Año 2016											
			Trimestre											
			Ene-Mar			Abr-Jun			Jul-Sep			Oct-Dic		
1	1	Adherencia de las cepas lácticas.				X	X	X						
		Pruebas de Tolerancia				X	X	X						
2	2	Pruebas de antagonismo y antibacterianas			X	X	X	X						
		Producción cuantitativa de ácido láctico				X	X							
		Producción de peróxido de hidrógeno				X	X							
		Naturaleza de la sustancia inhibitoria.				X	X	X						
3	3	Identificación genética de las cepas seleccionadas.					X	X						
		Pruebas de susceptibilidad antibiótica					X	X						
2	1	Diseño del proceso productivo de biomasa de las cepas probióticas seleccionadas a escala de laboratorio.					X	X	X	X	X	X	X	X
		Desarrollo de un proceso de fabricación del preparado en polvo.										X	X	X
		Evaluación de la viabilidad del prototipo formulado.										X	X	X
3	3	Evaluación in vivo del potencial de acción del formulado probiótico sobre aspectos productivos y fitosanitarios del arándano.										X	X	X
		Efectividad de aplicaciones foliares del producto biotecnológico formulado sobre la atracción de abejas en flor arándano.										X	X	X
3	3	Capacitación "Modelamiento de ensayos para evaluar la respuesta a la aplicación de nuevos productos"										X		
		Días de Campo												X

N° OE	N° RE	Actividades	Año 2017											
			Trimestre											
			Ene-Mar			Abr-Jun			Jul-Sep			Oct-Dic		
2	1	Diseño del proceso productivo de biomasa de las cepas probióticas seleccionadas a escala de laboratorio.	X	X										
2	2	Desarrollo de un proceso de fabricación del preparado en polvo.	X	X	X	X	X	X	X	X				
2	2	Evaluación de la viabilidad del prototipo formulado.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	3	Evaluación in vivo del potencial de acción del formulado probiótico sobre aspectos productivos y fitosanitarios del arándano.	X	X	X	X	X	X	X	X				
3	1	Efectividad de aplicaciones foliares del producto biotecnológico formulado sobre la atracción de abejas en flor arándano.										X	X	X
	2	Capacitación "Variables fitosanitarias críticas en el cultivo de los arándanos"										X		

Nº OE	Nº RE	Actividades	Año 2018														
			Trimestre														
			Ene-Mar			Abr-Jun			Jul-Sep			Oct-Dic					
2	2	Evaluación de la viabilidad del prototipo formulado.	X	X													
3	1	Efectividad de aplicaciones foliares del producto biotecnológico formulado sobre la atracción de abejas en flor arándano.										X	X	X			
	2	Evaluación in situ del formulado tecnológico final sobre cultivo de arándano.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	3	Protección de frutos post-cosecha.	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
4	1	Patentamiento.													X	X	
	2	Difusión de resultados, seminario de cierre y publicación.													X	X	
	3	Modelo de negocios y gira tecnológica												X	X	X	
	3	Días de Campo			X												

N° OE	N° RE	Actividades	Año 2019											
			Trimestre											
			Ene-Mar			Abr-Jun			Jul-Sep			Oct-Dic		
	2	Evaluación in situ del formulado tecnológico final sobre cultivo de arándano.	X	X										
4	1	Patentamiento.	X	X										
	2	Difusión de resultados, seminario de cierre y publicación.	X	X										
	3	Modelo de negocios y gira tecnológica	X	X										
	3	Días de Campo	X											

2.7. Modelo de transferencia y propiedad intelectual

Describa el modelo que permitirá transferir los resultados a los beneficiarios y la sostenibilidad de la iniciativa en el tiempo.

2.6.1. Modelo de transferencia

Describa la forma en que los resultados se transferirán a los beneficiarios. Para ello responda las siguientes preguntas orientadoras: ¿quiénes son los clientes, beneficiarios?, ¿quiénes la realizarán?, ¿cómo evalúa su efectividad?, ¿cómo se asegurará que los resultados esperados se transformen en beneficios concretos para los beneficiarios identificados?, ¿cómo se financiará en el largo plazo la innovación?, ¿con qué mecanismos se financiará el costo de mantención del bien/servicio público una vez finalizado el proyecto?

Los clientes beneficiarios del nuevo producto probiótico serán productores de arándanos a nivel nacional. El arándano es cultivo importante en Chile, ya que nuestro país exporta a contra estación a los exigentes mercados de Estados Unidos y Europa. No obstante lo anterior, cada vez más se enfrenta a las amenazas de emergentes competidores que llegan con productos altamente competitivos a los mercados internacionales. Tal panorama debe llevar a la industria nacional a replantearse sus estrategias y apostar fuertemente en tecnologías que permitan innovar y aumentar el valor agregado de las materias primas, de forma de asegurar los retornos económicos a toda la cadena productiva.

Es por ello que el presente proyecto propone desarrollar mediante procesos biotecnológicos un producto natural basado en cepas lácticas aisladas de abejas silvestres y entorno que fortalezca la industria frutícola del cultivo de arándanos, incrementando la tasa de polinización de los cultivos, previniendo enfermedades en la planta y frutos, asegurando una mayor calidad y estabilidad post cosecha de este berries, líder en el rubro frutícola nacional.

Para realizar una efectiva transferencia tecnológica la Universidad San Sebastián protegerá la innovación mediante la presentación de una patente de invención, 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 de los resultados del proyecto se podrá realizar mediante la venta o licenciamientos *knowhow* 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.

2.6.2. Protección de los resultados

Tiene previsto proteger los resultados derivados de la iniciativa (patentes, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, marca registrada, marcas colectivas o de certificación, denominación de origen, indicación geográfica, derecho de autor o registro de variedad vegetal).

(Marque con una X)

SI	<input checked="" type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
----	-------------------------------------	----	--------------------------

De ser factible, señale el o los mecanismos que tienen previstos y su justificación.
(Máximo 2.000 caracteres)

Como estrategia de protección de los resultados se tiene previsto, redactar y enviar una solicitud de patente de invención del producto obtenido con el desarrollo de este proyecto, esta solicitud será enviada al Instituto Nacional de Propiedad Industrial –INAPI. Se analizará mediante un estudio de patentabilidad la viabilidad de proteger los productos generados. Se espera patentar el nuevo proceso biotecnológico para la obtención de un producto natural basado en cepas lácticas aisladas de abejas silvestres y/o bosque nativo para fortalecer la industria frutícola del cultivo de arándanos. La Universidad San Sebastián, específicamente la Dirección General de Investigación será la encargada de apoyar en la gestión y tramitación de la solicitud a INAPI, para la obtención de la patente de invención. Luego del proceso de patentamiento se espera transferir la tecnología a empresas interesadas. Los mecanismos más comunes para ello son: venta o cesión de derechos de propiedad intelectual, concesión de licencias, contratos sobre conocimientos técnicos o *KnowHow*, alianzas estratégicas, empresa conjunta o *jointventures*, proyectos llave en mano, o acuerdos sobre consultorías. Una vez comenzado el proceso de patentamiento se analizará la mejor alternativa para realizar una efectiva transferencia tecnológica.

2.8. Potencial impacto

A continuación describa los potenciales impactos y/o beneficios productivos, económicos, comerciales, sociales y medio ambientales que se generarían con la realización de la iniciativa y/o sus resultados posteriores.

2.8.1. Identifique los beneficiarios actuales y potenciales de la ejecución de la iniciativa. (Máximo 3.000 caracteres)

Los beneficiarios actuales del nuevo producto probiótico serán los productores de arándanos a nivel nacional. La superficie total plantada de arándanos es de 13.016 hectáreas (Odepa-Cirén, 2012), la producción temporada 2012 fue de 102.200 toneladas, teniendo como rendimiento promedio: 7,8 ton/hectárea. Durante la temporada 2012, los volúmenes exportados de arándanos alcanzaron las 86.700 toneladas, Chile es actualmente el primer exportador mundial de arándanos frescos, con una participación del 30,9% del mercado mundial.

La Región del Biobío posee 4.280,2 hectáreas de arándano, lo que representa el 30 % de la superficie nacional, la que alcanza las 14.505,9 hectáreas, lo que la sitúa como la región con mayor superficie a nivel nacional, lo que permite aprovechar las oportunidades que presenta el mercado de los berries. Los beneficiarios potenciales de la propuesta son todos los productores de cultivos de berries a nivel nacional. Chile es el principal exportador de berries del hemisferio sur, en volumen y valor, y el quinto en volumen exportado a nivel mundial. En la última década, sus exportaciones han crecido sostenidamente, tanto en valor como en volumen, siendo los principales destinos EE.UU., Canadá y algunos países de Europa. En 2012, el total exportado de berries fue de 139.323 toneladas, con un valor de 550 millones de dólares. Esto incluye arándanos, frambuesas, frutillas, moras, zarzaparrillas, grosellas, murtas, mirtilos y otros. El 70% se exporta como congelado, mientras que el 20% se exporta en fresco y el 10% restante como jugo. En este contexto se puede indicar que la presente propuesta proyecta un impacto positivo en la industria de los berries mejorando la competitividad del sector

2.8.2. Replicabilidad

Señale la posibilidad de que se realicen experiencias similares en el mismo territorio u otras zonas del país, a partir de los resultados e información que se genere en la iniciativa. (Máximo 3.000 caracteres)

Los potenciales impactos y/o beneficios por el uso de nuevo producto natural basado en cepas lácticas aisladas de abejas silvestres y entorno que fortalezca la industria frutícola del cultivo de arándanos, podrán replicarse en todas las hectáreas de cultivos de arándanos a nivel nacional. Así, la replicabilidad de este proyecto, es transferible incluso a otras áreas hortofrutícolas.

2.8.3. Desarrollo de nuevas capacidades y fortalecimiento de potencialidades locales.

Describa cómo el desarrollo de la iniciativa potenciará el capital humano, infraestructura, equipamiento y actividad económica local. (Máximo 3.000 caracteres)

Dentro de los desafíos de la industria del arándano es mantener y acrecentar la posición de liderazgo con la que cuenta actualmente, además de mejorar y aumentar los programas de desarrollo científicotecnológico a fin de aumentar la eficiencia y programas de capacitación para mejorar la productividad de la mano de obra de la economía local.

Con el resultado de este proyecto se espera contribuir a mejorar la competitividad de la industria de los arándanos, poniendo a disposición un nuevo producto probiótico que permita incrementar la tasa de polinización de los cultivos de arándanos, con ello potenciando y fortaleciendo la economía de las localidades cercanas a los cultivos, incrementando la productividad de los cultivos y por consecuencia sus ingresos y las ventas de sus productos.

Por otra parte, con la estrategia del fortalecer el desarrollo de la investigación aplicada en la universidad y una vinculación estrecha con la empresa, se espera generar con el desarrollo de este proyecto un empaquetamiento tecnológico efectivo, como el que se está llevando a cabo en el marco de un proyecto concursado a Proyectos de Vinculación Ciencia Empresa FIC Regional "Desarrollo de un modelo de vinculación científica con el sector empresarial agroalimentario ganadero-lechero del Biobío para abordar la problemática sanitaria ganadera mediante la implementación de innovaciones y soluciones biotecnológicas".

2.8.4. En función de los puntos señalados anteriormente describa:

Potenciales impactos y/o beneficios productivos, económicos y comerciales que se generarían con la realización de la iniciativa

Los potenciales impactos y/o beneficios a nivel productivo, económicos y comerciales para los productores de arándanos serán el incrementando de la tasa de polinización de los cultivos, prevención de enfermedades en la planta y frutos e incremento en la calidad y estabilidad post cosecha de los arándanos. Estos beneficios impactarán positivamente a los productores incrementado sus ingresos económicos y contribuyendo al aumento de las ventas de sus productos. Por otra parte, al emplear tecnología limpia en el sistema productivo, no sólo es una estrategia comercial sino que también económica. Cada actividad productiva que se realice empleando menos tóxicos o productos que generen residuos, está demostrado que aumentan la productividad y traen ventajas económicas a la empresa, ya que generan un valor agregado que es bien valorado en los mercados internacionales.

2.8.5. Potenciales impactos y/o beneficios sociales que se generarían con la realización de la iniciativa

Los potenciales impactos y/o beneficios a nivel social serán el incremento de las exportaciones de arándanos chilenos en el mercado internacional, por consecuencia incremento en los ingresos por exportaciones a nivel país. También mejorará la calidad de los productos exportados, contribuyendo a la imagen de productos agroalimentarios a nivel internacional.

Por otra parte al incrementar la productividad incrementa también la necesidad de recurso humano en esta cadena de valor, ya que se requiere mayor mano de obra en los procesos de cultivo y cosecha. Es una oportunidad de emprendimiento social a través de la institución de cooperativas.

Por otra parte, el empleo de tecnologías innovadoras como el empleo de probióticos, tienen un impacto en el consumidor y trabajador. El trabajo a nivel mundial para la mujer se concentra en la agricultura y en el sector servicios y existe evidencia que la incidencia de lesiones y enfermedades es muy alta, asociada con la exposición a los pesticidas, agroquímicos, manejo de animales y el contacto con plantas peligrosas. De ahí que el empleo de la tecnología propuesta no debiera de impactar negativamente sobre la salud de las personas

2.8.6. Potenciales impactos y/o beneficios medio ambientales que se generarían con la realización de la iniciativa

Dentro de los beneficios medioambientales sin duda está que al emplear bacterias lácticas, estas son amigables con el entorno. De hecho en la última década han comenzado a tener un uso interesante en la biorremediación de suelos. Se espera entonces que el empleo de este producto mejore la calidad del suelo, entre a la cadena trófica en forma amigable, sin impacto medioambiental negativo. Así, el empleo de polen comercial por hectárea se vea reducido al mejorar la polinización

2.9. Indicadores de impacto

De acuerdo a lo señalado en la sección anterior, describa el o los indicadores a medir en la iniciativa y señale para el indicador seleccionado, lo que específicamente se medirá en la iniciativa.

Clasificación del indicador	Descripción del indicador	Fórmula del indicador	Línea base del indicador ¹²	Meta del indicador al término de la iniciativa ¹³	Meta del indicador a los 2 años de finalizado la iniciativa ¹⁴
Productivos	Rendimiento del cultivo de arándanos por ha	Ton/ha	7,8	8,0	8,5

¹²La línea base consiste en la descripción detallada del área de influencia de un proyecto o actividad, en forma previa a su ejecución. Completar con el valor que tiene el indicador al inicio de la iniciativa.

¹³Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar, al final de la iniciativa.

¹⁴Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar, al cabo de 2 años de finalizado la iniciativa.

Productivos	Pérdidas por temporada productiva	% pérdida / temporada	20	12	8
Productivos	Costo por ton producida	Costo x ton/ton producida	U\$1.50	U\$1.20	U\$1.10
Económicos y comerciales	Ingresos anuales por venta de arándanos	MUS\$/Ton	39	41	43
Sociales	Nº de hectáreas de cultivos de arándanos impactadas	Nº ha	0	10	55
Medio ambientales	Índice de polinización	Nº flores visitadas por polinizadores x minuto una vez a la semana/período floración arándano.	3	5	6

3. Costos totales consolidados

3.1. Estructura de financiamiento.

3.2. Costos totales consolidados.

4. Anexos

Anexo 1. Ficha identificación del postulante ejecutor

Nombre completo o razón social	Universidad San Sebastián	
Giro / Actividad	Educación	
RUT		
Tipo de organización	Empresas	
	Personas naturales	
	Universidades	X
	Otras (especificar)	
Banco y número de cuenta corriente del postulante ejecutor para depósito de aportes FIA		
Ventas en el mercado nacional, último año tributario (UF)		
Exportaciones, último año tributario (US\$)		
Número total de trabajadores		
Usuario INDAP (sí / no)		
Dirección postal (calle, comuna, ciudad, provincia, región)		
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Dirección Web	www.uss.cl	
Nombre completo representante legal	Hugo Sebastián Lavados Montes	
RUT del representante legal		
Profesión del representante legal	Ingeniero Comercial	
Cargo o actividad que desarrolla el representante legal en la organización postulante	Rector	
Firma representante legal		



Anexo 2. Ficha identificación de los asociados. Esta ficha debe ser llenada para cada uno de los asociados al proyecto.

Nombre completo o razón social	Berberries SpA	
Giro / Actividad	Agroindustria y exportaciones	
RUT		
Tipo de organización	Empresas	X
	Personas naturales	
	Universidades	
	Otras (especificar)	
Ventas en el mercado nacional, último año tributario (UF)		
Exportaciones, último año tributario (US\$)		
Número total de trabajadores		
Usuario INDAP (sí / no)		
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)		
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Dirección Web		
Nombre completo representante legal	Marcela Jofré Miranda	
RUT del representante legal		
Cargo o actividad que desarrolla el representante legal en la organización postulante		
Firma representante legal		



Anexo 3. Ficha identificación coordinador y equipo técnico. Esta ficha debe ser llenada por el coordinador y por cada uno de los profesionales del equipo técnico.

Nombre completo	Erica Eliana de Lourdes Castro Inostroza
RUT	
Profesión	Matrona, Doctora en Microbiología.
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Universidad San Sebastián
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Directora Simulación Clínica. Vicerrectoría de Campos Clínicos.
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Nombre completo	Patricio Oyarzun Cayo
RUT	
Profesión	Bioquímico
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Universidad San Sebastián
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Coordinador de Investigación Sede Concepción Profesor asociado Escuela de Ing. en Biotecnología
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	



Nombre completo	Jaime Cofre Rubilar
RUT	
Profesión	Biólogo marino
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

9



Nombre completo	María José Aguayo Acuña
RUT	
Profesión	Biólogo
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	





Nombre completo	Juan Pablo Mellado Leiva
RUT	
Profesión	Médico veterinario
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

9

Nombre completo	Ronald Enrique Gajardo Alarcón
RUT	
Profesión	Ingeniero Civil en Biotecnología
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Nombre completo	José Luis Daroch Neira
RUT	
Profesión	Ingeniero civil Químico
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	



Nombre completo	Pedro Felipe Alarcón Zapata
RUT	
Profesión	Bioquímico
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

II. Detalle administrativo (Completado por FIA)

- Los Costos Totales de la Iniciativa serán (\$):

Costo total de la Iniciativa		
Aporte FIA		
Aporte Contraparte	Pecuniario	
	No Pecuniario	
	Total Contraparte	

- Período de ejecución.

Período ejecución	
Fecha inicio:	01 de marzo de 2016
Fecha término:	28 de febrero de 2019
Duración (meses)	36

- Calendario de Desembolsos

Nº	Fecha	Requisito	Observación	Monto (\$)
1		Firma contrato		
2	03.01.2017	Aprobación de Informes Técnico y Financiero N°1		
3	26.05.2017	Aprobación de Informes Técnico y Financiero N°2		
4	03.01.2018	Aprobación de Informes Técnico y Financiero N°3		
5	25.05.2018	Aprobación de Informes Técnico y Financiero N°4		
6	03.01.2019	Aprobación de Informes Técnico y Financiero N°5		
7	31.05.2019	Aprobación de Informes Técnico y Financiero Finales	hasta*	
	Total			

(*). El informe financiero final debe justificar el gasto de este aporte



- Calendario de entrega de informes

Informes Técnicos	
Informe Técnico de Avance 1:	16.09.2016
Informe Técnico de Avance 2:	10.03.2017
Informe Técnico de Avance 3:	15.09.2017
Informe Técnico de Avance 4:	09.03.2018
Informe Técnico de Avance 5:	14.09.2018



Informes Financieros	
Informe Financiero de Avance 1:	16.09.2016
Informe Financiero de Avance 2:	10.03.2017
Informe Financiero de Avance 3:	15.09.2017
Informe Financiero de Avance 4:	09.03.2018
Informe Financiero de Avance 5:	14.09.2018



Informe Técnico Final:	08.03.2019
Informe Financiero Final:	08.03.2019



- Además, se deberá declarar en el Sistema de Declaración de Gastos en Línea los gastos correspondientes a cada mes, a más tardar al tercer día hábil del mes siguiente.