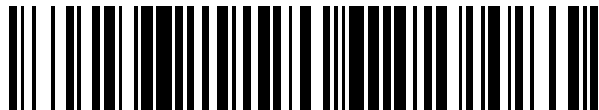


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 595**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

C12R 1/06 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2008 E 08743151 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 2150610**

54 Título: **Formulación de biofertilizante**

30 Prioridad:

21.04.2007 US 925444 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.10.2013

73 Titular/es:

**GIDEKEL, MANUEL (16.7%)
Carlos Dittborn 01045**

Temuco, CL;

GUTIERREZ, ANA (16.7%);

BARRIENTOS, LETICIA (16.7%);

CABRERA, GUSTAVO (16.7%);

BERRIOS, GRACIELA (16.7%) y

MIHOVILOVIC, IVAN (16.7%)

72 Inventor/es:

GIDEKEL, MANUEL;

GUTIERREZ, ANA;

BARRIENTOS, LETICIA;

CABRERA, GUSTAVO;

BERRIOS, GRACIELA y

MIHOVILOVIC, IVAN

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 427 595 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulación de biofertilizante

- 5 **PRIORIDAD:** Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos número 60/925,444 presentada el 21 de abril de 2007.

Campo de la invención

- 10 La presente invención se relaciona con biofertilizantes. Más específicamente, la presente invención se relaciona con los biofertilizantes que contienen microorganismos.

Descripción de la materia relacionada

- 15 El fósforo es uno de los principales macronutrientes necesarios en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Está presente en el suelo a niveles de 400 a 1200 mg kg⁻¹. Su ciclo en la biosfera se puede describir como sedimentario ya que no hay intercambio con la atmósfera. Los microorganismos juegan un papel central en el ciclo del fósforo. Este ciclo se lleva a cabo mediante la oxidación y una reducción cíclica en compuestos fosforados donde las reacciones de transferencia de electrones se producen entre los estados de oxidación de fosfinas (-3) a fosfatos (+5). La concentración de fósforo soluble en el suelo es normalmente muy baja, a niveles de 1 ppm o menos. Las células aceptan varias formas de fósforo pero la mayoría se absorbe en forma de HPO₄²⁻ o H₂PO₄.

- 20 El mecanismo principal para la solubilización de fosfato mineral es la acción de ácidos orgánicos sintetizados por microorganismos en el suelo. Esto causa la acidificación de la célula microbiana y sus alrededores. De esta manera, el fosfato inorgánico se puede liberar a partir del fosfato mineral por la sustitución de Ca²⁺.

- 25 Un número considerable de especies de bacterias, la mayoría asociadas con la rizosfera vegetal, son capaces de tener algún impacto beneficioso en el crecimiento vegetal. Por lo tanto, su uso como biofertilizantes, como agentes de control de otros organismos y en la mejora de la agricultura, ha sido objetivo de investigación por varios años. Sin embargo, la mayoría sino todos estos trabajos se concentran en la investigación de estos organismos en ambientes templados y/o tropicales y en gran parte en suelos alcalinos.

- 30 Se conoce que las bajas temperaturas afectan la captación de nutrientes y frecuentemente la deficiencia de fósforo es un resultado del estrés por bajas temperaturas. Las temperaturas frescas del suelo durante la temporada de crecimiento temprano son un factor que causa la deficiencia de fósforo en plantas de cultivo. El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las plantas necesitan fósforo para sintetizar ATP, azúcares y ácidos nucleicos. Las plantas que padecen de deficiencia de fósforo parecen ser débiles y desarrollan tarde. La deficiencia de fósforo además causa que las plantas sean propensas a diversos estreses bióticos.

- 35 El grupo se concentró en la investigación de plantas tolerantes a bajas temperaturas, especialmente de *Deschampsia antarctica* Desv. (Poacea). La *Deschampsia* es una planta altamente tolerante a las fuertes condiciones de congelación y es una de las dos especies de plantas vasculares que colonizaron naturalmente la Península Antártica Marítima. La fisiología y la genética de esta planta tolerante a la baja temperatura se caracterizaron en las solicitudes de patentes de los Estados Unidos US 11/120,351 y 11/639,474.

- 40 Nos interesamos en entender cómo esta planta tolerante a la baja temperatura es capaz de captar nutrientes para su crecimiento y desarrollo en temperaturas extremadamente bajas. La presente descripción se relaciona a las bacterias aisladas de la rizosfera de *Deschampsia antarctica*. Las bacterias de la rizosfera de *Deschampsia antarctica* son extremófilas, es decir organismos que requieren condiciones extremas para crecer y reproducirse. Estas bacterias son capaces de crecer y reproducirse en temperaturas alrededor de 0°C, por lo cual pueden definirse como bacterias psicófilas.

Sumario del invento

- 45 La invención de acuerdo con esta descripción resuelve un problema fundamental en la producción de plantas, que es su captación de agua y nutrientes (principalmente fósforo) cuando las plantas se estresan por las bajas temperaturas. La invención comprende formulaciones que contienen uno o más microorganismos capaces de solubilizar fósforo a bajas temperaturas, específicamente que comienzan a partir de 0°C. Estos microorganismos hacen posible que el fósforo presente en la roca fósforo, que normalmente no es usable por las plantas, esté biodisponible para su nutrición. Estas bacterias además contribuyen con compuestos químicos vitales para la planta, tales como agua y ácido indolacético, que es

una hormona reguladora del crecimiento de la planta. Ya que estas bacterias excretan compuestos sideróforos, estas protegen además las plantas contra el ataque de organismos fitopatogénicos.

Breve descripción de las figuras

- 5 Fig. 1. Cultivo de la cepa bacteriana DaBac2H aislada a partir de rizosfera de *Deschampsia antarctica* en una caja Petri.
- Fig. 2. Cultivo de la cepa bacteriana DaBac MII-9 aislada a partir de rizosfera de *Deschampsia antarctica* en una caja Petri.
- Fig. 3. Cultivo de la cepa bacteriana DaBacTI-8 aislada a partir de rizosfera de *Deschampsia antarctica* en una caja Petri.
- 10 Fig. 4. Ilustra la comparación del gen de ARNr 16S de la cepa DaBac TI-8 con el gen de ARNr 16S parcial de *Pseudomonas sp.* Nj-55.
- Fig. 5. Ilustra la comparación del gen de ARNr 16S de la cepa DaBac 2H con el gen de ARNr 16S parcial de la cepa *Pseudomonas trivialis* BIHB 749.
- Fig. 6. Ilustra la comparación del gen de ARNr 16S de la cepa DaBac MII-9 con el gen de ARNr 16S parcial de *Arthrobacter sp.* ON 14.
- 15 Fig. 7. Plantas de tomate inoculadas con A) biofertilizador bacteriano psicrófilico, B) biofertilizador comercial. C) Representa una planta control que se cultiva sin fertilizante. Las plantas se cultivan por 60 días en macetas bajo condiciones de invernadero.
- Fig. 8. Ilustra el efecto de la formulación bacteriana psicrófilica líquida en el desarrollo de las raíces y brotes de las plantas de tomate. Las plantas se recogieron del suelo 60 días después de plantadas. (A) La planta se cultiva con formulación bacteriana psicrófilica líquida. (B) La planta se cultiva con producto comercial. (C) La planta control se cultiva sin fertilizante.
- 20 Fig. 9. Semilla de tomate germinada tratada con 10⁹ CFU de formulación bacteriana psicrófilica que muestra una región de la raíz altamente desarrollada.
- Fig. 10. Ensayo de germinación de semillas de *Triticum aestivum* var Kumpa previamente desinfectadas con fungicidas comerciales e inoculada con biofertilizante bacteriano psicrófilico.

25 Descripción detallada de la invención

Se creó una colección de 70 cepas bacterianas a partir del suelo rizosférico de *Descampsia antarctica* durante los años 200-2005. Las cepas se mantienen a una temperatura de -80°C. Una evaluación de la colección mostró que el 70% de las bacterias eran psicrófilicas o tenían una temperatura de crecimiento óptima alrededor de 15°C. Además, todas ellas eran capaces de crecer a 4°C.

35 Con el fin de cultivar las cepas de la colección las cepas se sembraron en tubos falcon con una capacidad de 15 ml que contenían el medio Luria Bertani (LB). Las cepas se mantuvieron en agitación a 250 rpm y se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Basados en las determinaciones de diversas características de las cepas de la colección se seleccionaron tres de las cepas para estudios adicionales: *Pseudomonas antarctica* DaBact TI 8, designación de depósito en la ATCC PTA 8990; *Pseudomonas trivialis* DaBact2H, designación de depósito en la ATCC PTA 8988 y *Arthrobacteria sp.* MII, designación de depósito en la ATCC PTA 8989. Las colonias de estas cepas bacterianas en cultivos en caja Petri se muestran en las Figuras 1, 2 y 3. Las características morfológicas y fisiológicas de las tres cepas se describen más abajo.

40 **Caracterización de las tres cepas bacterianas:**

Se estudiaron los caracteres morfológicos y fisiológicos de las tres cepas. La Tabla 1 muestra las características morfológicas de las tres cepas seleccionadas aisladas a partir de la rizosfera de *Deschampsia antarctica*.

45 **Tabla 1.** Características morfológicas de las tres cepas bacterianas diferentes aisladas a partir de la rizosfera de *D. antarctica*.

Cepas	Morfología de la colonia ^a	Textura	Color	Morfología de la célula ^a	Tinción de Gram	Crecimiento ^b	
						4°C	37°C
<i>Pseudomonas antarctica</i>	Circular	Mucoide	Blanco	Varillas cortas delgadas	-	+	-
DaBact TI-8							
<i>Pseudomonas trivialis</i>	Circular	Seco	Húmedo	Varillas cortas	-	+	-
DaBact 2H							
<i>Arthrobacter spp.</i> DaBact	Circular	Amarillo claro	Amarillo	Varillas cortas	+	+	-
MII-9							

Cepas	Morfología de la colonia ^a	Textura	Color	Morfología de la célula ^a	Tinción de Gram	Crecimiento ^b	
						4°C	37°C
^a Patrón de crecimiento en agar LB sólido. Tinción de Gram: neg, negativa; pos, positiva							
^b Todos los aislamientos fueron capaces de crecer a 10 y 25°C.							

Las cepas de la colección se evaluaron con respecto a su resistencia a antibióticos. Los antibióticos que se usaron para la evaluación fueron ampicilina, actinomicina D, estreptomycin, gentamicina, canamicina, tetraciclina. La Tabla 2 muestra los resultados de resistencia a antibióticos de la cepa de *Pseudomonas antarctica* DaBact TI-8, la cepa de *Pseudomonas trivialis* DaBact 2H, y la cepa de *Arthrobacter ssp.* DaBact MII-9.

Tabla 2. Resistencia a diferentes antibióticos que se encontró para las diferentes bacterias aisladas a partir del suero rizosférico de *D. antarctica*.

Cepas	Ampicilina (100 µg ml ⁻¹)	Actinomicina D (10 µg ml ⁻¹)	Estreptomycin (10 µg ml ⁻¹)	Gentamicina (20 µg ml ⁻¹)	Canamicina (50 µg ml ⁻¹)	Tetraciclina (10 µg ml ⁻¹)
<i>Pseudomonas antarctica</i>	+	+	+	+	+	+
DaBact TI-8						
<i>Pseudomonas trivialis</i>	+	+	+	+		-
DaBact 2H						
<i>Arthrobacter ssp.</i>	-	-	-	+	+	-
DaBact MII-9						

Para caracterizar adicionalmente las cepas de bacterias, las cepas se cultivaron en medio LB sólido con diferentes concentraciones de metales pesados. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos con las tres cepas bacterianas.

Tabla 3. Crecimiento bacteriano en medio LB sólido con diferentes concentraciones de metales pesados. Los números representan las concentraciones más altas en las que las bacterias crecieron bien.

Metal Pesado	<i>Pseudomonas antarctica</i>	<i>Pseudomonas trivialis</i> DaBact	<i>Arthrobacter ssp.</i>
	DaBact TI-8	2H DaBact	DaBact MII-9
Cadmio (mM)	-	1	1
t (mM)	1	10	10
Zinc (mM)	5	5	5
Mercurio (mM)	0.2	0.4	0.4

Con el fin de determinar qué cepas de la colección tienen la capacidad de solubilizar fosfato, se usó un cultivo PVK modificado (Pikoyskava, 1948). Se usó fosfato de potasio (K₂HPO₄) al 10% (p/v) como fuente de fosfato inorgánico que precipita y se convierte en fosfato tricálcico (insoluble) cuando reacciona con cloruro de calcio.

La capacidad de solubilizar fosfato se evaluó en otras dos fuentes inorgánicas, a saber fosfato de calcio monobásico (Ca(HOP₄)₂ x H₂O) y piedra de fósforo. El cultivo PVK original se usó para hacer esto (Pikoyskava, 1948). El azul de bromofenol se usó en la preparación del medio con roca fósforo. Este es un reactivo que mejora la visibilidad del halo generado por la solubilización.

La siembra se hizo superficialmente por medio del uso de una alícuota (5µl) de cada suspensión bacteriana. La formación de un halo (precipitación) alrededor de la colonia en el 5to día después de la incubación a temperatura ambiente se estableció como el estándar para la solubilización del fosfato (Das, 1989; Singal y otros, 1991). Las cepas solubilizaron el fosfato en PKV al quinto día después de la incubación, y se midió el diámetro real del halo formado por estas bacterias. Se midió el diámetro total, con la deducción del diámetro de la colonia bacteriana lo que permitió así una comparación de la habilidad para solubilizar el fosfato entre las cepas estudiadas. Todos estos ensayos se realizaron a 4°C y los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Diámetro del halo y concentración de fósforo solubilizado por las cepas bacteriana de *Deschampsia antarctica* que se cultivaron en medio PVK, a 4°C, que contenía diferentes sustratos de fósforo inorgánico.

Identificación de la cepa	Ca ₃ (PO ₄) ₂ halo (mm) ^a	Ca(HPO ₄) ₂ *H ₂ O	Roca fosfórica (Gafsa)
<i>Pseudomonas antarctica</i>			
DaBact TI-8	3.3 +/- 0.6	5.3 +/- 0.6	3.3 +/- 0.6
<i>Pseudomonas Trivialis</i>			
DaBact 2H	5.3 +/- 1.2	3.0 +/- 0.0	3.3 +/-0.6
<i>Arthrobacter spp.</i>			
DaBact MII-9	ND	ND	ND

^a el valor del halo corresponde a la media de tres repeticiones.
^b ND: no determinado

5 [0019] Las cepas que formaron un halo en las tres fuentes de fosfato se seleccionaron a partir de las cajas Petri con el fin de cuantificar la capacidad real de las bacterias tomadas a partir del suelo rizoférico de *Deschampsia antarctica* para solubilizar fosfato. De las tres cepas caracterizadas en esta descripción *Arthrobacter spp.* DaBact MII-9 no formó un halo medible, pero se llevó al experimento siguiente. Cada una de las cepas se inoculó en tubos falcon de 50 ml que contenían 25 ml de cultivo nutritivo PVK líquido. Anterior a la inoculación, se añadieron a cada tubo 400 mg P /1 de fosfato inorgánico. Alternativamente 3.2 g de roca fósforo se añadieron a los tubos. Todos los tubos se esterilizaron a 120°C por 30 minutos. El pH en los cultivos se ajustó a 6.5 por medio del uso de una solución de NaOH. Cada tubo se inoculó con cepas extraídas a partir de las placas. Después los tubos se incubaron por 5 días, con agitación constante a 4°C. Las muestras se centrifugaron después a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se tomó una alícuota de 1 ml a partir del sobrenadante y se usó para determinar el contenido de fósforo soluble por medio del uso del método de sulfomolibdeno - ácido ascórbico (Método de Murphy y Riley, 1962). Las lecturas se compararon a aquellas obtenidas para el intervalo de concentraciones conocidas que varían de 0.1 a 0.8 ppm de fósforo. La Tabla 5 proporciona la cuantificación de fósforo solubilizado por las cepas seleccionadas y el cambio del pH en el medio debido al fósforo solubilizado.

Tabla 5. Concentración de fósforo solubilizado por la cepas bacterianas *Deschampsia antarctica* que se cultivan a 4°C, contenido de fósforo inorgánico y valores de pH del medio.

Identificación de la cepa	Roca fosfórica (Gafsa) mg P L ⁻¹	pH* final
<i>Pseudomonas antarctica</i>	34.3	4.2
DaBact TI-8		
<i>Pseudomonas Trivialis</i>	25.5	4.4
DaBact 2H		
<i>Arthrobacter spp.</i> DaBact	0	ND
MII-9		

* El pH inicial del medio PVK con P inorgánico fue de 6.5.

20 Los microorganismos tienen varios procesos por los cuales el P se puede movilizar en el ecosistema suelo-planta. Estos procesos se agrupan juntos en reacciones de solubilización de P en el suelo. Durante la solubilización del fosfato, se forman quelatos de calcio-, hierro- y aluminio- con diferentes ácidos orgánicos producidos por el metabolismo microbiano. Estos ácidos se conoce que solubilizan formas solubles de fosfato a una forma usable, tal como ortofosfato, lo que aumenta su disponibilidad potencial para las plantas. Una alícuota del caldo de cultivo de los microorganismos se usó para analizar el tipo de ácido orgánico excretado por las cepas de bacterias psicrófilas de esta descripción, y se analizó por medio del uso de HPLC. Se encontró que el P se solubiliza básicamente debido a la excreción de ácidos oxálicos (resultados no mostrados).

25 Las cepas bacterianas se caracterizaron adicionalmente por la medición de la actividad enzimática con el método semi cuantitativo API ZYM. Los resultados se muestran más abajo en la Tabla 6.

30

Tabla 6. Actividad enzimática de las cepas de bacterias aisladas determinada por medio del uso del método semi cuantitativo API ZYM. + significa que se observó actividad, - significa no actividad medible.

Enzima ensayada	<i>Pseudomonas antarctica</i> DaBact TI-8	<i>Pseudomonas trivialis</i> DaBact 2H	<i>Arthrobacter spp.</i> DaBact MII-9
Fosfatasa alcalina	+	+	+
Fosfatasa ácida	+	+	+
Naftol-AS-BI- fosfohidrolasa	+	+	+
Esterasa (C4)	+	+	+
Esterasa Lipasa (C8)	+	+	+
Lipasa (C14)	-	-	+
Leucina arilamidasa	+	+	+
Valina arilamidasa	+	+	+
Cistina arilamidasa	-	-	+
α -galactosidasa	-	-	+
β -galactosidasa	-	-	+
α -glucosidasa	-	-	+
N-acetil- β - glucosaminidasa	-	-	+
α -manosidasa	-	-	+

Caracterización genética de las cepas:

5

El ADNr 16S se amplificó selectivamente a partir del ADN genómico por PCR con oligonucleótidos cebadores diseñados para hibridar a posiciones conservadas en las regiones 3' y 5' de los genes de ARNr 16S.

10

Extracción de ADN genómico: La amplificación de los genes de ARNr 16S se llevó a cabo directamente en células lisadas por tratamiento a 80 °C por 10 min, seguido por 3 min a 100 °C.

15

Amplificación del gen del ARNr 16S: El ARNr 16S se amplificó selectivamente a partir del ADN genómico por PCR con oligonucleótidos cebadores diseñados para hibridar a posiciones conservadas en las regiones 3' y 5' de los genes de ARNr 16S. Se usaron cebadores bacterianos universales y para todos los aislados probados el cebador directo 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (sec. con núm. de ident.: 4) y 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (sec. con núm. de ident.: 5) permitió la amplificación de 1,502 bp del gen del ARNr 16S. La amplificación por PCR se llevó a cabo en un ciclador térmico Peltier, PTC-200 (M J Research, Estados Unidos) en 50 μ l de reacción que contenían 2.5 μ l de amortiguador de reacción 10x; 2.5 μ l de MgCl₂ 25 mM; 2.5 μ l de cada deoxiribonucleótido 2.5 mM; 2.5 μ l de cada primero 10 μ M, y 1 U de Taq ADN polimerasa (recombinante, Fermentas).

20

La temperatura y condiciones de ciclado fueron como sigue: Primero, precalentamiento a 94 °C por 2 min; después 30 ciclos a 94 °C por 1 min; 55 °C por 1 min; y 72 °C por 1.5 min; y una incubación final a 72 °C por 10 min. La presencia de productos de PCR y sus concentraciones se comprobaron por electroforesis de 5 μ l de productos en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Se incluyó un marcador de peso molecular (escalera de ADN de 1kb, Fermentas). Para generar clones de ARNr 16S casi de longitud completa, el producto de PCR se ligó en un vector pGEM-Teasy (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) y la reacción de ligazón se usó para transformar la cepa de *Escherichia coli* competente DH5 α .

25

30

Las colonias recombinantes se seleccionaron en placas de agar Luria-Bertani que contenían 20 μ g ml⁻¹ X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), y 0.5 mM IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), y 100 μ g ml⁻¹ ampicilina. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C. La presencia de insertos se determinó por PCR directo en una muestra a partir de colonias bacterianas blancas (positivas), por medio del uso de cebadores que flanquean los sitios de clonación del vector.

La secuenciación se llevó a cabo con un kit de secuenciación Dye Terminator Cycle y un secuenciador de ADN ABI 3730XL (Applied Biosystems) por Macrogen (Corea). Las secuencias de nucleótidos de ARNr 16S se identificaron por WWW/BLASTN 2.1.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (Altschul y otros, 1990, 1997) por medio del uso de las bases de datos de nucleótidos DDBJ/EMBL/GenBank. Las secuencias de ARNr 16S determinadas en este estudio se depositaron en las bases de datos de secuencias GenBank/ EMBL.

Las secuencias obtenidas se compararon con otras secuencias bacterianas disponibles en un GeneBank público: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul y otros, 1990, 1997)). Los resultados obtenidos se resumen aquí.

1. La cepa bacteriana DaBac TI-8 mostró 99% de identidad con el gen del ARNr 16s parcial de *Pseudomonas* sp. Nj-55, cepa Nj-55, que tienen la secuencia identificada como AM409368. La comparación de las secuencias se muestra en la Fig. 4.
2. La cepa bacteriana DaBac 2H mostró 99% de identidad con el gen del ARN ribosomal 16S de la cepa *Pseudomonas trivialis* BIHB 749, secuencia parcial, que tienen la secuencia identificada como DQ885949. La comparación de las secuencias se muestra en la Fig. 5.
3. La cepa de bacteria DaBac MII-9 mostró 99% de identidad con el gen del ARNr 16s parcial de *Arthrobacter* sp. ON14, aislado ON 14, que tiene la secuencia identificada como AJ810894. La comparación de las secuencias se muestra en la Fig. 6.

La invención se describe ahora por medio de ejemplos. Los ejemplos no se supone que limiten el alcance de la invención pero se proporcionan como modalidades ilustrativas de la invención. Una persona con experiencia en la técnica aprecia que diversas modificaciones de los ejemplos que aquí se presentan se pueden hacer sin apartarse del espíritu de esta invención.

EJEMPLO 1. Formulación líquida de fertilizante de bacterias psicrófilas para revestimiento de semillas

Este ejemplo proporciona una formulación líquida de fertilizante de bacterias psicrófilas, donde la formulación consiste de dos soluciones separadas que se combinan antes de usarse como revestimiento de semillas.

Para la primera solución, la bacteria que crece a 25°C, en el matraz de 1l que usaba un medio adecuado, se concentró por centrifugación con el fin de separar el sólido. Este sólido con un aspecto de jalea se suspendió en una cantidad mínima de medio. Un producto protector solar, tal como el rojo Congo o el colorante verde se añadió a los medios al 1% (p/v).

De acuerdo con una modalidad preferible las tres cepas bacterianas se usan para la primera solución en concentraciones iniciales similares. En este caso se usó la mezcla de tres cepas bacterianas que tenía una concentración inicial de 10^{12} CFU de cada una. Sin embargo, la formulación de biofertilizante se puede preparar a partir de cualquiera de las tres cepas de bacterias solas, o se puede usar también una mezcla de dos o tres de las cepas.

Para la segunda solución, se preparó una solución 1% (p/v) de un polisacárido, tal como la goma de guar, goma gelana, pectina, carboximetil celulosa, agar agar, goma xantana (u otros hidrocoloides de alimentos) para usarse como adhesivo. Adicionalmente, quitosana, un conocido polímero fungicida e inductor de la reacción de defensa de la planta se puede añadir a 0.5 -1% (p/v). Se debe tomar cuidado con el grado de acetilación de quitosana, debe ser menor que 85%, ya que podría actuar como bactericida además.

Las dos soluciones después se mezclan para tratar las semillas de plantas como un revestimiento. Las semillas se deben secar antes de la plantación y no se deben sembrar antes de plantar al menos 2h a partir del momento de la aplicación.

EJEMPLO 2. Formulación de estado sólido de las bacterias psicrófilas

Este ejemplo proporciona una formulación líquida de fertilizante de bacterias psicrófilas donde las bacterias se encapsulan y el fertilizante está en forma sólida. Las perlas de alginato se prepararon de la siguiente manera:

Se añadió 1ml de glicerol 30% a la solución de alginato sódico 1, 1.5 o 2%, según las propiedades del alginato (relación M/G) para obtener un volumen final de 25 ml. Después, 250 ml de cultivo bacteriano (obtenido a partir de una de las tres cepas o a partir de una combinación de dos o más cepas) se centrifugó, el sedimento de células se lavó con solución salina (NaCl 0.85%, p/v) y se suspendió en 25 ml de la mezcla de alginato y se mezcló completamente. Esta suspensión se añadió gota a gota en una solución acuosa de CaCl_2 1.5 o 2 % (p/v) estéril pre-enfriada con agitación suave para obtener las perlas de alginato - bacterianas. Estas perlas se dejaron endurecer durante 2-4 horas a temperatura ambiente. Las perlas se recogieron mediante el tamizado y se lavaron varias veces con agua estéril y se almacenaron a 4 °C. Con el fin de preservar la formulación, las perlas húmedas frescas se congelaron a -80°C antes de la liofilización a -45 °C durante 15 h. Las perlas secas liofilizadas se almacenaron en botellas de vidrio estériles.

Recuento de células bacterianas en las perlas

Para estimar los recuentos viables, las bacterias encapsuladas se liberaron de las perlas por resuspensión de 100 mg de perlas en solución salina regulada con fosfato (pH 7.0) durante 30 min seguido de homogenización. El número total de bacterias liberadas se determinó por el método de recuento de placa estándar después de la incubación a 30°C durante 48 h. A intervalos de un mes las densidades de células en las perlas se contaron por medio del uso del método similar como para estudiar la pérdida de células durante el almacenamiento. La concentración al comienzo del experimento era 10^{12} CFU. Después de 5 meses, la concentración era todavía 10^7 CFU.

EJEMPLO 3. Efecto del biofertilizante sobre la germinación de semillas

Una modalidad preferida de la presente invención es una formulación que comprende dos soluciones que se preparan por separado y se combinan en el momento de la aplicación como se describe en el Ejemplo 1 anterior. La solución combinada después se usa para el revestimiento de semillas. Se conoce que varios compuestos pueden inhibir la germinación de semillas por ser fitotóxicos. Con el fin de evaluar un posible efecto negativo del revestimiento de semillas por el biofertilizante, se probó el efecto del biofertilizante sobre la germinación de semillas de tomate y trigo. Los ensayos de germinación (que siguen las normas ISTA) demostraron que la inoculación del biofertilizante psicofílico no previno o inhibió la germinación de semillas, sino por el contrario promovió la germinación.

Se probó el efecto de la formulación sobre semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Don José) y semillas de trigo (*Triticum aestivum* var. Kumpa). Las semillas se desinfectaron con un fungicida comercial antes del revestimiento con el biofertilizante preparado como se describe en el Ejemplo 1. Después de dejar caer las semillas en la formulación bacteriana líquida se dejaron secar durante una hora y después se colocaron en cajas Petri para germinar en una cámara de crecimiento a 25° C. Los resultados de estos ensayos se presentan en las Tablas 7 a 9 y la Figura 9 y 10.

Tabla 7. Ensayo de germinación de acuerdo con las normas ISTA en semillas de tomate (variedad Don José) inoculadas con diferentes cantidades (CFU) del biofertilizante bacteriano psicofílico (las tres cepas se usaron en concentraciones iguales para producir la CFU final que se muestra en la primera columna)

Tratamiento	Día	
	5	14
Control(H ₂ O)	50	93
10 ⁶ CFU	82	92
10 ⁹ CFU	79	98
10 ¹² CFU	73	93
Biofertilizante comercial	37	93

Tabla 8. Resultados del ensayo de germinación de las semillas *Triticum aestivum* var Kumpa inoculadas con dos biofertilizantes.

Tratamiento	Día	
	4	8
Control	84	88
Biofertilizante bacteriano psicofílico	81	90
Biofertilizante comercial	60	73

Tabla 9. Resultados del ensayo de germinación de las semillas *Lycopersicum esculentum* var Don José inoculadas con dos biofertilizantes.

Tratamiento	Día	
	5	14
Control	48	93
Biofertilizante bacteriano psicofílico	49	98

Tratamiento	Día	
	5	14
Biofertilizante comercial	51	98

Como se puede observar en la Tabla 7, las semillas de tomate revestidas con el biofertilizante psicofílico de acuerdo con esta descripción germinaron evidentemente más rápido que las semillas tratadas con agua o con un biofertilizante comercial. De manera similar, los resultados de la Tabla 8 muestran que las semillas de trigo germinaron más rápido cuando se revistieron con el biofertilizante psicofílico de acuerdo con esta descripción en comparación con las semillas tratadas con agua o el biofertilizante comercial. Además, las semillas de trigo poseían un porcentaje de germinación más alto cuando se revistieron con el biofertilizante de esta descripción.

El aumento en la germinación y el desarrollo de las raíces podría ser debido a la producción y excreción del ácido indolacético IAA por las cepas de bacterias que se emplearon aquí. La Tabla 10 muestra las cantidades de IAA en el cultivo líquido bacteriano. Claramente, la cepa MII9 excretó las cantidades más altas de IAA.

Tabla 10. Determinación de la concentración de IAA en el cultivo líquido bacteriano de acuerdo con Send y Leopold (1954)

Cepa	IAA* (ug ml ⁻¹)
T18	0.62 ± 0.028
MII9	5.88 ± 0.238
2H	0.98 ± 0.026

EJEMPLO 4. Compatibilidad del biofertilizante psicofílico con fungicidas comerciales

Debido a que se usó un fungicida comercial antes del revestimiento de las semillas en el Ejemplo 3, además se quiso hacer un ensayo de compatibilidad de los fungicidas comerciales. En este ensayo las semillas se desinfectaron con diversos fungicidas comerciales antes del revestimiento con el biofertilizante bacteriano psicofílico. Los resultados muestran que el biofertilizante es compatible con al menos los siguientes productos fungicidas: Dividend (Syngenta), Real (BASF) y Raxil (Bayer). La Tabla 11 muestra que el pre-tratamiento con un fungicida comercial no condujo a la disminución de la concentración del biofertilizante (CFU/semilla) sobre las semillas. Los resultados en la Tabla 12 muestran altas tasas de germinación en semillas pre-tratadas con un fungicida antes del tratamiento del biofertilizante bacteriano psicofílico.

Tabla 11. Recuento bacteriano en semillas de *Triticum aestivum* var Kumpa desinfectadas previamente e inoculadas con biofertilizante bacteriano psicofílico.

Tratamientos	CFU / semilla
Dividend (Syngenta)	5,4 x 10 ⁵
Indar-Flo (Anasac, Dow)	5,3 x 10 ⁵
Baytan (Bayer)	5,3 x 10 ⁵
Real (BASF)	1,9 x 10 ⁴
Raxil (Bayer)	3,4 x 10 ⁵
Control (inoculado sin fungicida)	5,4 x 10 ⁶

Tabla 12. Resultados del ensayo de germinación en el 8vo día de semillas de *Triticum aestivum* var Kumpa desinfectadas previamente con fungicidas comerciales e inoculadas con el biofertilizante antártico.

Tratamientos	Germinación (%)
Dividend (Syngenta)	94
Indar-Flo (Anasac, Dow)	83
Baytan (Bayer)	79
Real (BASF)	92

Tratamientos	Germinación (%)
Raxil (Bayer)	95
Control (inoculado sin fungicida)	90

EJEMPLO 5. Efecto del biofertilizante psicrófilico sobre el crecimiento y desarrollo de plantas

5 El biofertilizante psicrófilico de acuerdo con esta descripción además ayuda en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esto se debe al hecho de que estas bacterias excretan sideróforos (compuestos quelantes de hierro). La presencia de estos compuestos se determinó cualitativamente en cepas aisladas (resultados no mostrados). Se conoce que los sideróforos son responsables de proteger las plantas contra algunos patógenos. Además, estas bacterias además excretan ácido indolacético (Tabla 10), que es una hormona reguladora del crecimiento.

10 Se probó el efecto del biofertilizante sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate. Las normas ISTA para la germinación de semillas se usaron para evaluar la eficacia de la formulación bacteriana sobre el crecimiento del tomate bajo condiciones controladas. Las semillas se revistieron con el biofertilizante psicrófilico como se describe en el Ejemplo 3 anterior. Las plántulas de tomate se cultivaron durante 30 días y después se trasplantaron a bolsas de plástico (capacidad de 1l), llenas con suelo esterilizado, bajo condiciones de invernadero. Las Figuras 7 y 8 muestran plántulas después de 60 días a partir de la plantación en el suelo. La actividad promotora del crecimiento del pie y el brote del biofertilizante se puede ver claramente.

20 Se analizaron las plantas de tomate después de 60 días a partir de la plantación de las plantas en suelo. Los resultados se recogen en la Tabla 13. Se puede ver que la altura de la planta, el peso fresco, así como los pesos secos de los brotes y raíces son claramente más altos que los de las plantas no tratadas con ningún biofertilizante. Aun si la altura de las plantas tratadas con un biofertilizante comercialmente disponible fue aproximadamente la misma que la de las plantas tratadas con el biofertilizante de esta invención, los pesos frescos y secos fueron claramente menores que los de las plantas tratadas con el biofertilizante de acuerdo con esta invención. La relación de brote-a-raíz de las plantas tratadas con el biofertilizante de la presente descripción fue menor que la de las plantas tratadas con agua o con un biofertilizante comercial. Esto se debió fundamentalmente al desarrollo pronunciado de las raíces. El desarrollo de la raíz se puede ver en la Fig. 8.

Tabla 13. Análisis de las plantas de tomate inoculadas con dos biofertilizantes 60 días después de la plantación en maceta y crecimiento bajo condiciones de invernaderos (n = 10).

Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Peso fresco (g)	Peso fresco del brote (g)	Peso fresco de la raíz (g)	Brote/Raíz
Biofertilizante bacteriano psicrófilico	21,7	17,1	1,11	0,19	5.84
Biofertilizante comercial	21,5	13,9	0,88	0,12	7.3
Control	19,0	12,4	0,72	0,11	6.54

30 Para analizar aun más los efectos del biofertilizante, se realizó un análisis químico foliar para cada tratamiento con el fin de establecer cuales fueron más eficientes en la captación de nutrientes de las plantas; los resultados se presentan en la Tabla 14. Como es evidente a partir de los resultados, el biofertilizante de acuerdo con esta descripción aumentó claramente los contenidos de nitrógeno, fósforo, potasio, y calcio en las hojas en comparación con las plantas de control no revestidas. Además el contenido de hierro en las hojas aumentó. Además, el tratamiento con un biofertilizante disponible comercialmente pareció dar resultados similares al tratamiento con el biofertilizante de esta invención. Notablemente, sin embargo, la concentración de calcio del material de las hojas fue claramente más alta después del tratamiento con el biofertilizante de la presente invención en comparación al tratamiento con el biofertilizante comercial.

Tabla 14. Resultados del análisis químico foliar de plantas de tomate cultivadas en invernaderos.

Muestra	Biofertilizante antártico	Biofertilizante comercial	Control
Materia seca	93,54	94,92	92,53
	2,52	2,67	1,82
P (%)	0,52	0,50	0,14
K (%)	4,20.	4,89	3,35

Muestra	Biofertilizante antártico	Biofertilizante comercial	Control
Ca (%)	2,21	1,65	1,06
Mg (%)	1,14	1,02	1,08
Na (%)	0,20	0,16	0,21
S (%)	0,44	0,49	0,36
A1 (ppm)	155	163	147
Zn (ppm)	68	63	74
Cu (ppm)	25	24	27
Fe (ppm)	153	138	123
Mn (ppm)	75	54	90
B (ppm)	39	38	38

Es evidente a partir de las Figuras 7 y 8 y las Tablas 13 y 14, que la aplicación del nuevo biofertilizante de esta descripción mejora la fertilización de plantas, principalmente el uso del P del suelo, junto con la mejora de la salud y el desarrollo de la planta. El uso de este biofertilizante será vital para los cultivos que tienen una gran necesidad de fertilizantes fosforados, tales como el trigo, que además tiene una etapa cuando la planta crece durante el período de invierno. Puesto que estas bacterias son capaces de solubilizar fósforo a muy baja temperatura (0°C), las plantas podrán sobrevivir al estrés causado por la temperatura a través de la contribución de nutrientes en su etapa más crítica. Por lo anterior, los biofertilizantes de acuerdo con esta invención mejoran el rendimiento en los cultivos y evitan considerablemente los fertilizantes fosforados.

Una de las características bioquímicas del biofertilizante de acuerdo con esta invención es su producción de compuestos reguladores del crecimiento, tales como el ácido indolacético (IAA). El IAA se conoce que mejora el desarrollo de las raíces de las plantas por la mejora de la absorción de agua y nutrientes. El fertilizante de acuerdo con esta invención además produce sustancias que actúan como antibióticos naturales y de ese modo ayudan al control del crecimiento de fitopatógenos en las raíces de las plantas.

EJEMPLO 6. Efectos del biofertilizante psicrófilo sobre el crecimiento del campo de trigo

El efecto del biofertilizante psicrófilo se probó en condiciones de campo sobre cultivos de trigo en la ciudad de Victoria, Temuco, Chile. Las semillas de trigo se desinfectaron y se revistieron con el biofertilizante bacteriano psicrófilo de la presente invención como se describe en el Ejemplo 3. Las semillas de control se desinfectaron y se trataron con agua.

Un campo de una hectárea se sembró directamente con las semillas por medio del uso de un diseño experimental de bloque aleatorio con cuatro repeticiones por tratamientos. Más aun, se midió el rendimiento total después de la cosecha y se calculó el rendimiento por unidad de área del campo de cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 15. Como se puede ver a partir de los resultados, el rendimiento de las plantas desarrolladas a partir de las semillas revestidas de biofertilizante fue más alto que el de las plantas de control y de la misma magnitud que las plantas de control cultivadas con fertilización de fósforo. Notablemente, la fertilización de fósforo no mejoró el rendimiento de las plantas desarrolladas a partir de semillas tratadas con biofertilizante.

Tabla 15. Parámetros de la cosecha de semillas de trigo revestidas con biofertilizante

Tratamientos	Rendimiento (ton/ha)	Peso 1000 granos (g)
Control	4.8 ± 0.2	32 ± 3
50 Kg P ₂ O ₅ /ha	4.8 ± 0.5	33 ± 3
100Kg P ₂ O ₅ /ha	5.1 ± 0.3	37 ± 3
150 Kg P ₂ O ₅ /ha	5.0 ± 0.4	35 ± 3
Biofertilizante	5.9 ± 0.2	40 ± 2
50 Kg P ₂ O ₅ /ha + Biofertilizante	5.6 ± 0.4	38 ± 2
100 Kg P ₂ O ₅ /ha + Biofertilizante	5.6 ± 0.3	38 ± 2

Tratamientos	Rendimiento (ton/ha)	Peso 1000 granos (g)
150 Kg P ₂ O ₅ /ha + Biofertilizante	5.3 ± 0.2	38 ± 3

La invención de acuerdo con esta solicitud no se limita al uso con cualquier cultivo específico o cualquier área geográfica específica. La invención se puede usar como un biofertilizante para cualquier planta que incluye pero sin limitarse a plantas del bosque, para plantas de verduras así como para los cultivos. Además, el biofertilizante de acuerdo con esta invención sería beneficioso en cualquier área donde las bajas temperaturas ocurren durante la temporada de crecimiento. El fertilizante de acuerdo con esta descripción se puede usar como sustancia de revestimiento de semillas, pero se puede usar también por aplicación directa en el suelo o cualquier otro método conveniente.

El frijol de soya es una de las plantas de cultivo más extensamente cultivadas que en muchas áreas padecen los problemas inducidos por las bajas temperaturas con disponibilidad de agua y fósforo. El uso del biofertilizante bacteriano psicrófilico de acuerdo con esta descripción en cultivos de frijol de soya tiene las siguientes ventajas:

1. La dosis del fertilizante fosforado en cultivos se reduce y así el costo de producción caerá.
2. El rendimiento del cultivo aumenta debido a una mejor absorción de nutrientes y una mejor salud de las plantas .
3. El fertilizante se puede usar en temperaturas extremas con el fin de mejorar la producción.
4. El fertilizante se puede usar en suelos ácidos donde el fósforo se inmoviliza en el suelo.

El biofertilizante se debe aplicar mediante el uso de máquinas para el tratamiento de semillas para garantizar la homogeneidad de la aplicación y la uniformidad de la cubierta de las semillas. Toda la inoculación se debe llevar a cabo preferentemente en un lugar donde no haya radiación solar directa. Las semillas tratadas generalmente se deben dejar airear durante 30 minutos antes de plantarlas si se desea plantarlas inmediatamente después de que se aplique el producto. La aplicación del producto puede causar cambios en la superficie de las semillas. Por esa razón, las semillas tratadas se desplazarán más lentamente en el procesamiento por lotes de las sembradoras de semillas que las semillas no tratadas. Esto significa que la máquina se debe recalibrar antes de aplicar la semilla.

Referencias

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul, S.F, Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25:3389-3402 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- Das, A.C., 1989. Utilization of insoluble phosphates by soil fungi. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 58:1208-1211.
- Murphy, J. y Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27:31-36.
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17:362-370
- Send, S. P.; Leopold, A. C. 1954. Paper chromatography of plant growth regulators and allied compounds. *Physiol. Plant.* 7: 98-108.
- Singal, R., Gupta, R., Kuhad, R.C. y Saxena, R.K. 1991. Solubilization of inorganic phosphates by a Basidiomycetous fungus *Cuathus*. *Indian J. Microbiol.* 31:397-401.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición biofertilizante que comprende las cepas bacterianas psicrófilas aisladas a partir de la rizosfera de *Deschampsia antarctica*, en donde la composición contiene una o más cepas bacterianas seleccionadas del grupo que consiste de *Pseudomonas antarctica* DaBact TI-9 (designación de la ATCC, PTA8990), *Pseudomonas trivialis* DaBact 2H (designación de la ATCC, PTA8988) y *Arthrobacter* ssp. DaBact MII-9 (designación de la ATCC, 8989).
2. La composición biofertilizante de la reivindicación 1, en donde la composición contiene cepas de *Pseudomonas antarctica* DaBact TI-9, *Pseudomonas trivialis* DaBact 2H y *Arthrobacter* ssp. DaBact MII-9 en concentraciones iguales.
- 10 3. La composición biofertilizante de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en donde el fertilizante se prepara antes de usar combinando una solución de la suspensión bacteriana y un producto protector solar con una solución de polisacárido.
- 15 4. Una composición biofertilizante que se prepara antes de usar combinando una suspensión bacteriana y una solución de polisacárido, en donde dicha suspensión bacteriana consiste de las cepas *Pseudomonas antarctica* DaBact TI-9, *Pseudomonas trivialis* DaBact 2H y *Arthrobacter* ssp. DaBact MII-9 cada una a la concentración de 10^{12} CFU y 1% (p/v) del producto protector solar, y dicha solución de polisacárido que es la solución de goma de guar 1% (p/v), goma gelana, pectina, carboximetil celulosa, agar, o goma xantana.
- 20 5. La composición biofertilizante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición de biofertilizante es para el revestimiento de semillas.
6. La composición biofertilizante de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición mejora la germinación de las semillas.
- 25 7. La composición biofertilizante de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 6, en donde la composición es compatible con cualquier fungicida comercial.
8. La composición biofertilizante de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en donde las cepas bacterianas están encapsuladas en perlas de alginato.
- 30 9. La composición biofertilizante de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 9, en donde el biofertilizante es aplicable a las plantas de cultivo y del bosque.
- 35 10. La composición biofertilizante de acuerdo con la reivindicación 9, en donde las plantas de cultivo son plantas dicotiledóneas.
- 40 11. La composición biofertilizante de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la planta de cultivo es tomate o frijol de soya.
12. La composición biofertilizante de acuerdo con la reivindicación 10, en donde las plantas de cultivo son plantas monocotiledóneas.
- 45 13. La composición biofertilizante de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la planta de cultivo es trigo.
14. Una composición biofertilizante para usar a bajas temperaturas, dicha composición de biofertilizante comprende las cepas bacterianas *Pseudomonas antarctica* DaBact TI-9 (designación de ATCC, PTA8990), *Pseudomonas trivialis* DaBact 2H (designación de ATCC, PTA8988) y *Arthrobacter* ssp. DaBact MII-9 (designación de ATCC, PTA8989).
- 50 15. Un método para mejorar la solubilización de fósforo en el suelo, la captación de agua y minerales, o el crecimiento a bajas temperaturas por la aplicación de una composición biofertilizante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

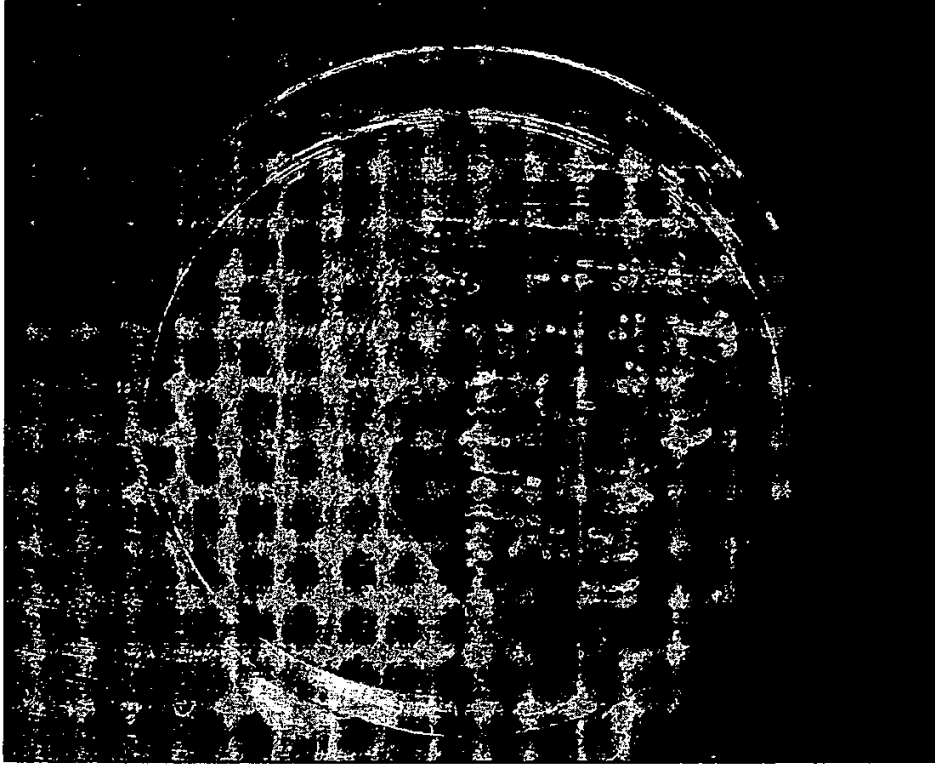


Fig. 1

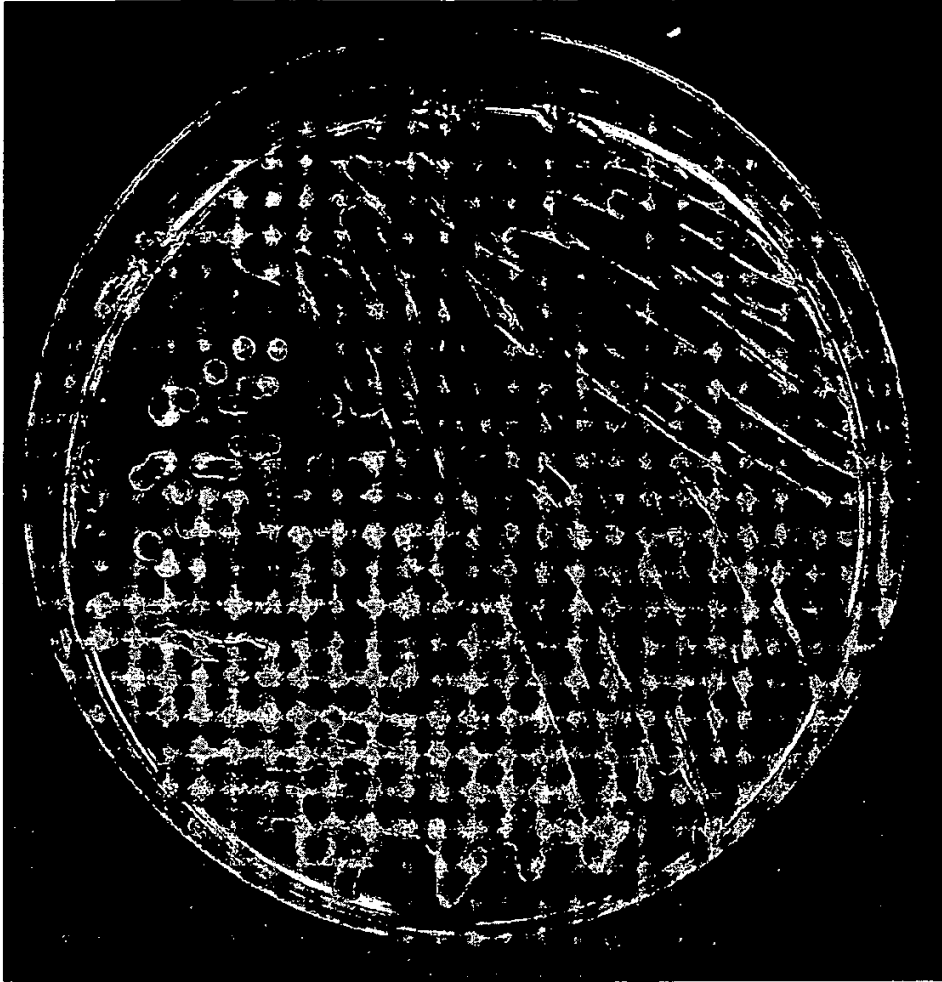


Fig. 2.

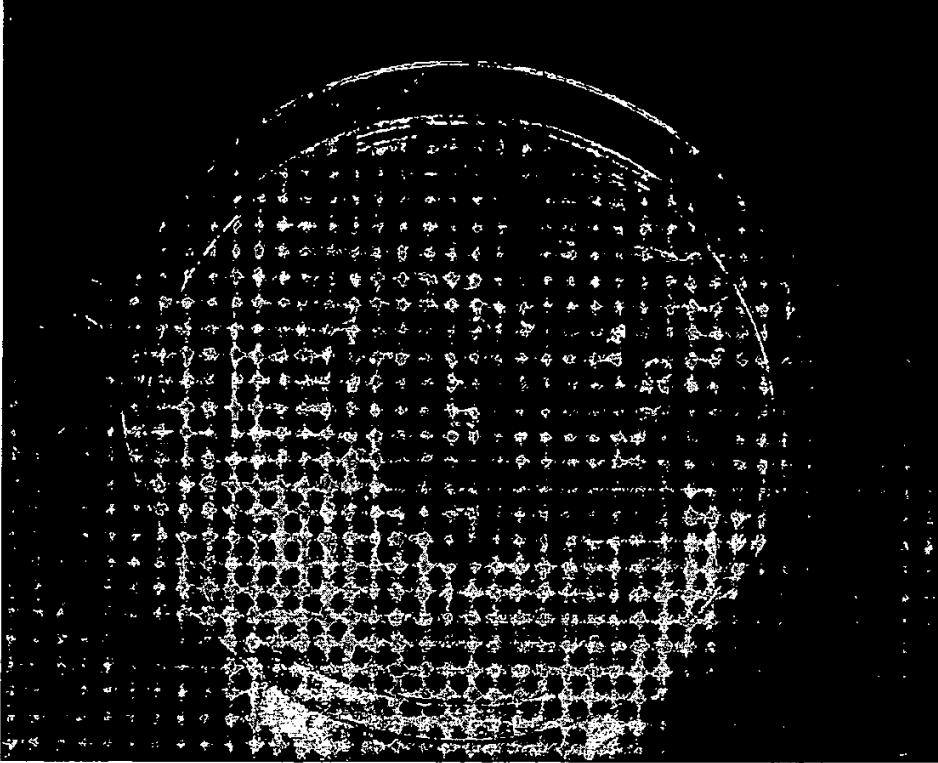


Fig. 3.

Gen de ARNr 16S parcial de *Pseudomonas* sp. Nj-55, cepa Nj-55 Longitud=1300

Puntuación= 1019 bits (314), Expect=0.0 Identidades=320/322
(99%), Brecha= 0 /322 (0%), Hebra=Más/Más

```

Query 1
TATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCCGTAACGTCAAAC 60
|||||
Sbjct 979
TATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCCGTAACGTCAAAC 1038

Query 61
AGCAAAGTATTAATTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCOGAGACC 120
|||||
Sbjct 1039
AGCAAAGTATTAATTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCOGAGACC 1098

Query 121
TTCTTCACACACGGCCATAGCTGGATCAGGCTTTGGCCCATTTGCCAATATCCCCACT 180
|||||
Sbjct 1099
TTCTTCACACACGGCCATAGCTGGATCAGGCTTTGGCCCATTTGCCAATATCCCCACT 1158

Query 181
GCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACCGATCATCCTCTCA 240
|||||
Sbjct 1159
GCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCA 1218

Query 241
GACCAGTTACGGATCGTCCGCTTGGTGAGCCATTACCCCACTAGCTAATCCGACCT 300
|||||
Sbjct 1219
GACCAGTTACGGATCGTCCGCTTGGTGAGCCATTACCCCACTAGCTAATCCGACCT 1278

Query 301
AGGCTCATCTGATAGCCCAAGGCCGAGGTCCCTGCTTTCTCCCGTAGGAOGTATGCG 360
|||||
Sbjct 1279
AGGCTCATCTGATAGCCCAAGGCCGAGGTCCCTGCTTTCTCCCGTAGGAOGTATGCG 1338

Query 361
GTATTAGCGTCCGTTTCCGAACGTTATCCCCCACTACCAGGCAGATTCTTAGGCATTACT 420
|||||
Sbjct 1339
GTATTAGCGTCCGTTTCCGAACGTTATCCCCCACTACCAGGCAGATTCTTAGGCATTACT 1398
    
```

Fig. 4.

```
Query 421
CACCCGTCGGCCCGCTCTCAAGAGAAGCAAGCTTCTCTCTACCGCTCGACTTGCATGTGTT 480
|||||
Sbjct 1399
CACCCGTCGGCCCGCTCTCAAGAGAAGCAAGCTTCTCTCTACCGCTCGACTTGCATGTGTT 1458

Query 481 AGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAACCTCT 522
          |||||
Sbjct 1459 AGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAACCTCT 1500
```

Fig. 4 cont.

```

: Gen de ARN ribosomal 16S de Pseudomonas trivialis cepa BIHB 749, secuencia
: parcial
: Longitud=1495

Puntuación= 1027 bits (518), Expect=0.0
Identidades=521/522 (99%), Brecha= 0 /522 (0%),
Hebras=Más/Más

Query 2
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGC 61
|||||
Sbjct 1
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGC 60

Query 62
GGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCT 121
|||||
Sbjct 61
GGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCT 120

Query 122
GCCTGCTACTGGGGGATACGTTCCGAAACGGACGCTAATACCCGATACGTCCTACGGGA 181
|||||
Sbjct 121
GCCTGCTACTGGGGGATACGTTCCGAAACGGACGCTAATACCCGATACGTCCTACGGGA 180

Query 182
GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGGCTATCAGATGAGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTT 241
|||||
Sbjct 181
GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGGCTATCAGATGAGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTT 240

Query 242
GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA 301
|||||
Sbjct 241
GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA 300

Query 302
CACITGGAACTGAGACACGGTCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA 361
|||||
Sbjct 301
CACITGGAACTGAGACACGGTCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA 360

Query 362
ATGGGGGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCCGATTGTAAG 421
|||||
Sbjct 361
ATGGGGGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCCGATTGTAAG 420

```

Fig 5

```
Query 422
CACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACA 481

|||||
Sbjct 421
CACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACA 480

Query 482 GAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGGGTAATA 523
          |||||
Sbjct 481 GAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGGGTAATA 522
```

Fig 5 cont

```

: Gen de ARNr 16S parcial de Arthobacter sp. ON14, aislamiento ON14
: Longitud=1495

Puntuación= 2878 bits (1452), Expect=0.0
Identidades=1491/1502 (99%), Brechas= 4 /1502 (0%),
Hebra=Más/Menos

Query 1
TGGTTACCTTGTACGACTTAGTCCCAATCGCCAGTCCACCTTCGACAGCTCCCTCCCC 60
|||||
Sbjct 1543
TGGTTACCTTGTACGACTTAGTCCCAATCGCCAGTCCACCTTCGACAGCTCCCTCCCC 1484

Query 61
ACAAGGGGGTTAGGCCACCGGCTTCGGGTGTACCAACTTCGGGACTTGACGGGGGGTG 120
|||||
Sbjct 1483
ACAAGGGGGTTAGGCCACCGGCTTCGGGTGTACCAACTTCGGGACTTGACGGGGGGTG 1424

Query 121
TGTACAAGGCCCGGGACGATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGGGATTACTAGCGACTC 180
|||||
Sbjct 1423
TGTACAAGGCCCGGGACGATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGGGATTACTAGCGACTC 1364

Query 181
CGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACGAGACCGGCTTTTGGGATTA 240
|||||
Sbjct 1363
CGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACGAGACCGGCTTTTGGGATTA 1304

Query 241
GCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCATTGTACCGGCCATTGTAGCATGGGTGAAGCCCAA 300
|||||
Sbjct 1303
GCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCATTGTACCGGCCATTGTAGCATGGGTGAAGCCCAA 1244

Query 301
GACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTGGTCTCCTCCTCCTCCGAGTGGACCCCGGCAG 360
|||||
Sbjct 1243
GACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTGGTCTCCTCCTCCTCCGAGTGGACCCCGGCAG 1184

Query 361
TCTCCTATGAGTCCCCACCATACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGGCTCGTTCG 420
|||||
Sbjct 1183
TCTCCTATGAGTCCCCACCATACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGGCTCGTTCG 1124

```

Fig. 6 (1/4)

```

Query 421
GGGACTTAACCCAAACATCTCAGGACACGAGCTGACGACACCCATGCACCACCTGTAAACC 480
|||||
Sbjct 1123
GGGACTTAACCCAAACATCTCAGGACACGAGCTGACGACACCCATGCACCACCTGTAAACC 1064

Query 481
GACCGCAAGCGGGGCACCTGTTCCAGGTATTACCGGTTTCATGTCAAGCCTTGGTAAGGT 540
|||||
Sbjct 1063
GACCGCAAGCGGGGCACCTGTTCCAGGTATTCCAGTTTCATGTCAAGCCTTGGTAAGGT 1004

Query 541
TCTTCGGGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGGCGCTTGIGCGGGCCCCCGTCAATT 600
|||||
Sbjct 1003
TCTTCGGGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGGCGCTTGIGCGGGCCCCCGTCAATT 944

Query 601
CCTTTGAGTTTATAGCCTTCCGGCGTACTCCCCAGGGGGGCAC7TAATGCGTTAGCTAC 660
|||||
Sbjct 943
CCTTTGAGTTTATAGCCTTCCGGCGTACTCCCCAGGGGGGCAC7TAATGCGTTAGCTAC 884

Query 661
GGCGGGAAAACGTTGGAATGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTAC 720
|||||
Sbjct 883
GGCGGGAAAACGTTGGAATGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTAC 824

Query 721
CAGGGTATCTAATCCTGTCCGCTCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTAATGCCCA 780
|||||
Sbjct 823
CAGGGTATCTAATCCTGTCCGCTCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTAATGCCCA 764

Query 781
GAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTCCCTCCYGATATCTGCGCATTTACCCGCTACACCAG 840
|||||
Sbjct 763
GAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTCCCTCCYGATATCTGCGCATTTACCCGCTACACCAG 704

Query 841
GAATTCAGTCTCCCTACATCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACCGCAGATCCGGGGTTG 900
|||||
Sbjct 703
GAATTCAGTCTCCCTACATCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACCGCAGATCCGGAGTTG 644

```

Fig. 6 (2/4)

```

Query 901
AGCCCCGGACTTTCACGGCAGACGGGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAAT 960
|||||
Sbjct 643
AGCCCCGGACTTTCACGGCAGACGGGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAAT 584

Query 961
TCCGGATAACGCTTTCGGCCCTACGTATTAACCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCCG 1020
|||||
Sbjct 583
TCCGGATAACGCTTTCGGCCCTACGTATTAACCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCCG 524

Query 1021
TTCCTTCGCAAGTACCCCTCAACCAACAAAATGCTGGCCTTGTCCCTACTGAAAGAGGT 1080
|||||
Sbjct 523
TTCCTTCGCAAGTACCCCTCAACCAACAAAATGCTGGCCTTGTCCCTACTGAAAGAGGT 464

Query 1081
TTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCAACGGGGGTGGCTGCATCAGGCTTTTCGCCCATTTG 1140
|||||
Sbjct 463
TTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCAACGGGGGTGGCTGCATCAGGCTTTTCGCCCATTTG 404

Query 1141
TGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCAGTCCAGTGTG 1200
|||||
Sbjct 403
TGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCAGTCCAGTGTG 344

Query 1201
GCCGGTCACCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCTGTCGCCCTGGTGAGCCATTACCTCACCAA 1260
|||||
Sbjct 343
GCCGGTCACCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCTGTCGCCCTGGTGAGCCATTACCTCACCAA 284

Query 1261
CAAGCTGATAGGCCGCGAGTCCATCCAAACCAATAAATCTTTCAACCAAAACCCCATGGC 1320
|||||
Sbjct 283
CAAGCTGATAGGCCGCGAGTCCATCCAAACCAATAAATCTTTCAACCAAAACCCCATGGC 224

Query 1321
AGGTAAGTCAATATCCAGTATTAGACCCCGTTTCCAAGGCTTATCCAGAGTTAAGGGC 1380
|||||
Sbjct 223
AGGTAAGTCAATATCCAGTATTAGACCCCGTTTCCAAGGCTTATCCAGAGTTAAGGGC 164

```

Fig. 6 (3/4)

```
Query 1381
AGGTTACTCACGTTACTCACCCTGTTCCGACTAATCCCCGACGCAAGCGCCAGTTCAT 1440
|||||
Sbjct 163 AGGTTACTCACGTTACTCACCCTGTTCCGACTAATCCCC--CGCAAGCG--
GGTTCAT 108
```

```
Query 1441
CGTTCGACTTGCA7GTGTTAAGCAGCGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAATC 1500
|||||
Sbjct 107
CGTTCGACTTGCA7GTGTTAAGCAGCGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAATC 48
```

```
Query 1501 TA 1502
||
Sbjct 47 TA 46
```

Fig. 6 (4/4)

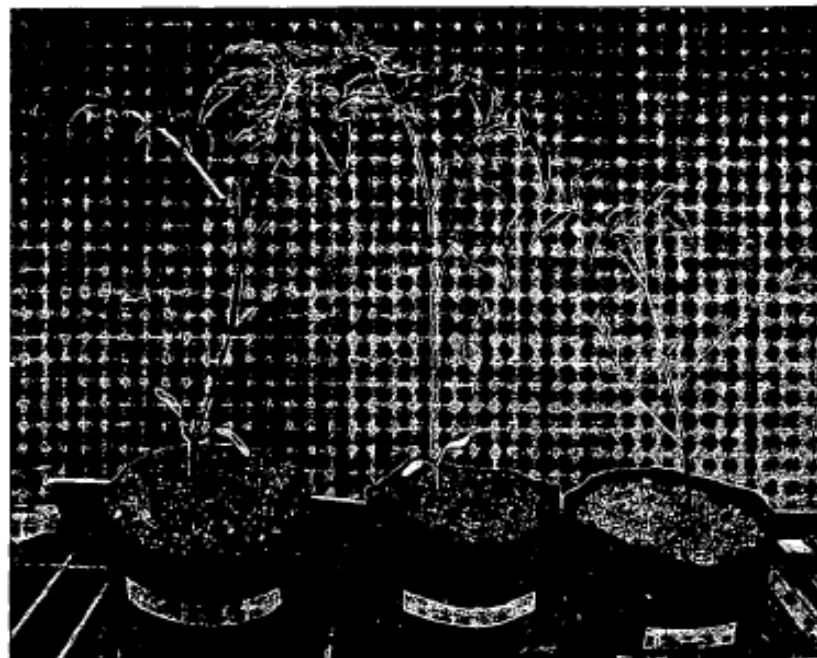


Fig 7.

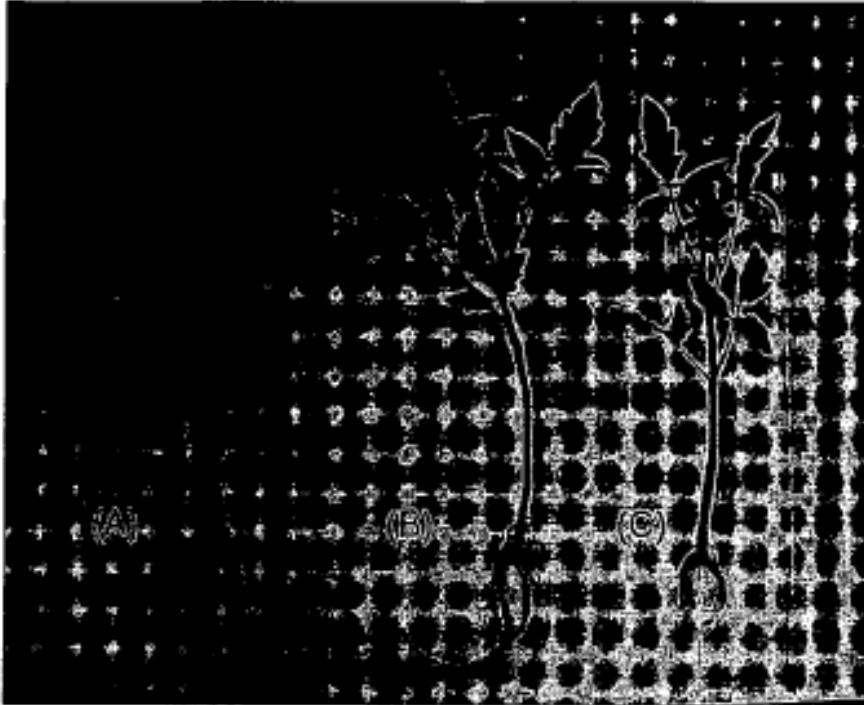


Fig. 8

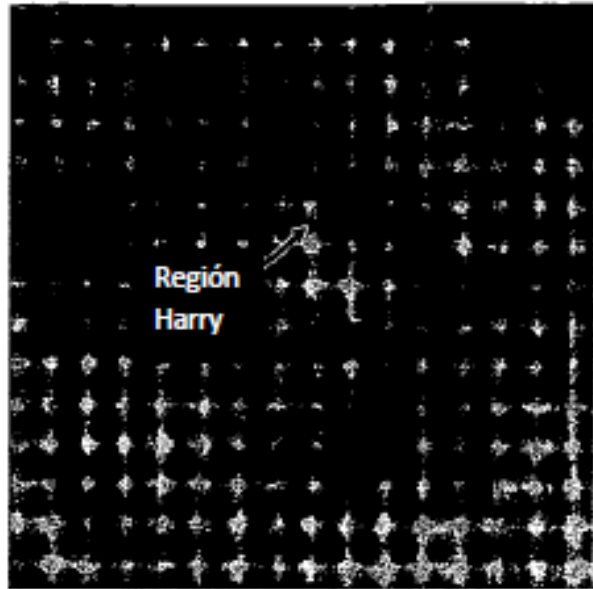


Fig. 9.

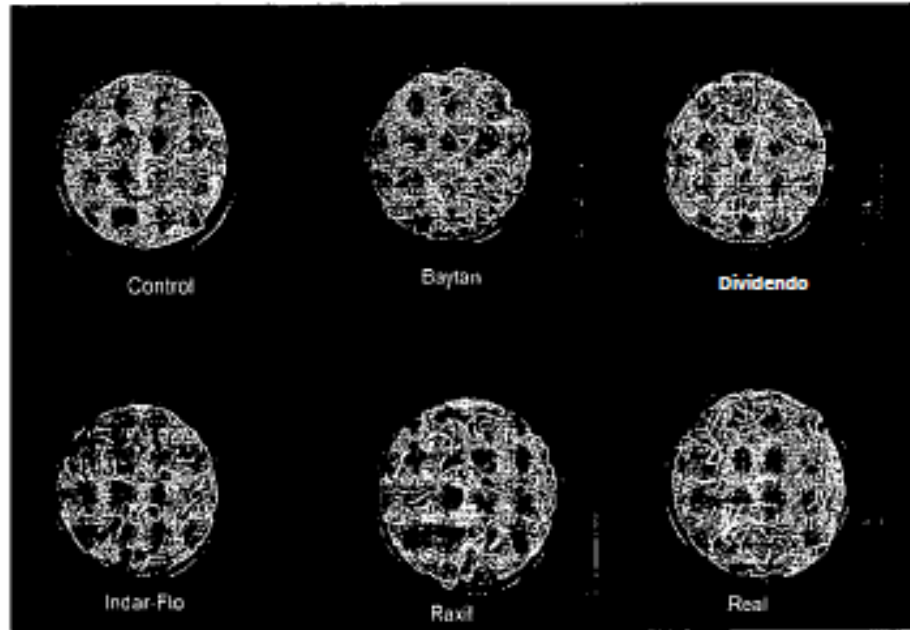


Fig. 10.