

CONSORCIOS MICROBIANOS QUE PRODUCEN ÁCIDO DIPICOLÍNICO Y MÉTODOS PARA SELECCIONAR MICROBIOS PARA LA FORMULACIÓN CONJUNTA CON PORTADORES

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

La presente reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/681,469, presentada el 6 de junio de 2018, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

CAMPO

La presente divulgación se refiere a microbios que producen ácido dipicolínico y métodos para identificar microbios con viabilidad mejorada, métodos para formular conjuntamente microbios con portadores, y composiciones que incluyen microbios y/o formulaciones conjuntas.

ANTECEDENTES

Los bioestimulantes vegetales basados en microbios ofrecen prácticas agrícolas sostenibles que protegen la salud del ecosistema. Además, la suplementación del microbioma de la planta y el suelo con microorganismos beneficiosos tiene el potencial de promover el crecimiento vegetal y la adaptación de las plantas, aumentar la productividad, mejorar la fertilidad del suelo y reducir los insumos químicos, lo que resulta en prácticas agrícolas más sostenibles. En las prácticas agrícolas actuales, los bioestimulantes microbianos se pueden aplicar conjuntamente y/o formular conjuntamente con numerosos portadores húmedos o secos.

COMPENDIO

Los inoculantes microbianos pueden ser susceptibles a la química del o de los portadores utilizados. Además, las condiciones de almacenamiento y la duración del almacenamiento antes de la aplicación también pueden afectar a los microbios. Estos factores pueden impactar de forma negativa su viabilidad y, en última instancia, limitar su eficacia en el campo. En la presente se describen composiciones y métodos que dan como resultado una supervivencia de microbios mejorada y/o una formulación conjunta

mejorada de microbios con portadores o semillas. En algunas modalidades, los métodos incluyen seleccionar uno o más microbios con viabilidad o supervivencia prolongada, ya sea solos y/o en formulación conjunta con uno o más portadores o semillas.

En algunas modalidades, se describen en la presente microbios que producen ácido dipicolínico (DPA) y composiciones que incluyen tales microbios. En un ejemplo, la composición incluye *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus koreensis*, *Bacillus drentensis*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium pasteurianum*, *Lactobacillus paracasei*, *Fontibacillus sp. (panacisegetis)*, *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus azoreducens*, *Paenibacillus chibensis*, *Paenibacillus cookii*, *Paenibacillus sp. (chitinolyticus)*, *Paenibacillus sp. (P1XP2)*, *Pseudomonas sp.*, y *Streptomyces griseus* (en algunos ejemplos, denominado en la presente el consorcio “DFC”). En una modalidad, la composición incluye células de especies microbianas depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) el 16 de mayo de 2019 y con el número de depósito asignado PTA-125924. En otras modalidades, los consorcios o composiciones microbianos descritos incluyen, consisten esencialmente en, o consisten en dos o más (tales como 5 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, o todos) microbios que tienen secuencias de ADNr 16S con al menos 95 % de identidad (tal como al menos 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad o más) con las SEQ ID NO: 3-25.

También se describen composiciones que incluyen los microbios o consorcios descritos (por ejemplo, el consorcio DFC) y uno o más portadores (tales como un portador seco o un portador líquido) o una o más semillas. En algunos ejemplos, el portador incluye un fertilizante líquido o seco, una sustancia derivada del suelo, una sustancia orgánica, un material inerte, un producto químico para el control del polvo o una mezcla de dos o más de estos.

En algunas modalidades, los métodos incluyen seleccionar un microbio para la formulación conjunta con un portador o semilla, que incluye la identificación de un microbio que comprende uno o más genes sintasa del ácido dipicolínico (DPA), un microbio que expresa una o más proteínas sintasa de DPA, y/o un microbio que produce cantidades detectables de DPA; y seleccionar el microbio para la formulación conjunta con un portador. En algunas modalidades, los métodos también incluyen la formulación conjunta

del microbio seleccionado con el portador o semilla. En algunos ejemplos, los microbios seleccionados incluyen uno o más de los incluidos en las Tablas 25 o 26, que incluye, de modo no taxativo, todos los enumerados en la Tabla 26.

En algunos ejemplos, los métodos incluyen la detección de uno o más genes de la sintasa de DPA (tal como un gen de la subunidad A de la sintasa de DPA (DpaA) y/o un gen de la subunidad B de la sintasa de DPA (DpaB)) o una o más proteínas DpaA y/o DpaB en un microbio. Los genes DpaA incluyen ácidos nucleicos que codifican una proteína DpaA con al menos 20 % (por ejemplo, al menos 60 %) de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la FIGURA 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 26-41). Los genes DpaB incluyen ácidos nucleicos que codifican una proteína DpaB con al menos 20 % (por ejemplo, al menos 60 %) de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la FIGURA 2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 42-56). Las proteínas DpaA incluyen proteínas DpaA con al menos 20 % (tal como al menos 60 %) de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la FIGURA 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 26-41). Las proteínas DpaB incluyen proteínas DpaB con al menos 20 % (tal como al menos 60 %) de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la FIGURA 2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 42-56). En otros ejemplos, los métodos incluyen la detección de uno o más genes o proteínas Isf en un microbio. Los genes Isf incluyen ácidos nucleicos que codifican una proteína Isf con al menos 20 % (por ejemplo, al menos 60 %) de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la FIGURA 3 (por ejemplo, SEQ ID NO: 57-67). Las proteínas Isf incluyen proteínas Isf con al menos 20 % (tal como al menos 60 %) de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la FIGURA 3 (por ejemplo, SEQ ID NO: 57-67). En otros ejemplos, los métodos incluyen detectar DPA en un microbio o medio que contiene un microbio, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de fluorescencia.

En algunas modalidades, el método incluye formular conjuntamente uno o más microbios seleccionados con un portador al poner en contacto los microbios seleccionados (que incluyen, de modo no taxativo, los consorcios microbianos descritos en la presente) en forma líquida o seca con uno o más portadores líquidos o secos. En algunos ejemplos, el portador incluye un fertilizante líquido o seco, una sustancia derivada del suelo, una sustancia orgánica, un material inerte, un producto químico para el control del polvo o una

mezcla de dos o más de estos. En otros ejemplos, los métodos incluyen tratar semillas con uno o más microbios seleccionados (que incluyen, de modo no taxativo, los consorcios microbianos descritos en la presente). En algunos ejemplos, los métodos incluyen además la formulación conjunta de uno o más microbios seleccionados y uno o más microbios que no comprenden uno o más genes sintasa de DPA, no expresan una o más proteínas sintasa de DPA y/o un microbio que no produce cantidades detectables de DPA con el portador o la semilla.

Las características anteriores y otras de la divulgación resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIGURA 1 es una alineación de las secuencias de la proteína DpaA de las bacterias indicadas. Se alinearon catorce secuencias de DpaA de 13 cepas (SEQ ID NO: 26-39) mediante el uso de Clustal Omega (clustal.org/omega) con los ajustes predeterminados. Luego se generó una secuencia de consenso ("Consensus60"; SEQ ID NO: 40) mediante el uso de un umbral de identidad de secuencia mínimo del 60 %. PRK08306 (SEQ ID NO: 41) es la secuencia de consenso de la superfamilia DpaA recuperada de la base de datos NCBI CDD Conserved Domain Family (ncbi.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi).

La FIGURA 2 es una alineación de secuencias de proteínas DpaB de las bacterias indicadas. Se alinearon trece secuencias de DpaB de 13 cepas (SEQ ID NO: 42-54) mediante el uso de Clustal Omega (clustal.org/omega) con la configuración predeterminada. Luego se generó una secuencia de consenso ("Consensus60"; SEQ ID NO: 55) mediante el uso de un umbral de identidad de secuencia mínimo del 60 %. PRK08305 (SEQ ID NO: 56) es la secuencia de consenso de la superfamilia DpaB recuperada de la base de datos NCBI CDD Conserved Domain Family (ncbi.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi).

La FIGURA 3 muestra una alineación de 10 secuencias de proteínas Isf de cinco bacterias (SEQ ID NO: 57-66) y una secuencia consenso (SEQ ID NO: 67).

La FIGURA 4 es un gráfico que resume la supervivencia de las bacterias en combinación con los portadores indicados.

La FIGURA 5 es un gráfico que muestra el peso seco de los brotes de pepino de 32 días en plantas tratadas con perlita o perlita impregnada con un consorcio microbiano (AMC1).

La FIGURA 6 es un gráfico que muestra el peso seco de brotes de pepino de 32 días en plantas tratadas con perlita, perlita impregnada con consorcio microbiano DFC, bentonita y bentonita impregnada con consorcio microbiano DFC.

La FIGURA 7 es un gráfico que muestra el peso seco de brotes de pepino de 32 días en plantas sin tratar, plantas tratadas con consorcio DFC líquido y plantas tratadas con perlita impregnada con consorcio microbiano DFC.

La FIGURA 8 es un gráfico que muestra la supervivencia de bacterias del consorcio DFC en combinación con semillas de maíz y soja, junto con tratamientos con insecticidas/fungicidas.

LISTADO DE SECUENCIAS

Cualquier secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos enumeradas en la presente o en el Listado de secuencias adjunto se muestran utilizando abreviaturas de letras estándar para nucleótidos y aminoácidos, tal como se define en 37 CFR § 1.822. En al menos algunos casos, solo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida mediante cualquier referencia a la hebra mostrada.

La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de consenso de *Streptomyces pratensis*.

La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de consenso de *Streptomyces venezuelae*.

La SEQ ID NO: 3 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Bacillus firmus*.

La SEQ ID NO: 4 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S consenso de *Paenibacillus azoreducens*.

La SEQ ID NO: 5 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Bacillus amyloliquefaciens*.

La SEQ ID NO: 6 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Bacillus flexus*.

La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Bacillus licheniformis*.

La SEQ ID NO: 8 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Bacillus megaterium*.

5 La SEQ ID NO: 9 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Bacillus pumilus*.

La SEQ ID NO: 10 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Bacillus koreensis*.

10 La SEQ ID NO: 11 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Bacillus drentensis*.

La SEQ ID NO: 12 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Bacillus subtilis*.

La SEQ ID NO: 13 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Clostridium bifermentans*.

15 La SEQ ID NO: 14 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Clostridium beijerinckii*.

La SEQ ID NO: 15 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Clostridium pasteurianum*.

20 La SEQ ID NO: 16 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Lactobacillus paracasei*.

La SEQ ID NO: 17 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S parcial de *Fontibacillus sp. (panacisegetis)*.

La SEQ ID NO: 18 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Oceanobacillus oncorhynchi*.

25 La SEQ ID NO: 19 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Paenibacillus lautus*.

La SEQ ID NO: 20 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Paenibacillus chibensis*.

30 La SEQ ID NO: 21 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Paenibacillus cookii*.

La SEQ ID NO: 22 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Paenibacillus sp. (chitinolyticus)*.

La SEQ ID NO: 23 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S parcial de *Paenibacillus sp. (P1XP2)*.

La SEQ ID NO: 24 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Pseudomonas sp.*

5 La SEQ ID NO: 25 es una secuencia de ácido nucleico de ADNr 16S de *Streptomyces griseus*.

Las SEQ ID NO: 26-39 son secuencias de aminoácidos de DpaA.

Las SEQ ID NO: 40-41 son secuencias de aminoácidos de consenso de DpaA.

Las SEQ ID NO: 42-54 son secuencias de aminoácidos de DpaB.

10 Las SEQ ID NO: 55-56 son secuencias de aminoácidos de consenso de DpaB.

Las SEQ ID NO: 57-66 son secuencias de aminoácidos de Isf.

La SEQ ID NO: 67 es una secuencia de aminoácidos de consenso de Isf.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 Los microbios que no forman esporas a menudo son más susceptibles a los factores dañinos que ocurren durante el procesamiento y la aplicación en el campo que los microbios que forman esporas. El proceso de selección para identificar microbios que forman esporas a partir de grandes inventarios microbianos puede resultar tedioso y llevar mucho tiempo. Esto generalmente implica pruebas de laboratorio húmedo para la supervivencia (por ejemplo, en formulaciones conjuntas con los portadores de elección),
20 con una garantía limitada de supervivencia y una vida útil extendida del producto final.

En la presente se describe un método y estrategia novedosos para seleccionar microbios con alta confianza en la prolongación de la vida útil, ya sea como formulaciones bioestimulantes independientes y/o en formulación conjunta con portadores o semillas
25 húmedos o secos, lo que acelera de forma significativa el tiempo de espera para las pruebas de nuevos productos en ensayos de campo. Tal como se describe en la presente, las bacterias formadoras de esporas con genes o proteínas DPA identificados y/o que producen DPA superan a las cepas sin genes DPA identificados y sin producción detectable de DPA en términos de capacidad de supervivencia en formulación conjunta
30 con portadores a lo largo del tiempo. Finalmente, se describe un consorcio de microbios que incluye cepas productoras de DPA.

I. Condiciones

A menos que se especifique de otro modo, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Krebs *et ál.*, *Lewin's Genes XI*, publicado por Jones y Bartlett Learning, 2012 (ISBN 1449659853); Kendrew *et ál.*, (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 2011 (ISBN 8126531789); y George P. Rédei, *Diccionario enciclopédico de genética, genómica y proteómica*, 2ª edición, 2003 (ISBN: 0-471-26821-6).

Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la técnica a poner en práctica la presente divulgación. Las formas singulares "un", "una" y "el/la" se refieren a uno o más de uno, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "que comprende una célula" incluye una o varias células y se considera equivalente a la frase "que comprende al menos una célula". Tal como se usa en la presente, "comprende" significa "incluye". Por lo tanto, "que comprende A o B" significa "que incluye A, B o A y B", sin excluir elementos adicionales. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan mediante referencia en su totalidad para todos los fines. En caso de conflicto, prevalecerá la presente descripción, incluyendo las explicaciones de términos.

Si bien se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente para llevar a la práctica o analizar la tecnología descrita, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean taxativos.

Para facilitar la revisión de las diversas modalidades de esta divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

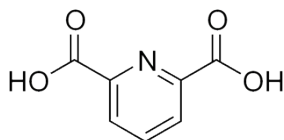
Portador: Una sustancia que se puede utilizar como portador de administración (por ejemplo, en formulación conjunta o como inoculante) para microbios, tales como los microbios o consorcios microbianos descritos en la presente (también denominado en la presente como "agro-portadores"). El portador puede ser líquido o sólido (seco). Los portadores de ejemplo incluyen fertilizantes líquidos o secos, sustancias derivadas del

suelo (por ejemplo, carbón vegetal, arcillas, césped) sustancias orgánicas (por ejemplo, aserrín, salvado de trigo/soja/avena, compost) y materiales inertes (por ejemplo, perlita, vermiculita, bentonita, Azomite®, caolín, silicatos, talco). En algunos ejemplos, las semillas también pueden denominarse portadores.

Contacto: Colocación en asociación física directa, que incluye en forma sólida y/o líquida. Por ejemplo, el contacto puede ocurrir con uno o más microbios (tales como los microbios en un consorcio microbiano) y un portador o una semilla. El contacto también puede ocurrir con uno o más microbios, formulación conjunta de microbio/portador, o formulación conjunta de microbio/semilla y suelo, plantas y/o partes de plantas (tal como follaje, tallo, plántula, raíces y/o semillas).

Cultivo: Crecimiento intencional de uno o más organismos o células en presencia de fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales minerales. En un ejemplo, tal crecimiento puede tener lugar en un medio nutritivo sólido o semisólido, o en un medio líquido en el que se disuelven o suspenden los nutrientes. En otro ejemplo, el cultivo puede tener lugar en una superficie o por cultivo sumergido. El medio nutritivo puede estar compuesto por nutrientes complejos o puede definirse químicamente.

Ácido dipicolínico (ácido piridin-2,6-dicarboxílico; DPA): Un compuesto con la estructura



En la mayoría de los microbios, el DPA se produce por conversión de dihidrodipicolinato en DPA por la enzima dipicolinato sintasa. La sintasa de DPA tiene dos subunidades, la subunidad A (DpaA o spoVFA) y la subunidad B (DpaB o spoVFB). Se proporcionan en la presente secuencias de aminoácidos de DpaA y DpaB de ejemplo (FIGURAS 1 y 2).

Algunas bacterias (por ejemplo, alguna *Clostridium*) son capaces de sintetizar DPA, a pesar de que carecen de genes DpaA y DpaB identificables. Sin limitarse a ninguna teoría, se propone que estas bacterias utilicen una proteína relacionada estructuralmente, la flavoproteína de transferencia de electrones (etfA), que es una oxidorreductasa de mononucleótido de flavina (FMN). Se cree que EtfA cataliza la etapa final en la vía de biosíntesis al convertir el dihidrodipicolinato en ácido dipicolínico (Orsburn *et ál.*, *Mol.*

Microbiol. 75:178-186, 2010). De manera alternativa, algunas bacterias pueden utilizar una flavoproteína de hierro y azufre (Isf) en la producción de DPA.

Heterólogo: Se origina de diferentes especies o fuentes genéticas. Por ejemplo, un ácido nucleico que es heterólogo de una célula se origina en un organismo o especie distinta de la célula en la que se expresa. Los métodos para introducir un ácido nucleico heterólogo en células bacterianas incluyen, por ejemplo, la transformación con un ácido nucleico, que incluye electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas.

En otro ejemplo de uso del término heterólogo, un ácido nucleico unido de forma operativa a un promotor heterólogo es de un organismo, especie o gen distinto al del promotor. En otros ejemplos del uso del término heterólogo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido o una parte de este se une de forma operativa a un ácido nucleico heterólogo que codifica un segundo polipéptido o una parte de este, por ejemplo para formar una proteína de fusión de origen no natural.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico, proteína u organismo) ha sido sustancialmente separado o purificado de otros componentes biológicos (tal como otras células, restos celulares u otras proteínas o ácidos nucleicos). Los componentes biológicos que se han "aislado" incluyen aquellos componentes purificados mediante métodos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos, proteínas o microbios recombinantes, así como péptidos o ácidos nucleicos sintetizados químicamente. El término "aislado" (o "enriquecido" o "purificado") no requiere pureza absoluta y puede incluir microbios o moléculas que estén aisladas al menos en un 50 %, tal como al menos 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % aisladas.

Microbio: Un microorganismo, que incluye, de modo no taxativo, bacterias, arqueobacterias, hongos y algas (tal como microalgas). En algunos ejemplos, los microbios son organismos unicelulares (por ejemplo, bacterias, cianobacterias, algunos hongos o algunas algas). En otros ejemplos, el término microbios incluye organismos multicelulares, tales como ciertos hongos o algas (por ejemplo, hongos filamentosos multicelulares o algas multicelulares).

Composición microbiana: Una composición (que puede ser sólida, líquida o al menos parcialmente ambas) que incluye células de al menos un tipo (o especie) de microbio (o una población de células de al menos un tipo de microbio). En algunos ejemplos, una composición microbiana comprende células de uno o más tipos (especies)

de microbios (o una o más poblaciones de microbios) en un líquido (tal como un medio de almacenamiento, cultivo o fermentación o un fertilizante líquido), por ejemplo, como una suspensión en el líquido. En otros ejemplos, una composición microbiana incluye células de uno o más tipos (especies) de microbios (o una o más poblaciones de microbios) en la superficie o incrustadas en un medio sólido o gelatinoso (que incluye de modo no taxativo una placa de cultivo), o una suspensión o pasta. En otros ejemplos, una composición microbiana incluye células de uno o más tipos (o especies) de microbios (o una o más poblaciones de microbios) en asociación con un material seco o semilla, tal como en la superficie o impregnadas en un material seco o semilla.

Consortio microbiano: Una mezcla, asociación o ensamblaje de células de dos o más especies microbianas, que en algunos casos están en contacto físico entre sí. Los microbios de un consorcio pueden afectarse entre sí por contacto físico directo o mediante interacciones bioquímicas, o ambos. Por ejemplo, los microbios de un consorcio pueden intercambiar nutrientes, metabolitos o gases entre sí. Por lo tanto, en algunos ejemplos, al menos algunos de los microbios en un consorcio son metabólicamente interdependientes. Tales interacciones interdependientes pueden cambiar de carácter y extensión a lo largo del tiempo y con las condiciones culturales cambiantes.

Transducido y transformado: Un virus o vector "transduce" una célula cuando transfiere ácido nucleico a la célula. Una célula es "transformada" por un ácido nucleico transducido en la célula cuando el ADN es replicado por la célula, ya sea por incorporación del ácido nucleico en el genoma celular, o por replicación episomal. Tal como se usa en la presente, el término transformación abarca todas las técnicas mediante las cuales una molécula de ácido nucleico podría introducirse en tal célula, que incluye la conjugación bacteriana, la transfección con vectores virales, la transformación con vectores plásmidos y la introducción de ADN no conjugado mediante electroporación, lipofección y aceleración de la pistola de partículas.

Vector: Una molécula de ácido nucleico que puede introducirse en una célula hospedadora, que produce así una célula hospedadora transformada o transducida. Los vectores de ADN recombinante son vectores que incluyen ADN recombinante. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicarse en una célula hospedadora, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables, un sitio de clonación para la introducción de ácidos

nucleicos heterólogos, un promotor (por ejemplo, para la expresión de un ácido nucleico unido de forma operativa) y/u otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Los vectores incluyen vectores plásmidos, que incluye los plásmidos para expresión en células bacterianas gram negativas y/o gram positivas. Los ejemplos de vectores incluyen los que se utilizan en *E. coli*.

Viabilidad: Capacidad de una célula (tal como una célula microbiana) para crecer o reproducirse en condiciones apropiadas para el crecimiento o la reproducción. En algunos ejemplos, "supervivencia" o "capacidad de supervivencia" se refiere a la viabilidad de una célula (tal como una microbiana) después de un período de almacenamiento en estado líquido o seco, sola, en una mezcla con otras células microbianas, y/o cuando se formula conjuntamente con un portador o semilla.

II. Métodos de identificación de microbios con viabilidad en formulaciones conjuntas

En la presente se describen métodos para identificar microbios que permanecen viables o sobreviven cuando se formulan conjuntamente con un portador líquido o sólido. Los microbios pueden formularse conjuntamente de forma individual con un portador o semilla (por ejemplo, una sola cepa o especie de microbios se formula conjuntamente con un portador o semilla) o pueden ser parte de un consorcio o mezcla de microbios (por ejemplo, dos o más cepas o especies de microbios) que se formula conjuntamente con un portador o semilla. En otras modalidades, los métodos incluyen identificar microbios que permanecen viables o sobreviven durante un período de tiempo prolongado en un consorcio (tal como un consorcio independiente o formulado conjuntamente con un portador o semilla).

En algunos ejemplos, los microbios identificados con los métodos descritos en la presente, por ejemplo, los microbios que incluyen uno o más genes de sintasa de DPA, expresan una o más proteínas DPA y/o producen cantidades detectables de DPA tienen una viabilidad mejorada (solos o en una formulación conjunta) que los microbios que no incluyen uno o más genes de sintasa de DPA, no expresan una o más proteínas de sintasa de DPA y/o no producen cantidades detectables de DPA. En algunos ejemplos, los microbios identificados con los métodos descritos en la presente tienen al menos 10 % de viabilidad aumentada (por ejemplo, al menos 20 %, al menos 0 %, al menos 40 %, al

menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 5 veces o más viabilidad aumentada) en comparación con un microbio que no incluye uno o más genes de sintasa de DPA, no expresa una o más proteínas sintasa de DPA y/o no produce cantidades detectables de DPA. La viabilidad incrementada puede incluir un mayor número de células viables después de un período de tiempo establecido y/o una viabilidad durante un período de tiempo más largo.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente incluyen identificar microbios que incluyen en su genoma uno o más genes que codifican una sintasa de DPA, expresan una o más proteínas sintasa de DPA y/o producen cantidades detectables de DPA. Tales microbios se identifican como microbios que pueden permanecer viables o sobrevivir individualmente o cuando se formulan conjuntamente con un portador líquido o sólido (por ejemplo, en comparación con uno o más microbios que no incluyen genes que codifican una sintasa de DPA, no expresan uno o más proteínas sintasa de DPA y/o no producen cantidades detectables de DPA). Los microbios identificados pueden seleccionarse además para uso posterior, tal como para la formulación conjunta con una semilla o portador líquido o sólido. En algunos ejemplos, los microbios permanecen viables o sobreviven (ya sea individualmente o cuando se formulan conjuntamente con un portador o semilla) durante al menos 1 día, al menos 3 días, al menos 5 días, al menos 7 días, al menos 10 días, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 8 meses, al menos 10 meses, al menos 1 año, al menos 2 años, o más (por ejemplo, al menos 1-28 días, al menos 5-21 días, al menos 2-6 semanas, al menos 4-8 semanas, al menos 2-6 meses, al menos 3-9 meses, al menos 4-10 meses, al menos 6 meses a 1 año, al menos 1-2 años o más).

Los métodos para determinar la viabilidad o supervivencia de un microbio incluyen la detección del crecimiento del microbio en cultivo. En algunos ejemplos, una preparación que contiene células microbianas (en estado líquido o seco, o en formulación conjunta con un portador o semilla) se inocula en un medio líquido, se incuba en condiciones adecuadas para el crecimiento microbiano y la presencia y/o cantidad de microbios se miden después de un período de tiempo definido. En otros ejemplos, una preparación que

contiene células microbianas (en estado líquido o seco, o en formulación conjunta con un portador o semilla) se esparce sobre una placa que contiene medio sólido o semisólido, se incuba en condiciones adecuadas para el crecimiento microbiano, y se mide la presencia y/o número de microbios (tales como presencia, tamaño y/o cantidad de colonias). En algunos ejemplos, los microbios se identifican, por ejemplo, mediante métodos de PCR. En el Ejemplo 1 se proporcionan métodos de ejemplo para determinar la viabilidad e identidad de las células microbianas.

En modalidades adicionales, los métodos incluyen seleccionar uno o más microbios que incluyen uno o más genes de sintasa de DPA, expresar una o más proteínas de sintasa de DPA, y/o producir cantidades detectables de DPA y, opcionalmente, formular conjuntamente el uno o más microbios seleccionados con uno o más portadores o semillas. En algunos ejemplos, los métodos incluyen preparar una formulación conjunta de uno o más de los microbios seleccionados con uno o más portadores o semillas. Los métodos incluyen poner en contacto uno o más microbios con uno o más portadores o semillas, por ejemplo, en forma sólida (seca) o líquida. En algún ejemplo, el o los portadores o la o las semillas se ponen en contacto con una mezcla de microbios. La mezcla incluye microbios que expresan sintasa de DPA o producen DPA (tales como microbios seleccionados o producidos mediante el uso de los métodos descritos en la presente, que incluyen, de modo no taxativo, DFC) y también pueden incluir uno o más microbios que no expresan sintasa de DPA o producen DPA. En algunos ejemplos, el portador se pone en contacto con un líquido que incluye alrededor de 10^3 - 10^9 células/mL o más (por ejemplo, alrededor de 1×10^3 células/mL, alrededor de 5×10^3 células/mL, alrededor de 1×10^4 células/mL, alrededor de 5×10^4 células/mL, alrededor de 1×10^5 células/mL, alrededor de 5×10^5 células/mL, alrededor de 1×10^6 células/mL, alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor de 1×10^7 células/mL, alrededor de 5×10^7 células/mL, alrededor de 1×10^8 células/mL, alrededor de 5×10^8 células/mL, alrededor de 1×10^9 células/mL, alrededor de 5×10^9 células/mL, o más) de cada microbio.

En algunas modalidades, un líquido que incluye uno o más de los microbios seleccionados (y opcionalmente uno o más microbios adicionales) se pone en contacto con uno o más portadores secos o semillas. En algunos ejemplos, el líquido que incluye los microbios es un cultivo bacteriano fresco o congelado o una mezcla de cultivos bacterianos frescos o congelados. En otros ejemplos, el líquido que incluye los microbios

es un líquido al que se han añadido microbios liofilizados. Se deja que el líquido que incluye uno o más microbios se empape en el portador seco o la semilla. En algunos ejemplos, se usa una cantidad de líquido que incluye uno o más microbios de modo que el portador seco o la semilla se sature, por ejemplo para proporcionar una distribución relativamente uniforme de los microbios por todo el portador o la semilla. Sin embargo, también se pueden usar cantidades no saturantes de líquido. En ejemplos no taxativos, la cantidad es de alrededor de 35 $\mu\text{L/g}$ a 6 mL/g . En algunos ejemplos, el portador o semilla impregnado de microbios se seca (tal como a temperatura ambiente o a alrededor de 30-35 °C) y se almacena a temperatura ambiente (por ejemplo, en un recipiente cerrado o hermético).

En otras modalidades, un líquido que incluye uno o más de los microbios seleccionados (y opcionalmente uno o más microbios adicionales) se mezcla con uno o más portadores líquidos. En algunos ejemplos, el líquido que incluye los microbios es un cultivo bacteriano fresco o congelado o una mezcla de cultivos bacterianos frescos o congelados. En otros ejemplos, el líquido que incluye los microbios es un líquido al que se han añadido microbios liofilizados. El líquido que incluye los microbios se puede mezclar con el portador líquido en cualquier cantidad seleccionada, por ejemplo, de 0,1 % -90 % (v/v), tal como 0,5-1 %, 1-5 %, 2-10 %, 3-6 %, 4-8 %, 5-15 %, 8-20 %, 10-25 %, 20-40 %, 30-50 %, 40-60 %, 50-75 % o 70-90 % (v/v). En algunos ejemplos, los microbios se mezclan con el portador líquido en alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,5%, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9%, alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 % o alrededor de 90 % (v/v). En un ejemplo no taxativo, la mezcla de microbios se agrega al portador líquido al 0,5 % (v/v) o en una proporción de 1:180. En otro ejemplo no taxativo, la mezcla de microbios se agrega a un portador líquido concentrado (tal como un portador líquido concentrado 10X) al 90 % (v/v) para producir una concentración 1X del portador líquido. La cantidad de células microbianas en la mezcla se puede ajustar para lograr una concentración final deseada de células microbianas, dependiendo del factor de dilución que se utilizará. La mezcla de microbios se almacena a temperatura ambiente (por ejemplo, en un recipiente cerrado o hermético).

En algunas modalidades, se usa una preparación seca de microbios (tal como microbios liofilizados) en la formulación conjunta con una semilla o portador seco. En algunos ejemplos, los microbios liofilizados se mezclan con una semilla o portador seco (tal como alrededor de 40 mg de microbios/kg de portador o semilla hasta alrededor de 1 g de microbios/kg de portador o semilla). En algunos ejemplos de esta modalidad, los microbios liofilizados se añaden a un líquido que luego se pone en contacto con la semilla o el portador seco. En otros ejemplos, los microbios liofilizados se añaden a un líquido y luego se ponen en contacto con la semilla o el portador seco tal como se describió anteriormente.

A. Detección de ácidos nucleicos sintasa de DPA

En algunas modalidades, los métodos incluyen identificar la presencia de una o más moléculas de ácido nucleico sintasa de DPA (tales como ADN, ADNc o ARNm) en un microbio o población de microbios. En algunos ejemplos, los métodos incluyen la detección de uno o más genes sintasa de DPA (como DpaA y/o DpaB) en el genoma de un microbio. En algunos ejemplos, un microbio incluye los genes DpaA y DpaB. Los genes sintasa de DPA de ejemplo incluyen *B. subtilis* DpaA (n.º de registro GenBank NC_000964.3, 1744367-1745260, incorporado a la presente mediante referencia como presente en GenBank el 3 de junio de 2018) y DpaB (n.º de registro GenBank NC_000964.3, 1745236-1745865, incorporado a la presente mediante referencia como presente en GenBank el 3 de junio de 2018). En algunos ejemplos, un gen DpaA codifica una proteína que se muestra en la FIGURA 1 o una proteína con al menos 20 % de identidad de secuencia (tal como al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o más) con una proteína mostrada en la FIGURA 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 26-39). En algunos ejemplos, un gen DpaB codifica una proteína que se muestra en la FIGURA 2 o una proteína con al menos 20 % de identidad de secuencia (tal como al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o más) con una proteína mostrada en la FIGURA 2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 42-54). En algunos ejemplos, una proteína DpaA o DpaB tiene una o más regiones

conservadas identificadas en las secuencias "Consensus60" en las FIGURAS 1 y 2, respectivamente (SEQ ID NO: 40 y 55, respectivamente).

En otras modalidades, los métodos incluyen identificar la presencia de uno o más ácidos nucleicos (tales como ADN, ARNm o ADNc) que están implicados en una vía alternativa para la síntesis de DPA. En algunos ejemplos, el método incluye identificar la presencia o expresión de uno o más ácidos nucleicos que codifican una flavoproteína de transferencia de electrones (como EtfA) o una flavoproteína de hierro-azufre (como Isf). La flavoproteína de transferencia de electrones es un heterodímero que consiste en una subunidad alfa y una beta, y forma parte de la superfamilia de alfa hidrolasa de nucleótido de adenina. Secuencias de ácido nucleico de EtfA bacteriano de ejemplo incluyen los números de registro de GenBank CP000312.1 (2508382-2509389), NC_004578.1 (2407768-2408697), NC_009089.1 (977905-978927), NC_019382.1 (1357738-1356809, complemento), NC_003030.1 (2833696-2833268, complemento), NC_002971.4 (1062557-1061613, complemento) y NC_003063.2 (650447-651376), cada uno de los cuales se incorpora en la presente mediante referencia como presente en GenBank el 3 de junio de 2018. Las secuencias de aminoácidos de EtfA bacteriana de ejemplo incluyen ABG86939, NP_792007.1, YP_001087282.1, YP_006967336.1, NP_349315.1, NP_820116.1, y NP_357016.2, cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante referencia como presente en GenBank el 3 de junio de 2018). Las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos de Isf de ejemplo incluyen los números de registro de GenBank CP016318 (3060700-3061308) y ARE63607, respectivamente (incorporados a la presente mediante referencia como están presentes en GenBank el 3 de junio de 2018) y los mostrados en la FIGURA 3 (por ejemplo, SEQ ID NO: 57-66).

En algunos ejemplos, los ácidos nucleicos sintasa de DPA (o ácidos nucleicos EtfA o Isf) pueden identificarse mediante análisis de secuencia de un microbio (por ejemplo, secuenciación y/o secuenciación del genoma completo mediante el uso de oligonucleótidos específicos de sintasa de DPA). En algunos ejemplos, el análisis de secuencia se realiza utilizando secuencias presentes en una o más bases de datos, que incluye GenBank (ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/), ENSEMBL (ensembl.org/index.html), IMG (img.jgi.doe.gov), MicrobesOnline (microbesonline.org), SEED (theseed.org), o GOLD (gold.jgi-psf.gov). En el Ejemplo 1 más adelante, se proporcionan métodos de ejemplo para identificar genes sintasa de DPA. Pueden usarse métodos similares para identificar

genes EtfA o Isf.

En algunos ejemplos, los ácidos nucleicos de un microbio o una población de microbios se aíslan, amplifican o ambos antes de la detección. En algunos ejemplos, la amplificación y detección de la expresión ocurren simultáneamente o casi simultáneamente. En algunos ejemplos, la expresión de ácidos nucleicos puede detectarse mediante PCR (por ejemplo, PCR, PCR en tiempo real, RT-PCR o RT-PCR cuantitativa). Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden aislarse y amplificarse al emplear kits comercialmente disponibles. En un ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden incubar con cebadores que permitan la amplificación de ácidos nucleicos DpaA y/o DpaB (o EtfA o Isf), en condiciones suficientes para permitir la amplificación de tales productos. Los amplicones resultantes pueden detectarse.

En otro ejemplo, los ácidos nucleicos de un microbio o una población de microbios se incuban con sondas que pueden unirse a moléculas de ácido nucleico DpaA y/o DpaB (o EtfA o Isf) (tal como ADNc, ADN genómico o ARN (como ARNm)) en condiciones de alta rigurosidad. Entonces se puede detectar la hibridación resultante. En otros ejemplos, se analiza un microbio o una población de microbios al aplicar moléculas de ácido nucleico aisladas obtenidas de los microbios a una matriz. En un ejemplo, la matriz incluye oligonucleótidos complementarios a los ácidos nucleicos DpaA y/o DpaB (o EtfA o Isf). En un ejemplo, las moléculas de ácido nucleico microbiano se incuban con una matriz que incluye oligonucleótidos complementarios a DpaA y/o DpaB (o EtfA o Isf) durante un tiempo suficiente para permitir la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico aisladas y las sondas de oligonucleótidos, formando de este modo complejos de oligonucleótido:molécula de ácido nucleico aislado. Los complejos de oligonucleótido:molécula de ácido nucleico aislada se analizan luego para determinar si los ácidos nucleicos están presentes en la muestra.

B. Detección de proteínas sintasa de DPA

Como alternativa, o además de detectar ácidos nucleicos sintasa de DPA, las proteínas se pueden detectar mediante el uso de métodos tales como inmunoensayos (tales como transferencia Western, inmunohistoquímica, citometría de flujo o ELISA) o espectrometría de masas. En algunos ejemplos, una proteína DpaA incluye una proteína con al menos 20 % de identidad de secuencia (tal como al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60

%, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o más) con una proteína mostrada en la FIGURA 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 26-39). En algunos ejemplos, una proteína DpaB incluye una proteína con al menos 20 % de identidad de secuencia (tal como al menos 25
5 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o más) con una proteína mostrada en la FIGURA 2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 42-54). En algunos ejemplos, una proteína DpaA o DpaB tiene una o más regiones conservadas identificadas
10 en las secuencias "Consensus60" en las FIGURAS 1 y 2, respectivamente (SEQ ID NO: 40 y 55, respectivamente). En otros ejemplos, una proteína Isf incluye una proteína con al menos 20 % de identidad de secuencia (tal como al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al
15 menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o más) con una proteína mostrada en la FIGURA 3 (por ejemplo, SEQ ID NO: 57-66).

En algunos ejemplos, las proteínas se purifican antes de la detección. En un ejemplo, las proteínas DpaA y/o DpaB (o Isf) se pueden detectar al incubar una muestra microbiana con un anticuerpo que se une específicamente a DpaA y/o DpaB (o Isf). El
20 anticuerpo ("anticuerpo primario") puede incluir una etiqueta detectable. Por ejemplo, el anticuerpo primario se puede etiquetar directamente o la muestra se puede incubar posteriormente con un anticuerpo secundario que está etiquetado (por ejemplo, con una etiqueta fluorescente). La etiqueta se puede entonces detectar, por ejemplo, mediante microscopía, ELISA, citometría de flujo o espectrofotometría. En otro ejemplo, la muestra
25 se analiza mediante transferencia Western para detectar la expresión de proteínas DpaA y/o DpaB. Un experto en la técnica puede generar anticuerpos para DpaA, DpaB o Isf, por ejemplo, mediante el uso de las secuencias de aminoácidos de las FIGURAS 1-3.

Las etiquetas adecuadas para el anticuerpo o anticuerpo secundario incluyen varias enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, agentes
30 magnéticos y materiales radiactivos. Los ejemplos no taxativos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa. Los ejemplos no taxativos de complejos de grupos protésicos

adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos no taxativos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Un material luminiscente de ejemplo no taxativo es luminol; un agente magnético de ejemplo no taxativo es gadolinio, y las etiquetas radiactivas de ejemplo no taxativo incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

C. Detección de DPA

En algunas modalidades, los métodos incluyen identificar un microbio o población de microbios que produce DPA (tal como niveles detectables de DPA). En algunos ejemplos, los métodos incluyen detectar al menos DPA 1 nM (tal como al menos 2 nM, al menos 5 nM, al menos 10 nM, al menos 25 nM, al menos 50 nM, al menos 100 nM, al menos 200 nM, al menos 500 nM de DPA o más). En un ejemplo, los métodos incluyen la detección de DPA mediante el uso de un ensayo de fluorescencia de terbio-DPA (ver, por ejemplo, Rosen, *Anal. Chem.* 69:1082-1085, 1997; Pellegrino *et al.*, *Anal. Chem.* 70:1755-1760, 1998; Ammann *et al.*, *Int. J. Microbiol* 2011:435281, 2011). En resumen, el contacto de DPA con terbio(III) forma un complejo que tiene una mayor fluorescencia en comparación con el terbio(III), lo que permite la detección y/o cuantificación de DPA en una muestra. En el Ejemplo 1 se describe un ensayo de Terbio-DPA de ejemplo.

III. Microbios y formulaciones conjuntas

En la presente se describen microbios que incluyen uno o más genes sintasa de DPA en su genoma, expresan una o más proteínas sintasa de DPA y/o producen DPA. En algunos ejemplos, los microbios se modifican para incluir uno o más genes sintasa de DPA en su genoma, expresar una o más proteínas sintasa de DPA y/o producir DPA. También se describen formulaciones conjuntas de los microbios con uno o más portadores o semillas.

A. Microbios

Los microbios que poseen uno o más genes sintasa de DPA, expresan una o más proteínas sintasa de DPA, y/o producen DPA incluyen, de modo no taxativo, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.* (estrechamente relacionados con *B. kochii*, *B. pocheonensis*, y *Bacillus sp.* (cepa R-27341)), *Clostridium beijerinckii*, *Oceanobacillus oncorhynchi*,

Paenibacillus chibensis, *Paenibacillus cookii*, *Paenibacillus lautus*, *Virgibacillus halophilus*, *Paenibacillus azoreducens*, y *Bacillus firmus*. En algunos ejemplos, estas bacterias incluyen las descritas en la publicación PCT n.º WO 2018/045004 (incorporada a la presente mediante referencia en su totalidad). Los microbios adicionales incluyen los

5 enumerados en las Tablas 25 y 26. En algunos ejemplos, estos microbios también tienen capacidad de esporulación; sin embargo, la capacidad de esporulación y la presencia de genes sintasa de DPA identificables o la producción de DPA no son completamente concordantes (ver, por ejemplo, la Tabla 6).

En modalidades adicionales, se describen composiciones que incluyen microbios

10 que poseen uno o más genes sintasa de DPA, expresan una o más proteínas sintasa de DPA y/o producen DPA, que incluye los denominados en la presente como Consorcio de Formulación Seca (DFC). Los microbios en el DFC incluyen, de modo no taxativo, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus koreensis*, *Bacillus drementensis*, *Bacillus subtilis*,

15 *Clostridium bifermentans*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium pasteurianum*, *Lactobacillus paracasei*, *Fontibacillus sp. (panacisegetis)*, *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus azoreducens*, *Paenibacillus chibensis*, *Paenibacillus cookii*, *Paenibacillus sp. (chitinolyticus)*, *Paenibacillus sp. (P1XP2)*, *Pseudomonas sp.*, y *Streptomyces griseus*. En una modalidad, la composición incluye células de especies

20 microbianas depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) el 16 de mayo de 2019 y con el número de depósito asignado PTA-125924.

Un experto en la técnica reconocerá que la identificación de microbios, particularmente a nivel de especie o cepa, no siempre es posible. En algunos ejemplos, los microbios en las composiciones descritas en la presente se analizaron mediante

25 secuenciación del ADNr 16S y secuenciación del genoma completo seguido de la comparación con secuencias en bases de datos públicas. Sin embargo, debido a las limitaciones de la información en las bases de datos de secuencias (que incluyen poca o ninguna información para algunas especies o cepas y/o cambios en la nomenclatura a lo largo del tiempo), puede resultar difícil proporcionar identificaciones definitivas de especies

30 o cepas. Por lo tanto, en algunas modalidades, las especies microbianas incluidas en las composiciones descritas se identifican por su identidad de secuencia con las secuencias de ADNr 16S proporcionadas en la presente (SEQ ID NO: 3-25). En algunos ejemplos, los

consorcios o composiciones microbianos descritos incluyen, consisten esencialmente en, o consisten en dos o más (tales como 5 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, o todos) de los microbios que tienen secuencias de ADNr 16S con al menos un 95 % de identidad (tal como al menos un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) con las SEQ ID NO: 3-25.

Los microbios que poseen uno o más genes de sintasa de DPA, expresan una o más proteínas de sintasa de DPA y/o producen cantidades detectables de DPA también incluyen microbios que no tienen naturalmente uno o más genes de sintasa de DPA, expresan una o más proteínas de sintasa de DPA y/o producen DPA, pero se modifican para hacerlo. En algunos ejemplos, un microbio que no tiene naturalmente uno o más genes de sintasa de DPA, expresa una o más proteínas de sintasa de DPA, y/o produce DPA se modifica para expresar uno o más genes de sintasa de DPA heterólogos, tal como DpaA y/o DpaB o uno o más genes Isf. Los genes y proteínas DpaA y DpaB de ejemplo y los genes y proteínas Isf se describen en la Sección II y las FIGURAS 1-3, que incluye las SEQ ID NO: 26-67).

Las bacterias que pueden modificarse para expresar uno o más genes de sintasa de DPA heterólogos incluyen, de modo no taxativo, *Azotobacter* (tal como *Azotobacter vinelandii*), *Clostridium* (tal como *Clostridium pasteurianum*), *Streptomyces* (tal como *Streptomyces griseus*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces pratensis*), *Sporolactobacillus* spp. (por ejemplo, *Sporolactobacillus dextrus*), *Sporosarcina* spp. (por ejemplo, *Sporosarcina halophila*), *Desulfotomaculum* spp. (por ejemplo, *Desulfotomaculum guttoideum*), *Nocardiopsis* Spp. (por ejemplo, *Nocardiopsis sinuspersici*), *Promicromonospora* spp. (por ejemplo, *Promicromonospora enterophila*, *Promicromonospora soli*), *Brevibacillus* spp. (por ejemplo, *Brevibacillus centrosporus*), *Rummeliibacillus* spp. (por ejemplo, *Rummeliibacillus pycnus*), *Lysinibacillus* spp., *Terribacillus* spp. (por ejemplo, *Terribacillus shanxiensis*), *Micromonospora* spp. (por ejemplo, *Micromonospora fulva*, *Micromonospora palomenea*), *Saccharopolyspora* spp. (por ejemplo, *Saccharopolyspora spinose*, *Saccharopolyspora indica*), y *Fontibacillus* spp. (por ejemplo, *Fontibacillus panacisegetis*). En algunos ejemplos, estas bacterias incluyen las descritas en la publicación PCT n.º WO 2018/045004 (incorporada a la presente mediante referencia en su totalidad).

En algunos ejemplos, el gen DpaA y/o DpaB heterólogo se coloca bajo el control de un promotor. En algunos ejemplos, el promotor es un promotor constitutivo, mientras que

en otros ejemplos, el promotor es inducible (por ejemplo, un promotor T7 inducible). En ejemplos adicionales, el promotor es un promotor inducible por arabinosa (por ejemplo, el sistema pBAD), un promotor lac (inducción directa de IPTG/lactosa), un promotor trc (inducción directa de IPTG/lactosa), un promotor inducible por tetraciclina, o un promotor pho (inducida por privación de fosfato). El gen DpaA y/o DpaB heterólogo puede incluirse en un vector, por ejemplo unido de forma operativa a un promotor. Pueden usarse métodos similares para los genes EtfA o Isf.

Se pueden expresar simultáneamente en bacterias múltiples genes (tal como dos o más sintasa de DPA y/o genes Isf). Para asegurar la producción adecuada y coordinada de múltiples enzimas a partir de una única vía, cada ácido nucleico que codifica un gen heterólogo se coloca opcionalmente bajo el control de un único tipo de promotor, tal como el promotor inducible T7. Un ejemplo son los vectores Duet™ (Novozymes), que están diseñados con replicones compatibles y genes de resistencia a fármacos para la propagación y el mantenimiento eficaz de cuatro plásmidos en una sola célula. Esto permite la coexpresión de hasta ocho proteínas diferentes. En otros ejemplos, el vector es un vector pET, tal como un vector pET21 o pET28. Los vectores basados en pET y pET están comercialmente disponibles, por ejemplo en Novagen (San Diego, CA) o Clontech (Mountain View, CA).

En un ejemplo, el vector es pET21a o pET28a. En algunos ejemplos, el vector pET incluye un marcador de resistencia (por ejemplo, resistencia a ampicilina o kanamicina) y un promotor T7. El sitio de clonación múltiple se ha manipulado de manera que se pueda expresar más de un gen (tal como 2, 3, 4 o más) a partir de un solo vector. En algunos ejemplos, los genes se expresan como un producto multicistrónico (por ejemplo, un producto bi-cistrónico, tri-cistrónico, etc.), con un solo ARNm y múltiples polipéptidos producidos. En otros ejemplos, los genes se expresan como múltiples productos monocistrónicos, con un polipéptido y ARNm individuales producidos para cada gen. Pueden seleccionarse vectores apropiados dependiendo del gen o genes que se expresen y de la célula hospedadora que se esté transformando.

En algunos ejemplos, un plásmido se introduce extracromosómicamente y se replica dentro del microbio hospedador. En otros ejemplos, después de la introducción del plásmido, se produce un evento de recombinación homóloga doble y uno o más genes se insertan en el genoma.

Se puede llevar a cabo la transformación de una célula bacteriana con ADN recombinante. Cuando el hospedador es células bacterianas, competentes que son capaces de la absorción de ADN puede prepararse a partir de células recogidas después de la fase de crecimiento exponencial y posteriormente tratadas por el método de CaCl_2 mediante el uso de procedimientos bien conocidos en la técnica. De manera alternativa, se puede usar MgCl_2 o RbCl . Las bacterias también se pueden transformar mediante electroporación, conjugación o transducción.

B. Portadores y tratamientos de semillas

En la presente se describen métodos para formular conjuntamente uno o más microbios con uno o más portadores y composiciones que incluyen uno o más microbios y uno o más portadores. El portador puede ser líquido o sólido (seco). Los portadores incluyen fertilizantes líquidos o secos (tal como fertilizantes que incluyen urea, potasa, fosfato de amonio, y/o nitrato de amonio), sustancias derivadas del suelo (por ejemplo, arcilla, turba, carbón, suelo inorgánico) sustancias orgánicas (por ejemplo, carbón vegetal, aserrín, salvado de trigo/soja/avena, compost, fibra de coco) y/o materiales inertes (por ejemplo, perlita, vermiculita, bentonita, Azomite®, caolín, silicatos, piedra pómez, talco). Los portadores de ejemplo incluyen Azomite®, perlita, biocarbón, fertilizantes secos (tal como urea, MOP o MAP), fertilizante líquido (tal como UAN) y productos químicos para el control del polvo (tal como los disponibles en ArrMaz, FL, EE. UU.). Portadores de ejemplo adicionales incluyen montmorillonita, atapulgita, aluminosilicato hídrico (Agsorb Products Group, IL, EE. UU.), akadama (Eastern Leaf Inc, CA, EE. UU.), Gránulos de arcilla Seramis (Greens hydroponics, Reino Unido), Aquasmart™ Pro (Aquasmart, TX, EE. UU.), Pyro-Gro (productos Green Air, OR, EE. UU.), lava triturada, guijarros de arcilla).

En algunas modalidades, las formulaciones conjuntas con portadores incluyen el consorcio de 22 microbios descritos en WO 2018/045004 (incorporado a la presente mediante referencia en su totalidad; denominado en la presente AMC1) y uno o más de los portadores descritos en la presente. En otras modalidades, las formulaciones conjuntas con portadores incluyen el consorcio de 23 microbios descritos en la presente (por ejemplo, los microbios enumerados en la Tabla 26 o el depósito ATCC PTA-125924) y uno o más portadores. Las formulaciones conjuntas también incluyen una o más (tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o más) microbios y uno o más de los portadores descritos en la presente. En algunos ejemplos, una

formulación conjunta incluye al menos un microbio que incluye o expresa uno o más sintasa de DPA y/o gen o genes Isf (o produce DPA) y un portador. En otros ejemplos, una formulación conjunta incluye al menos un microbio que incluye o expresa uno o más genes de sintasa de DPA o produce DPA y al menos un microbio que no incluye o expresa un
5 uno o más genes de sintasa de DPA o no produce DPA con un portador. Los métodos para formular conjuntamente un portador y uno o más microbios incluyen poner en contacto uno o más portadores con uno o más microbios. En algunos ejemplos, el uno o más microbios están en forma líquida (por ejemplo, están en un medio líquido) o están en forma sólida o seca.

10 También se describen en la presente métodos para tratar semillas con uno o más microbios (por ejemplo, formular conjuntamente uno o más microbios con una o más semillas) y composiciones que incluyen uno o más microbios y una o más semillas. En tales modalidades, las semillas son el "portador" para los microbios. En algunas modalidades, los tratamientos de semillas incluyen el consorcio de 22 microbios descritos
15 en WO 2018/045004 (incorporado a la presente mediante referencia en su totalidad) y una o más semillas. En otras modalidades, los tratamientos de semillas incluyen el consorcio de 23 microbios descritos en la presente (por ejemplo, los microbios enumerados en la Tabla 26 o el depósito ATCC PTA-125924) y una o más semillas. En otros ejemplos, una formulación conjunta incluye al menos un microbio que incluye o expresa uno o más genes
20 de sintasa de DPA y/o Isf (o produce DPA) y una semilla. En otros ejemplos, una formulación conjunta incluye al menos un microbio que incluye o expresa uno o más genes de sintasa de DPA o produce DPA y al menos un microbio que no incluye o expresa uno o más genes de sintasa de DPA o no produce DPA y un semilla. Las semillas de ejemplo que pueden tratarse con uno o más microbios incluyen, de modo no taxativo, semillas de
25 maíz, semillas de girasol, semillas de canola, semillas de trigo, semillas de pepino, semillas de tomate, semillas de arroz y semillas de algodón.

En algunos ejemplos, las semillas tratadas con microbios se preparan al aplicar microbios directamente a las semillas (por ejemplo, al poner en contacto la semilla con uno o más microbios). En otros ejemplos, las semillas tratadas con microbios se preparan al
30 aplicar los microbios como una capa superior a las semillas que se han tratado previamente con un insecticida y/o fungicida (por ejemplo, al poner en contacto semillas tratadas con insecticida y/o fungicida con uno o más microbios). En otros ejemplos más,

las semillas tratadas con microbios se preparan al mezclar los microbios con un insecticida y/o fungicida (tal como una suspensión de insecticida/fungicida) y al aplicar la mezcla a las semillas (por ejemplo, al poner en contacto la semilla con una mezcla de insecticida y/o fungicida y uno o más microbios). Los insecticidas y fungicidas de ejemplo que se pueden
 5 usar en combinación con los microbios incluyen, de modo no taxativo, metalaxilo, trifloxistrobina, ipconazol, clotianidina, tiametoxam, fludioxonil, mfenoxam, azoxistrobina, tiabendazol, piraclostrobina, imidacloprid, Fluxapyroxad, y/o Sedexane. En algunos ejemplos, el uno o más microbios aplicados a la semilla están en forma líquida (por ejemplo, están en un medio líquido) o están en forma sólida o seca. Los métodos para
 10 preparar semillas tratadas incluyen, de modo no taxativo los descritos en *Seed Treatment: Oregon Pesticide Applicator Training Manual* (Paulsrud *et ál.*, Urbana, Illinois, 2001) y el Ejemplo 13.

IV. Métodos de uso

15 Las composiciones microbianas descritas, solas o en formulación conjunta con uno o más portadores líquidos o secos, se pueden usar para tratar suelo, plantas o partes de plantas (tales como raíces, tallos, follaje, semillas o plántulas). En otros ejemplos, las composiciones microbianas descritas pueden usarse en forma de semillas tratadas.

En algunos ejemplos, el tratamiento con las composiciones descritas y/o portadores
 20 o semillas tratadas con las composiciones descritas mejora el crecimiento de las plantas, mejora la tolerancia al estrés y/o aumenta el rendimiento del cultivo. En algunas modalidades, los métodos incluyen poner en contacto el suelo, plantas (tales como follaje de plantas, tallos, raíces, plántulas u otras partes de plantas) o semillas con una composición microbiana o formulación conjunta descrita en la presente. En otras
 25 modalidades, los métodos incluyen plantar semillas tratadas con las composiciones descritas. Los métodos también pueden incluir cultivar las plantas tratadas, partes de plantas o semillas y/o cultivar plantas, partes de plantas o semillas en el suelo tratado.

En algunos ejemplos, se calcula la cantidad de la o las composiciones, sola o como una formulación conjunta de uno o más microbios y portadores o semillas a aplicar (por
 30 ejemplo, por acre o hectárea) y la composición se diluye en agua (o en algunos ejemplos, fertilizante líquido) hasta una cantidad suficiente para rociar o irrigar el área a tratar (si la composición es un líquido). La composición se puede aplicar en el momento de la siembra

de semillas en una proporción de 0,5-2 litros por acre (tal como 0,5 L/acre, 1 L/acre, 1,5 L/acre o 2 L/acre). La composición también se puede aplicar al suelo (por ejemplo, cerca de las raíces de la planta) o a la planta una o más veces durante el crecimiento, en la misma o en una cantidad diferente. En otros ejemplos, la composición se puede mezclar con herbicidas, insecticidas, pesticidas o productos químicos reguladores del crecimiento de las plantas diluidos. Si la composición a aplicar es un sólido (tal como una formulación seca), el sólido se puede aplicar directamente al suelo, plantas o partes de plantas o se puede suspender o disolver en agua (u otro líquido) antes de su uso.

En algunos ejemplos, el tratamiento del suelo, semillas, plantas o partes de plantas con una composición divulgada aumenta el crecimiento de la planta (tal como el tamaño total de la planta, cantidad de follaje, cantidad de raíces, diámetro de las raíces, longitud de las raíces, producción de macollos, producción de frutos, producción de polen, y/o producción de semillas) en al menos alrededor de 5 % (por ejemplo, al menos alrededor de 10 %, al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 100 %, al menos alrededor de 2 veces, al menos alrededor de 3 veces, al menos alrededor de 5 veces, al menos alrededor de 10 veces o más). En otros ejemplos, los métodos descritos dan como resultado un aumento de la producción de cultivos en alrededor de 10-75 % (tal como alrededor de 20-60 % o alrededor de 30-50 %) en comparación con los cultivos no tratados. Otras medidas del rendimiento del cultivo incluyen la calidad de la fruta, rendimiento, contenido de almidón o sólidos, contenido de azúcar o brix, vida útil de la fruta o el producto cosechable, producción de rendimiento comercial o tamaño objetivo, calidad de la fruta o producto, macollamiento de la hierba y resistencia al tránsito peatonal en césped, polinización y cuajado, floración, cantidad de flores, vida útil de las flores, calidad de floración, enraizamiento y masa de raíces, resistencia de los cultivos al acame, tolerancia al estrés abiótico al calor, sequía, frío y recuperación después del estrés, adaptabilidad a suelos pobres, nivel de fotosíntesis y enverdecimiento y salud de las plantas. Para determinar la eficacia de los productos, los controles incluyen las mismas prácticas agronómicas sin adición de microbios, realizadas en paralelo.

Los métodos y composiciones y/o formulaciones conjuntas descritos se pueden usar en conexión con cualquier cultivo (por ejemplo, para el tratamiento directo del cultivo o para el tratamiento del suelo antes o después de la siembra). Los cultivos de ejemplo

incluyen, de modo no taxativo, alfalfa, almendra, plátano, cebada, brócoli, repollo, cannabis, canola, zanahorias, cítricos y cultivos de árboles frutales, maíz, algodón, pepino, flores y plantas ornamentales, ajo, uvas, lúpulo, plantas hortícolas, puerro, melón, palma aceitera, cebolla, maní y legumbres, piña, álamo, pinos y árboles maderables, papa, frambuesa, arroz, sésamo, sorgo, soja, calabaza, frutilla, caña de azúcar, girasol, tomate, césped y pastos forrajeros, sandía, trigo y eucalipto.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características y/o modalidades particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse como que limitan la divulgación a las características o modalidades particulares descritas.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Aislamiento e identificación de microbios: Todos los microbios se derivaron de la colección microbiana de Agrinos (AMC) y se describieron previamente en WO 2018/045004, excepto por cuatro microbios adicionales descritos en la presente. Estos microbios adicionales se aislaron como se describe a continuación.

Las bacterias *Streptomyces pratensis* y *Streptomyces venezuelae* se aislaron del suelo a granel (N38° 38' 49.402", W121° 40' 5.775"). Brevemente, la muestra de suelo se suspendió en una solución salina amortiguada con fosfato estéril-TWEEN® 80 antes de la dilución en serie y se colocó en varios tipos de medios semisólidos. *S. pratensis* y *S. venezuelae* se aislaron del medio agar Azotobactercon placas de manitol (HIMEDIA #M372) después de una incubación de hasta 3 días a 30°C. Las cepas se esparcieron de forma repetida en medio semisólido MP (ver más abajo) hasta que fueron isogénicas.

Se aisló *Bacillus firmus* de una muestra de HYT® A (Agrinos AS) que se había mezclado previamente con fertilizante (UAN32) en una proporción de 1:180. Después de tres semanas de incubación a temperatura ambiente, alícuotas de la mezcla se colocaron en placas en varios tipos de medios semi-sólidos y se incubaron durante hasta 3 días a 30 °C. Se recogió una colonia de *B. firmus* de una placa de agar mediana de Pikovskaya (HIMEDIA # M520). La cepa se estrió de forma repetida sobre medio semisólido MP (ver más adelante) hasta que fue isogénico.

Se aisló *Paenibacillus azoreducens* de una muestra de HYT® A (Agrinos AS). *P. azoreducens* se aisló como una colonia que crecía en medio de agar con sulfato de amonio 1-10 mM (NaCl 0,585 g/L, KCl 0,075 g/L, CaCl₂ 0,147 g/L, MgSO₄ 0,049 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1,32-0,132 g/L, KH₂PO₄ 0,054 g/L en amortiguador HEPES pH 7,5). La cepa se
 5 estrió de forma repetida sobre medio semisólido MP (ver más adelante) hasta que fue isogénico.

Clasificación taxonómica de los microbios recién descritos: Para las cuatro cepas recién descritas, se realizó la secuenciación del genoma completo de los aislados biológicamente puros tal como se describe a continuación. El ensamblaje del genoma *de*
 10 *nov*o se realizó con el proceso de ensamblaje del genoma jerárquico (HGAP, Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, EE. UU.).

Las identificaciones taxonómicas se realizaron principalmente utilizando secuencias de ARN ribosómico (ARNr) 16S. Las secuencias de ARNr 16S se identificaron por primera vez dentro del ensamblaje del genoma *de novo* utilizando RNAmmer
 15 (cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/). Luego las secuencias 16S se clasificaron mediante el uso de alineación por pares con NCBI BLASTn, el clasificador bayesiano sin tratamiento previo del Proyecto de base de datos ribosomales (RDP) (Wang *et ál.* *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5261-5267, 2007), y construcción de árboles filogenéticos *de novo* de Greengenes y mapeo de rangos (DeSantis *et ál.* *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5069-502,
 20 2006). A continuación, se realizaron asignaciones de especies utilizando un consenso de los tres métodos.

En base a lo anterior, las identificaciones microbianas se realizaron de la siguiente manera:

- *Streptomyces pratensis*. Mediante el uso de las secuencias 16S, también se realizó
 25 una clasificación taxonómica del genoma completo. Las secuencias de codificación de proteínas se identificaron mediante el uso de Prodigal (Hyatt *et ál.* *BMC Bioinformatics*, 11:119, 2010). Esta clasificación utilizó un conjunto de 49 grupos conservados de familias de grupos ortólogos (COG) (Tatsuov *et ál.* *Science* 278:631-637, 1997) para encontrar el conjunto correspondiente de secuencias para un genoma específico . Las secuencias del genoma seleccionado se insertaron
 30 luego en las alineaciones de referencia, los vecinos más cercanos se extrajeron y concatenaron, y se proporcionó un árbol a partir de ellos utilizando FastTree2 (un

método de máxima verosimilitud aproximada; Price *et ál.* *PLoS One* 5:e9490, 2010). Este riguroso método de clasificación seleccionó a *Streptomyces pratensis* como la especie de referencia más apropiada. El genoma de referencia para *Streptomyces pratensis* ATCC 33331 se descargó de NCBI RefSeq y se alineó con la secuencia del genoma completo obtenida mediante el uso de MUMmer (mummer.sourceforge.net/). La alineación reveló un amplio acuerdo global y confirmó que los dos están estrechamente relacionados a una escala de todo el genoma. Se proporciona una secuencia de consenso 16S como SEQ ID NO: 1.

- *Streptomyces venezuelae*. Los resultados de todos los análisis apoyaron fuertemente la identificación de este aislado como *S. venezuelae*. Se proporciona una secuencia 16S consenso como la SEQ ID NO: 2.
- *Bacillus firmus*. Los resultados de todos los análisis apoyaron fuertemente la identificación de este aislado como *B. firmus*. Se proporciona una secuencia 16S consenso como la SEQ ID NO: 3.
- *Paenibacillus azoreducens*. Los resultados de todos los análisis apoyaron firmemente la identificación de este aislado como *P. azoreducens*. Se proporciona una secuencia de consenso 16S como SEQ ID NO: 4.

Identificación del potencial de actividad metabólica microbiana: Todas las actividades metabólicas microbianas potenciales se evaluaron mediante el uso de ensayos de laboratorio tal como se describe en WO 2018/045004, incorporado a la presente mediante referencia en su totalidad. Para determinar si el microbio reduce los compuestos que contienen azufre a sulfuros durante el proceso de metabolismo, se utilizaron los productos de identificación API® de bioMérieux de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (bioMérieux, Inc., Durham, NC, EE. UU.). Los resultados del perfil de actividad metabólica clave para los microbios recientemente identificados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Actividades metabólicas de nuevos aislados microbianos

Microbio	Metab. de N	Tolerancia a la sal	Solub. mineral	Celulolítico/Quitinolítico	Otra actividad beneficiosa para las plantas	Metab. de azufre	Metab. de hierro/ Sideróforo
<i>Streptomyces venezuelae</i>	N, D	≥ 2,5 %		Quitina + celulosa	M + IAA		Biosíntesis y transporte de sideróforos
<i>Streptomyces pratensis</i>	N	≥ 2,5 %		Quitina + celulosa	M + IAA		Biosíntesis y transporte de sideróforos
<i>Bacillus firmus</i>	N	< 5 %		Celulosa	M + IAA		Transporte de sideróforos
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	N	< 2.5%	P, Ca		IAA	Prod. de H ₂ S	Transporte de sideróforos

D: desnitrificación, N: fijación de nitrógeno, P: fosfato, Ca: calcio, IAA: producción de ácido indol-3-acético, M: asimilación de ácido málico, H₂S: producción de sulfuro de hidrógeno

- 5 **Evaluación de la producción de ácido dipicolínico (DPA) en bacterias:** La evaluación de la producción de DPA en cepas bacterianas de interés se realizó con un ensayo de fluorescencia de terbio-DPA, esencialmente tal como lo describe Rosen (*Anal. Chem.* 69:1082-1085, 1997); Pellegrino *et ál.* (*Anal. Chem.* 70:1755-1760, 1998); y Ammann *et ál.* (*Int. J. Microbiol.* 2011:435281, 2011). Brevemente, cada cepa isogénica se
- 10 cultivó en medio de agar (ver la Tabla 2) ya sea de forma aeróbica o anaeróbica. Las cepas aerobias se cultivaron a 30 °C durante un máximo de 3 días, mientras que las cepas

anaerobias se cultivaron a 35 °C en sistemas de contenedores BD GasPak EZ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) con sobres de generación de gas anaeróbico Pack-Anaero (Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc., Tokio, Japón) durante un máximo de 3 días. Para el ensayo de DPA, se tomaron aproximadamente 5 µL de bacterias de una colonia que crecía en una placa y se resuspendieron en 10 mL de amortiguador de acetato de sodio (0,2 M, pH 5). La suspensión se sometió a autoclave durante 15 min a 121 °C, 15 psig y se enfrió a temperatura ambiente durante alrededor de 30 min. Posteriormente se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión sometida a autoclave y una solución de cloruro de terbio(III) hexahidratado 30 µM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.). A continuación, se midió la fluorescencia (excitación de 272 nm, emisión de 545 nm) mediante el uso de un lector de imágenes Cytation 5 (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.).

Cultivo de bacterias utilizadas en este estudio en medios semisólidos: Las cepas bacterianas isógenas almacenadas a -80 °C como bancos de células maestras se cultivaron en medio de agar (Tabla 2) hasta que se observó la formación de colonias distintas. Brevemente, las cepas aerobias se cultivaron a 30 °C durante un máximo de 3 días, mientras que las cepas anaerobias se cultivaron a 35 °C en sistemas de contenedores BD GasPak EZ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) con sobres de generación de gas anaeróbico Pack-Anaero (Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc., Tokio, Japón) hasta por 3 días.

Tabla 2. Medios de agar utilizados para cultivar microbios

Género	Medio a base de agar*
<i>Bacillus spp.</i>	MP, NA (amyloliquefaciens; flexus; licheniformis; subtilis), BHI (subtilis; licheniformis; flexus), RCM (firmus; sp.(pocheonensis)), YPD (megaterium; amyloliquefaciens), RhX (amyloliquefaciens)
<i>Lactobacillus spp.</i>	RCM, MP, MRS
<i>Virgibacillus spp.</i>	YPD, MP
<i>Paenibacillus</i>	BHI, MP, NA (cookii, lautus), RCM (azoreducens), R2A

Género	Medio a base de agar*
<i>spp.</i>	(chibensis)
<i>Clostridium spp.</i>	RCM (pasteurianum; beijerinckii), AMAS (pasteurianum), NA (beijerinckii), MP (pasteurianum; beijerinckii), MP
<i>Oceanobacillus spp.</i>	BHI, RhX, NA, MP
<i>Acetobacter spp.</i>	RCM, YPD, MP
<i>Pseudomonas spp.</i>	MP, YPD, BHI (putida), RCM (sp. (fluorescens))
<i>Streptomyces spp.</i>	MP, BHI, NA (pratensis), YPD (griseus)
<i>Azotobacter spp.</i>	MP, AMAS, RhX

*NA: agar nutritivo (BD n.º 213000); YPD: dextrosa de peptona de levadura (BD n.º 242720); BHI: agar para infusión de cerebro y corazón (Teknova, CA, EE. UU.); RhX: medio 111 Rhizobium X (ATCC); AMAS: agar de medio azotobacter (HIMEDIA n.º M372); RCM: refuerzo del medio de clostridium (BD n.º 218081); MRS: Lactobacilli MRS (BD n.º 288210); R2A: agar R2A (HIMEDIA n.º SMEB962), MP: agar de medio melaza (melaza al 2 % p/v, 0,15 g/L de MgSO₄, 0,1 g/L de CaCl₂, 0,12 g/L de FeSO₄, 1 g/L de K₂SO₄, extracto de levadura de 5 g/L, 10 g/L de peptona, 5g/L de NaCl, 0,1g/L de NaMoO₄, 0,01g/L de MnCl₂, 0,03 g/L de KH₂PO₄, 0,03 g/L de Na₂HPO₄ y 15 g/L de agar)

Cultivo de cepas de bacterias individuales utilizadas en este estudio en medio líquido: Se inocularon colonias seleccionadas de cepas cultivadas en agar en medio líquido esterilizado apropiado (Tabla 3) y se incubaron durante hasta 3 días. Cepas aerobias se cultivaron a 30 °C con agitación (125-175 rpm) mientras que las cepas anaerobias se cultivaron bajo gas N₂ en botellas de suero sellados o tubos Hungate a 35 °C sin agitación. Cuando fue necesario, se produjeron consorcios microbianos al mezclar volúmenes iguales de cepas cultivadas individualmente. En la Tabla 4 se resume un resultado típico que ilustra la cantidad de células por mL por cepa (ver más adelante). El contenido microbiano se determinó mediante PCR digital de gotas (ddPCR) utilizando

Supermix para sondas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), tal como se describe en WO 2018/045004.

Tabla 3: Medios líquidos utilizados para cultivar microbios

Género	Medio líquido*
<i>Bacillus spp.</i>	BHI (flexus; licheniformis; sp.(pocheonensis); subtilis), YPDS (megaterium; amyloliquefaciens), NB (firmus)
<i>Lactobacillus spp.</i>	RCM
<i>Virgibacillus spp.</i>	BHIS
<i>Paenibacillus spp.</i>	BHI (chibensis; cookii; lautus), NB (azoreducens)
<i>Clostridium spp.</i>	RCM
<i>Oceanobacillus spp.</i>	BHIS
<i>Acetobacter spp.</i>	YPD
<i>Pseudomonas spp.</i>	YPDS 0,5 %
<i>Streptomyces spp.</i>	YEME
<i>Azotobacter spp.</i>	MP

- 5 * YPD: dextrosa de peptona de levadura (BD n.º 242720); YPDS: peptona de dextrosa de levadura (BD n.º 242720) suplementada con 0,5 g/L de NaCl; BHI: infusión de cerebro y corazón (Teknova, CA, EE. UU.); RCM: refuerzo del medio de clostridium (BD n.º 218081);
- 10); BHIS: infusión de cerebro y corazón (Teknova, CA, EE. UU.) suplementada con 45 g/L de NaCl; RCM: refuerzo del medio de clostridium (BD n.º 218081); MP: Medio de melaza (melaza al 2 % p/v, 0,15 g/L de MgSO₄, 0,1 g/L de CaCl₂, 0,12 g/L de FeSO₄, 1 g/L de K₂SO₄, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl, 0,1 g/L de NaMoO₄, 0,01 g/L de MnCl₂, 0,03 g/L de KH₂PO₄ y 0,03 g/L de Na₂HPO₄); YEME: medio de extracto de levadura-extracto de malta (3 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de bacto-peptona; 3 g/L de extracto de malta; 10 g/L de glucosa; 340 g/L de sacarosa, 5 mM de

MgCl₂); NB: caldo de nutrientes (BD n.º 234000)

Tabla 4: Cantidad típica de células bacterianas por mL de formulación líquida final mezclando cepas cultivadas individualmente.

Microorganismos	Número de células bacterianas por mL de formulación líquida final (mezcla de individuos)
<i>Bacillus megaterium</i>	2.53E+07
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	7.66E+07
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1.97E+07
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	4.58E+07
<i>Lactobacillus buchneri</i>	1.77E+07
<i>Bacillus subtilis</i>	5.26E+07
<i>Paenibacillus cookii</i>	9.14E+07
<i>Lactobacillus vini</i>	9.06E+07
<i>Bacillus licheniformis</i>	5.00E+08
<i>Paenibacillus lautus</i>	5.16E+07
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	2.12E+07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	8.30E+07
<i>Bacillus sp.</i>	1.26E+08
<i>Pseudomonas putida</i>	1.02E+08
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.96E+08
<i>Streptomyces griseus</i>	3.76E+07
<i>Paenibacillus chibensis</i>	9.34E+07
<i>Bacillus flexus</i>	5.88E+07
<i>Clostridium pasteurianum</i>	3.29E+07
<i>Azotobacter vinelandii</i>	6.02E+07
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1.95E+07
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	3.36E+07

Producción de consorcios microbianos cultivados conjuntamente por

fermentación: Se cultivaron bacterias aerobias y/o anaerobias en un medio que contenía 2 % de melaza suplementado con elementos esenciales tales como fosfatos, sodio, potasio y cloruros (en forma de solución salina amortiguada con fosfato comercialmente disponible) así como también aminoácidos, nitrógeno y péptidos/proteínas en forma de suero en polvo de calidad alimentaria (0,1 % p/v) y extracto de soja no transgénico producido de forma enzimática (0,25 % p/v; Ferti-Nitro Plus Plant N; Ferti-Organic , Brownsville, TX, EE. UU.). Las concentraciones de cloruro de sodio oscilaron entre 0-4 % p/v. Las cepas de la Tabla 4 descritas anteriormente (a las que se hace referencia en la presente como AMC1) se inocularon en biorreactores DASGIP de 2 L (Eppendorf North America Hauppauge, NY) con un volumen de trabajo de 1,5 litros con una inoculación final de DO₆₀₀ para cada cepa entre 6.67E-05 a 6.67E-04. Se utilizaron hidróxido de amonio y ácido fosfórico como soluciones básicas y ácidas, respectivamente, para mantener el pH entre pH 5,5 y 6,9. La temperatura se controló entre 28 °C y 35 °C. Las fermentaciones anaerobias se rociaron continuamente con gas N₂ para mantener un ambiente anaerobio, mientras que el aire rociado se usó en fermentaciones aerobias como fuente de oxígeno para los microbios durante la duración de la fermentación (típicamente hasta 3 días). Para algunos experimentos, después de la fermentación, se combinaron lotes que contenían diferentes cepas para generar una mezcla bacteriana completa de 22 cepas. En la Tabla 5 se resume un resultado típico que ilustra el número de células por mL por cepa (ver a continuación). El contenido microbiano en los fermentados se determinó mediante PCR digital de gotas (ddPCR) mediante el uso de Supermix para sondas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), tal como se describe en WO 2018/045004.

Tabla 5. Cantidad típica de células bacterianas por mL de formulación líquida final mediante cultivo conjunto

Microorganismos	Número de células bacterianas por mL de formulación líquida final (cultivo conjunto)
<i>Bacillus megaterium</i>	1.40E+04
<i>Lactobacillus</i>	9.60E+05

Microorganismos	Número de células bacterianas por mL de formulación líquida final (cultivo conjunto)
<i>paracasei/casei</i>	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1.60E+07
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1.20E+07
<i>Lactobacillus buchneri</i>	1.00E+05
<i>Bacillus subtilis</i>	1.30E+06
<i>Paenibacillus cookii</i>	6.60E+03
<i>Lactobacillus vini</i>	8.20E+04
<i>Bacillus licheniformis</i>	9.30E+05
<i>Paenibacillus lautus</i>	2.00E+09
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	2.00E+09
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6.00E+05
<i>Bacillus sp.</i>	3.20E+05
<i>Pseudomonas putida</i>	2.30E+07
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.20E+07
<i>Streptomyces griseus</i>	7.50E+06
<i>Paenibacillus chibensis</i>	5.80E+03
<i>Bacillus flexus</i>	6.00E+06
<i>Clostridium pasteurianum</i>	4.80E+06
<i>Azotobacter vinelandii</i>	1.30E+07
<i>Virgibacillus halophilus</i>	6.10E+06
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2.00E+06

Producción de consorcio microbiano liofilizado: En algunos experimentos, el consorcio de microbios producido se liofilizó antes de experimentar en formulación conjunta con agroportadores. Los consorcios se produjeron ya sea agrupando un volumen igual de bacterias cultivadas individualmente o utilizando fermentados cultivados conjuntamente (descritos anteriormente). La liofilización se realizó esencialmente tal como se describe en WO 2018/045004. Brevemente, las formulaciones microbianas liofilizadas

se produjeron al mezclar los consorcios microbianos líquidos con una solución de manitol/lioprotector (OPS Diagnostics Lebanon, NJ, EE. UU.) según la recomendación del fabricante y la suspensión microbiana se dividió en alícuotas en viales de liofilización (OPS Diagnostics, Lebanon, NJ, EE. UU.). Después de 60 minutos a -80 °C, las mezclas se colocaron en el sistema de liofilización FreeZone 6 (Labconco, Kansas City, MO), se aplicó vacío y se dejó sublimar el agua de las muestras. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta que se necesitaron. En algunos experimentos, la solución lioprotectora se preparó al agregar los siguientes productos químicos a cultivos microbianos para una concentración final de 0,75 g/L de caldo de soja tríptico (Becton, Dickinson and Company, EE. UU.), 10 g/L de sacarosa (Sigma Aldrich, EE. UU.) y 5 g/L de leche desnatada (Carnation, Nestlé SA, CH).

Formulación conjunta de microbios con agroportadores: Consorcios microbianos líquidos (producidos a partir del cultivo conjunto o cultivados individualmente y luego agrupados) o cepas de bacterias individuales producidas tal como se describe anteriormente, se impregnaron en agro-portadores tales como perlita, Azomite® (Azomite, UT, EE. UU.), piedra pómez, fertilizante de fosfato de amonio monobásico (MAP; Mosaic, MN, EE. UU.), muriato de fertilizante de potasa (MOP; Mosaic, MN, EE. UU.) y Biochar (Cool Terra®; Cool Planet Energy system, CO, EE. UU.). Dependiendo de las características de retención de agua del portador, se utilizaron diferentes volúmenes de consorcios microbianos para saturar el portador desde tan solo 35 µL por gramo hasta 6 mL por gramo. La mezcla de microbio/agroportador se secó luego durante la noche a 30 °C-35 °C antes de almacenarla en recipientes herméticos para estudios de supervivencia microbiana de vida útil adicionales y ensayos de plantas.

En el caso de la formulación conjunta con agroquímicos líquidos tal como urea y nitrato de amonio en agua (UAN₃₂; TGI, CA, EE. UU.) o agentes de control de polvo de fertilizantes (DUSTROL; ArrMaz FL, EE. UU.), consorcios microbianos líquidos, producidos tal como se detalló anteriormente, se mezclaron en diversas proporciones (descritas en los ejemplos siguientes) antes del almacenamiento y análisis de supervivencia microbiana. Todo el trabajo se realizó en condiciones sanitarias para minimizar la contaminación.

En algunos casos, se utilizaron consorcios bacterianos liofilizados para minimizar los efectos del caldo de cultivo en la química del portador. Los detalles se describen en ejemplos según sea apropiado.

Análisis de genomas de bacterias para la producción de sintasa de DPA

Extracción de ADN genómico microbiano: Se cultivaron y recolectaron células bacterianas de diferentes especies a partir de caldo líquido optimizado y condiciones de cultivo. El kit de aislamiento de ADN PowerSoil (MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, EE. UU.) se utilizó para extracciones de ADN genómico a pequeña escala. Para extracciones de ADN genómico a gran escala, se utilizó el kit de ADN genómico bacteriano de GenElute (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) o el conjunto de amortiguadores de ADN genómico de Qiagen y Genomic-tip500/G (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo los métodos recomendado por el fabricante. El ADN genómico resultante se precipitó posteriormente con un volumen igual de isopropanol, se lavó con etanol al 70 %, se secó al aire y se resuspendió en amortiguador TE.

Secuenciación del genoma completo (WGS): La secuenciación del genoma completo de los aislados biológicamente puros se realizó mediante el uso del sistema PacBio RSII (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, EE. UU.) siguiendo el método recomendado por el fabricante para la preparación y secuenciación de la biblioteca de secuencias. Se generó un promedio de 73.000 lecturas de 24 kb de longitud en promedio a partir de los aislados microbianos, seguidos de ensamblaje de genoma *de novo* con el proceso de ensamblaje del genoma jerárquico (HGAP, Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, EE. UU.).

Identificación de la secuencia codificante de sintasa de DPA en cepas de bacterias seleccionadas: Los análisis bioinformáticos iniciales incluyeron miembros seleccionados de la clase Bacilli; *Bacillus* (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus sp.*, y *Bacillus flexus*), así como *Lactobacillus* (*Lactobacillus delbrueckii*). Primero, utilizando secuencias de genoma completo adquiridas previamente, se realizó un análisis de pan-genoma bacteriano utilizando BPGA-Versión-1.3 (iicb.res.in/bpga/index.html) para estimar la diversidad genómica y determinar el núcleo (conservado), accesorio (prescindible) y grupo genético único (específico de la cepa). A continuación, se realizó una búsqueda de cualquier subunidad A de sintasa de dipicolinato (DpaA) en el conjunto de genes accesorios. A esto le siguió una búsqueda completa de las cepas en la Tabla 1 para DpaA y DpaB utilizando un script con Bash personalizado (Free Software Foundation, 2007).

Brevemente, los genes que codifican proteínas se anotaron en dos etapas. Prodigal

(algoritmo de búsqueda de genes de programación dinámica procariótica (Hyatt *et ál.*, *BMC Bioinformatics* 11:119, 2010)) se utilizó para identificar las coordenadas de genes candidatos, pero no describe el producto génico putativo. Estos genes candidatos se compararon luego con grandes bases de datos de manera jerárquica, comenzando con una base de datos confiable más pequeña, pasando a bases de datos de tamaño mediano pero específicas al dominio, y finalmente a modelos curados de familias de proteínas. De forma predeterminada, se utilizó un umbral de valor electrónico de 10^{-6} con la siguiente serie de bases de datos:

1. Todas las proteínas bacterianas en UniProt que tienen proteína real o evidencia de transcripción y no son un fragmento. BLAST+ se utiliza para la búsqueda.

2. Todas las proteínas de genomas bacterianos terminados en RefSeq para un género específico. BLAST+ se utiliza para la búsqueda.

3. Una serie de bases de datos ocultas de perfiles de modelos de Markov, que incluye Pfam (Punta *et ál.*, 2012) y TIGRFAM (Haft *et ál.*, 2013). Esto se realiza utilizando hmmscan del paquete HMMER 3.1 (Eddy, 2011).

4. Si no se pueden encontrar coincidencias, etiquetar como "proteína hipotética".

Luego, estos datos se tabularon junto con la capacidad de esporulación y la capacidad de supervivencia de la formulación seca (ver Tabla 6) para establecer correlaciones entre la sintasa de DPA y la viabilidad. A continuación, se realizaron alineaciones de los genes DpaA y DpaB utilizando Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) y la composición de aminoácidos y estadísticas de frecuencia calculadas utilizando Seaview 4 (Gouy *et ál.* *Mol. Biol. Evol.* 27: 221-224, 2010). A continuación, se utilizaron alineaciones de aminoácidos DpaA y DpaB para calcular secuencias consenso y matrices de probabilidad en R utilizando los paquetes Biostrings y seqinr (Pagès *et ál.*, 2016; Charif y Lobry, *Structural Approaches to Sequence Evolution*, págs. 207-232, 2007; R Core Team, 2016).

Tabla 6. Resumen de cepas capaces de esporular y producir DPA

Cepas de bacterias	Capacidad de esporulación	Presencia de genes de sintasa de DPA	Producción de DPA

Cepas de bacterias	Capacidad de esporulación	Presencia de genes de sintasa de DPA	Producción de DPA
<i>A. pasteurianus</i>	N	NE	ND
<i>A. vinelandii</i>	S	NE	ND
<i>B. amyloliquefaciens</i>	S	S	S
<i>B. flexus</i>	S	S	S
<i>B. licheniformis</i>	S	S	S
<i>B. megaterium</i>	S	S	S
<i>B. subtilis</i>	S	S	S
<i>Bacillus sp.</i>	S	S	S
<i>C. beijerinckii</i>	S	NE	S
<i>C. pasteurianum</i>	S	NE	ND
<i>L. buchneri</i>	N	NE	ND
<i>L. casei/paracasei</i>	N	NE	ND
<i>L. delbrueckii</i>	N	NE	ND
<i>L. vini</i>	N	NE	ND
<i>O. oncorhynchi</i>	S	S	ND
<i>P. chibensis</i>	S	S	S
<i>P. cookii</i>	S	S	S
<i>P. lautus</i>	S	S	S
<i>P. putida</i>	N	NE	ND
<i>Pseudomonas sp.</i>	N	NE	ND
<i>S. griseus</i>	S	NE	ND
<i>V. halophilus</i>	S	S	ND
<i>S. venezuelae</i>	S	NE	ND
<i>S. pratensis</i>	S	NE	ND
<i>P. azoreducens</i>	S	S	S
<i>B. firmus</i>	S	S	S

S: sí; N: no; NE: no encontrado; ND: no detectado

Bacterias en ensayo de supervivencia de consorcios

Preparación de la muestra de formulación conjunta líquida: Para cada punto de tiempo de vida útil, 1 mL de la formulación conjunta (consorcio agroquímico/bacteriano) se diluyó en serie de 10^{-1} a 10^{-5} en agua de peptona estéril.

Preparación de la muestra de formulación seca: Para cada punto de tiempo de vida útil, se suspendieron 0,03-1 g de formulación seca (agroportador/consorcio bacteriano) en hasta 3 mL de caldo de cultivo tal como agua de peptona u otro medio apropiado y se incubó hasta 1 hr a temperatura ambiente. En algunos casos, se utilizó una sonicación suave (35 khz) para liberar bacterias de las matrices secas utilizando un sonicador de baño de agua (limpiador ultrasónico VWR). Posteriormente, la suspensión se diluyó en serie de 10^{-1} a 10^{-5} en agua de peptona estéril u otro tipo de caldo de cultivo. En otros casos, el material seco se agregó directamente al medio líquido para el crecimiento.

Ensayo de supervivencia: las cepas bacterianas que se sometieron a uno o más tratamientos tuvieron la oportunidad de multiplicarse. Con el fin de maximizar el potencial de crecimiento de cada cepa del consorcio, se utilizaron varios medios de agar diferentes como chA (quitina semiseca, 5 g/L; K_2HPO_4 , 0,7 g/L; KH_2PO_4 , 0.3 g/L; $MgSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,5 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L; $ZnSO_4$, 0,001 g/L; $MnCl_2$, 0,001 g/L y agar, 15 g/L), RCM, NA, MP, YPD, RhX, AMAS, y/o BHIS. En algunos casos, cada dilución en serie producida anteriormente se extendió en placa sobre uno o más medios de agar por duplicado. En otros casos, el material seco producido anteriormente se suspendió en uno o más medios líquidos en séxtuple. Para los cultivos en placa, las placas se incubaron en incubadoras estáticas, una en condiciones aerobias a 30 °C y la otra en condiciones anaerobias a 35 °C durante 3 días. Para los cultivos líquidos, los tubos se incubaron con agitación aerobia a 30 °C o de forma anaerobia estática a 35 °C durante 7 días. Las bacterias que habían sobrevivido al o los tratamientos crecieron formando colonias o se multiplicaron en cultivos líquidos, y este crecimiento luego se muestreó e identificó mediante el uso de PCR digital de gotitas (ddPCR).

El ADN genómico se extrajo de las células recolectadas utilizando el kit DNeasy PowerLyzer PowerSoil (Qiagen, Inc., Germantown, MD, EE. UU.) según las recomendaciones del fabricante. Luego se cuantificó el ADN utilizando el fluorómetro Quantas y el dsDNA QuantiFluor (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU.) y se

procesó para su identificación y cuantificación utilizando sondas específicas de cepa junto con ddPCR (Dreo *et ál.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 406:6513-6528, 2014; Yin, *et ál.*, *Journal of Microbiological Methods* 65:21-31, 2006). Brevemente, las reacciones de ddPCR se prepararon al combinar muestras de ADN, cebadores y sondas (diseñadas utilizando secuencias únicas de los genes 16S y/o secuencias de genes codificantes únicas identificadas a partir de ensamblajes de genoma WGS tal como se describió anteriormente en WO 2018/045004, incorporado a la presente mediante referencia) con ddPCR Supermix para sondas de Bio-Rad según las recomendaciones del fabricante. A continuación, se generaron gotas utilizando el generador de gotas QX200™ o el instrumento AutoDG™ según las recomendaciones del fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando el gradiente nexus Eppendorf Mastercycler® utilizando las condiciones de ciclo térmico recomendadas del ddPCR Supermix para sondas de Bio-Rad. Siguiendo el protocolo de PCR, las reacciones se leyeron utilizando el lector de gotas QX200. Finalmente, las concentraciones se analizaron con el software QuantaSoft™.

En el caso de la identificación de la capacidad de supervivencia de una sola cepa después de la formulación conjunta con agroportador líquido o seco, se realizó una colocación en placa simple mediante el uso del medio de agar más adecuado para las cepas dadas, tal como se describe en la Tabla 2.

Ejemplo 2

Identificación de la secuencia codificante de sintasa de DPA en cepas bacterianas seleccionadas

Subunidad A de dipicolinato sintasa (DpaA): Una alineación de aminoácidos de DpaA de las cepas bacterianas reveló que es divergente, con solo el 28,4 % de los aminoácidos conservados. Los resultados se resumen en las Tablas 7-9 y la FIGURA 1. *Oceanobacillus oncorhynchi* parecía más divergente que la mayoría de las otras cepas. Al calcular el porcentaje de identidad con el denominador definido como posiciones alineadas, *O. oncorhynchi* tenía un 58% de identidad con la secuencia consenso mediante el uso de BLOSUM62. Además, estos cambios de aminoácidos parecían encontrarse en regiones conservadas para la mayoría de las cepas analizadas. La alineación de aminoácidos de DpaA también reveló que *Virgibacillus halophilus* tenía dos copias del gen,

probablemente debido a una duplicación del gen. La primera copia era muy divergente (51 % de identidad con la secuencia consenso, el mismo método que antes), y la segunda copia parecía haber sido truncada por 29 aminoácidos, además de cambios significativos de aminoácidos. Además, mientras que todos los demás casos de DpaA se localizaron secuencialmente con DpaB como parte de un operón, en *V. halófilo* los dos genes están separados por otros 539 genes.

Tabla 7. Número de copias del gen DpaA

Cepas con genes DPA	Número de copias del gen DpaA
<i>Bacillus megaterium</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Paenibacillus lautus</i>	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1
<i>Bacillus sp.</i>	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1
<i>Bacillus flexus</i>	1
<i>Bacillus firmus</i>	1
<i>Virgibacillus halophilus</i>	2
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1

10

Tabla 8. Diversidad de secuencia de genes DpaA

Sitios seleccionados:	303	100,0 %
Completo (sin espacios, sin X):	262	86,5 %
Variable:	208	68,6 %
Informativo:	176	58,1 %

Espacios o X:	41	13,5 %
Idéntico:	54	17,8 %
Conservado, no idéntico:	32	10,6 %
Total conservado:	86	28,4 %

Tabla 9. Composición de aminoácidos de los genes DpaA

Composición de aminoácidos (todos los sitios)	
Grupo 1:	30,50 %
E:	5,7
D:	6
Q:	3,4
N:	3,1
H:	2,3
R:	4,3
K:	5,6
Grupo 2:	29,90 %
I:	9.3
L:	10.2
M:	2.8
V:	7.6
Grupo 3:	33,50 %
A:	9
P:	3,7
S:	5,8
G:	8,3
T:	6,7
Grupo 4:	4,90 %
F:	3,2
Y:	1,6

Grupo 5:	1,30 %
W:	0,1
C:	1,2

Subunidad B de dipicolinato sintasa (DpaB): Una alineación de aminoácidos de DpaB de las cepas bacterianas reveló que está más conservada que DpaA, con un 45,5 % de los aminoácidos conservados. Los resultados se resumen en las Tablas 10-12 y la FIGURA 2. No se detectaron duplicaciones ni truncamientos importantes. Tal como se mencionó anteriormente, todas las copias de DpaB se localizaron secuencialmente con DpaA como parte de un operón, excepto *V. halófilo*, cuyo DpaB se encuentra 539 genes corriente arriba de DpaA.

10 Tabla 10. Número de copias del gen DpaB

Cepas con genes DPA	Número de copias del gen DpaB
<i>Bacillus megaterium</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Paenibacillus lautus</i>	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1
<i>Bacillus sp.</i>	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1
<i>Bacillus flexus</i>	1
<i>Bacillus firmus</i>	1
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1

Tabla 11. Diversidad de secuencias DpaB

Sitios seleccionados:	202	100,0 %
-----------------------	-----	---------

Completo (sin espacios, sin X):	196	97,0 %
Variable:	133	65,8 %
Informativo:	104	51,5 %
Espacios o X:	6	3,0 %
Idéntico:	63	31,2 %
Conservado, no idéntico:	29	14,4 %
Total conservado:	92	45,5 %

Tabla 12. Composición de aminoácidos de los genes DpaB

Composición de aminoácidos (todos los sitios)	
Grupo 1:	30,30 %
E:	4,8
D:	4,7
Q:	3,8
N:	6,2
H:	1,4
R:	3,2
K:	6,3
Grupo 2:	29,00 %
I:	6,5
L:	9,8
M:	4,3
V:	8,4
Grupo 3:	34,30 %
A:	8,3
P:	6,6
S:	5,2
G:	7
T:	7,1

Grupo 4:	4,70 %
F:	3
Y:	1.7
Grupo 5:	1,70 %
W:	0,6
C:	1,1

Correlación entre la producción de DPA (en los ensayos descritos anteriormente) y la presencia de genes de DPA:

Tal como se indica en la Tabla 6, se detectó *Clostridium beijerinckii* como una cepa productora de DPA mediante el ensayo de fluorescencia de Terbio-DPA, pero ni DpaA ni DpaB fueron identificables en su genoma. Se halló que *C. beijerinckii* posee una flavoproteína de hierro-azufre (Isf) que está relacionada estructuralmente con EtfA, que ha sido previamente implicada en la producción de DPA (Orsburn *et ál.*, *Mol. Microbiol.* 75:178-186, 2010). Se detectaron seis copias de la flavoproteína hierro-azufre en el genoma de *C. beijerinckii*. A continuación, estas secuencias se alinearon con secuencias *isf* de cuatro bacterias diversas: *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanosarcina thermophila*, y *Peptoclostridium difficile* (FIGURA 3). Esta proteína Isf está ausente en *Clostridium pasteurianum* no se detectó producción de DPA en *C. pasteurianum*. En el Ejemplo 12 se proporciona soporte adicional para el papel de Isf en la producción de DPA.

Ejemplo 3

Supervivencia de cepas individuales seleccionadas en un portador

Se realizó una evaluación de la supervivencia bacteriana en Azomite® impregnado con cepas individuales. Se seleccionaron cuatro cepas en función de su capacidad para producir DPA en ensayos de laboratorio y/o en los resultados de la identificación del gen DPA. El material impregnado se almacenó seco durante 5 días antes de evaluar la supervivencia de las bacterias. Los resultados son los indicados en la Tabla 13. El 100 % de las cepas con producción detectable de DPA (2/2) permanecieron viables durante 5 días. Para las cepas con producción indetectable de DPA, el 50 % (1/2 cepas) permaneció viable durante 5 días.

Tabla 13. Supervivencia de bacterias individuales en formulación conjunta con Azomite® seco vs. Producción de DPA

Microbio	Producción de DPA	Viabilidad de 5 días
<i>Streptomyces venezuelae</i>	0	1
<i>Streptomyces pratensis</i>	0	0
<i>Bacillus firmus</i>	1	1
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	1

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de producción de DPA representa las cepas que dieron positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA.

En un segundo experimento, se amplió la cantidad de cepas. Se realizó una evaluación de la capacidad de supervivencia de las bacterias en Azomite® después de la impregnación durante un período de 1 mes. Brevemente, Azomite® se impregnó con cepas isogénicas individuales, se secó y se tomaron muestras los días 3, 7, 14, 21 y 28 para el análisis de viabilidad de bacterias. Los resultados son los indicados en la Tabla 14 y muestran que el 100 % (4/4) de bacterias con genes DPA identificados y que producen DPA permanecieron viables durante 1 mes. Para las cepas sin genes DPA identificados y producción indetectable de DPA, el 40 % (2/5 cepas) permaneció viable durante 1 mes.

Tabla 14. Supervivencia de bacterias individuales en formulación conjunta con Azomite® seco vs. identificación del gen DPA y producción de DPA

Microbio	Genes DPA	Producción de DPA	3 días	7 días	14 días	21 días	28 días
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Paenibacillus putida</i>	0	0	1	0	0	0	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	1	1	1	1
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1	1	1	1	1

Microbio	Genes DPA	Producción de DPA	3 días	7 días	14 días	21 días	28 días
<i>Streptomyces venezuelae</i>	0	0	1	0	0	0	0
<i>Streptomyces pratensis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus firmus</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	1	1	1	1	1	1

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de genes DPA representa aquellas cepas que poseen genes DpaA y DpaB. La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dieron positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA.

5

Luego se probó un segundo agroportador (perlita). Se realizó una evaluación de la supervivencia microbiana durante un período de 1 mes, tal como se describió anteriormente con Azomite®. Los resultados son los indicados en la Tabla 15 y muestran que el 100 % (4/4) de las bacterias con genes DPA identificados y que producen DPA permanecieron viables durante 1 mes. Para las cepas sin genes DPA detectados y producción indetectable de DPA, el 60 % (3/5 cepas) permaneció viable durante 1 mes.

10

Tabla 15. Supervivencia de bacterias individuales en formulación conjunta con perlita seca vs. identificación del gen DPA y producción de DPA

Microbio	genes DPA	Producción de DPA	3 días	7 días	14 días	21 días	28 días
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Paenibacillus putida</i>	0	0	1	1	1	1	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	1	1	1	0
<i>Streptomyces</i>	0	0	1	1	1	1	0

Microbio	genes DPA	Producción de DPA	3 días	7 días	14 días	21 días	28 días
<i>griseus</i>							
<i>Streptomyces venezuelae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptomyces pratensis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus firmus</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	1	1	1	1	1	1

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de genes DPA representa aquellas cepas que poseen genes DpaA y DpaB. La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dieron positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA.

5

Ejemplo 4

Supervivencia de consorcios microbianos en un portador

En el siguiente experimento, se cultivaron 22 bacterias individualmente y posteriormente se mezclaron para producir un consorcio, tal como se describió anteriormente. Se impregnó Azomite® seco en forma granulada con 0,23-0,4 mL de consorcio (para preservar la integridad del gránulo), se secó y se almacenó durante dos semanas antes de analizar qué bacterias sobrevivieron utilizando el ensayo para evaluar la viabilidad microbiana de un consorcio (Ejemplo 1). Se realizaron dos ensayos independientes, y los resultados se resumen en la Tabla 16. Se observó que el 83 % y el 92 % de las cepas de bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables 2 semanas después de la impregnación en Azomite®. La cepa que no pareció mostrar una viabilidad constante en los dos ensayos fue *O. oncorhynchi*. Tal como se mencionó anteriormente, la subunidad A de la sintasa de DPA de *O. oncorhynchi* parece más divergente que la mayoría de las otras cepas examinadas, con un 58 % de identidad con la secuencia consenso mediante el uso de BLOSUM62. Para las cepas sin genes de DPA identificados y sin producción de DPA detectable, los resultados variaron

entre el 60 % y el 70 % de las bacterias que permanecieron viables dentro del mismo período. La reproducibilidad entre los dos ensayos fue baja y puede atribuirse a diferentes estados metabólicos de este conjunto de microbios en el momento de la impregnación.

- 5 Tabla 16. Supervivencia de bacterias individuales en formulación conjunta con Azomite® seco

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	Ensayo 1	Ensayo 2	
			2 semanas	2 semanas	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	1	Bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	1	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	1	0	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	1	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	0	1	Bacterias sin genes
<i>Azotobacter</i>	0	0	1	1	

<i>vinelandii</i>					DPA identificados y sin producción de DPA detectable
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	1	0	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	1	0	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	1	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1	1	

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de genes DPA representa aquellas cepas que poseen genes DpaA y DpaB. La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA.

5

De manera similar al experimento con Azomite® descrito anteriormente, las 22 bacterias se cultivaron individualmente y posteriormente se mezclaron para producir un consorcio. Se impregnó perlita con 2-6 mL de consorcio, se secó y se almacenó durante 2 semanas antes de analizar qué bacterias sobrevivieron mediante el uso del ensayo para analizar la viabilidad microbiana de un consorcio, (Ejemplo 1). Se realizaron dos ensayos independientes, y los resultados se resumen en la Tabla 17. Se observó que el 58 % y el 100 % de las cepas de bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecen viables dos semanas después de la impregnación en perlita. Para las cepas sin genes de DPA identificados y sin producción de DPA detectable, los resultados variaron entre el 60 % y el 80% de las bacterias que permanecieron viables dentro del mismo período. En comparación con el experimento Azomite®, las bacterias con genes DPA identificados y/o productores de DPA mostraron una buena reproducibilidad incluso utilizando un sustrato de impregnación diferente. También superaron a aquellos sin genes

10

15

DPA identificados o sin producción detectable de DPA en nuestro ensayo.

Tabla 17. Supervivencia de bacterias individuales del consorcio en formulación conjunta con perlita

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	Ensayo 1	Ensayo 2	
			2 semanas	2 semanas	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	1	Bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	0	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	1	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	0	1	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	1	Bacterias sin genes DPA identificados
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	1	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	1	0	
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	0	
<i>Clostridium</i>	0	0	1	1	

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	Ensayo 1	Ensayo 2	
			2 semanas	2 semanas	
<i>pasteurianum</i>					y sin producción de DPA detectable
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	1	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	1	1	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	1	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1	1	

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de genes DPA representa aquellas cepas que poseen genes DpaA y DpaB. La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA.

5

Ejemplo 4

Supervivencia de consorcios microbianos formulados conjuntamente con agentes líquidos para el control del polvo

En los experimentos siguientes, se cultivaron cepas bacterianas de interés en placas de agar semisólidas mediante el uso de medios tal como se describe anteriormente (ver Tabla 2). Se generaron formulaciones conjuntas químicas de control de polvo/bacterias al suspender un asa de 1 μ L raspado de una placa de agar en 200 μ L de agua de peptona estéril, y al mezclar luego con químicos de control de polvo a una tasa del 5 % v/v. A continuación, se determinó la capacidad de supervivencia de cada cepa en

10

la formulación conjunta al inocular medio fresco (Tabla 3) con la mezcla de bacterias/agroquímico y puntuar los signos de crecimiento.

Supervivencia de bacterias formuladas conjuntamente con MDC-200: Se realizó una evaluación de la viabilidad bacteriana después de la formulación conjunta con el agente de control de polvo MDC-200 (ArrMaz, FL, EE. UU.) durante un período de 1 mes. Los resultados son tal como se indican en la Tabla 18. Se observó que el 92 % (11/12) de las bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables durante 1 mes. Para las cepas sin genes DPA identificados y producción indetectable de DPA, el 0% (0/10 cepas) permaneció viable durante 1 mes.

Supervivencia de bacterias formuladas conjuntamente con DUSTROL® 3275: Se realizó una evaluación de la viabilidad bacteriana después de la formulación conjunta con DUSTROL® 3275 (ArrMaz, FL, EE. UU.) durante un período de 1 mes. Los resultados son tal como se indican en la Tabla 18. Se observó que el 100 % (12/12) de las bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables durante 1 mes. Para las cepas sin genes DPA identificados y producción indetectable de DPA, el 0 % (0/10 cepas) permaneció viable durante 1 mes.

Supervivencia de bacterias formuladas conjuntamente con DUSTROL® 3133: Se realizó una evaluación de la viabilidad bacteriana después de la formulación conjunta con DUSTROL® 3133 (ArrMaz, FL, EE. UU.) durante un período de 1 mes. Los resultados son tal como se indican en la Tabla 18. Se observó que el 100% (12/12) de las bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables durante 1 mes. Para las cepas sin genes DPA identificados y producción indetectable de DPA, el 0 % (0/10 cepas) permaneció viable durante 1 mes.

Supervivencia de bacterias formuladas conjuntamente con DUSTROL® 3139: Se realizó una evaluación de la viabilidad bacteriana después de la formulación conjunta con DUSTROL® 3139 (ArrMaz, FL, EE. UU.) durante un período de 1 mes. Los resultados son tal como se indican en la Tabla 18. Se observó que el 92 % (11/12) de las bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables durante 1 mes. Para las cepas sin genes DPA identificados y producción indetectable de DPA, el 0 % (0/10 cepas) permaneció viable durante 1 mes.

Supervivencia de bacterias formuladas conjuntamente con DUSTROL® 3001: Se realizó una evaluación de la viabilidad bacteriana después de la formulación conjunta

con DUSTROL® 3001 (ArrMaz, FL, EE. UU.) durante un período de 1 mes. Los resultados son tal como se indican en la Tabla 18. Se observó que el 33 % (4/12) de las bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables durante 1 mes. Para las cepas sin genes DPA identificados y producción indetectable de DPA, el 0 % (0/10 cepas) permaneció viable durante 1 mes. La supervivencia reducida en este experimento puede deberse a la incompatibilidad de los microbios (ya sea que produzcan o no DPA) con uno o más componentes de DUSTROL® 3001.

Supervivencia de bacterias formuladas conjuntamente con DUSTROL® 3010:

Se realizó una evaluación de la viabilidad bacteriana después de la formulación conjunta con DUSTROL® 3010 (ArrMaz, FL, EE. UU.) durante un período de 1 mes. Los resultados son tal como se indican en la Tabla 18. Se observó que el 75% (9/12) de las bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables durante 1 mes. Para las cepas sin genes DPA identificados y producción indetectable de DPA, el 20 % (2/10 cepas) permaneció viable durante 1 mes.

Tabla 18. Supervivencia de un mes de bacterias individuales del consorcio en formulación conjunta con productos químicos líquidos para el control del polvo

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	MDC-200	DUSTROL® 3133	DUSTROL® 3001	DUSTROL® 3010	DUSTROL® 3001	DUSTROL® 3010	Bacterias con genes DPA identificados y/o producción de DPA
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	MDC-200	DUSTROL® 3133	DUSTROL® 3001	DUSTROL® 3010	DUSTROL® 3001	DUSTROL® 3010	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	1	0	1		
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	1	1	1		
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	1	1	1	1		
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	1	1	0	0		
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	1	1	1	0	1		
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	1	1	1	0		
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	1	1	0	0		
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	1	1	0	1		
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	0	0	0	0	1		Bacterias sin genes DPA identificados y sin producción de DPA detectable
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Lactobacillus casei</i>	0	0	0	0	0	0	0		

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	MDC-200	DUSTROL® 3275	DUSTROL® 3133	DUSTROL® 3139	DUSTROL® 3001	DUSTROL® 3010	DUSTROL®
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de genes DPA representa aquellas cepas que poseen genes DpaA y DpaB. La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA. Las siguientes seis columnas (MDC-200, DUSTROL® 3275, 3133, 3139, 3001 y 3010) representan la viabilidad de 1 mes en cada formulación conjunta. La columna final resume la capacidad de supervivencia para el grupo de cepas que A) posee genes DPA conocidos, produce DPA o ambos y B) no posee genes DPA conocidos ni produce DPA.

10

Ejemplo 5

Supervivencia de consorcios microbianos formulados conjuntamente con fertilizante líquido UAN

Se realizó una evaluación de la viabilidad bacteriana después de la formulación conjunta con fertilizante líquido UAN en varios puntos de tiempo durante un período de 1 mes. Brevemente, cada cepa isogénica se cultivó en medio líquido (como se describió anteriormente) ya sea de forma aerobia o anaerobia. A continuación, los cultivos se mezclaron en proporciones iguales y la mezcla se combinó luego con UAN32 en una proporción de 1:180 (microbios:UAN). La supervivencia microbiana se evaluó los días 0, 7, 14 y 28 y se resume en la Tabla 19. Para el punto de tiempo del día 0 (~1 hora después de la formulación conjunta), el 83 % (10/12) de las cepas bacterianas con genes DPA

20

identificados y/o que producen DPA permanecieron viables. Para las bacterias sin producción detectable de DPA, solo el 20 % (2/10 cepas) permaneció viable para el punto de tiempo del Día 0. En el punto de tiempo del día 7, el 67 % (8/12) de las cepas bacterianas con genes DPA identificados y/o productores de DPA permanecieron viables.

- 5 Después del día 7, no hubo cambios en la viabilidad de este conjunto de cepas. Para las bacterias sin producción detectable de DPA, solo el 10% (1/10 cepas) permaneció viable para el punto de tiempo del Día 7.

Tabla 19. Capacidad de supervivencia bacteriana durante un período de un mes en formulación conjunta con fertilizante UAN

Género / especie	genes DPA	Producción de DPA	UAN - 0 días	UAN - 7 días	UAN - 14 días	UAN - 30 días	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	0	0	0	Bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	1	1	1	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	0	0	0	0	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	1	1	1	

Género / especie	genes DPA	Producción de DPA	UAN - 0 días	UAN - 7 días	UAN - 14 días	UAN - 30 días	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	0	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	0	0	0	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0*	0*	0*	0*	1	Bacterias sin genes DPA identificados y sin producción de DPA detectable
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	1	1	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus casei</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0	0	0	0	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1	0	0	0	

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de genes DPA representa aquellas cepas que poseen genes DpaA y DpaB. La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA. Las siguientes 4 columnas representan

puntos de tiempo en los que se probó la viabilidad de la formulación conjunta mediante el uso del ensayo descrito anteriormente.

*El día 30, se detectó que *Acetobacter pasteurianus* (una cepa incapaz de producir DPA) era viable por primera vez, lo que indica falsos negativos para los puntos de tiempo de 0, 7 y 14 días.

Ejemplo 6

Supervivencia de consorcios microbianos formulados conjuntamente con Biochar

En este experimento, las 22 bacterias que se muestran en la Tabla 4 se cultivaron individualmente y posteriormente se mezclaron para producir un consorcio, como se describió anteriormente. Se impregnó un gramo de Biochar (Cool Terra®; Cool Planet Energy system, CO, EE. UU.) con ~0,5 ml de consorcio, se secó y se almacenó durante 7 días antes de analizar qué bacterias sobrevivieron utilizando el ensayo de supervivencia descrito anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 20. El 66,7 % (7/12 cepas) de las bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables 7 días después de la impregnación en biocarbón. Para las cepas sin genes de DPA identificados y sin producción de DPA detectable, el 30 % (3/10 cepas) permaneció viable dentro del mismo período de tiempo.

Tabla 20. Supervivencia de bacterias del consorcio en biocarbón después de 7 días

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	7 días	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	Bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	0	

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	7 días	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	0	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	0	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	0	Bacterias sin genes DPA identificados y sin producción de DPA detectable
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	1	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	1	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0	

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de genes DPA representa aquellas cepas que poseen genes DpaA y DpaB. La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA.

Ejemplo 7

Supervivencia de consorcios microbianos formulados conjuntamente con gránulos de fertilizante seco

En este experimento, las 22 bacterias que se muestran en la Tabla 4 se cultivaron individualmente y posteriormente se mezclaron para producir un consorcio y se impregnaron en fertilizante seco MOP (0-0-60) a una tasa de 35 $\mu\text{L/g}$, tal como se describió anteriormente. A continuación, el fertilizante se almacenó a temperatura ambiente y se tomaron muestras periódicamente para evaluar la supervivencia microbiana tal como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 21. El 66,7 % (8/12 cepas) de las bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables hasta 7 días. Para las cepas sin genes de DPA identificados y sin producción de DPA detectable, el 30 % (3/10 cepas) permaneció viable dentro del mismo período de tiempo.

Tabla 21. Supervivencia de bacterias del consorcio en MOP después de 7 días

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	Supervivencia el día 7	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	Bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	0	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	0	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	1	

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	Supervivencia el día 7	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	0	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	1	Bacterias sin genes DPA identificados y sin producción de DPA detectable
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	1	

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de genes DPA representa aquellas cepas que poseen genes DpaA y DpaB. La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA.

5

Las 22 bacterias que se muestran en la Tabla 4 se cultivaron individualmente y posteriormente se mezclaron para producir un consorcio y se impregnaron en MAP (11-52-0) a una tasa de 35 $\mu\text{L/g}$, tal como se describió anteriormente. A continuación, el fertilizante se almacenó a temperatura ambiente y se tomaron muestras periódicamente para evaluar la supervivencia microbiana tal como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 22. En este caso, el 58,3 % (7/12 cepas) de las

10

bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables hasta 7 días. Para las cepas sin genes de DPA identificados y sin producción de DPA detectable, el 40% (4/10 cepas) permaneció viable dentro del mismo período de tiempo.

5 Tabla 22. Supervivencia de bacterias del consorcio en MAP después de 7 días

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	Supervivencia el día 7	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	Bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	0	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	0	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	0	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	0	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	1	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	1	Bacterias sin genes DPA identificados y sin producción de DPA
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0	1	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	Supervivencia el día 7	
<i>delbrueckii</i>				detectable
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	0	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	1	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	1	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0	

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de genes DPA representa aquellas cepas que poseen genes DpaA y DpaB. La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA.

5

Ejemplo 9

Supervivencia de microbios del consorcio en comparación con la expresión/producción de DPA

En este experimento, las 22 bacterias que se muestran en la Tabla 4 se cultivaron individualmente y posteriormente se mezclaron para producir un consorcio, como se describió anteriormente. A continuación, el consorcio se almacenó a temperatura ambiente y se tomaron muestras periódicamente para evaluar la supervivencia microbiana tal como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 23.

En la semana 2, el 83 % (10/12 cepas) de las bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA permanecieron viables. Para las cepas sin genes de DPA identificados y sin producción de DPA detectable, el 60% (6/10 cepas) permaneció viable dentro del mismo período de tiempo. Después de 7,5 semanas, ese 58 % (7/12 cepas) de las bacterias con genes DPA identificados y/o productores de DPA permanecieron viables. Para las cepas sin genes de DPA identificados y sin producción de DPA detectable, el 50% (5/10 cepas) permaneció viable dentro del período.

Tabla 23. Supervivencia de bacterias del consorcio en medio gastado

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	2 semanas	7,5 semanas	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	1	Bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	0	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	1	
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	0	
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	0	0	0	
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	0	1	0	
<i>Virgibacillus halophilus</i>	1	0	0	0	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	1	1	1	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	1	1	Bacterias sin genes DPA identificados
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0	0	
<i>Clostridium</i>	0	0	1	1	

Género/especie de bacterias	genes DPA	Producción de DPA	2 semanas	7,5 semanas	y sin producción de DPA detectable
<i>pasteurianum</i>					
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	1	0	
<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	0	0	1	1	
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	1	1	
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	0	
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0	0	
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0	0	

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección. La columna de genes DPA representa aquellas cepas que poseen genes DpaA y DpaB. La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA.

5

Ejemplo 10

Resumen de supervivencia microbiana

10

En todos los casos analizados, las esporas formadoras de bacteria con genes DPA identificados y/o que producen DPA superaron a las cepas sin genes DPA identificados y sin producción detectable de DPA en términos de supervivencia en la formulación conjunta con agroportadores a lo largo del tiempo, como formulaciones líquidas o secas (Tabla 24 y FIGURA 4). Por lo tanto, en el diseño racional de consorcios microbianos con características beneficiosas para la planta/suelo seleccionados para la formulación conjunta con agroportadores (húmedos y/o secos) o como tratamientos de semillas, la

selección de microbios que forman esporas y que producen DPA puede ayudar a proporcionar que las funcionalidades microbianas deseadas (tales como, de modo no taxativo, metabolismo del nitrógeno, metabolismo del azufre, tolerancia a la sal, solubilización de sales minerales, degradación de celulosa, degradación de quitina, producción de fitohormonas, metabolismo del hierro, desfosforilación de materia orgánica) se retienen en los microbios supervivientes. En algunos casos, esto puede garantizar una redundancia suficiente en las funcionalidades microbianas presentes en el consorcio diseñado racionalmente para cumplir con los cultivos objetivo, los suelos y las necesidades de prácticas de aplicación, así como los desafíos geográficos y regulatorios.

10

Tabla 24. Supervivencia de cepas microbianas en formulación conjunta con agroquímicos/portadores

Portador (vida útil evaluada)	Bacterias con genes identificados y/o que producen DPA	Bacterias sin genes DPA identificados y sin producción de DPA detectable
MDC-200 (1 mes)	92 %	0 %
DUSTROL® 3275 (1 mes)	100 %	0 %
DUSTROL® 3133 (1 mes)	100 %	0 %
DUSTROL® 3139 (1 mes)	92 %	0 %
DUSTROL® 3001 (1 mes)	33 %	0 %
DUSTROL® 3010 (1 mes)	75 %	20 %

Portador (vida útil evaluada)	Bacterias con genes DPA identificados y/o que producen DPA	Bacterias sin genes DPA identificados y sin producción de DPA detectable
UAN (1 mes)	67 %	0 %
Perlita (2 semanas)	75-100 %	60-80 %
Azomite® (2 semanas)	83,3 %	60 %
Biochar (1 semana)	66,7 %	30 %
MOP (1 semana)	66,7 %	30 %
MAP (1 semana)	58,3 %	40 %
Líquido envejecido/Medio gastado (7,5 semanas)	58 %	50 %

Ejemplo 11

Evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal

Las semillas de pepino compradas en The Seed Kingdom (Lubbock, TX) se pre-germinaron durante 4 días a 22-24 °C en papel de germinación enrollado (Anchor Paper, Saint Paul, MN) impregnado con una mezcla diluida de fertilizante líquido (25 ppm NPK en agua). El medio para plantación en macetas (Sunshine Mix) se trató previamente con una solución Hoagland (Hoagland, *Calif. Agric. Exp. Stn. Bull.* 347:36-39, 1938), modificado para contener P, 30,97 ppm; K, 39,1 ppm; Ca, 40,0 ppm; Mg, 14,59 ppm; S, 20,143 ppm; Fe, 1,010 ppm; Cu, 0,019 ppm; Co, 0,012 ppm; B, 2,44 ppm; Mn, 0,494 ppm; Mo, 0,001 ppm y Zn, 0,056 ppm. Se utilizó una tasa de 1 L por libra [0,45 kg] de medio para plantación en macetas. A cada maceta, se le añadió 1 mL de una solución de urea al 10 % p/v antes de trasplantar plántulas de pepino pregerminadas con una longitud similar. Para cada tratamiento (que incluye el control) se aleatorizaron 17-18 plantas en bandejas en condiciones de crecimiento definidas, se controló la temperatura (16-24 °C) y el

fotoperíodo de 12 horas. Las macetas de control contenían 2 g de perlita sin tratar. Las macetas experimentales se trataron con perlita impregnada con 2 mL de las 22 bacterias que se muestran en la Tabla 4. La perlita impregnada se había almacenado seca durante dos semanas antes de su uso en este ensayo. Las bandejas se regaron 3 veces por semana con solución de Hoagland modificada. Después de 28 a 32 días, se secaron los brotes y se registraron los pesos de cada planta. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía (análisis de varianza) y con la prueba de Tukey post-hoc para comparar muestras dentro del experimento. El peso seco de los brotes aumentó en las plantas tratadas con la perlita impregnada de microbios, aunque no alcanzó significancia estadística (FIGURA 5). Tal como se describe en el Ejemplo 4 (Tabla 17), principalmente microbios con genes DPA identificados y/o con producción detectable de DPA sobrevivieron en perlita impregnada, un subconjunto del consorcio inicial.

Ejemplo 12

Consortio que produce DPA

Para identificar cepas adecuadas para su uso en el diseño de un consorcio que produce DPA adicional, se examinó una colección microbiana interna. Las cepas derivadas de géneros que se sabe que esporulan se revivieron a partir de reservas de glicerol bacteriano en medios apropiados y se dejaron crecer durante hasta tres días. A continuación, se seleccionaron colonias individuales y se pasaron al menos tres veces para verificar la pureza. Las cepas se ensayaron para determinar la producción de DPA mediante el uso del ensayo de fluorescencia de terbio-DPA tal como se describe en el Ejemplo 1. Las cepas que se mostró que producen DPA se seleccionaron para secuenciar el genoma completo. La secuenciación del genoma completo de los aislados biológicamente puros se realizó mediante el uso del sistema de secuenciación Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) siguiendo el método recomendado por el fabricante para la preparación y secuenciación de la biblioteca de secuencias. Se generó un promedio de 5.133.928 lecturas de 87 pb de longitud en promedio a partir de los aislados microbianos. El ensamblaje del genoma *de novo* se realizó utilizando SPAdes 3.12.0 (Nurk *et ál.*, *J. Comput. Biol.* 20:714-737, 2013). Los cóntigos ensamblados se anotaron luego con PROKKA (Seemann, *Bioinformatics* 30(14):2068-2069, 2014). A continuación, se evaluaron los genomas anotados para determinar la presencia de la

subunidad A de dipicolinato sintasa (*DpaA*) y subunidad B de dipicolinato sintasa (*DpaB*) y flavoproteína de hierro-azufre (*Isf*, Tabla 25). En la mayoría de los casos, las cepas que producían DPA poseían genes *DpaA* y *DpaB* y carecían de genes *Isf*. Todas las cepas que producían DPA y carecían de *DpaA* y *DpaB* poseían una o más copias de los genes *Isf*.

5 En tres casos, las cepas poseían los tres genes (*DpaA*, *DpaB* e *Isf*). Por lo tanto, la detección de la producción de DPA a través del ensayo de fluorescencia de terbio-DPA se correlacionó perfectamente con la presencia de genes *DpaA*, *DpaB* y/o *Isf*.

Tabla 25. Clasificación taxonómica del genoma completo, producción de DPA y número de copias de genes para *DpaA*, *DpaB* e *Isf*

ID del genoma completo	Producción de DPA	Número de copia genética		
		<i>DpaA</i>	<i>DpaB</i>	<i>Isf</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus koreensis</i>	1	1	1	0
<i>Bacilo clausii</i>	1	1	1	0
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	0	0	6
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	0
<i>Clostridium</i> sp. (<i>carboxidivorans</i>)	1	0	0	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1	0
<i>Clostridium</i> sp. (<i>scatologenes</i>)	1	0	0	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1	1	0
<i>Brevibacillus</i> sp. (<i>choshinensis</i>)	1	1	1	0
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus</i> sp. (<i>pocheonensis</i>)	1	1	1	0
<i>Lysinibacillus</i> sp. (<i>fusiformis</i>)	1	1	1	0
<i>Lysinibacillus</i> sp. (<i>chungkukjangi</i>)	1	1	1	0

ID del genoma completo	Producción de DPA	Número de copia genética		
		<i>DpaA</i>	<i>DpaB</i>	<i>Isf</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	1	1	1	0
<i>Rummeliibacillus sp. (pycnus)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	1	1	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	0
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus aryabhatai</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus</i> sp. (<i>amylolyticus</i>)	1	1	1	0
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	0	0	11
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus</i> sp. (<i>chitinolyticus</i>)	1	1	1	0
<i>Bacillus</i> sp. (<i>wudalianchiensis</i>)	1	1	1	0
<i>Paenibacillus larvae</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	3	3	0
<i>Paenibacillus</i> sp. (<i>agaridevorans</i>)	1	1	1	0
<i>Clostridium</i> sp. (<i>tyrobutyricum</i>)	1	0	0	1
<i>Paenibacillus sp. (alvei)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (selenatarsenatis)</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1	1	1	0
<i>Fontibacillus</i> sp. (<i>panacisegetis</i>)	1	1	1	0
<i>Bacillus firmus</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1	0
<i>Lysinibacillus</i> sp.	1	1	1	0

ID del genoma completo	Producción de DPA	Número de copia genética		
		<i>DpaA</i>	<i>DpaB</i>	<i>Isf</i>
<i>(chungkukjangi)</i>				
<i>Paenibacillus sp. (ehimensis)</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus lactis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus farraginis</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1	1	1	0
<i>Brevibacillus massiliensis</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus litoralis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus endophyticus</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus frigoritolerans</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus velezensis</i>	1	1	1	0
<i>Clostridium aerotolerans</i>	1	1	1	1
<i>Sphingomonas koreensis</i>	1	0	0	2
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	0	0	10
<i>Clostridium aerotolerans</i>	1	1	1	2
<i>Brevibacillus sp. (brevis)</i>	1	2	2	0
<i>Bacillus sp. (cereus)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus badius</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus aryabhattai</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus anthracis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus drentensis</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (cuccumis)</i>	1	1	1	0
<i>Paenibacillus peoriae</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (cereus)</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus aryabhattai</i>	1	1	1	0
<i>Bacillus sp. (solani)</i>	1	1	1	0
<i>Terribacillus sp. (aidingensis)</i>	1	1	1	0

ID del genoma completo	Producción de DPA	Número de copia genética		
		<i>DpaA</i>	<i>DpaB</i>	<i>Isf</i>
<i>Bacillus sp. (circulans)</i>	1	1	1	0
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	1	1	1	0

La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA, 1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección.

5 Para las cepas que dieron positivo en la producción de DPA, actividades metabólicas microbianas potenciales (tales como, de modo no taxativo, metabolismo del nitrógeno, metabolismo del azufre, tolerancia a la sal, solubilización de sales minerales, degradación de la celulosa, degradación de la quitina, producción de fitohormonas, metabolismo del hierro, desfosforilación de la materia orgánica) se evaluaron utilizando
10 ensayos de laboratorio tal como se describe en WO 2018/045004 y el Ejemplo 1. Las cepas que poseen el mayor número de actividades metabólicas se seleccionaron para la fermentación conjunta en consorcios microbianos junto con 5 cepas que carecen de producción de DPA que se seleccionaron por sus actividades metabólicas (ver Ejemplo 1). Aquellas cepas que demostraron ser susceptibles de fermentación conjunta en consorcio
15 (ver Tabla 26), también referidas en la presente como Consorcio de Formulación Seca (DFC), se seleccionaron para la formulación conjunta con un portador como bentonita, perlita y/o urea.

 Todos los consorcios incluidos en este ejemplo se fermentaron de la siguiente manera. Se cultivaron cepas de bacterias aerobias y anaerobias en un medio que contenía
20 una fuente de azúcar del 2-10 %. Los aminoácidos, nitrógeno y péptidos se proporcionaron en forma de uno o más de los siguientes: suero en polvo de grado alimenticio (0,1-0,5 % p/v), extracto de levadura (0,1-0,5 % p/v), extracto de soja sin OMG producida enzimáticamente (0,1-0,5 % p/v; Ferti-Nitro Plus Plant N; Ferti-Organic, Brownsville, TX, EE. UU.), espirulina (0,1-0,5 % p/v) y/o peptona (0,1-0,5 % p/v). Cuando
25 fue necesario, se proporcionaron vitaminas y micronutrientes adicionales mediante extracto de algas marinas (0,1-0,5 % p/v), vitaminas B purificadas (Sigma) y/o solución de metales traza de Wolfe. Cuando fue necesario, se agregaron sales adicionales como solución salina amortiguada con fosfato y/o adición de cloruro de sodio (0-4 % p/v). Se

inocularon cepas de AMC1 (descritas anteriormente) en biorreactores DASGIP de 2 L (Eppendorf North America Hauppauge, NY) con un volumen de trabajo de 1,5 litros. El pH durante la fermentación se mantuvo entre 5,0 y 7,0. Las condiciones de aireación durante la fermentación se controlaron variando la agitación, la composición del gas (aire y/o gas nitrógeno) y las tasas de flujo de gas para obtener la tasa de transferencia de oxígeno objetivo (estimada mediante el uso de k_{La}) y variaron de tener un k_{La} (por hora) de 0 a 110. La temperatura se controló entre 28 °C y 35 °C.

Tabla 26. Consorcio cultivado conjuntamente (“DFC”) diseñado para la formulación conjunta con portadores o como tratamiento de semillas

Taxonomía	Producción de DPA
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1
<i>Bacillus firmus</i>	1
<i>Bacillus flexus</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1
<i>Bacillus pumilus</i>	1
<i>Bacillus koreensis</i>	1
<i>Bacillus drentensis</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Clostridium bifermentans</i>	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0
<i>Fontibacillus</i> sp. (<i>panacisegetis</i>)	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	0
<i>Paenibacillus lautus</i>	1
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1

Taxonomía	Producción de DPA
<i>Paenibacillus cookii</i>	1
<i>Paenibacillus</i> <i>sp.</i> (<i>chitinolyticus</i>)	1
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0

La columna de producción de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA, 1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección.

- 5 Para producir formulaciones conjuntas, se aplicó fermentado DFC a bentonita o perlita, y luego se secó durante aproximadamente 24 horas. En algunos casos, el fermentado se concentró mediante centrifugación antes de la aplicación. A continuación, se ensayó la viabilidad de las formulaciones conjuntas. Además, se evaluaron determinadas formulaciones conjuntas en los ensayos de la sala de crecimiento de plantas para verificar las características beneficiosas de las plantas.

10 *Viabilidad de DFC y AMC1 con portadores:* En la preparación para los ensayos de campo que incluyeron líquido DFC, líquido AMC1, perlita impregnada de DFC, perlita impregnada de AMC1, bentonita impregnada de DFC, y bentonita impregnada de AMC1, cada uno de DFC y AMC1 se fermentó conjuntamente y los portadores de perlita o bentonita se impregnaron con 2 mL/g o 1 mL/g respectivamente. La perlita y la bentonita impregnadas se almacenaron secas durante una a tres semanas, momento en el que se realizó el ensayo de viabilidad para determinar el número de cepas que eran viables en el momento de la aplicación. Además, el líquido se almacenó durante una semana, momento en el que se realizó el ensayo de viabilidad para determinar el número de cepas que eran viables en el momento de la aplicación. En líquido, 16 de las 23 cepas de DFC fueron viables después de una semana frente a 14 de las 22 cepas de AMC1 (Tabla 27).

Tabla 27. Viabilidad de los consorcios DFC y AMC1 en líquido después del envejecimiento

	Líquido DFC	Líquido AMC1
	T0 - En la aplicación	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1
<i>Bacillus flexus</i>	0	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	0	1
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	1	0
<i>Bacillus koreensis</i>	0	
<i>Bacillus pumilus</i>	1	
<i>Paenibacillus sp.</i> (chitinolyticus)	1	
<i>Paenibacillus sp.</i> (P1XP2)	1	
<i>Fontibacillus sp.</i> (panacisegetis)	1	

	Líquido DFC	Líquido AMC1
	T0 - En la aplicación	
<i>Bacillus firmus</i>	0	
<i>Clostridium bifermentans</i>	1	
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	
<i>Bacillus drementensis</i>	0	
<i>Bacillus sp.</i>		0
<i>Virgibacillus halophilus</i>		0
<i>Acetobacter pasteurianus</i>		1
<i>Azotobacter vinelandii</i>		0
<i>Lactobacillus buchneri</i>		1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		0
<i>Lactobacillus vini</i>		1
<i>Pseudomonas putida</i>		0
Cant. total Viable:	16	14

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección.

En perlita impregnada, 17 de 23 cepas de DFC frente a 14 de 22 cepas de AMC1 fueron viables después de hasta tres semanas (Tabla 28).

5

Tabla 28. Viabilidad de los consorcios DFC y AMC1 impregnados en perlita después del envejecimiento

	Perlita DFC	Perlita AMC1
	T0 - En la aplicación	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1

	Perlita DFC	Perlita AMC1
	T0 - En la aplicación	
<i>Bacillus flexus</i>	1	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	0	0
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0
<i>Bacillus koreensis</i>	1	
<i>Bacillus pumilus</i>	1	
<i>Paenibacillus sp.</i> (chitinolyticus)	1	
<i>Paenibacillus sp.</i> (P1XP2)	1	
<i>Fontibacillus sp.</i> (panacisegetis)	1	
<i>Bacillus firmus</i>	1	
<i>Clostridium bifermentans</i>	0	
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	

	Perlita DFC	Perlita AMC1
	T0 - En la aplicación	
<i>Bacillus drentensis</i>	0	
<i>Bacillus sp.</i>		1
<i>Virgibacillus halophilus</i>		0
<i>Acetobacter pasteurianus</i>		1
<i>Azotobacter vinelandii</i>		0
<i>Lactobacillus buchneri</i>		1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		0
<i>Lactobacillus vini</i>		0
<i>Pseudomonas putida</i>		0
Cant. total Viable:	17	14

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección.

En bentonita impregnada, 17 de 23 cepas de DFC frente a 14 de 22 cepas de AMC1 fueron viables después de hasta tres semanas (Tabla 29). Esto ilustra cómo las cepas productoras de DPA mantienen una viabilidad mejorada cuando se almacenan en líquido, así como cuando se secan en un portador como perlita o bentonita.

Tabla 29. Viabilidad de los consorcios DFC y AMC1 impregnados en bentonita después del envejecimiento

	Bentonita DFC	Bentonita AMC1
	T0 - En la aplicación	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1
<i>Bacillus flexus</i>	1	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1

	Bentonita DFC	Bentonita AMC1
	T0 - En la aplicación	
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	0	0
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0
<i>Bacillus koreensis</i>	0	
<i>Bacillus pumilus</i>	1	
<i>Paenibacillus sp. (chitinolyticus)</i>	1	
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1	
<i>Fontibacillus sp. (panacisegetis)</i>	1	
<i>Bacillus firmus</i>	1	
<i>Clostridium bifermentans</i>	0	
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	
<i>Bacillus drementensis</i>	0	
<i>Bacillus sp.</i>		1
<i>Virgibacillus halophilus</i>		0

	Bentonita DFC	Bentonita AMC1
	T0 - En la aplicación	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>		0
<i>Azotobacter vinelandii</i>		0
<i>Lactobacillus buchneri</i>		1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		0
<i>Lactobacillus vini</i>		1
<i>Pseudomonas putida</i>		0
Cant. total Viable:	17	14

1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección.

Después de 3 meses de envejecimiento, la perlita impregnada con DFC mostró que 15 cepas eran viables, mientras que la perlita impregnada con AMC1 mostró que solo 11 cepas eran viables y solo una de las cuales no producía DPA (Tablas 30 y 31).

Tabla 30. Viabilidad de AMC1 impregnado en perlita y bentonita a lo largo del tiempo

	DPA	Perlita - 3 meses	Bentonita - 3 meses
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1
<i>Bacillus flexus</i>	1	1	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1
<i>Bacillus sp.</i>	1	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	1	1

<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1	1
<i>Virgibacillus halophilus</i>	0	0	0
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1	1
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	0	0	0
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0	0	0
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	1	1
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0	0	1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	0	1
<i>Lactobacillus vini</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0
Cant. total Viable:		11	13

La columna de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA. 1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección.

- 5 Después de los mismos 3 meses de envejecimiento, la bentonita impregnada con DFC mostró que 19 cepas eran viables, mientras que la perlita impregnada con AMC1 mostró que 13 cepas eran viables y solo tres de las cuales no producían DPA (Tablas 30 y 31).

10 Tabla 31. Viabilidad de DFC impregnado en perlita y bentonita a lo largo del tiempo

	DPA	Perlita - 3 meses	Bentonita - 3 meses
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	1
<i>Bacillus flexus</i>	1	0	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	1

<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus chibensis</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus cookii</i>	1	1	1
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus lautus</i>	1	1	1
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1	1	1
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	1	1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	0	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0
<i>Streptomyces griseus</i>	0	0	0
<i>Bacillus koreensis</i>	1	0	1
<i>Bacillus pumilus</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus sp. (chitinolyticus)</i>	1	1	1
<i>Paenibacillus sp. (P1XP2)</i>	1	1	1
<i>Fontibacillus sp. (panacisegetis)</i>	1	1	1
<i>Bacillus firmus</i>	1	0	1
<i>Clostridium bifermentans</i>	1	0	0
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	1	1	1
<i>Bacillus drementensis</i>	1	0	0
Cant. total Viable:		15	19

La columna de DPA representa aquellas cepas que dan positivo en la producción de DPA mediante el ensayo de fluorescencia Terbio-DPA. 1 = detectado y 0 = no detectado o por debajo del límite de detección.

- 5 *Evaluación de la actividad beneficiosa de las plantas DFC:* Las semillas de pepino compradas en The Seed Kingdom (Lubbock, TX) se pre-germinaron durante 4 días a 22 °C en papel de germinación enrollado (Anchor Paper, Saint Paul, MN) impregnado con una mezcla diluida de fertilizante líquido (25 ppm NPK en agua). En el momento de la

preparación de la semilla, el medio para plantación en macetas (Sunshine Mix) se preparó con un tratamiento previo de 67,60 kg de fosfato tricálcico (TCP) ha⁻¹ y una solución Hoagland modificada (Hoagland, Calif. Agric. Exp. Stn. Bull. 347:36-39, 1938). Esta solución de Hoagland, NK+ se modificó para contener N, 56,03 ppm; P, 0 ppm; K, 39,1 ppm; Ca, 40,0 ppm; Mg, 14,59 ppm; S, 20,143 ppm; Fe, 1,010 ppm; Cu, 0,019 ppm; Co, 0,012 ppm; B, 2,44 ppm; Mn, 0,494 ppm; Mo, 0,001 ppm y Zn, 0,056 ppm, que se aplicó a una tasa de 1 L por libra de medio para plantación en macetas. Los tratamientos de control también contenían 10 g de perlita sin tratar o 20 g de bentonita sin tratar por libra de medio para plantación en macetas. En comparación, las macetas experimentales tenían la misma cantidad de perlita o bentonita que las macetas de control, sin embargo, esos portadores estaban impregnados con 2 mL/g de DFC o 1 mL/g de DFC, respectivamente. La perlita y la bentonita impregnadas se almacenaron secas durante dos semanas antes de su uso en este ensayo, momento en el que se realizó el ensayo de viabilidad para determinar el número de cepas de DFC que eran viables en el momento de la aplicación. La gran mayoría de las cepas (15-18 de 23 cepas viables) sobrevivieron al proceso de formulación conjunta y envejecimiento.

Después de la pre-germinación de las semillas de pepino, se seleccionaron plántulas de longitud similar y se trasplantó una en cada maceta. Para cada tratamiento (que incluye el control) se aleatorizaron 18 plantas en bandejas en condiciones de crecimiento definidas, se controló la temperatura (16-24 °C) y el fotoperíodo de 12 horas. Las bandejas se regaron por primera vez tres días después del trasplante con una solución de Hoagland modificada, PK+ que contiene N, 0 ppm; P, 14,49 ppm; K, 19,55 ppm; Ca, 20,0 ppm; Mg, 14,59 ppm; S, 20,143 ppm; Fe, 1,010 ppm; Cu, 0,019 ppm; Co, 0,012 ppm; B, 2,44 ppm; Mn, 0,494 ppm; Mo, 0,001 ppm y Zn, 0,056 ppm. Luego se regaron las bandejas 3 veces por semana con solución de Hoagland NK+. Después de 32 días, se recolectaron los brotes y se registraron los pesos secos de cada planta. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía (análisis de varianza) y con una prueba de Tukey post-hoc para comparar muestras dentro del experimento. Estos ensayos se realizaron dos veces en dos ocasiones distintas.

Los resultados del ensayo inicial mostraron un aumento significativo en el peso de los brotes tanto para la perlita impregnada en DFC como para la bentonita impregnada en DFC en comparación con los controles (FIGURA 6). Los resultados del segundo ensayo

también mostraron un aumento significativo en el peso de los brotes tanto para el tratamiento con líquido DFC como con la perlita impregnada con DFC, y aunque la perlita impregnada con DFC se comportó mejor que el tratamiento con líquido DFC, no fueron significativamente diferentes (FIGURA 7). Por lo tanto, la formulación conjunta con un portador no afectó la eficacia en comparación con el producto líquido fresco.

Ejemplo 13

Tratamiento de semillas de microbios

Se aplicaron tratamientos de semillas de microbios a semillas de maíz y soja utilizando un tratador por lotes SGS (SGS North America, Brookings, SD, EE. UU.). Se trató un kg de semilla por cada tratamiento. En tratamientos de semillas separados, los microbios se aplicaron directamente a la semilla sin tratar, se aplicaron como una capa superior a la semilla previamente tratada con un paquete de insecticida/fungicida, o se mezclaron con la suspensión de insecticida/fungicida antes de la aplicación a la semilla. Para el maíz, el tratamiento con insecticida/fungicida consistió en una mezcla de Acceleron que contenía metalaxil, trifloxistrobina, ipconazol y clotianidina, o una mezcla CruiserMaxx que contenía Cruiser (tiаметoxam), fludioxonil, mefenoxam, azoxistrobina y tiabendazol. Para la soja, el tratamiento con insecticida/fungicida consistió en una mezcla de Acceleron que contenía metalaxil, piraclostrobina, imidacloprid y fluxapiroxad, o una mezcla de CrusierMaxx que contenía Cruiser (tiаметoxam), mefenoxam, fludioxonil y Sedexane.

Después del tratamiento de la semilla, se probó la viabilidad (tal como en el Ejemplo 1) dentro de las 48 horas y tres semanas después. La inmensa mayoría de las cepas (19-20 de 23 cepas viables) sobrevivieron al proceso de formulación conjunta inicial. Después de tres semanas, solo se observó una ligera reducción de la viabilidad (17-18 de 23 cepas viables; FIGURA 8). Esto ilustró que la selección de cepas que producen DPA fue eficaz no solo para fertilizantes secos tal como bentonita y perlita, sino también eficaz como un tratamiento de semillas. Además, las semillas se evaluaron en busca de germinación para determinar el impacto del tratamiento de semillas en el potencial de germinación. Se realizó una prueba de Vigor en Frío, donde se evaluaron 4 replicaciones de 100 semillas para la germinación. Cada réplica de 100 semillas se plantó en papel de celulosa crepé humedecido y se enfrió durante la noche a 10 °C. Las semillas se cubrieron luego con una

pulgada [2,54 cm] de arena no estéril mojada al 70 % de su capacidad de retención de agua y se volvieron a poner a 10 °C durante siete días sin luz. Luego las semillas se movieron a 25 °C durante cuatro días. Se evaluaron las plántulas que emergieron a través de la arena. Los resultados se informaron como un porcentaje que representa el número de plántulas categorizadas como normales según las reglas de AOSA. Las puntuaciones de 82 % o más se consideran el mínimo aceptable para comercializar un lote de semillas de maíz de acuerdo con el Iowa State Seed Lab y SGS. Todos los tratamientos tuvieron un porcentaje de germinación de al menos 83,8 % o más (Tabla 32). Esto ilustra que además de funcionar bien en forma de tratamiento de semillas, las cepas productoras de DPA no impactaron negativamente en la germinación de dichas semillas.

Tabla 32. Tasa de germinación promedio de semillas de maíz y soja tratadas con DFC mediante el uso de la prueba de germinación de vigor en frío

	Maíz		Soja	
	<i>Sin tratar</i>	<i>DFC</i>	<i>Sin tratar</i>	<i>DFC</i>
Sin tratamiento fungicida	90,30 %	87,50 %	87,50 %	83,80 %
Tratado con Acceleron	89,30 %	87,90 %	86,00 %	84,90 %
Tratado con CruiserMaxx	88,00 %	86,00 %	85,00 %	88,65 %

En vista de las muchas modalidades posibles a las que se pueden aplicar los principios de la divulgación, debe reconocerse que las modalidades ilustradas son solo ejemplos y no deben tomarse como taxativos del alcance de la invención. Más bien, el alcance de la invención se define mediante las siguientes reivindicaciones. Por lo tanto, se reivindica como nuestra invención todo lo que entra dentro del alcance y espíritu de estas reivindicaciones.

Se reivindica:

1. Una composición que comprende células de especies microbianas que incluyen o consisten en cada uno de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus flexus*,
5 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus koreensis*, *Bacillus drentensis*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium pasteurianum*, *Lactobacillus paracasei*, *Fontibacillus sp. (panacisegetis)*, *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus azoreducens*, *Paenibacillus chibensis*, *Paenibacillus cookii*, *Paenibacillus sp. (chitinolyticus)*, *Paenibacillus sp. (P1XP2)*,
10 *Pseudomonas sp.*, y *Streptomyces griseus*.
2. Una composición que comprende células de especies microbianas que incluyen o consisten en microbios con secuencias de ácido nucleico de ADNr 16S que tienen al menos un 99 % de identidad de secuencia con cada una de las SEQ ID NO: 3-25.
3. La composición de la reivindicación 2, que comprende células de especies
15 microbianas que incluyen o consisten en microbios con secuencias de ácido nucleico de ADNr 16S de cada una de las SEQ ID NO: 3-25.
4. Una composición que comprende el número de depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-125924.
- 5 La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende
20 además uno o más de quitina, quitosano, glucosamina, aminoácidos y fertilizante líquido.
6. Un método que comprende poner en contacto el suelo, plantas, partes de plantas o semillas con la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. El método de la reivindicación 6, que comprende además poner en contacto el
25 suelo, plantas, partes de plantas o semillas con uno o más de quitina, quitosano, glucosamina y aminoácidos.
8. El método de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que comprende además poner en contacto el suelo, plantas, partes de plantas o semillas con un fertilizante líquido.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además
30 poner en contacto el suelo, plantas, partes de plantas o semillas con uno o más pesticidas, uno o más fungicidas, uno o más herbicidas, uno o más insecticidas, una o más hormonas vegetales, uno o más elicitores de plantas, o combinaciones de dos o más de estos.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende además

activar las especies microbianas en la composición antes de poner en contacto el suelo, plantas, partes de plantas o semillas con la composición.

11. Una composición que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador o una semilla.

12. La composición de la reivindicación 11, donde el portador comprende urea, potasa, fosfato de amonio, nitrato de amonio, arcilla, turba, carbón, tierra inorgánica, carbón vegetal, aserrín, salvado de trigo/soja/avena, compost, fibra de coco, perlita, vermiculita, bentonita, Azomite®, caolín, silicatos, piedra pómez, talco, un fertilizante líquido o un químico líquido para el control del polvo.

13. La composición de la reivindicación 11, donde la semilla comprende semilla de maíz, semilla de girasol, semilla de canola, semilla de trigo, semilla de pepino, semilla de tomate, semilla de arroz y/o semilla de algodón.

14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende además uno o más insecticidas y/o fungicidas.

15. Un método para seleccionar un microbio para la formulación conjunta con un portador o semilla, que comprende:

identificar un microbio que comprende uno o más genes sintasa de ácido dipicolínico (DPA), un microbio que expresa una o más proteínas de sintasa de DPA y/o un microbio que produce DPA; y

seleccionar el microbio para la formulación conjunta con un portador o semilla.

16. El método de la reivindicación 15, que comprende además formular conjuntamente el microbio seleccionado con el portador o la semilla.

17. El método de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, donde uno o más genes de sintasa de DPA comprenden un gen de la subunidad A de sintasa de DPA (DpaA) y/o un gen de la subunidad B de sintasa de DPA (DpaB).

18. El método de la reivindicación 17, donde el gen DpaA codifica una proteína DpaA con al menos un 20 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 26-41 o donde el gen DpaB codifica una proteína DpaB con al menos 20 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 42-56.

19. El método de la reivindicación 18, donde el gen DpaA codifica una proteína DpaA con al menos 60% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de

aminoácidos de las SEQ ID NO: 26-41 o donde el gen DpaB codifica una proteína DpaB con al menos 60% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 42-56.

20. El método de la reivindicación 19, donde el gen DpaA codifica una proteína DpaA que comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 26-41 o donde el gen DpaB codifica una proteína DpaB que comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 42-56.

21. El método de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, donde una o más proteínas DPA comprenden una proteína de la subunidad A de la sintasa de DPA (DpaA) y/o una proteína de la subunidad B de la sintasa de DPA (DpaB).

22. El método de la reivindicación 21, donde la proteína DpaA comprende al menos 20 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 26-41 o donde la proteína DpaB comprende al menos 20 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 42-56.

23. El método de la reivindicación 22, donde la proteína DpaA comprende al menos 60 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 26-41 o donde la proteína DpaB comprende al menos 60 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 42-56.

24. El método de la reivindicación 23, donde la proteína DpaA comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 26-41 o donde la proteína DpaB comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID. NO: 42-56.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24, donde identificar un microbio que comprende uno o más genes de sintasa de ácido dipicolínico (DPA) comprende detectar ácidos nucleicos o secuencias de ácido nucleico que codifican el uno o más genes de sintasa de DPA.

26. El método de la reivindicación 25, donde el ácido nucleico es ADN, ARNm o ADNc.

27. El método de la reivindicación 25 o la reivindicación 26, donde la detección del ácido nucleico comprende una o más de secuenciación de ácido nucleico, amplificación de ácido nucleico, hibridación de ácido nucleico y análisis de micromatrices.

28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 27, donde identificar un microbio que expresa la una o más proteínas de sintasa de DPA comprende un

inmunoensayo o espectrometría de masas.

29. El método de la reivindicación 28, donde el inmunoensayo comprende transferencia Western, ELISA, citometría de flujo o inmunohistoquímica.

30. El método de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, donde identificar un microbio que produce DPA comprende detectar DPA en el microbio o en el medio que contiene el microbio.

31. El método de la reivindicación 30, donde la detección de DPA comprende un ensayo de fluorescencia.

32. El método de la reivindicación 31, donde el ensayo de fluorescencia comprende un ensayo de fluorescencia de Terbio-DPA.

33. El método de la reivindicación 15 o la reivindicación 15, donde identificar un microbio que produce DPA comprende identificar un microbio que comprende uno o más genes *EtfA* o *Isf* y/o expresa una o más proteínas *EtfA* o *Isf*.

34. El método de la reivindicación 33, donde la proteína *Isf* comprende al menos 20 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 57-66.

35. El método de la reivindicación 34, donde la proteína *Isf* comprende al menos 60% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 57-66.

36. El método de la reivindicación 35, donde la proteína *Isf* comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 57-66.

37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 36, donde el microbio seleccionado tiene una mayor viabilidad cuando se formula conjuntamente con un portador o semilla en comparación con un microbio que no comprende uno o más genes de sintasa de ácido dipicolínico (DPA), no expresa una o más proteínas de sintasa de DPA, y/o no produce DPA.

38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 37, donde la formulación conjunta del microbio seleccionado con el portador o semilla comprende poner en contacto uno o más microbios seleccionados con el portador o semilla.

39. El método de la reivindicación 38, donde uno o más microbios seleccionados están en un medio líquido.

40. El método de la reivindicación 39, donde uno o más microbios seleccionados están

en forma sólida o seca.

41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40, que comprende además poner en contacto el portador o semilla con uno o más microbios que no comprenden uno o más genes de sintasa de DPA, no expresan una o más proteínas DPA y/o no producen DPA.

42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 41, donde el portador comprende un portador seco o sólido.

43. El método de la reivindicación 42, donde el portador seco o sólido comprende un fertilizante seco, una sustancia derivada del suelo, una sustancia orgánica, un material inerte o una mezcla de dos o más de estos.

44. El método de la reivindicación 43, donde el fertilizante seco comprende urea, potasa, fosfato de amonio y/o nitrato de amonio; la sustancia derivada del suelo comprende arcilla, turba, carbón o suelo inorgánico; la sustancia orgánica comprende carbón vegetal, aserrín, salvado de trigo/soja/avena, compost o fibra de coco; o el material inerte comprende perlita, vermiculita, bentonita, Azomite®, caolín, silicatos, piedra pómez o talco.

45. El método de la reivindicación 42, donde el portador líquido comprende un fertilizante líquido o un producto químico líquido para el control del polvo.

46. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 41, donde la semilla comprende semilla de maíz, semilla de girasol, semilla de canola, semilla de trigo, semilla de pepino, semilla de tomate, semilla de arroz y/o semilla de algodón.

47. El método de la reivindicación 46, donde la semilla tratada comprende además uno o más insecticidas y/o fungicidas.

RESUMEN

Se proporcionan métodos para seleccionar un microbio para la formulación conjunta con un portador. En algunos ejemplos, los métodos incluyen identificar un microbio que comprende uno o más genes de sintasa de ácido dipicolínico (DPA), un microbio que expresa una o más proteínas de sintasa de DPA y/o un microbio que produce DPA; y seleccionar el microbio para la formulación conjunta con un portador. Los métodos incluyen opcionalmente formular de forma conjunta el microbio seleccionado con el portador. En algunos ejemplos, los métodos incluyen la detección de uno o más genes de sintasa de DPA o una o más proteínas DpaA y/o DpaB en un microbio. En otros ejemplos, los métodos incluyen detectar DPA en un microbio o medio que contiene un microbio, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de fluorescencia. También se proporcionan composiciones microbianas que incluyen uno o más microbios que comprenden uno o más genes de sintasa de DPA, expresan una o más proteínas sintasa de DPA y/o producen DPA.