



Informe Técnico Final

Proyectos de Emprendimiento Innovador

Nombre del proyecto	PSA Free: Desarrollo un nuevo método de biocontrol contra el fitopatógeno <i>Pseudomonassyringae</i> pv. <i>actinidiae</i> usando un antimicrobiano natural.
Código del proyecto	FIA PYT-2019-0705
Nº de informe	Final
Período informado (considerar todo el periodo de ejecución)	Desde el 1 de julio de 2022 hasta el 31 de enero de 2023
Fecha de entrega	08 de febrero del 2023

INSTRUCCIONES PARA COMPLETAR Y PRESENTAR EL INFORME

I. Todas las secciones del informe deben ser contestadas, utilizando caracteres tipo Arial, tamaño 11.

II. Sobre la información presentada en el informe

- Debe completar todas las secciones del documento según corresponda.
- Debe estar basada en la última versión del Plan Operativo aprobada por FIA.
- Debe ser resumida y precisa. Si bien no se establecen números de caracteres por sección, no debe incluirse información en exceso, sino solo aquella información que realmente aporte a lo que se solicita informar.
- Debe ser totalmente consistente en las distintas secciones y se deben evitar repeticiones entre ellas.
- Debe estar directamente vinculada a la información presentada en el informe financiero y ser totalmente consistente con ella.

III. Sobre los anexos adjuntos al informe

- Deben enumerar y nombrar los documentos adjuntados en la tabla de la sección 15 del informe.
- Deben incluir toda la información que complemente y/o respalde la información presentada en el informe, especialmente a nivel de los resultados alcanzados.
- Se deben incluir materiales de difusión, como diapositivas, publicaciones, manuales, folletos, fichas técnicas, entre otros.
- También se deben incluir cuadros, gráficos y fotografías, pero presentando una descripción y/o conclusiones de los elementos señalados, lo cual facilite la interpretación de la información.

IV. Sobre la presentación a FIA del informe

- La presentación de los informes técnicos se realizará mediante la entrega de 2 copias digitales idénticas y sus anexos, en la siguiente forma:
 - a) Un documento "Informe técnico final", en formato word.
 - b) Un documento "Informe técnico final en formato pdf.
 - c) Los anexos identificando el número y nombre, en formato que corresponda.
- La entrega de los documentos antes mencionados debe hacerse mediante correo electrónico dirigido al correo electrónico de la Oficina de Partes de FIA (oficina.partes@fia.cl). La fecha válida de ingreso corresponderá al día, mes y año en que es recepcionado el correo electrónico en Oficina de partes de FIA. Es responsabilidad del Ejecutor asegurarse que FIA haya recepcionado oportunamente los informes presentados.

- Para facilitar los procesos administrativos, se sugiere indicar en el "Asunto" del correo de envío: **"Presentación de Informe Técnico Final Proyecto Código PYT-XXXX-YYYY"**.
- La fecha de presentación debe ser la establecida en la sección detalle administrativo del Plan Operativo del proyecto o en el contrato de ejecución respectivo.
- El retraso en la fecha de presentación del informe generará una multa por cada día hábil de atraso equivalente al 0,2% del último aporte cancelado.

CONTENIDOS

1.	ANTECEDENTES GENERALES	5
2.	RESUMEN DEL PERÍODO INFORMADO	5
3.	OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO.....	5
4.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE).....	7
5.	RESULTADOS ESPERADOS (RE).....	¡Error! Marcador no definido.
6.	CAMBIOS Y PROBLEMAS DEL PROYECTO.....	9
7.	ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO.....	13
8.	CAMBIOS EN EL ENTORNO.....	14
9.	DIFUSIÓN.....	14
11.	CONCLUSIONES	17
12.	RECOMENDACIONES	17
13.	ANEXOS.....	18
14.	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	33

1. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre Ejecutor:	Manuel Alejandro Arce Arellano
Nombre(s) Asociado(s):	Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Coordinador Principal:	Manuel Alejandro Arce Arellano
Coordinar Alterno:	Camila Andrea Prince Casarotto
Región(es) de ejecución:	v región
Fecha de inicio iniciativa:	30 de diciembre de 2019
Fecha término iniciativa:	31 de enero de 2023

2. RESUMEN DEL PROYECTO

Entregar de manera **resumida**¹ las principales actividades realizadas y resultados obtenidos durante todo el periodo de ejecución del proyecto, fundamentando con datos cuantitativos y cualitativos que respalden los resultados.

(Máximo 1.000 caracteres sin espacio)

3. RESUMEN DEL PERIODO NO INFORMADO

Entregar de manera **resumida**² las principales actividades realizadas y resultados obtenidos durante el periodo comprendido entre el último informe técnico de avance y el informe final, fundamentando con datos cuantitativos y cualitativos que respalden los resultados.

En el periodo anterior, se informó los resultados de los ensayos de estabilidad fisicoquímica del método de control a diferentes temperaturas (25, 30 y 37°C) por 24 y 48 horas respectivamente. Los resultados indicaron que el biocontrolador mantiene su efectividad en todas las temperaturas, con una mayor efectividad (30% de efectividad) a 25° C, luego de 48 hrs post aplicación. Además, se reportó que la efectividad de del biocontrolador no se vio afectada entre los rangos de pH entre 2 y 11. Finalmente, en cuanto a la exposición directa del biocontrolador a la radiación UV, los resultados mostraron una disminución de la población.

¹ Esta síntesis se debe limitar a citar las ideas más importantes, es decir, excluye datos irrelevantes y no brinda espacio a interpretaciones subjetivas.

² Esta síntesis se debe limitar a citar las ideas más importantes, es decir, excluye datos irrelevantes y no brinda espacio a interpretaciones subjetivas.

Por otra parte, se realizaron ensayos de compatibilidad entre el biocontrolador y los co-formulantes comerciales que el biocontrolador es compatible con los co-formulantes basados en compuestos e incompatible con basados en ácidos orgánicos.

Se informó la caracterización de los compuestos responsables del efecto antimicrobiano contra la Psa, en donde se identificaron 24 compuestos relacionados con actividad antimicrobiana.

4. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Desarrollar un nuevo biocontrolador natural contra el fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

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

Nº OE	Objetivo específico (OE)	% de avance al término del proyecto
1	Caracterizar el compuesto antimicrobiano aislado de un cultivo bacteriano de <i>Alcaligenes spp.</i>	100%
2	Demostrar la efectividad del biocompuesto <i>in vitro</i> y en condiciones de invernadero	80%
3	Optimizar la formulación para el biocompuesto natural contra Psa	100%
4	Desarrollo la estrategia y titularidad de la protección intelectual	60%
5	Desarrollo de un modelo de negocios	100%

6. RESULTADOS ESPERADOS (RE)

Cuantificar y describir el avance de los RE al término del proyecto.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE) ³	% de cumplimiento ⁴
1	1	Caracterización química de compuestos con propiedades antimicrobiana	100%
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto ⁵ .			
En primera instancia se secuenció el genoma de la bacteria y se realizó un análisis genómico, identificando la presencia de 4 agrupamientos biosintéticos, los cuales codifican para betalactona, policétido sintasa de tipo 1, fosfonato y sintetasa de péptidos no ribosomales. El análisis LC-MS de los extractos, reveló la presencia de 314 compuestos, de los cuales 24 de estos han sido reportados con actividad antimicrobiana.			
Indique el número y nombre del anexo que respalde ⁶ el cumplimiento de los resultados del proyecto.			
1			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	% de cumplimiento
2	1	Efectividad antimicrobiana del biocompuesto <i>in vitro</i> .	100%
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.			
. Los resultados de efectividad antimicrobiana <i>in vitro</i> revelaron que el método de biocontrol tiene una efectividad del 30% contra la Psa. Además, se realizó un ensayo de antagonismo en medio sólido, que demostró que el antagonismo sobre la Psa es a través de la secreción de compuestos inhibitorios al medio			
Indique el número y nombre del anexo que respalde el cumplimiento de los resultados del proyecto.			
2			

³ El Resultado Esperado (RE) corresponde al indicado en el Formulario de Postulación (Plan Operativo).

⁴ El porcentaje de cumplimiento es el porcentaje de avance del resultado en relación con la línea base y la meta planteada. Se determina en función de los valores obtenidos en las mediciones realizadas para cada indicador de resultado. El porcentaje de avance de un resultado no se define según el grado de avance que han tenido las actividades asociadas éste. Acorde a esta lógica, se puede realizar por completo una actividad sin lograr el resultado esperado que fue especificado en el Plan Operativo. En otros casos se puede estar en la mitad de la actividad y ya haber logrado el 100% del resultado esperado

⁵ Cuando corresponda, justificar las discrepancias entre los resultados programados y los obtenidos

⁶ Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, fotos, protocolos, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan el cumplimiento de los resultados del proyecto.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	% de avance a la fecha
2	2	Efectividad antimicrobiana del biocompuesto en plantas de invernadero.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
<p>Se realizaron dos ensayos por separado. El primero en discos de hojas donde se midió la supervivencia del fitopatógeno en dichos discos en ausencia y presencia del biocontrolador, mostrando una reducción de un 80% en la supervivencia de Psa.</p> <p>En cuanto a los ensayos en plantas se vio que las plantas no desarrollaron daño en las hojas al ser infectadas con el patógeno y el biocontrolador.</p>			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			
3			
Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	% de avance a la fecha
2	3	Efectividad antimicrobiana del biocompuesto en campo.	0%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
<p>Debido a las evidencias publicadas recientemente, de la posible patogenicidad en seres humanos de nuestra bacteria productora del biocompuesto, los ensayos fueron suspendidos por razones de bioseguridad.</p> <p>Se requiere mayor información de la cepa a la cual pertenece <i>Alcaligenes spp</i>, y estudios relevantes de su inocuidad para ser utilizadas en los ensayos de campo propuestos en este proyecto. Al contar con el genoma del microorganismo, es posible hacer un análisis exhaustivo de islas de patogenicidad y genes específicos, lo que se ha propuesto como proyección del trabajo.</p>			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			
4			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	% de avance a la fecha
3	1	Formulación y Estabilidad Fisicoquímica del Biocontrolador	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
<p>Se realizaron los ensayos de efectividad a diferentes temperaturas (25, 30 y 37°C) por 24 y 48 horas respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que el biocontrolador mantiene su efectividad en todas las temperaturas, siendo su mayor efectividad (30%) luego de 48 horas de aplicación a 25°C. Además, se realizaron ensayos de efectividad a diferentes valores de pH. Los resultados sugieren que la efectividad de del biocontrolador no se vio afectada entre los rangos de pH entre 2 y 11. Posteriormente, se realizó un ensayo de tolerancia a la radiación UV, donde los resultados sugieren que la exposición directa del biocontrolador a la radiación UV, causa una disminución de la población. Por otra parte, se realizaron ensayos de compatibilidad y eficiencia del biocontrolador con co-formulantes comerciales, con el fin de mejorar su eficacia contra la Psa. Los ensayos de compatibilidad entre el biocontrolador y los co-formulantes comerciales sugieren que, el biocontrolador es compatible con los co-formulantes basados en compuestos siliconados, manteniendo una alta población viable. Por otra parte, el uso de co-formulantes basados ácidos orgánicos mostraron ser incompatibles con el biocontrolador, reduciendo su población. La efectividad del biocompuesto en contra la Psa en presencia de los diferentes coadyuvantes, los resultados obtenidos sugieren que la efectividad es mayor al usar, co-formulantes basados en compuestos siliconados, en comparación a los compuestos basados en ácidos orgánicos</p>			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			
5			
Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	% de avance a la fecha
4	1	Desarrollo la estrategia y titularidad de la protección intelectual	60%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
<p>El desarrollo de protección intelectual del biocompuesto está estuvo a cargo del asociado (OTL de la PUCV) quien hizo un análisis del estado del arte actual relacionado con tecnologías asociadas a nuestro proyecto, concluyendo que el biocopuesto es patentable. Sin embargo, informó posteriormente que el proceso de la protección intelectual se llevaría a cabo en un plazo superior al acordado, no cumpliendo con los plazos definidos en el proyecto, por lo que el dinero destinado a este ítem no pagó al asociado.</p>			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			

6			
Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	% de avance a la fecha
5	1	Desarrollo de un modelo de negocios	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
<p>Se diseñó un modelo de negocio basado en el modelo canvas, identificándose la propuesta de valor ya que, nuestro producto es un microorganismo nativo de plantas de kiwi, inocuo para el medio ambiente y los consumidores, además de ser mucho más específico contra el patógeno, no afectando el microbioma de la planta. Las actividades claves como la validación de la efectividad del biocopuesto lo que se ha demostrado en los <i>ensayos in vitro</i> en diferentes condiciones y respaldado por análisis genómicos y metabólicos. segmento de clientes. Recursos claves, donde hemos tenido contacto con diversos investigadores del área agrícola y fitopatología aprendiendo nuevas técnicas y las líneas de investigación relacionadas al proyecto. Los canales de comunicación se han desarrollado teniendo reuniones con productores de interesados en nuestra propuesta como el vivero Grupo Hijuelas y Sociedad agrícola Graneros.</p>			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			
7			

7. CAMBIOS Y PROBLEMAS DEL PROYECTO

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

Describir cambios y problemas	Consecuencias (positivas o negativas) para el cumplimiento de los objetivos general y específicos	Ajustes realizados al proyecto para abordar los cambios y problemas
Se reportan posibles efectos patogénicos en humanos, de la bacteria en estudio.	No se pudo llevar a cabo los ensayos en campo.	Debido al tiempo restante del proyecto no se pudieron realizar ensayos que reemplazaran los ensayos presupuestados para cumplir los objetivos propuestos. Se propone como proyección realizar un análisis genómico para estudiar la inocuidad del microorganismo.
El plazo para realizar el estudio de patentabilidad y protección intelectual se extiende, por parte de la PUCV.	No se logra finalizar la protección de la propiedad intelectual.	El objetivo no ha sido logrado. Sin embargo, se comenzó a trabajar en la protección del nombre de la marca PSA:Free

8. ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO

1. **Actividades programadas en el plan operativo y realizadas durante el período de ejecución del proyecto. Enumere según carta Gantt y explique brevemente.**

OE2RE2 Efectividad del bioconpuesto en plantas de invernadero.

2. **Actividades programadas en el plan operativo y no realizadas durante el período de ejecución del proyecto. Enumere según carta Gantt y explique brevemente.**

OE2RE3 Efectividad del bioconpuesto en campo (suspendido).

OE4RE4 Desarrollo la estrategia y titularidad de la protección intelectual (incompleta).

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

No se cumple

12. CAMBIOS EN EL ENTORNO

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

Debido a la existencia de evidencia de la posibilidad de efectos patógenos en *Alcaligenes spp.* se deben suspender ensayos en campo por normas de bioseguridad.

13. DIFUSIÓN

Describa las actividades de difusión realizadas durante la ejecución del proyecto:

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes ⁷	Documentación generada ⁸
29/11 al 02/12	La Serena	Presentación póster	1	8 y 9

⁷ Debe adjuntar en anexos las listas de participantes.

⁸ Debe adjuntar en anexos el material de difusión generado.

14. CONSIDERACIONES GENERALES

1. ¿Considera que los resultados obtenidos permitieron alcanzar el objetivo general del proyecto?

No

2. ¿Cómo fue el funcionamiento del equipo técnico del proyecto y la relación con los asociados, si los hubiere?

El funcionamiento y la relación del equipo técnico y los asociados fue buena. Sin embargo, el retraso y posterior cambio de plazos en el desarrollo de la propiedad intelectual produjo el no cumplimiento de un objetivo, por lo que se debió informar en un comienzo que estos plazos eran difíciles de cumplir.

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

No se lograron cumplir todos los objetivos.

En el transcurso del proyecto se tuvo una gran cantidad de dificultades relacionadas con la situación sanitaria del COVID 19. Principalmente, la imposibilidad de ingresar al laboratorio de microbiología PUCV, en los periodos en que Valparaíso se encontraba en cuarentena, por lo que se debió solicitar a FIA la reprogramación del proyecto en dos ocasiones.

Por otro lado, hubo una extensión en el plazo del desarrollo de la propiedad intelectual por parte del asociado, lo que ocasionó el no cumplimiento del objetivo específico 4.

Finalmente, se debió suspender los ensayos en campos por una posibilidad de efectos patógenos de nuestra bacteria en estudio en seres humanos, presentando un posible riesgo sanitario.

4. Complete el siguiente cuadro de resultados de proyecto, marcando con una x en la respuesta correcta:

Indique el tipo de innovación desarrollada:	Producto/Servicio	X
	Proceso	

Para el caso de innovación en producto y/o servicio, ¿realizó la primera venta del nuevo producto y/o servicio al término del proyecto?	Si	
	No	X
Para el caso de innovación en proceso, ¿Implementó el nuevo proceso al término del proyecto?	Sí	
	No	X
En el caso que su emprendimiento no estuviera formalizada al comienzo del proyecto, ¿logró constituir su empresa durante la ejecución del proyecto?	Sí	
	No	X
Durante la ejecución del proyecto, ¿Recibió otros fondos del estado?	Sí	
	No	X

18. CONCLUSIONES

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

Los resultados obtenidos en el proyecto muestran el que el efecto antimicrobiano contra Psa del biocontrolador en condiciones in vitro, se mantienen en amplios rangos de temperatura y pH. Además, de mantener su efectividad sumado con co-formulantes siliconados, lo que ayuda en la aplicación en plantas de kiwi.

No se pudo obtener resultados en campo, ya que la patogenicidad del microorganismo en seres humanos es dudosa, representando un posible riesgo sanitario. Como proyección, se propone realizar los ensayos pertinentes para asegurar la inocuidad de nuestro biocontrolador y así probar su aplicación en plantas de kiwi, en su estado nativo.

19. RECOMENDACIONES

Indique las recomendaciones/sugerencias que se consideran relevantes en relación con lo trabajado durante la ejecución del proyecto.

Como proyección del trabajo se recomienda tener un estudio certero de la inocuidad de biocontrolador utilizando herramientas bioinformáticas.

20. ANEXOS

1. Caracterización genética y metabólica de los extractos producidos por el biocontrolador.

1.1 Secuenciación del Genoma

Para la secuenciación del Genoma, se hizo crecer el microorganismo productor en medio líquido Luria Bertani (LB) a 25°C durante 24 horas. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10 µl y se sembró por agotamiento en placas de medio LB, incubándose a 25°C durante 48 horas.

Para la extracción del material genético, se tomó una colonia del microorganismo productor y se creció en medio líquido LB a 25°C, hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 1 UA. Luego se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo bacteriano y se centrifugó a 10000 RPM por 10 min, con el objetivo de obtener un pellet bacteriano. La extracción se realizó usando el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuenciación del genoma fue realizada por el servicio MicrobesNG, a través de la tecnología Illumina. Los resultados crudos de esta se presentan en la Tabla 1.

Sample ID	Median Insert	Mean Coverage	Mean Coverage Excluding 0s	Number of Reads	Number of Reads w/ Insert Size > 300
39469_Af1	736	126.904	126.916	1125263	941245
39470_Af2	743	150.421	150.439	1341506	1139746
39471_Af3	743	178.43	178.451	1570170	1387741

Tabla 1: Datos crudos de la secuenciación del genoma del microorganismo productor.

El ensamble de los reads fue realizado por el servicio MicrobesNG como parte del servicio. Los resultados del ensamble se presentan en la Tabla 2.

Sample ID	# contigs > 0 bp	# contigs > 1000 bp	Total Length > 0bp	Total Length > 1000 bp	# Contigs	Largest Contig	Total Length	GC %	N50	N75	L50	L75
39469_Af1	86	20	4257498	4240512	24	746811	4242977	56.79	423548	273608	4	7
39470_Af2	83	20	4256053	4240214	25	746811	4243416	56.79	423548	299709	4	7
39471_Af3	78	18	4255294	4239435	25	746811	4243660	56.79	423548	299709	4	7

Tabla 2: Datos del ensamble de los reads obtenidos en la secuenciación del microorganismo productor.

1.2 Anotación del Genoma

Para realizar la anotación del genoma se utilizó el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) y el genoma que se anotó fue el 39469_Af1. Los resultados de la anotación se muestran en la Tabla 3.

Genome	Alcaligenes faecalis
Domain	Bacteria
Taxonomy	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Alcaligenes; Alcaligenes faecalis
Size	4257498
GC %	56,8
N50	423548
L50	4
# Contigs	86
# Subsystems	304
# CDS	3995
# RNA	59

Tabla 3: Descripción General de la Anotación del Genoma Af1.

La anotación del genoma Af1 arrojó 3995 secuencias codificantes, clasificadas en 304 subsistemas, tal como se ve en la Figura 1.

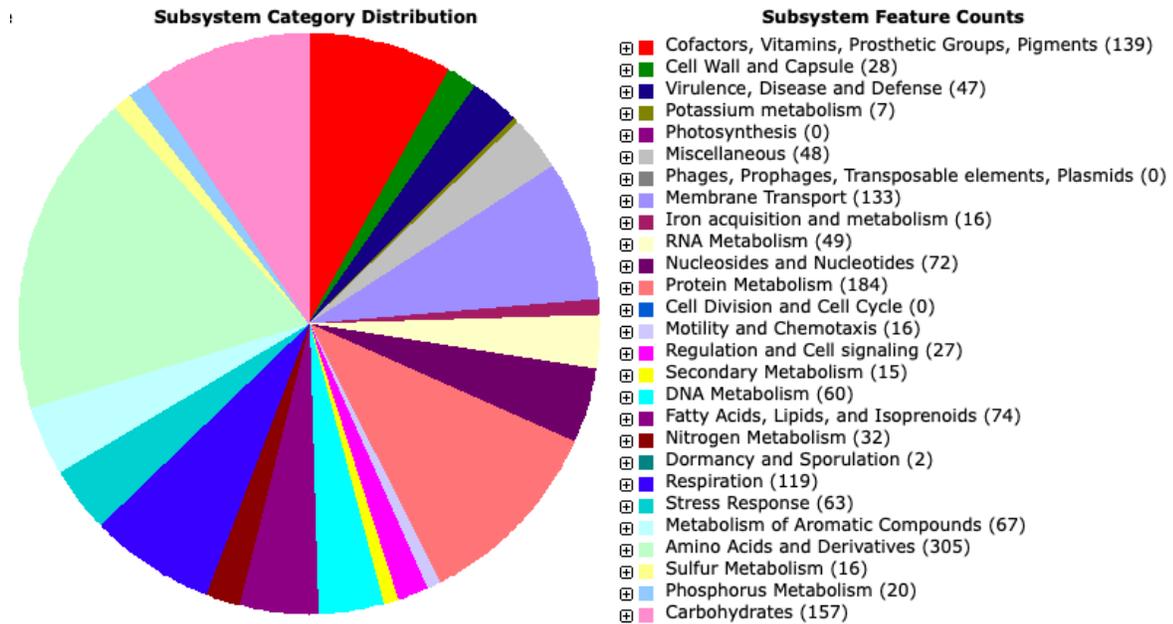


Figura 1: Distribución de las secuencias codificantes del genoma Af1 y su distribución en subsistemas.

1.3 Identificación de agrupamientos biosintéticos presentes en el genoma Af1

Para identificar agrupamientos biosintéticos presentes en el genoma, se realizó un análisis utilizando el servidor antiSMASH. Para el análisis se utilizaron parámetros de búsqueda sugeridos por el servidor. Los agrupamientos identificados en el genoma se presentan en la Tabla 4.

Region	Type	From (bp)	To (bp)
Contig 1	Ectoine	626900	637292
Contig 2	T1PKS	447146	494720

Contig 5	NRPS-Resorcinol	12665	89105
Contig 6	Betalactone 1	19965	48099
Contig 6	Phosphonate	227532	268410
Contig 8	Betalactone 2	113340	144529
Contig 9	Terpene	27175	48905

Tabla 4: Regiones de metabolitos secundarios identificados en el genoma del microorganismo productor

1.4 Análisis de metabolitos secundarios

Para determinar que compuestos estarían involucrados en el efecto antimicrobiano contra la Psa, se llevó a cabo un análisis LC-MS. El microorganismo productor fue crecido en medio LB líquido, hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 1. Se tomaron 4 muestras de 1 ml cada una, las cuales fueron centrifugadas a 10000 RPM por 10 minutos para obtener un sobrenadante libre de células. El sobrenadante fue filtrado usando filtros pirinola con tamaño de poro de 0,2 μm . Los extractos filtrados fueron enviados al servicio Creative Proteomics para su análisis. Los metabolitos obtenidos fueron comparados con la bibliografía disponible, para identificar su potencial antimicrobiano.

RT [min]	m/z	Molecular Weight	Name	Type	Ref
2,816	89,03812	88,03054	Quinoline	Antibacterial	(1)
2,863	103,04942	102,04185	Cycloserine	Antibacterial	(2)
1,719	105,0695	104,06224	2,3-Diaminopropionic Acid	Antibiotic Precursor	(3)
0,632	266,15948	113,59816	Sydonic acid	Antibacterial	(4)
5,699	136,02065	135,01334	Benzothiazole	Antibacterial	(5)
3,148	136,07437	135,06713	3-Aminoacetophenon	Antibiotic Precursor	(6)

3,398	147,05429	146,04712	4(3H)-quinazolinone	Antibacterial	(7)
6,409	150,03603	149,02877	Benzyl Isothiocyanate	Antibacterial	(8)
1,334	165,05363	164,04625	p-Coumaric acid	Antibacterial	(9)
4,19	184,09573	183,08821	3-phenyllactic acid	Antibacterial	(10)
0,872	263,05963	262,05242	rhein	Antibacterial	(11)
4,235	581,36151	580,35407	Bacillaene	Antibacterial	(12)

Tabla 4: Metabolitos secundarios con potencial antimicrobianos identificados en el análisis LC-MS.

2. Efectividad del biocontrolador en condiciones *in vitro*.

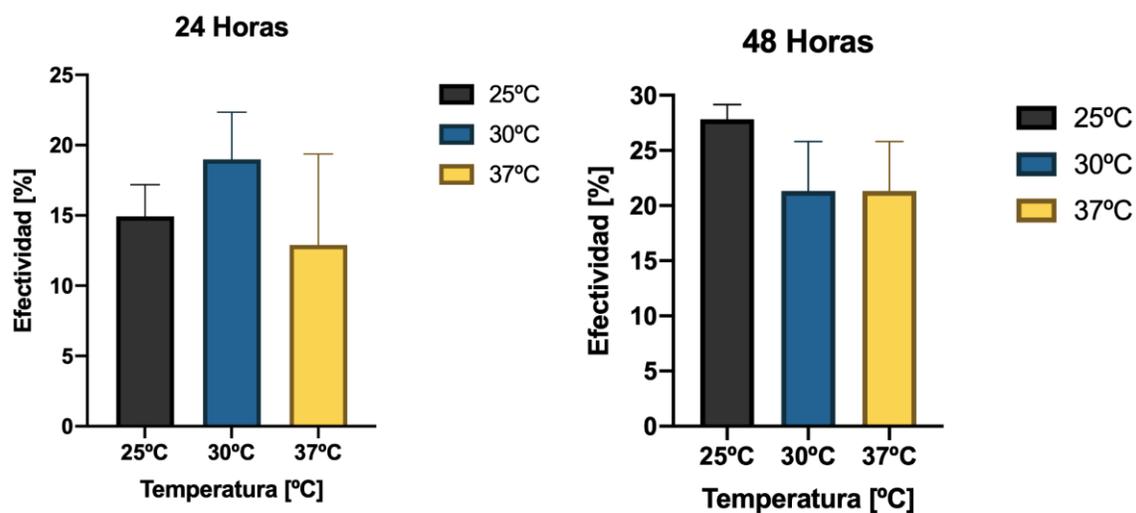


Figura 2: Porcentaje de efectividad del método de biocontrol frente a Psa bajo diferentes condiciones de temperatura.

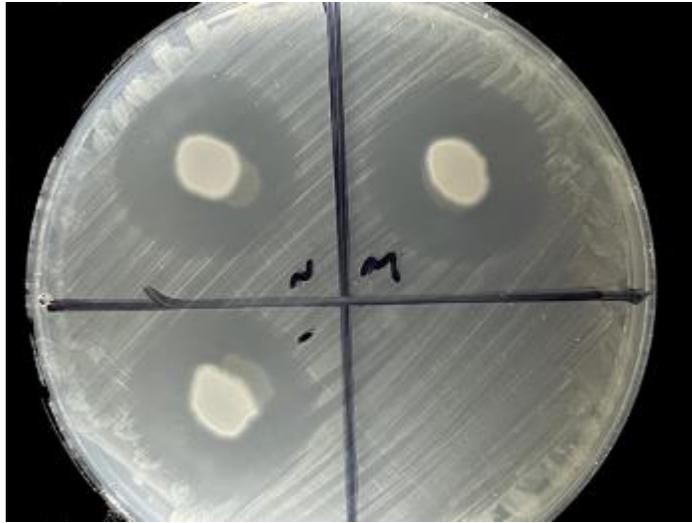


Figura 3: Ensayo de inhibición del método de biocontrol frente a Psa.

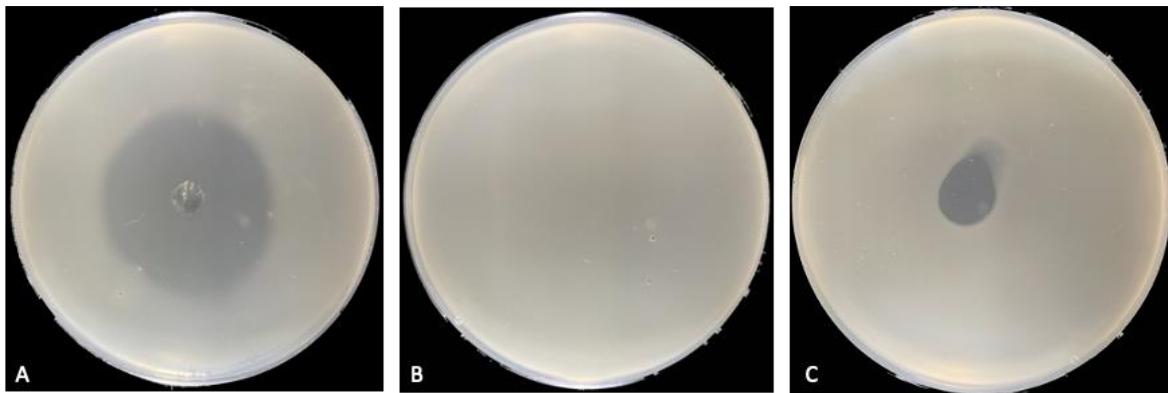


Figura 4: Ensayo de antagonismo en medio sólido. A) Biocontrolador, B) Control Negativo, C) Control Cobre.

3. Efectividad del biocontrolador en plantas de invernadero.

3.1 Ensayos en discos de hojas de kiwi

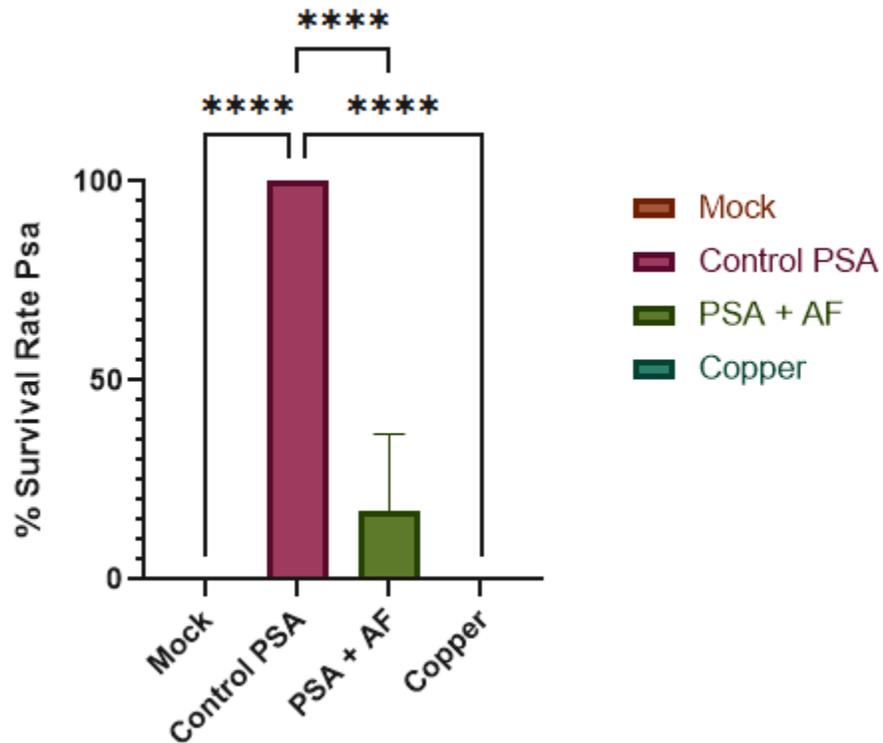


Figura 5: Porcentaje de supervivencia del fitopatógeno Psa en discos de hoja. Se observa una reducción del 100% de supervivencia a 20%.

3.2 Ensayos en plantas

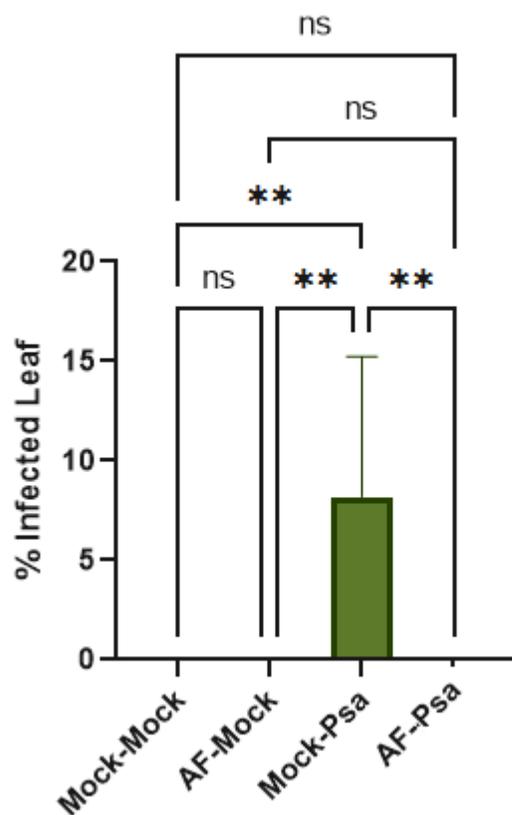


Figura 6: Porcentaje de daño en hojas de plantas de kiwi por infección de Psa. Se observa una que el porcentaje de daño es casi nulo al aplicar el biocontrolador (AF-PSA).

4. Efectividad del biocontrolador en campo.

Se adjunta link de acceso a paper sobre patogenisidad de *Alcaligenes spp.*

<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/s12879-020-05557-8.pdf>

5. Formulación para el biocompuesto natural contra Psa

5.1 Ensayos de Estabilidad Fisicoquímica

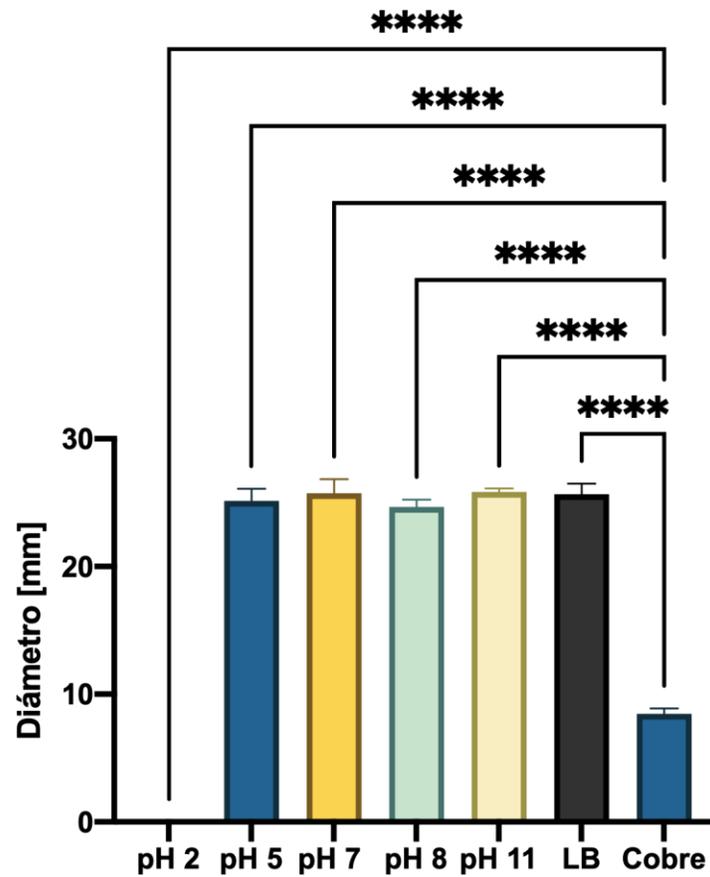


Figura 7: Ensayo de efectividad del biocompuesto contra PSA a diferentes pH luego de 48 horas.

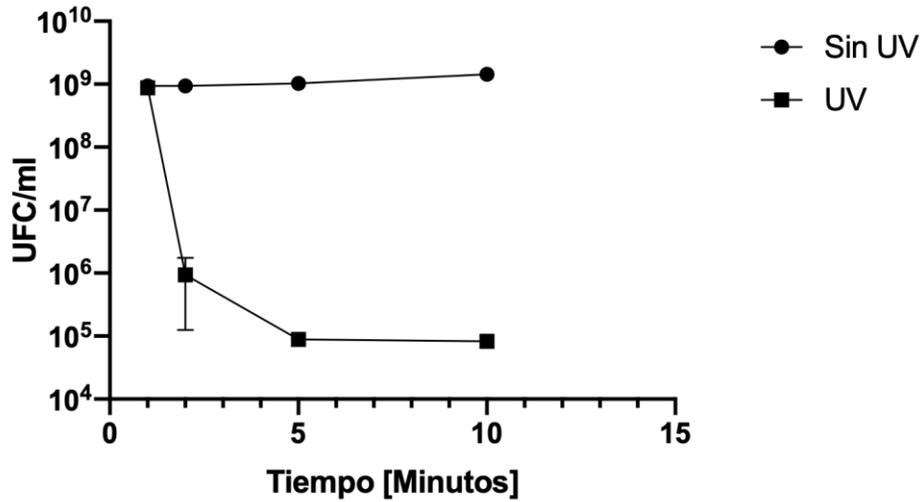


Figura 8: Efecto de la radiación UV en la sobrevivencia del biocontrolador.

5.2 Ensayos de Formulación

Compuesto	Principio Activo
Silwet TX 100	3-(polioxietilen) propilheptametiltrisiloxano
Humeasil	3-(polioxietilen) propilheptametiltrisiloxano
Break	Éter de alilo etoxilado propoxilado y 3-(polioxietilen) propilheptametiltrisiloxano
Regulux	Ácido Ortofosfórico
Indicate 5	Ácido Ortofosfórico y Nonifenol Etoxilado

Tabla 5: Coformulantes utilizados en los ensayos de formulación

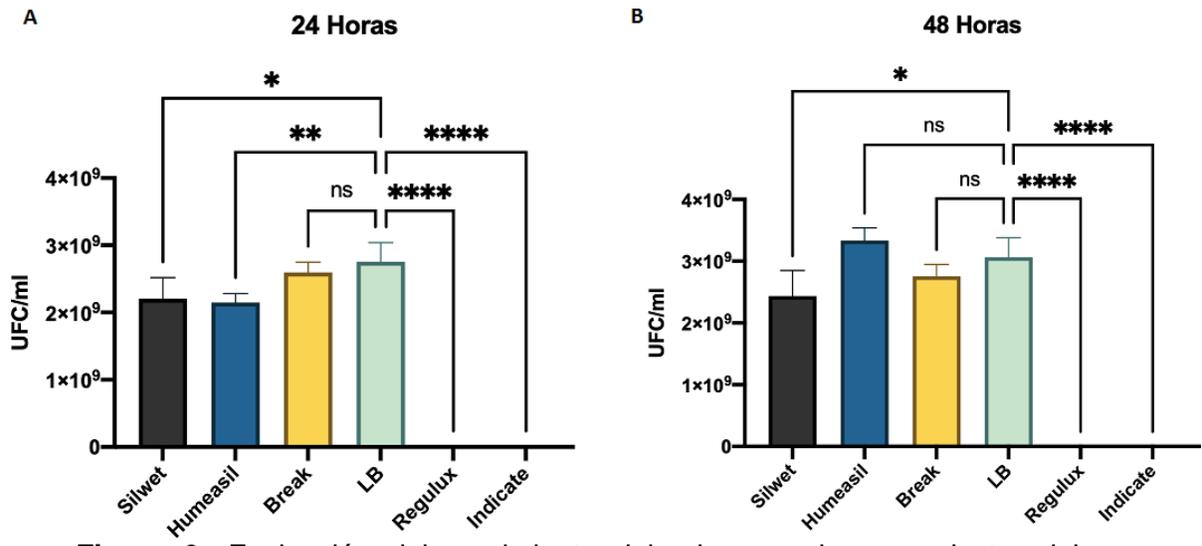


Figura 9: Evaluación del crecimiento del microorganismo productor del compuesto antimicrobiano (*Alcaligenes spp.*) en presencia de diferentes coadyuvantes de uso agrícola.

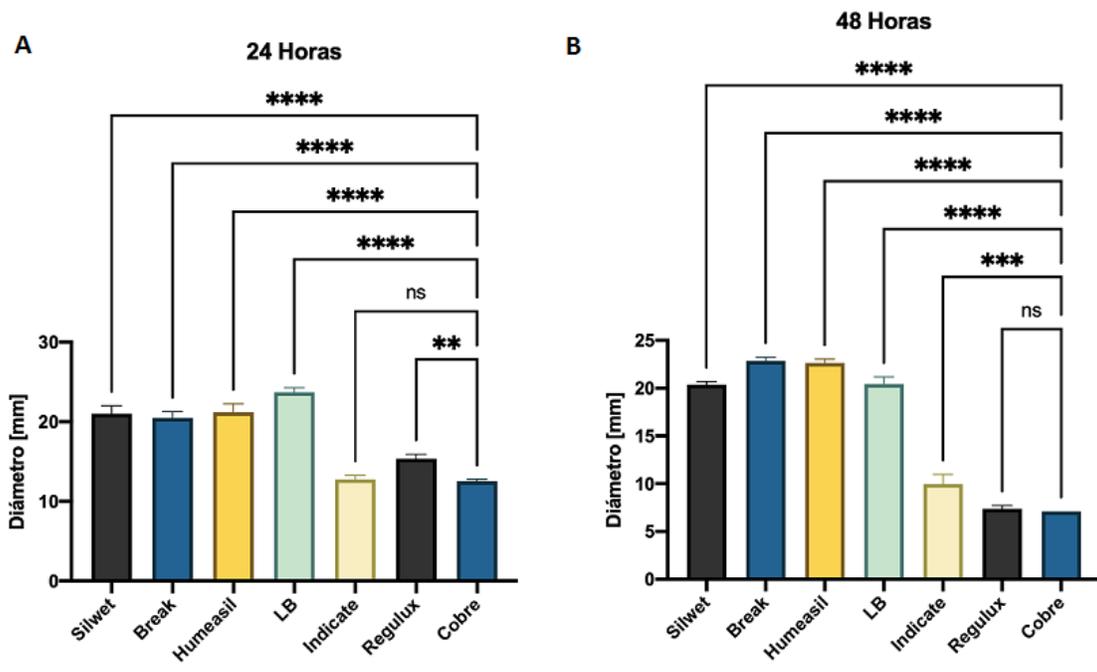


Figura 10: Evaluación de la efectividad del compuesto antimicrobiano, en presencia de diferentes coadyuvantes de uso agrícola.

6. Desarrollo la estrategia y titularidad de la protección intelectual.

El desarrollo de la estrategia de protección intelectual se lleva a cabo netamente por el asociado (PUCV) quien, en una primera instancia revisó los resultados preliminares del proyecto obtenidos en el laboratorio. Luego, realizó un acuerdo de participación entre Asociado y ejecutor definiendo los compromisos de cada uno. Posteriormente, realizó un estudio del estado del arte en relación al uso del microorganismo productor *Alcaligenes spp*, como uso de biocontrolador (Figura 6).

Nº	BUSCADOR /SOLICITUD DE PATENTE	NOMBRE	INFORMACIÓN	AÑO	INVENTOR / SOLICITANTE	OBSERVACIÓN
1	Google Patent	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain	An <i>Alcaligenes faecalis</i> B137W is preserved in China Center for Type Culture Collection on May 7, 2013, and has a preservation number of CCTCC NO-M2013176. A fermentation filtrate of the above strain has an inhibition effect on <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Colletotrichum capsici</i> and <i>Alternaria alternate</i> , the inhibition effect of the fermentation filtrate on the <i>Rhizoctonia solani</i> is strongest, and the inhibition rate of the fermentation filtrate of the <i>Alcaligenes faecalis</i> B137W to the <i>Rhizoctonia solani</i> is 60.26% and is equal to the inhibition of validamycin to the <i>Rhizoctonia solani</i> , so the strain can be developed into bio-control agents.	2013	张亚廖晓兰苏品黄魏刘双清程程, Hunan Agricultural University.	búsqueda: <i>Alcaligenes faecalis</i> and patent. Se analiza el biocontrol de la cepa contra distintos hongos.
2	Patentscope	US20200131096 - BIOFERTILIZER COMPOSITION AND METHOD OF MANUFACTURE	A biofertilizer composition and method of manufacturing the same contains a microorganism consortium in culture medium, a first additive having an organic acid chelating agent, a second additive having a nitrogen source, a potassium source, a chelated metal, and a salt, and water. The microorganism consortium comprises, at least, beneficial lactic acid fermenting microbes, bacteria belonging to the Bacilli class, and yeast.	2020	Sabeshan Kanagalingam, Dak	<i>Alcaligenes</i> and <i>faecalis</i> and metabolites and agriculture
3	Patentscope	IN201911020119 - A NOVEL NANO-BIOPESTICIDE FORMULATION AND METHOD OF PREPARATION THEREOF	The present invention relates constitutively production of antimicrobialmetabolites from endophytic bacteria, their nanoformulation and their application onto plants for augmented plant growth and defense response. The endophyticbacterium used in the current invention was <i>Alcaligenes faecalis</i> BHU 12, grown in the presence of a concentration gradient of dead cell powder of <i>Sclerotium roffii</i> , a disastrous polyphagous phytopathogen. A nano-formulation was developed from effective metabolites and evaluated their efficacy against several fungal plant pathogens.	2020	SINGH, Harikesh Bahadur RAY, Shatrupa RAJPUT, Rahul Singh SINGH, Prachi SINGH, Jyoti VAISHNAV, Anukool DUBEY, Rajesh Kumar SARMA, Binchi Kumar	<i>Alcaligenes</i> and <i>faecalis</i> and metabolites and agriculture
4	Patentscope	WO2014035319 - RHIZOBACTERIA AND USES THEREOF	The invention relates to the rhizobacterium <i>Bacillus thuringiensis</i> strain AZP2 and the use thereof in improving plant growth and tolerance to biotic and abiotic plant stresses.	2013	TIMMUSK, Saima	<i>alcaligenes faecalis</i> and phytopathogens. La patente se relaciona más con el desarrollo de un biofertilizante.
4	Patentscope	WO1997045018 - PLANT IMMUNIZATION COMPOSITIONS	The present invention provides an agent for inducing resistance against phytopathogenic microorganisms in plants wherein the agent is an extract of biomass from non-plant-pathogenic microorganisms obtainable by the following process: a) resuspending 50g to 200g (dry weight) of biomass from non-plant-pathogenic microorganisms per liter of inorganic or organic solvent; b) stirring at room temperature for 1 to 12 hours; c) incubating; d) resuspending; e) allowing to cool to room temperature; and f) optionally filtering.	1997	MOESINGER, Egon	<i>alcaligenes faecalis</i> and phytopathogens. La patente se relaciona con el uso de microorganismos no patógenos para inducir respuesta de defensa en plantas.
6	Scholar Google	Characterization of <i>Alcaligenes faecalis</i> strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens	bacterial strain possessing both bacteriostatic and fungistatic activity (biocontrol activity) against pathogens of cyclamen (<i>Cyclamen</i> sp.) was isolated from the soil in Gifu Prefecture, Japan, and characterized with respect to its taxonomic and biocontrol properties. The sequence of its 16S rRNA gene, morphology, biochemistry, and fatty acid composition demonstrated that it is a strain most closely related to <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> LMG 1229 ^T . The isolate was	2013	Shin-ichiro Yokoyama, Yoshitomi Adachi, Shuichi Asakura, Erina Kohyama	Búsqueda: <i>Alcaligenes faecalis</i> biocontrol of PSA

Figura 11: Listado de Patentes y trabajos relacionados con biocontroladores de la especie *Alcaligenes spp*. Realizando por la OTL PUCV (objetivo incompleto).

7. Desarrollo de un modelo de negocios



Figura 12: Modelo de negocio PSA-free.

21. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Hamama WS, Ibrahim ME, Gooda AA, Zoorob HH. Efficient Synthesis, Antimicrobial, Antioxidant Assessments and Geometric Optimization Calculations of Azoles-Incorporating Quinoline Moiety. *J Heterocycl Chem.* 2018;55(11):2623–34.
2. Hidy PH, Hodge EB, Young V V., Harned RL, Brewer GA, Phillips WF, et al. Structure and reactions of cycloserine. *J Am Chem Soc.* 1955;77(8):2345–6.
3. Thomas MG, Chan YA, Ozanick SG. Deciphering tuberactinomycin biosynthesis: Isolation, sequencing, and annotation of the viomycin biosynthetic gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(9):2823–30.
4. Liu YJ, Zhang JL, Li C, Mu XG, Liu XL, Wang L, et al. Antimicrobial Secondary Metabolites from the Seawater-Derived Fungus *Aspergillus sydowii* SW9. *Molecules.* 2019;24(24):4–11.
5. Morsy MA, Ali EM, Kandeel M, Venugopala KN, Nair AB, Greish K, et al. Screening and molecular docking of novel benzothiazole derivatives as potential antimicrobial agents. *Antibiotics.* 2020;9(5).
6. Bhuyan BK. Pactamycin, an antibiotic that inhibits protein synthesis. *Biochem Pharmacol.* 1967;16(8):1411–20.
7. Quian Y, Allegretta G, Janardhanan J, Peng Z, Mahasenan K V, Lastochkin E, et al. Exploration of the Structural Space in 4(3H)-Quinazolinone Antibacterials. *J Med Chemistry.* 2020;63(10):5287–96.
8. Dufour V, Stahl M, Rosenfeld E, Stintzi A, Baysse C. Insights into the mode of action of benzyl isothiocyanate on *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(22):6958–68.
9. Lou Z, Wang H, Rao S, Sun J, Ma C, Li J. P-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control [Internet].* 2012;25(2):550–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.022>
10. Mu W, Yu S, Zhu L, Zhang T, Jiang B. Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;95(5):1155–63.
11. Joung DK, Joung H, Yang DW, Kwon DY, Choi JG, Woo S, et al. Synergistic effect of rhein in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Exp Ther Med.* 2012;3(4):608–12.
12. Patel PS, Huang S, Fisher S, Pirnik D, Aklonis C, Dean L, et al. Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *J Antibiot (Tokyo) [Internet].* 1995;48(9):997–1003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592068>

