



Informe Final Técnico

Generación de un biofertilizante mediante el uso de genómica y microencapsulación para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile.

PYT – 2012 - 0088

Período comprendido desde el 01/11/2012 hasta el 31/10/2015

19 de noviembre de 2015

Contenido

1.	ANTECEDENTES GENERALES	3
1.1.	Antecedentes Principales:.....	3
1.2.	Costo general:.....	3
1.3.	Ejecución presupuestaria:	3
2.	RESUMEN EJECUTIVO	4
3.	INFORME TÉCNICO	5
3.1.	Objetivos del Proyecto:.....	5
3.2.	Metodología del Proyecto:	7
3.3.	Actividades del Proyecto	9
3.4.	Resultados del Proyecto.....	10
3.5.	Fichas Técnicas y Análisis Económico:	20
3.6.	Impactos y Logros del Proyecto	24
3.7.	Conclusiones.....	25
4.	INFORME DE DIFUSIÓN.....	26
4.1.	Foros, reuniones y día de campo	26
4.2.	Publicaciones Científicas	27
4.3.	Ejecución de Tesis	27
5.	ANEXOS	28

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Antecedentes Principales:

Código Proyecto:	PYT-2012-0088
Nombre del proyecto:	Generación de un biofertilizante mediante el uso de genómica y microencapsulación para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile.
Nombre Ejecutor:	Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola
Nombre(s) Asociado(s):	Confederación Nacional de Federaciones de Cooperativas Campesinas Ltda., CAMPOCOOP Universidad de La Frontera - Núcleo Científico Tecnológico Biorecursos (BIOREN)
Coordinador del Proyecto:	Véronique Amiard
Regiones de ejecución:	La Araucanía
Fecha de inicio iniciativa:	1 de Noviembre de 2012
Fecha término Iniciativa:	31 de Octubre de 2015
Tipo Convenio FIA:	

1.2. Costo general:

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

1.3. Ejecución presupuestaria:

Acumulados a la Fecha		Monto (\$)
Aportes FIA	Suma cuotas programadas	
	Suma cuotas pagadas	
	Suma gasto programado	
	Suma gasto real	
Aportes Contraparte	Gasto programado	
	Gasto real	
	Gasto pecuniario programado	
	Gasto pecuniario real	

2. RESUMEN EJECUTIVO

- 2.1. Resumen ejecutivo del desarrollo del proyecto, sus objetivos, justificación, resultados e impactos logrados. Debe ser globalizante, incorporando aspectos de importancia general dentro del proyecto, y dejando el detalle de la discusión en el Texto Principal. Debe ser corto y específico, no repitiendo las discusiones, análisis y calificaciones específicas contenidas en el Texto Principal.

El uso de especies leguminosas en la agricultura ha cobrado mayor importancia en el último tiempo, no solo por los productos vegetales asociados al mismo cultivo, sino por ser una alternativa sustentable para la inclusión de nitrógeno al ecosistema agrícola. La necesidad de contar con alternativas de fertilización de menor costo, amigables con el ambiente y sustentables en el tiempo, han incentivado el uso de sistemas naturales para satisfacer los requerimientos nutritivos de los cultivos. El objetivo general del proyecto involucra generar un biofertilizante que contribuya al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino amarillo de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile. Lo anterior, a través del uso del sistema natural de fijación nitrogenada, existente en la simbiosis lupino-*Bradyrhizobium*.

Los resultados técnicos demuestran que el proyecto se llevó a cabo de buena forma, con modificaciones menores para asegurar la generación del producto y lograr una mayor eficacia en el escalamiento del mismo. A través de técnicas de secuenciación masiva se identificaron varias cepas de la bacteria fijadora de nitrógeno *Bradyrhizobium*, además de recuperar el genoma totalmente secuenciado de dos de dichas cepas. Dichas bacterias fueron utilizadas para desarrollar un biofertilizante, a través de la micro-encapsulación de las mismas. Mediante la utilización de polímeros orgánicos y liofilización, se logró proteger y mantener a las cepas de *Bradyrhizobium*, de manera asegurar la generación de nódulos y consiguiente fijación nitrogenada de forma eficiente.

Lo anterior expone que la utilización de nuestra propuesta de bio-fertilizante es una alternativa válida dentro de la agronomía y cultivo del lupino amarillo, el cual posee una interesante proyección de expansión a nivel nacional, toda vez que existe una alta demanda de proteína vegetal a nivel mundial, junto con un incremento de la tendencia a preferir fuentes no transgénicas.

Comparaciones de superficies sembradas bajo condiciones de la Agricultura Familiar Campesina (AFC), mostraron que siembras inoculadas con el biofertilizante, sin fertilización nitrogenada, mostraron similares rendimientos que siembras sin inocular pero fertilizadas con nitrógeno. Lo anterior, dado el alto costo asociado al uso de fertilizantes químicos en el negocio agrícola, señala un impacto positivo sobre la explotación agrícola. El análisis económico presentado muestra claramente esta reducción, como también el potencial incremento de los ingresos. Esto es de suma importancia sobre todo para la Agricultura Familiar Campesina.

Actualmente, se prepara un proyecto de inversión, que de concretarse, llevaría a incorporar una superficie sobre 20.000 hectáreas con lupino amarillo, por lo que la producción de biofertilizantes a escala comercial será un atractivo negocio y de bajo riesgo. Además, facilitará el cultivo de especie leguminosa, transformándola en una atractiva materia prima para la elaboración de alimentos saludables para consumo humano y dietas animales.

3. INFORME TÉCNICO

3.1. Objetivos del Proyecto:

OBJETIVO GENERAL: Generar un biofertilizante para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino amarillo de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile.

Objetivo Específico 1: Identificar mediante genómica y seleccionar cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno de acuerdo a su capacidad de incrementar los rendimientos en condiciones de campo.

Resultado 1: Cepas de bacteria fijadora de nitrógeno identificada (Meta: 20 – Logro: 21)

Se identificaron vía técnicas de microbiología y biología molecular 21 cepas bacterianas con capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico. Estas cepas pertenecen a 10 géneros diferentes de bacterias fijadoras de nitrógeno. Se realizaron dos ensayos en invernadero a fin de seleccionar las más eficientes. (Anexo 1 – Tabla 1)

Resultado 2: Cepas de bacteria fijadora de nitrógeno con capacidad de incrementar los rendimientos de lupino amarillo, seleccionadas. (Meta: 5 – Logro: 5)

Se confirman las cinco bacterias fijadoras de nitrógeno comprometidas en el proyecto a través de la secuenciación del genoma total de dos ellas, y la secuenciación parcial de tres de ellas (Figura 1)

Objetivo Específico 2: Desarrollar un prototipo de biofertilizante a partir de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas mediante un proceso de microencapsulación escalable comercialmente.

Resultado 3: Mejoramiento de la sobrevivencia de las bacterias fijadora de nitrógeno por microencapsulación. (Meta: 70% - Logro: 80%)

Se logró aumentar significativamente la sobrevivencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno a través de la modificación de la mezcla polimérica utilizada en la micro-encapsulación. Se comprobó la integridad de la estructura de las microcápsula observándola por microscopio electrónico de barrido (Anexo 1 – Figura 2).

Resultado 4: Prototipo de biofertilizante para lupino obtenido mediante un proceso eficiente de microencapsulación y escalable comercialmente. (Meta: 1 – Logro: 1)

Este Objetivo se logra en un 100% obteniendo 1 prototipo de biofertilizante, sin embargo como se informó en el último informe se modificó el protocolo de micro-encapsulación. Básicamente, se cambió la composición de la mezcla polimérica, se disminuyó la temperatura en el proceso de secado (Spray drier) y se aumentó el flujo de mezcla polimérica conteniendo la bacteria.

Objetivo Específico 3: Validar en campos de la agricultura familiar campesina el uso del biofertilizante en siembras de lupino amarillo.

Resultado 5: Incremento de 20% del rendimiento proteico en ausencia de fertilización nitrogenada en siembras de lupino amarillo. (Meta: 2016 Kg/HA – Logro: 1351 Kg/HA)

Se cultivó y cosechó la semilla de lupino amarillo utilizando bacterias micro-encapsuladas como las generadoras del nitrógeno necesitado por planta. Comparaciones entre las parcelas sembradas bajo la inoculación/no fertilización química nitrogenada y no inoculación/fertilización química nitrogenada no mostraron diferencias significativas, y la reducción de rendimiento de grano se debe principalmente por condiciones climáticas adversas. (Figuras 3, 4 y 5)

Objetivo Específico 4: Gestionar el desarrollo comercial del Biofertilizante

Resultado 6: Empresa para la comercialización del biofertilizante creada. (Meta:1 – Logro:1)

Se crea empresa para la producción y comercialización del biofertilizante. (Diario Oficial Oct. 2013)

Constitución de la sociedad (25 de sept. 2013)

Publicación en el diario oficial (3 de oct. 2013)

Inscripción en el registro de comercio (4 de oct. 2013)

Resultado 7: Producción de Biofertilizante y servicio de biofertilización de semilla. (Meta: 120.000 Kg – Logro: 15.600 Kg)

La producción y servicio del biofertilizante se realizó dentro de las fechas programadas, por lo que el resultado propuesto fue ejecutado, sin embargo en el periodo de formulación del proyecto había un plan de escalamiento de siembras que contemplaba para la temporada agrícola 2015-2016 alrededor de 7000 ha de lupino considerando que al menos 1000 de ellas podrían contar con semilla biofertilizada. No obstante, diversos factores entre los que se cuenta el acceso a financiamiento por parte de la empresa o spin out creado por el CGNA impidieron continuar el aumento de superficie (que en 2014-2015 alcanzó a 1100 ha), de modo que en la temporada 2015-2016 solo se sembraron 492 ha; de las cuales 130 ha contaron con la semilla inoculada.

3.2. Metodología del Proyecto:

Objetivo N° 1	Identificar mediante genómica y seleccionar cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno de acuerdo a su capacidad de incrementar los rendimientos en condiciones de campo.
Mediante técnicas de microbiología y biología molecular se seleccionaron cepas de bacteria del género <i>Rhizobium</i> y <i>Bradyrhizobium</i> a partir de cepas bacterianas aisladas de lupino recolectadas en diferentes partes de la Araucanía. Las bacterias de raíces y nódulos fueron aisladas en medio de cultivo solido (YM). Se seleccionaron las bacterias correspondientes al género <i>Bradyrhizobium</i> en función de las características de las colonias. Mediante genómica en la Unidad de Genómica y Bioinformática del CGNA se identificaron las bacterias fijadoras de nitrógeno y las bacterias previamente seleccionadas se multiplicaron en medio líquido hasta llegar a la cantidad necesaria para la extracción de sus ADN. Las diferentes especies de rhizobia se identificaron por PCR ocupando set de partidores específicos para el ADNr 16S de cada especie. La diversidad genética entre diferentes cepas de rhizobio se determinaron por secuenciación de los genes <i>nif</i>, <i>nod</i>, and <i>dna</i>. Las secuencias genéticas de estos genes fueron comparadas con las de cepas de rizobios provenientes del Banco de Microorganismos de Alemania DSMZ. La evaluación de las cepas identificadas para mejorar el rendimiento proteico del lupino amarillo, se realizaron en un ensayo en campo siguiendo un diseño aleatorizado de bloques subdivididos considerando cinco repeticiones. Las variables serán la ausencia/presencia de fertilización nitrogenada (bloque principal) y las distintas cepas de rizobios (subparcelas). Además se sometieron a los tratamientos dos inoculantes comerciales. Se midió el peso de materia seca total, el porcentaje de efectividad de la fijación de nitrógeno, la cantidad de nódulos presentes en las raíces y su coloración en una etapa precoz del cultivo. También se midió el porcentaje de proteína del grano (base materia seca) y el rendimiento de proteína por hectárea.	

Objetivo N° 2	Desarrollar un prototipo de biofertilizante a partir de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas mediante un proceso de microencapsulación escalable comercialmente.
1. Microencapsulación de bacterias La suspensión bacteriana se agrega a 30 mL de solución de la matriz encapsulante (alginato/almidón) y luego introducida mediante una bomba peristáltica a un recipiente que permitirá el goteo de la mezcla a una solución de CaCl_2 1.5% formando las microcápsulas. Para esto, un diseño factorial es utilizado para determinar la influencia de las variables independientes sobre viabilidad bacteriana como respuesta, luego de la microencapsulación usando la Metodología de Superficie de Respuesta. Las variables independientes serán: razón alginato/almidón (X_1), diámetro de la microcápsula (X_2), la cinética de liberación de bacterias (X_3), y la estabilidad de almacenamiento (X_4). Los datos experimentales son sujetos a un análisis de regresión lineal para obtener una ecuación polinomial ajustada y luego un análisis de varianza es realizado para identificar los factores de control que muestran un efecto significativo en la variación de la respuesta. Luego, gráficos de contorno y tridimensionales permiten identificar la combinación óptima de las variables independientes para obtener la máxima viabilidad bacteriana. EL análisis de los resultados es llevado a cabo mediante Design Expert 6.0 software. 2. Unión de las microcápsulas a las semillas de lupino. Las microcápsulas secadas a 25°C son mezcladas en un tambor con agitación homogénea con las semillas de lupino y una solución diluída (0.1 a 5%) de lecitina o carboximetilcelulosa dependiendo	

de la adhesividad resultante de las microcápsulas a la semilla. Las microcápsulas adheridas a las semillas son contabilizadas mediante una lupa estereoscópica. 3. Cinética de liberación de las bacteria por la microcapsula El objetivo de este experimento es estimar las propiedades de liberación de las bacterias para evaluar el comportamiento de la microcápsula adherida a la semilla en el suelo a diferentes porcentajes de humedad. Las microcápsulas adheridas a la semilla se colocan en el suelo estéril, conteniendo distintos porcentajes de humedad (20 a 90%). El diámetro de las cápsulas será medido cada día al igual que la viabilidad bacteriana. El control del ensayo corresponderá a suelo estéril con bacterias no encapsuladas. 3. Estudio de viabilidad bacteriana y biodegradabilidad biofertilizante en suelo: Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con lupino amarillo (línea experimental 100% homocigota), tres repeticiones y cinco mezclas de biofertilizante, en condiciones de campo, montado en la fecha de siembra de un agricultor durante 6 meses. Se evaluó la viabilidad bacteriana (UCF/g suelo), y la biodegradabilidad del biofertilizante en suelo en el tiempo.	
Objetivo Nº 3	Validar en campos de la agricultura familiar campesina el uso del biofertilizante en siembras de lupino amarillo. El biofertilizante con mayor viabilidad bacteriana en condiciones de suelo, se preparó a mayor escala y se validó en cinco predios de agricultores de CAMPOCOOP, abarcando los sectores de Maquehue, Huichahue, San Ramón, Púa y Freire. El diseño de la evaluación consistió en la siembra de pares de parcelas, las cuales fueron cultivadas en forma idéntica, y solo se diferenciaron en inoculación de micro-encapsulado (conteniendo bacterias fijadoras de nitrógeno) y fertilización química nitrogenada (con y sin nitrógeno).
Objetivo Nº 4	Gestionar el desarrollo comercial del biofertilizante Para el cumplimiento de este objetivo el CGNA creó una empresa (NG-Seeds S.A) en la cual participan 5 cooperativas de la Agricultura Familiar Campesina y la cual realiza transferencia a los agricultores de una variedad de semilla de lupino dulce de alto rendimiento proteico y la cual se encuentra biofertilizada. NG-Seeds es la encargada además de negociar la venta de la semilla consumo por los agricultores campesinos con la industria demandante de proteína, enfocándose inicialmente en la industria del salmón. Gracias a este negocio, los agricultores pueden y podrán acceder a una semilla Premium, que les permitirá entrar a la industria de alimentos con un mayor poder negociador, pudiendo pactar contratos pre-cosecha que garanticen precio y cantidad a vender, haciendo a su vez, uso eficiente de sus terrenos, menores costos por kilo de proteína producida por el agricultor, permitirán competir con mayor eficiencia con el costo de la proteína de soya importada, lo que se traduce en una mayor sustentabilidad del cultivo del lupino en Chile.

3.3. Actividades del Proyecto

Nº OE	Nº RE	Actividad	Año 2012				Año 2013				Año 2014				Año 2015			
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	1	Identificación por microbiología de bacterias del genero <i>Bradyrhizobium</i> .				X X	X X	X X	X X	X X								
1	1	Identificación por genómica de diferentes cepas de <i>Bradyrhizobium</i> .				X X	X X	X X	X X	X X								
1	2	Prueba en campo de la eficiencia de fijación de nitrógeno de las cepas previamente identificada.				X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X			
1	2	Selección de las cepas más eficiente						X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X			
2	3	Evaluación de sobrevivencia de bacterias (<i>Bradyrhizobium</i>) microencapsuladas.				X	X	X										
2	3	Microencapsulación de las bacterias eficiente para la fijación de nitrógeno previamente seleccionadas.						X	X									
2	4	Evaluación de la viabilidad bacteriana en campo con 5 prototipo de biofertilizante							X	X	X							
2	4	Selección del prototipo de biofertilizante que permite la mayor sobrevivencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno.									X							
3	5	Preparación de biofertilizante a mayor escala (3 kg de bacteria microencapsuladas) para inocular 300 kg de semilla.									X	X						
3	5	Evaluación de la capacidad del biofertilizante a incrementar rendimiento en 5 campos de agricultores de CAMPOCOOP.										X	X	X	X	X		
4	6	Crear una empresa para producir y comercializar el biofertilizante				X	X	X	X									
4	7	Prestación de Servicio de Biofertilizado														X	X	X

Las principales desviaciones en cuanto a programación se produjeron en las 4 primeras actividades del objetivo n° 1. En las actividades 1 y 2 si bien se realizaron las pruebas en el tiempo determinado ninguna de las bacterias identificadas correspondía al género *Bradyrhizobium*, por lo que hubo que repetir el ensayo y aislar nuevamente bacterias, proceso que se cumplió en Nov. 2013.

En cuanto a la actividad 3 su diferencia a lo programado se debe principalmente a la siembra tardía de la prueba en campo lo que no permitió optimizar el proceso de microencapsulación.

Finalmente la actividad n°4 sufrió cambios debido a que se modificó el prototipo de microencapsulación.

3.4. Resultados del Proyecto

Identificar mediante genómica y seleccionar cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno de acuerdo a su capacidad de incrementar los rendimientos en condiciones de campo.

A pesar de que la atmosfera contiene 10^{15} toneladas de nitrógeno inorgánico (N_2), este debe ser transformado antes de ser incorporado al ciclo biológico (Zahran 1999). De todo el nitrógeno transformado, un cuarto es generado anualmente por la simbiosis plantas leguminosas-Rhizobia (Masson-Boivin et al. 2009). El uso de especies leguminosas en la agricultura ha cobrado mayor importancia en el último tiempo, no solo por los productos vegetales asociados al mismo cultivo, sino por ser una alternativa sustentable para la inclusión de nitrógeno al ecosistema agrícola (Canfield et al. 2010). El éxito de la fijación nitrogenada en leguminosas depende, en gran medida, de la presencia de las bacterias que aseguren la formación de nódulos, y la consiguiente simbiosis que transforme nitrógeno inorgánico en nitrógeno disponible para la planta. El lupino es una leguminosa que adquiere parte importante de su nitrógeno a través de esta simbiosis, en específico de la asociación que pueda lograr con la bacteria *Bradyrhizobium* (Abd-Alla 1999). El proyecto incluyó el aislamiento e identificación de bacterias asociadas a nódulos de lupino (Figura 1).



Figura 1. Nódulos en raíces de lupino amarillo (círculo amarillo)

Se obtuvieron un total de 21 cepas (de 20 comprometidas), de las cuales 5 fueron identificadas como *Bradyrhizobium*. (Campos et al. 2014; Anexo 1-Tabla1). Estudios de secuenciación masiva confirmaron la identidad de estas bacterias (Anexo1-Figura1), y posteriores análisis bioinformáticos han sido capaz de recuperar el genoma completo de dos de dichas cepas (Figuras 2 y 3).

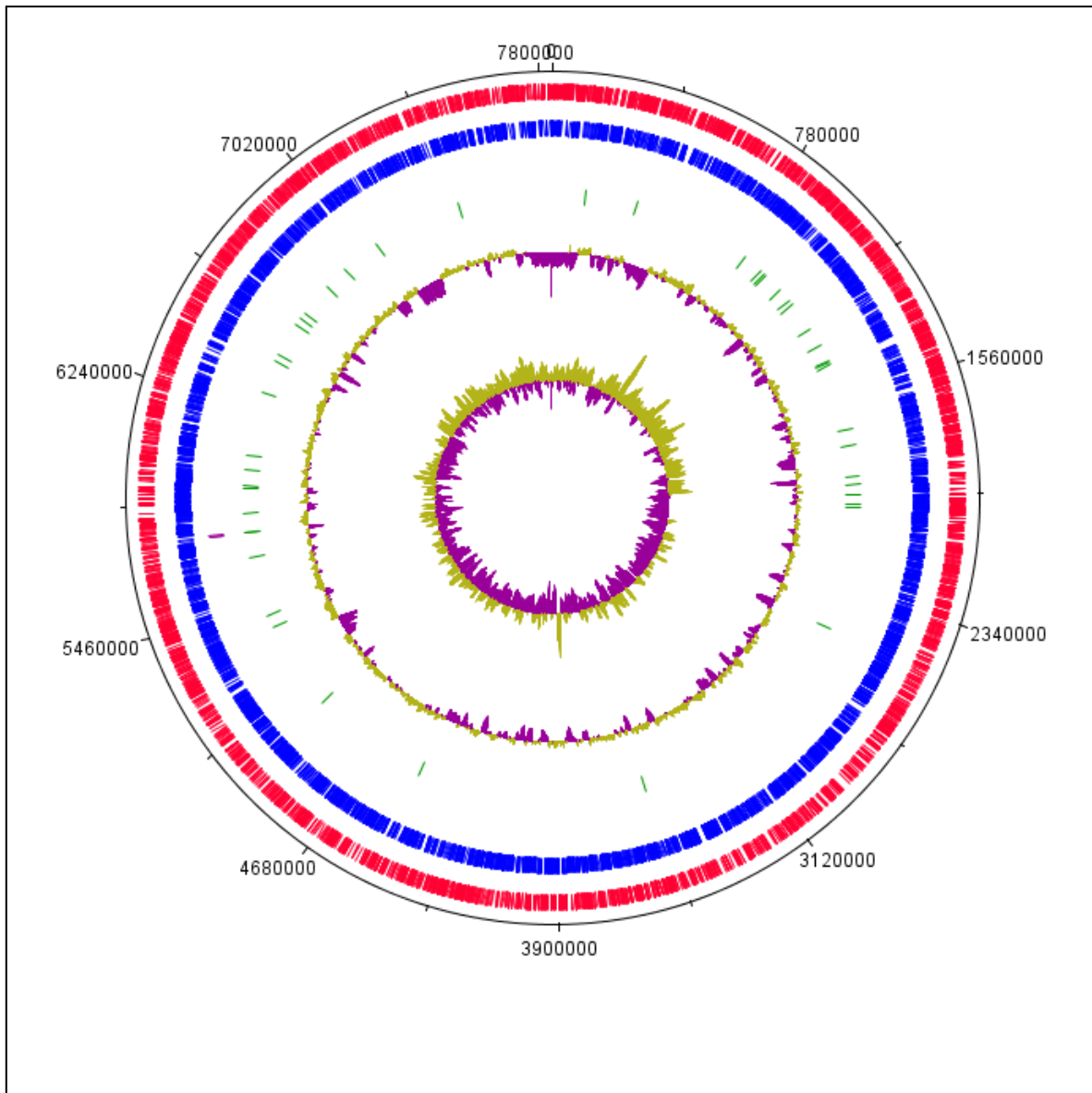


Figure 2. Representación del pseudocromosoma circular de *Bradyrhizobium canariense* strain 20 (Cepa 20). Los anillos desde el más externo (anillo1) al más interno (anillo 6). Anillo 1 muestra los CDS (Secuencia codificante de ADN) en color rojo. Anillo 2 muestra CDS en dirección reversa en color azul. Anillo 3 muestra los ARNr en color púrpura, mientras en anillo 4 se muestran los ARNt en color verde. Anillo 5 muestra el gráfico de GC, y el anillo 6 muestra el gráfico de tendencia GC. Los genes fueron visualizados usando el software DNA PLOTTER.

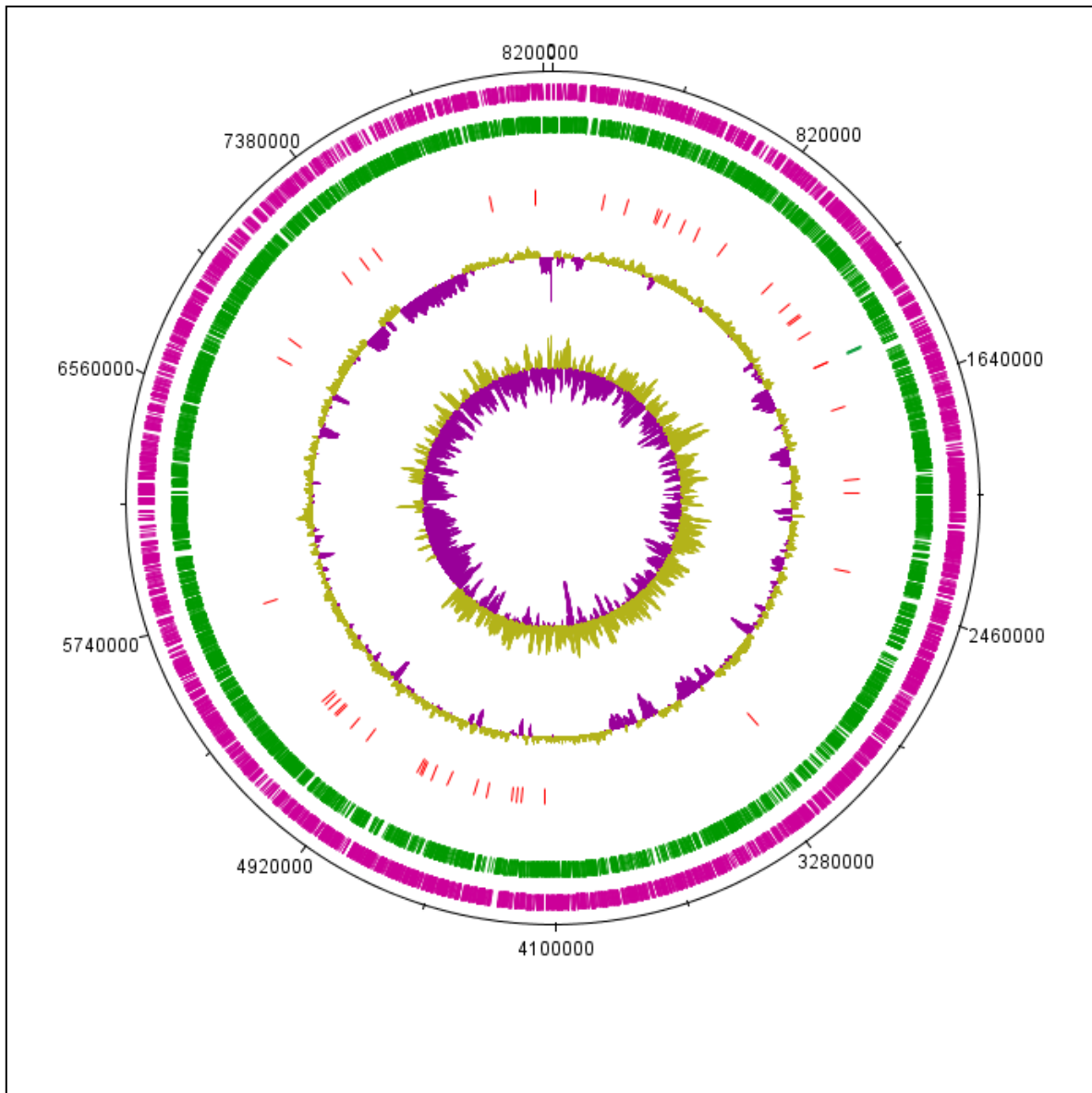


Figura 3. Representación del pseudocromosoma circular de *Bradyrhizobium canariense* strain 26 (Cepa 26). Los anillos desde el más externo (anillo1) al más interno (anillo 6). Anillo 1 muestra los CDS (Secuencia codificante de ADN) en color rosado. Anillo 2 muestra CDS en dirección reversa en color verde. Anillo 3 muestra los ARNr en color verde oscuro, mientras en anillo 4 se muestran los ARNt en color rojo. Anillo 5 muestra el gráfico de GC, y el anillo 6 muestra el gráfico de tendencia GC. Los genes fueron visualizados usando el software DNA PLOTTER.

Aunque existieron algunas diferencias en la cantidad de data de secuencia masiva utilizada en los respectivos ensamblajes (Tabla 1), el largo total de los genomas fue similar y permitió la identificación de las especies de *Bradyrhizobium*, que en ambos casos pertenecieron a *B. canariensis*.

Bacterium	Número de reads	Número de contigs	N50	Largo promedio de contig (bp)	Contig más largo (bp)	Largo Total (bp)
Cepa 20	2.149.080	492	29.300	16.344	103.317	8.041.704
Cepa 26	801.962	127	169.765	65.181	578.825	8.278.023

Tabla 1. Estadísticas de ensamblaje utilizando el software A5

La confirmación de la localización taxonómica de las cepas de *B. canariensis* fue finalmente evaluada a través de la comparación de genes comunes presentes en bacterias y el uso de bases de dato públicas. Análisis filogenéticos muestran claramente que las cepas aisladas por el proyecto pertenecen al género *Bradyrhizobium*, específicamente al cluster de *B. canariensis* (Figura 4).

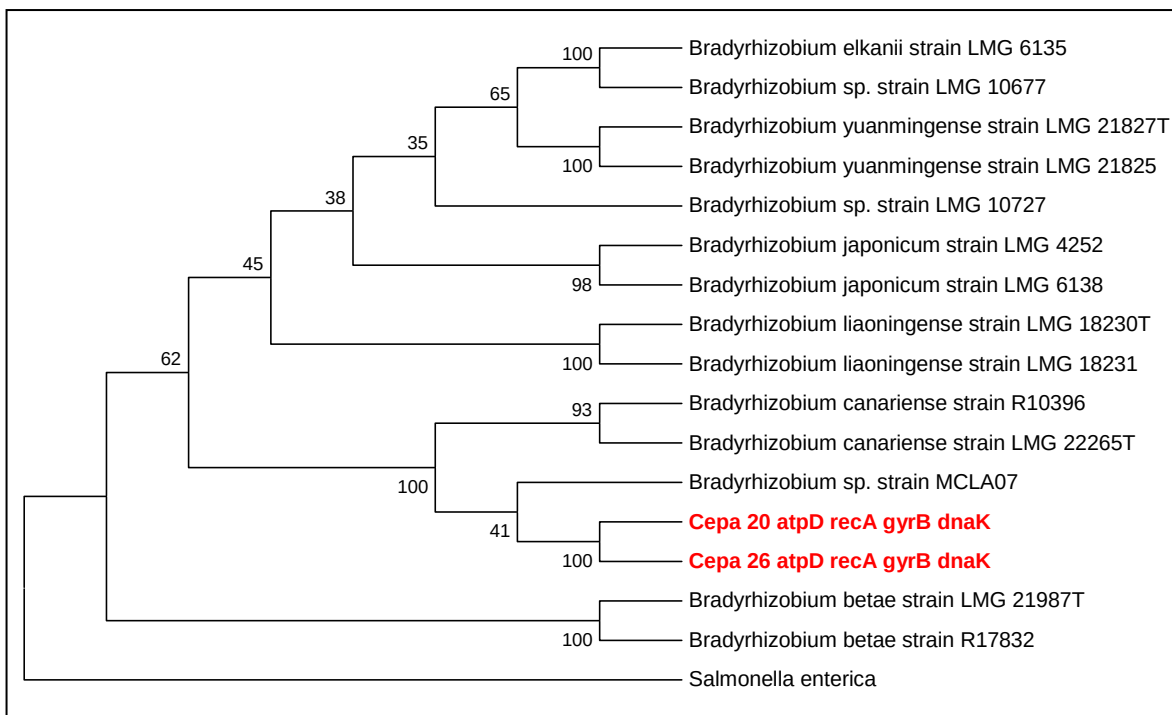


Figura 4. Clasificación taxonómica de los aislados: Árbol filogenético de genes *atpD*, *recA*, *gyrB*, *dnaK* fue calculado usando clustalW para alineamiento de secuencias y máximo likelihood para la construcción del árbol. El software MEGA5 fue usado para visualización usando un bootstrap de 100. Cepas identificadas por el proyecto se destacan en color rojo.

Desarrollar un prototipo de biofertilizante a partir de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas mediante un proceso de microencapsulación escalable comercialmente.

La utilización de inoculantes para promover la fijación nitrogenada en cultivos leguminosos ha sido ampliamente utilizada en la agricultura. Sin embargo, el éxito de los mismos para asegurar la nodulación, y consecuente fijación, está directamente relacionada con la viabilidad de las rhizobia (bacterias) incluidas en el inoculante. La sobrevivencia de la rhizobia en la superficie de la semilla es normalmente baja, debido a la falta de protección en contra de la desecación, altas temperaturas, y/o compuestos tóxicos usados para proteger la semilla (Burton 1976; Date 1968). El proyecto contempló la utilización de una matriz polimérica basada en alginato de sodio y maltodextrina para la micro-encapsulación de *Bradyrhizobium*. Esta mezcla ha sido usada exitosamente como pared protectora en la micro-encapsulación de especies microbianas (Bashan 1998; Both et al. 2012), debido a diversas propiedades favorables. La maltodextrina es osmoticamente inactiva y presenta baja viscosidad, confiriendo protección, espacios intercelulares y fortalecimiento de la microcápsula (Wilson and Shah 2007; Chavez and Ledebor 2007). Por su parte, el alginato otorga alta estabilidad mecánica, alta porosidad, viscosidad, resistencia a altas temperaturas y tolerancia a condiciones climáticas adversas (Kailasapathy 2002). La utilización de la maltodextrina-alginato de sodio generó los resultados esperados (Figura 5), por lo que se utilizó en el resto del proyecto.

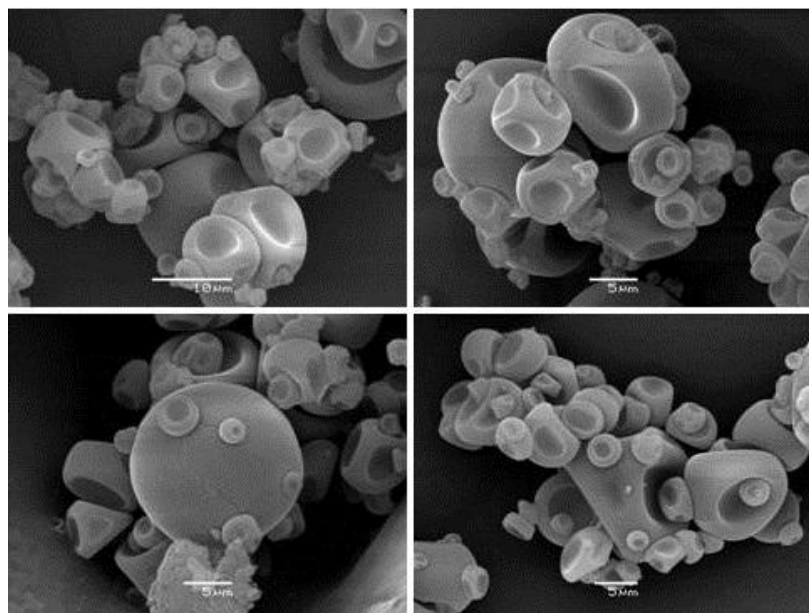


Figura 5. Fotografías de microcápsulas obtenidas por microscopio electrónico de barrido

Originalmente, el proyecto contemplaba la utilización de secado spraydrier para la elaboración final del micro-encapsulado. Sin embargo, las condiciones de calor, asociadas a susceptibilidad natural de *Bradyrhizobium* a condiciones estresantes, limitó el uso de esta técnica de secado para generar los volúmenes necesarios de microcápsulas con bacterias viables. Por esta razón, se utilizó liofilización para secar la mezcla polimérica conteniendo a las cepas de *Bradyrhizobium* (Figura 6). Los resultados fueron satisfactorios, dada la alta tasa de colonias recuperadas en tests

viabilidad (Figura 7). Finalmente, se procedió a crecer los volúmenes necesarios de las cepas confirmadas de *Bradyrhizobium*, para luego secar la mezcla polimérica usando liofilización.



Figura 6. Muestras de cepas de *Bradyrhizobium* microencapsuladas y secadas mediante liofilización.



Figura 7. Test de viabilidad post micro-encapsulación. Puntos blancos en placa Petri señalan presencia de colonias vivas de *Bradyrhizobium*.

Validar en campos de la agricultura familiar campesina el uso del biofertilizante en siembras de lupino amarillo.

Aunque el proyecto contemplo la siembra de varios experimentos durante su desarrollo, la mayor evaluación se bajo las condiciones de la AFC. Para esto, se realizó la transferencia y seguimiento de siembras localizadas en cinco predios distribuidos en La Araucanía (Figura 8). En todas las localidades se cosecho la producción de semillas en parcelas de ¼ ha sembradas con y sin la inoculación de la bacteria micro-encapsulada (Anexo 1 Figura 2).

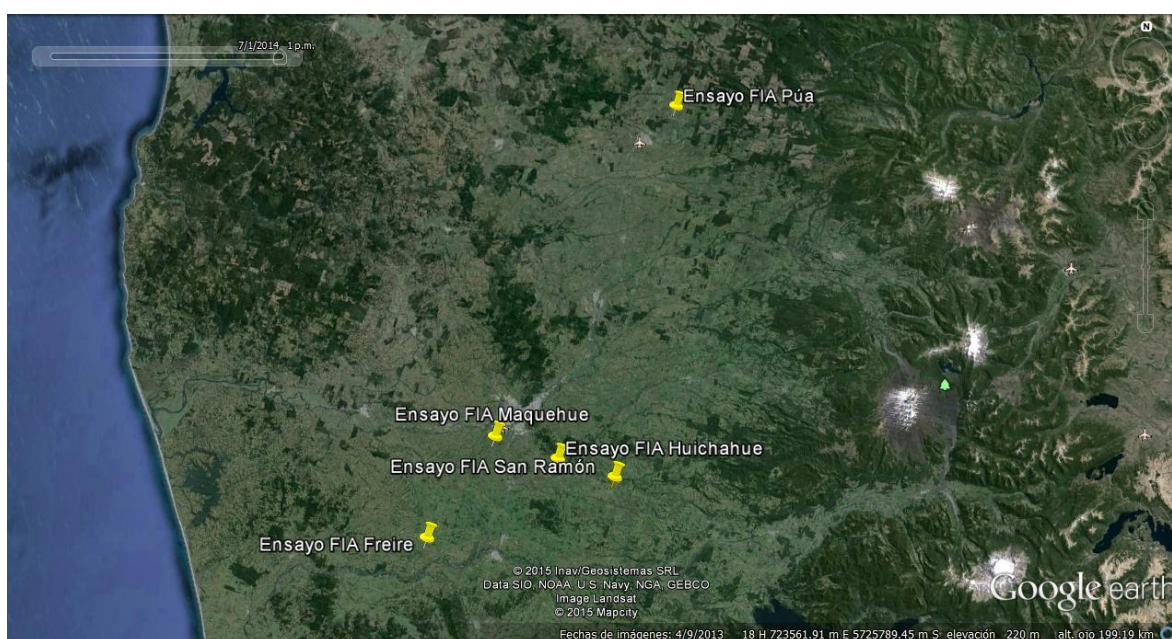


Figura 8. Localización de los predios de la Agricultura Familiar Campesina involucradas en la evaluación de las micro-cápsulas conteniendo las bacterias fijadoras de nitrógeno

Los resultados de la evaluación mostraron que no existió diferencias significativas ($P>0.11$) entre las parcelas sembradas con bacteria/sin fertilización nitrogenada y las sembradas sin bacterias/con fertilización nitrogenada (Figura 9). A pesar de que no se vio un incremento en la producción de semillas y, por consiguiente proteína con el uso del biofertilizante, el hecho de que con menor fertilización nitrogenada se hayan alcanzado similares rendimientos, sugiere que un año normal, sin déficit hídrico, los rendimientos deberían ser superiores. Si pudo observarse diferencias en productividad entre las diferentes localidades evaluadas. Desgraciadamente, las terrenos de explotaciones agrícolas asociados a la AFC son altamente heterogéneos en términos de productividad y calidad de suelos, lo que en muchas situaciones se traduce en rendimientos pobres. El nivel de fertilidad y calidad de suelos sin duda compromete los rendimientos de cualquier cultivo; sin embargo, esto no fue suficiente para eliminar el efecto positivo producido por

el microencapsulado desarrollado por el proyecto. La reducción del uso de fertilizantes nitrogenados no solo disminuye el impacto en el ambiente agrícola en donde se desarrolla la explotación, sino que además reduce el costo de uno de los insumos más importantes del cultivo del lupino amarillo.

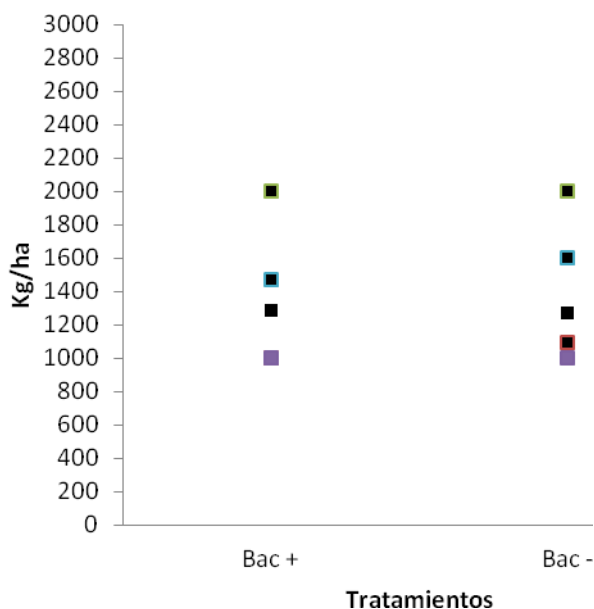


Figura 9. Gráfico donde se muestran rendimientos de semilla de las cinco localidades incluidas en el proyecto. Rendimientos son presentados en Kg/ha. Bac+ identifica a parcelas sembradas con semillas inoculadas con micro-cápsulas y sin fertilización nitrogenada; Bac- identifica a parcelas sembradas con sin inoculación y con fertilización nitrogenada. Diferencias entre los dos grupos fue no significativa (T-test; $P > 0.11$).

Gestionar el desarrollo comercial del biofertilizante

La alianza CGNA – NG-Seeds construida para impulsar negocios tecnológicos, permitirá generar tanto los volúmenes de biofertilizante, como la semilla certificada de AluProt-CGNA. Durante la temporada de siembra 2015-2016, se sembraron alrededor de 100ha de AluProt-CGNA con semillas inoculadas con el biofertilizante generado durante el desarrollo del proyecto. La mayoría de la superficie utilizada fue sembrada con semilla AluProt-CGNA acondicionada directamente por NG-Seeds (Figura 10), de manera de asegurar la correcta utilización de la tecnología desarrollada, además de capitalizar en un producto de mayor valor agregado (semilla certificada inoculada). Al cierre de este informe, las siembras de AluProt-CGNA se encontraban en perfectas condiciones, sin embargo, estimaciones de rendimientos de producción de semilla y proteína deberán hasta la cosecha de la temporada agrícola actual (enero, febrero 2016).



Figura 10. Acondicionamiento de semilla certificada de AluProt-CGNA, por parte de NG-Seeds, en términos de inoculación de micro-encapsulado, fungicida e insecticida previo siembra.

Referencias

- Abd-Alla MH. 1999. Nodulation and nitrogen fixation of *Lupinus* species with *Bradyrhizobium* (lupin) strains in iron-deficient soil. *Biol Fertil Soils* 28:407-415.
- Andrews S. 2011. FastQC—a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics.
- AZIZ, Ramy K., et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 2008, vol. 9, no 1, p. 75.
- Burton, JC (1976) Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. In: Nutman PS (ed) *Symbiotic nitrogen fixation*. Int Biological Programme, Cambridge University Press, pp 175–189
- Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG. 2010. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science* 330:192-196.
- Chavez BE, Ledebor AM (2007) Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Dry Technol* 25:1193–1201
- Coil D, Jospin G, and Darling A. 2014. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, doi: 10.1093/bioinformatics/btu661.
- Date RA (1968) Rhizobial survival on the inoculated legume seed. *Trans Int Congr Soil Sci* 2:75–83
- Kailasapathy K (2002) Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr Issues Intest Microbiol* 3:39–48

- Krueger F. (2013). Trim Galore. A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files, with some extra functionality for MspI-digested RRBS-type (Reduced Representation Bisulfite-Seq) libraries.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends in Microbiology 17:458-466
- TAMURA, Koichiro, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution, 2011, vol. 28, no 10, p. 2731-2739.
- Wilson N, Shah N (2007) Microencapsulation of vitamins. Asean Food J 14:1–14
- Zahrn H.H. 1999. Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63:968-989.

3.5. Fichas Técnicas y Análisis Económico:

- **Ficha del biofertilizante.**

A continuación se presenta la estructura de costos de producción del biofertilizante desarrollado. Los componentes del costo siguen una perspectiva industrial, aun cuando las unidades producidas se han llevado a cabo en un sistema semi-experimental/industrial. Además, dentro de los costos no están considerados aquellos relacionados al uso de inversiones en equipos que tiene el agente desarrollador, por lo cual, al escalar la producción debieran ser consideradas inversiones en equipos de acuerdo a la escala de producción estimada. Cabe señalar que a nivel industrial este negocio posee varios elementos escala-intensivos.

En este sentido, la alianza CGNA – NG-Seeds construida para impulsar los negocios tecnológicos, permite consolidar volúmenes de demanda que logran justificar el emprendimiento y escalamiento de esta tecnología, en particular llevar a cabo las inversiones comerciales en equipamiento.

Tabla. Costos de producción de biofertilizante.

Para producción de 1 kg de biofertilizante

Conservación					
Conservación microorganismos	730	kwatt/año	110	\$/kwatt	80300
Multiplicación y encapsulado					
Medio YM	63	g/1000g de bofertilizante	119.000	\$/kg	7.497
Alginato	40	g/1000g de bofertilizante	28.000	\$/kg	1.120
Maltodextrina	1.120	g/1000g de bofertilizante	1.150	\$/kg	1.288
Energía eléctrica	51	kwatt/ciclo	110	\$/kwatt	5.588
Mano de obra producción biofertilizante	0,5	JH técnico	28.000	\$/JH	14.000
Total costo variable (\$/kg de biofertilizante)					29.493

Costo variable del biofertilizante para inocular 1 kg de semilla de lupino amarillo **\$ 59,0**

Costo variable de biofertilizante para 120 k de semilla (dosis de siembra por hectárea) **\$ 7.078,3**

(nota: Se necesitan aprox. 240 g de biofertilizante para 120 kg)

El producto final será entregado de manera integrada a la semilla de lupino pro medio de la inoculación.

- **Análisis económico.**

Dada la naturaleza de la tecnología desarrollada, la cual ha sido creada como insumo estratégico y específico para lupino amarillo, en especial para la variedad *Aluprot*-CGNA, el valor económico de la innovación debe ser medida fundamentalmente en función del incremento de valor que se genere en la producción de lupino. En este sentido, las pruebas de campo fueron realizadas inoculando la semilla de lupino, la cual fue establecida en el invierno de 2014 y cosechada en 2015, tal como consta en los informes respectivos.

Durante dicha temporada, las condiciones climáticas, en especial el régimen de precipitaciones, afectó negativamente el cultivo, lo que impidió la expresión de su rendimiento, impactando los tratamientos con y sin inoculación. Lo anterior se debe a pesar de la mayor fijación biológica de nitrógeno, puesto que para que se logre un mayor rendimiento de grano es fundamental contar con agua suficiente para el llenado de los granos. Por ello, solo fue posible observar una tendencia a incrementar el rendimiento en las unidades establecidas con inoculante, en comparación con aquellas sin el biofertilizante, sin embargo dichas diferencias no fueron significativas estadísticamente.

Esta situación es muy propia de comportamientos biológicos que dependen de la interdependencia de factores. Lo anterior genera que se exprese el efecto de un insumo solo si está presente su(s) complemento(s), como fue descrito por Libeg (1840) para el caso de los nutrientes y por Bartholomew (1958) para el caso del desarrollo de las especies.

De esta forma, el efecto en la producción en base a los resultados obtenidos en la temporada de evaluación no permite identificar de manera significativa un incremento en la producción de proteína. Sin embargo, existen indicios que indican que es prudente conservar la hipótesis inicial, la cual señala que bajo condiciones normales de precipitaciones, el biofertilizante elaborado podría incrementar un 20% la producción de proteína/ha, lo cual representaría un aumento de 417 kg de lupino/ha (base 2.083 kg/ha sin inoculación).

Tabla. Incremento potencial de ingresos por ventas.

Supuesto de cálculo		
Rendimiento base (grano)	Kg/ha	2.083
Grit (60% proteína)	del grano	70%
Rendimiento esperado (grano)	Kg/ha	2.500
Diferencia (grano)	Kg/ha	417
Diferencia (grit)	Kg/ha	292
Precio (grit)	US\$/ton	615
	\$/kg	430,5
Potencial incremento de ingresos	\$/ha	125.663

El uso de este biofertilizante también impacta en los costos de producción, los cuales disminuyen como consecuencia de la reducción de fertilizante nitrogenado. Lo anterior se puede observar en las tablas siguientes.

Tabla. Estructura de costos estándar del cultivo de lupino amarillo Aluprot-CGNA en la región de la Araucanía. Cultivo con biofertilizante.

Ítem	Cantidad	Unidad	Valor unitario (\$/ha)	Sub Total (\$/ha)
Servicio de Maquinaria				176.000
Arado	1	ha	20.000	20.000
Rastraje	2	ha	15.000	30.000
Siembra	1	ha	25.000	25.000
Pulverización	4	ha	12.000	48.000
Fertilización	1	ha	10.000	10.000
Cosecha	1	ha	43.000	43.000
Insumos				263.629
Semilla	120	kg/ha	650	78.000
Fertiyeso	200	kg/ha	124	24.874
Mezcla fertilizante	200	kg/ha	395	78.992
Pesticida	7	ha	10.466	73.263
Inoculante	1	ha	8.500	8.500
Mano de obra				15.000
Siembra	0.50	JH	15.000	7.500
Cosecha	0.50	JH	15.000	7.500
Sub total (\$)				454,629

Tabla. Estructura de costos estándar del cultivo de lupino amarillo Aluprot-CGNA en la región de la Araucanía. Cultivo sin biofertilizante.

Ítem	Cantidad	Unidad	Valor unitario (\$/ha)	Sub Total (\$/ha)
Servicio de Maquinaria				176.000
Arado	1	ha	20.000	20.000
Rastraje	2	ha	15.000	30.000
Siembra	1	ha	25.000	25.000
Pulverización	4	ha	12.000	48.000
Fertilización	1	ha	10.000	10.000
Cosecha	1	ha	43.000	43.000
Insumos				309.629
Semilla	120	kg/ha	650	78.000
Fertiyeso	200	kg/ha	124	24.874
Mezcla fertilizante	200	kg/ha	395	78.992
Fertilizante nitrogenado	120	Kg/ha	450	54.000
Pesticida	7	ha	10.466	73.263
Mano de obra				15.000
Siembra	0.50	JH	15.000	7.500
Cosecha	0.50	JH	15.000	7.500
Sub total (\$)				500.129

Los costos de producción muestran una reducción de \$45.500/ha, equivalente al 9.1% del total de costos variables del cultivo de lupino amarillo.

Si a la reducción de costos se suma el potencial de incremento de ingresos, las diferencias con un cultivo sin el uso de biofertilizante sería de 171.163, equivalente a un 27% más de margen.

Tabla. Comparación de costos variables de producción, ingresos y margen de dos cultivos de lupino, con y sin biofertilizante.

	Unidad	Sin biofertilizante	Con biofertilizante
Costo producción (variables)	\$/ha	500.129	454,629
Producción estimada (grano)	Kg/ha	2.083	2.500
Producción estimada (grit)	Kg/ha	1.458	1.750
Precio venta (grit)	\$/kg	430,5	430,5
Ingresos estimados	\$/ha	627.712	753.375
Margen Bruto	\$/ha	127.583	298.746
Diferencia	\$/ha		171.163
			27.3%

- **Análisis de las perspectivas del biofertilizante.**

El cultivo del lupino amarillo posee una interesante proyección de expansión a nivel nacional, toda vez que existe una alta demanda de proteína vegetal a nivel mundial, junto con un incremento de la tendencia a preferir fuentes no transgénicas. Además, esta leguminosa se adapta muy bien a la rotación de cultivos anuales que se practica en la Región de la Araucanía y territorios cercanos de las regiones vecinas, además de presentar un adecuado potencial productivo en esta zona geográfica, lo que le permite no solo ser incorporado en la rotación, sino también desplazar otros rubros.

Por otra parte, las ventajas de calidad de la variedad (*Aluprot*-CGNA) objeto del biofertilizante desarrollado, ofrece condiciones propicias para el incremento de su producción, toda vez que es altamente apreciada por la industria de alimentos para animales (salmones, aves, rumiantes, etc.), además de ser una atractiva materia prima para la elaboración de alimentos saludables para consumo humano.

En efecto, en la actualidad se prepara un proyecto de inversión y estímulo que llevaría a incorporar una superficie de sobre 20.000 hectáreas con este cultivo. De concretarse esta iniciativa, la producción de biofertilizantes a escala comercial será un atractivo negocio y de bajo riesgo.

- **Descripción estrategias de marketing del producto.**

Dada la condición particular del modelo de negocios impulsado para este lupino, el cual está caracterizado por una alta integración vertical a través de la empresa NG-Seeds, además de alianzas y acuerdos con productores por medio de un sistema de contrato de siembras y compra de la producción, la estrategia comercial será definir un protocolo de manejo del cultivo del lupino amarillo bajo contrato donde se incorpore el biofertilizante como un insumo estratégico, no sustituible.

A partir de esta definición estratégica, toda la entrega de semillas irá acompañada del inóculo (biofertilizante), conformando así parte del costo de la semilla. Para ello, la conformación de la empresa NG-Seeds será esencial para este propósito.

La definición de precios y cantidades será definida en virtud del programa de siembras anuales, en conjunto con la estructura de costos existentes para la producción, encapsulado e inoculación del biofertilizante.

3.6. Impactos y Logros del Proyecto

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio	0	1	1
Producción (<i>por producto</i>)	1.458 kg/ha	1.750 kg/ha	292 kg/ha
Costos de producción			
Ventas y/o Ingresos			
<i>Nacional</i>			
<i>Internacional</i>			
Convenios comerciales			

Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	1	1		Lupino súperproteico inoculado
Proceso				
Servicio				

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes		
Solicitudes de patente		
Intención de patentar	1	Proceso de encapsulación y plataforma de screening para asegurar pureza de bacterias.
Secreto industrial		
Resultado no patentable		
Resultado interés público		

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (<i>Citas, título, descripción</i>)
Publicaciones	1	"Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules", en revista World Journal of Microbiology and Biotechnology 2014
(<i>Por Ranking</i>)		
Eventos de divulgación científica		
Integración a redes de investigación		

Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (<i>Título, grado, lugar, institución</i>)
Tesis pregrado	1	"Microencapsulación de bacterias fijadoras de Nitrógeno mediante secador spray", Tesis de pregrado para la obtención de título de Biotecnólogo, UFRO
Tesis postgrado		
Pasantías		
Cursos de capacitación		

3.7. Conclusiones

Los resultados técnicos demuestran que el proyecto se ha podido llevar a cabo y que si bien surgieron leves modificaciones de ejecución para lograr una mayor eficacia del producto a gran escala, la calidad de la variedad (Aluprot-CGNA) objeto del biofertilizante desarrollado, ofrece condiciones favorables para incrementar su producción, además que es altamente apreciada por la industria de alimentos para animales (salmones, aves, rumiantes, etc.). Así también es una atractiva materia prima para la elaboración de alimentos saludables para consumo humano.

Lo anterior expone que la utilización de nuestra propuesta de bio-fertilizante (micro-encapsulado de bacteria fijadora de nitrógeno) es una alternativa válida dentro de la agronomía y cultivo del lupino amarillo el cual posee una interesante proyección de expansión a nivel nacional, toda vez que existe una alta demanda de proteína vegetal a nivel mundial, junto con un incremento de la tendencia a preferir fuentes no transgénicas.

Por otro lado, el alto costo asociado al uso de fertilizantes químicos en el negocio agrícola, señala que cualquier producto que lo reduzca tendrá un impacto positivo sobre la explotación agrícola; el análisis económico presentado muestra claramente esta reducción como también el potencial incremento de los ingresos. Esto es de suma importancia sobre todo para la Agricultura Familiar Campesina.

Actualmente, se prepara un proyecto de inversión, que de concretarse llevaría a incorporar una superficie sobre 20.000 hectáreas con este cultivo, por lo que la producción de biofertilizantes a escala comercial será un atractivo negocio y de bajo riesgo.

4. INFORME DE DIFUSIÓN

4.1. Foros, reuniones y día de campo

4.1.1. Presentación del Proyecto en el marco de la primera reunión de Directorio. (Anexo 2 - Actividad 1)

Realizado el 30 de enero de 2013 en el Salón Hotel Bayern, Temuco.

El Proyecto fue presentado a agricultores, empresas y autoridades del agro encabezadas por el Seremi de Agricultura de La Araucanía, Jorge Ratgheb. Además de la presentación de la iniciativa también quedó conformado el directorio del proyecto compuesto por los representantes de las instituciones asociadas, FIA y el CGNA.

Documentación Generada:

- Primer Acta de Reunión de Directorio
- Díptico sobre el proyecto
- Invitaciones
- Programa Actividad
- Listado de asistentes
- Presentación en PPT del proyecto
- Comunicado de Prensa
- Publicaciones en diversos medios de comunicación

4.1.2. Stand de Difusión Avances del Proyecto en el Marco del “Foro Innovando con identidad regional en el sector agroindustrial de La Araucanía”. (Anexo 2 – Actividad 2)

Actividad realizada en 16 de octubre de 2013 en el Salón de convenciones Dreams Temuco. Contó con un total de 180 participantes donde reunió a los representantes de todos los sectores ligados a la cadena agroindustrial los que analizaron junto a especialistas las oportunidades que se presentan para dar valor al grano.

Actores relevantes en materia agroindustrial como es el caso de Alimentos El Globo, Ancali, Salmón Chile, Iansagro, Avelup, Nutriterra, Grano Trade, Copeval, Basf Chile, SG-2000, Aproleche, Alupra, NG-Seeds, junto a agricultores, cooperativas, investigadores e instituciones públicas participaron en el panel final de este Foro en el que se discutieron los alcances de la aplicación de innovaciones que entreguen mayor competitividad al sector agroindustrial.

La actividad contó con el apoyo del Fondo de Innovación para la Competitividad Regional y la Fundación para la Innovación Agraria, FIA.

4.1.3. Stand de Difusión Avances del Proyecto en el Marco del IV Día de Campo Anual del CGNA. (Anexo 2 – Actividad 3)

Día de Campo realizado el 28 de noviembre de 2013 en el sitio experimental del CGNA en INIA Carillanca. Actividad en la que asistieron alrededor de 150 personas tanto como Agricultores asociados a FEDERCOOP, agricultores de la Región de la Araucanía, empresas ligadas al ámbito agrícola, profesionales, técnicos y autoridades del agro. Además se mostraron diversos productos

para alimentación animal y humana, elaborados en base a esta materia prima; maquinarias con alta tecnología que utiliza el centro de investigación; el desarrollo de un biofertilizante microencapsulado; y un proceso semi-industrial en vivo para la elaboración de leche de lupino para alimentación en planteles lecheros.

4.1.4. Día de campo, sector Huichahue, realizado el 07 de enero de 2015, en donde asistieron alrededor de 90 personas.

[http://www.cgna.cl/index.php?id=25&tx_ttnews\[pointer\]=1&tx_ttnews\[tt_news\]=421&tx_ttnews\[backPid\]=1&cHash=f39de9c7b3](http://www.cgna.cl/index.php?id=25&tx_ttnews[pointer]=1&tx_ttnews[tt_news]=421&tx_ttnews[backPid]=1&cHash=f39de9c7b3)

4.2. **Publicaciones Científicas**

Publicación en revista World Journal of Microbiology and Biotechnology con el título “Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules”, 2014 (Anexo 2 – Publicaciones Científicas)

4.3. **Ejecución de Tesis**

Tesis de pregrado para la obtención de título de Biotecnólogo. “Microencapsulación de bacterias fijadoras de Nitrógeno mediante secador spray”, ejecutada por la alumna Daniela Campos. (Anexo 2 – Ejecución de tesis)

5. ANEXOS

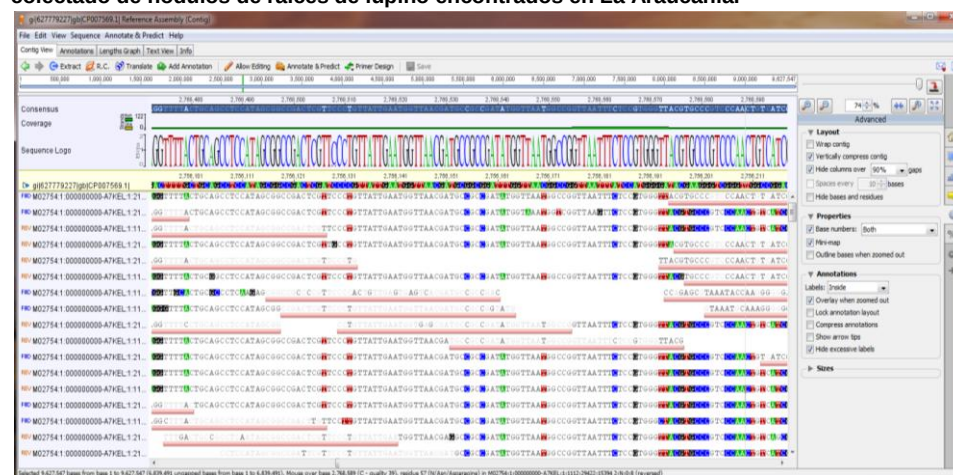
Anexo 1: Resultados Técnicos

- TABLA N°1

Cepas	Identificación	Similarity (%) ^b	N° de Accession.
5	<i>Enterobacter cloacae</i> from ginger rhizome (KC009683)	99	KF750615
11	<i>Ochrobactrum anthropi</i> from farm soil (KC857470)	99	KF750616
14	Root endophytic <i>Enterobacter ludwigii</i> from <i>Panax notoginseng</i> (JN700134)	99	KF750617
	Root endophytic <i>Enterobacter ludwigii</i> from <i>Panax notoginseng</i> (JN700134)	99	KF750617
15	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> from rhizosphere soil of peanut (JN585718)	92	KF750623
16	<i>Rhizobium</i> sp. from nodules of <i>Phaseolus vulgaris</i> (KF638351)	100	
22A	<i>Bradyrhizobium</i> sp. nodulating <i>Lupinus consentinii</i> from alkaline soils (HQ233235)	100	
22B	<i>Bradyrhizobium</i> sp. from root nodules of <i>Cytisus villosus</i> (EU561069)	100	
23	Nitrogen-fixing <i>Enterobacter</i> sp. from rhizosphere of sugarcane (KC833507)	99	KF750618
25A	<i>Rhizobium</i> sp. from root nodule of <i>Cillindria grandiflora</i> . (JX855172)	100	
26C	<i>Sphingomonas</i> sp. from cluster roots of <i>Lupin albus</i> (JN590370)	100	
27A	<i>Mesorhizobium amorphae</i> grassland soil in Kawatabi experimental farm (AB741445)	100	
27B	<i>Bradyrhizobium</i> sp. from root nodules of <i>Retama sphaerocarpa</i> (KF357617)	100	
27E	<i>Sphingobacteriaceae bacterium</i> kmd_062 from rhizosphere soil (EU723098)	100	
28E	<i>Rhizobium</i> sp. from potassium mine soil (JF900025)	100	
28F	<i>Rhizobium</i> sp. from root nodules of <i>Phaseolus vulgaris</i> (JF318173)	99.7	
28G	<i>Rhizobium tropici</i> from root nodule of <i>Ledespa</i> sp. (GQ181030)	100	
29	Diazotrophic <i>Stenotrophomonas</i> sp. from maize (JX174242)	99	KF750619
33	Endophytic <i>Stenotrophomonas</i> sp. from peanut (JQ579644)	99	KF750620
34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> from rhizosphere soil of pepper (KF574910)	100	KF750621
35	<i>Enterobacter ludwigii</i> from rhizosphere (JX122497)	99	KF750622
36	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> from soil (EU927145)	96	KF750624

- FIGURA 1

Ejemplo grafico de parte de la secuencia del total del genoma de Cepa 26 de *Bradyrhizobium japonicum*, colectado de nódulos de raíces de lupino encontrados en La Araucanía.



- **FIGURA 2** Cosecha de lupino amarillo en la localidad de San Ramón. A) Vista de parcelas sembradas con semilla inoculada (izquierda del letrero), y sin inocular (derecha del letrero). B) La cosecha se realizó utilizando Automotriz experimental Wintersteiger-CGNA.

A)



B)



DIARIO OFICIAL
DE LA REPÚBLICA DE CHILE

Núm. 40.673

03 de Octubre de 2013

SECCIÓN SOCIEDADES
CONSTITUCIÓN SOCIEDAD ANÓNIMA

692356 PRODUCTORA DE SEMILLAS NG-SEEDS S.A.

EXTRACTO

(CVE: 692356)

CARLOS ALARCON RAMIREZ, Notario Titular, Temuco, Certifica: Por Escritura Pública otorgada ante mí, Hoy la "CORPORACIÓN CENTRO DE GENÓMICA NUTRICIONAL AGRO ACUÍCOLA", domicilio en la comuna de Temuco; la "COOPERATIVA AGRÍCOLA Y CAMPESINA MOÑENCO", domicilio en la comuna de Padre Las Casas; la "COOPERATIVA CAMPESINA LOS ROBLES", domicilio de la comuna de Padre Las Casas; la "COOPERATIVA CAMPESINA HUICAHUE", domicilio en la comuna de Padre Las Casas; la "COOPERATIVA CAMPESINA PEÑIWEN", domicilio en la comuna de Padre Las Casas; la "COOPERATIVA CAMPESINA WULI-AGRO", domicilio en la comuna de Padre Las Casas; Constituyen Sociedad Anónima Cerrada, como sigue: Nombre: "**PRODUCTORA DE SEMILLAS NG-SEEDS S.A.**" Nombre Fantasía: "NG-SEEDS S.A." Objeto: Multiplicación, producción, siembra, comercialización, importación, exportación, secado, intervención, selección y procesamiento de semillas y/o productos vegetales cualquier origen, denominación o naturaleza; y, en general, efectuar todas actividades lucrativas que socios acuerden, siempre que digan directa relación con objeto social o tengan por objeto su desarrollo o complementación.- Domicilio: ciudad Temuco.- Duración: indefinida.- Capital social y número de acciones y privilegios: Capital social dividido 2 series acciones, Serie A 3.000 acciones ordinarias, nominativas, igual valor inicial cada una, sin valor nominal. Serie B 8.000 acciones preferidas, nominativas, igual valor inicial cada una, sin valor nominal. Acciones Serie A otorgarán sus dueños todos y cada uno derechos ley otorga ordinariamente accionistas Sociedad Anónima. Acciones Serie B dará derecho a sus titulares obtener utilidades equivalentes a cuatro veces lo que corresponde a acción ordinaria o de Serie A. Como contrapartida, cada acción Serie B tendrá derecho voto limitado, equivalente cuarta parte de una acción ordinaria o Serie A, por lo que para tener derecho a un voto deben reunirse cuatro acciones preferentes de la Clase B. Preferencia acciones Serie B durará plazo 15 años a contar fecha presente escritura. Monto Capital suscrito y pagado y plazo para enterarlo: En este acto se emiten 3.000 acciones Serie A que se suscriben y pagan de contado presente acto suma En mismo acto se emiten 8.000 acciones Serie B, de las cuales se suscriben y pagan presente acto 100 acciones por valor total y se suscriben 2.000 por valor total de pagaderas plazo 3 años a contar fecha presente escritura.- Demás estipulaciones constan de la escritura pública extractada.- Temuco, a 25 de Septiembre del año 2013.- Doy Fé.

Anexo 2: Difusión

- **ACTIVIDAD 1**
- **Primer Acta de Reunión de Directorio**

Acta Primera Sesión de Directorio Proyecto FIA PYT-2012-0088

En Temuco, comuna de Temuco a 30 de Enero de 2013, siendo las diez horas, en calle Prat N° 146, tuvo lugar la primera sesión de Directorio del proyecto *Generación de un biofertilizante mediante el uso de genómica y microencapsulación para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile*.

UNO.- ASISTENCIA Y MESA. Concurrieron los representantes de las instituciones participantes, señores(as): Daniel Rebolledo M. (CAMPOCOOP); Claudio Soler A. (FIA), Fernando Arancibia M. (FIA); Haroldo Salvo G. (CGNA); Veronique Amiard, Coordinadora del Proyecto.

DOS.- TABLA DE LA SESION. Don Haroldo Salvo informa que se ha convocado a la presente sesión para los efectos de:

1. Conformación del directorio del proyecto.
2. Fijación de la periodicidad de las futuras sesiones de directorio.

TRES.- DESARROLLO DE LA SESION.

Punto 1.

Se acuerda que el directorio del proyecto sería la instancia de apoyo a la gestión de coordinación del proyecto, velar por el fiel cumplimiento del Plan operativo del proyecto, o proponer mejoras o soluciones a situaciones imprevistas.

También se plantea que el directorio es una instancia de alta importancia para el encuentro de los asociados del proyecto, donde se puedan plantear inquietudes y demandas de sus sectores.

Se acuerda nombrar un presidente del proyecto, quien debiera coordinar las futuras reuniones del directorio. Por unanimidad se acuerda que el presidente del directorio, sea don Haroldo Salvo-Garrido.

Punto 2.

Respecto a la periodicidad de las reuniones de directorio, se acuerda que se realice inmediatamente posterior a la entrega del informe de avance, es decir cada seis meses. Ante eventuales situaciones que ameriten una reunión extraordinaria de directorio, se procederá a su inmediata citación.

La citación de las reuniones queda bajo la responsabilidad del presidente del directorio y/o coordinadora del proyecto.

No habiendo más puntos en tabla, se cierra la reunión a las 10:40 a.m.

En comprobante, firman los asistentes.

FERNANDO ARANCIBIA

DANIEL REBOLLEDO M.

CLAUDIO SOLER

HAROLDO SALVO G.

VERONIQUE AMARD

- Díptico sobre el proyecto

Ventajas

Económicas: Reducción de gastos al no requerir nitrógeno químico y al evitar los costos de su aplicación.

Ambientales: producto natural y biodegradable, amigable con el ambiente, que reemplazará a un producto químico contribuyendo positivamente en la huella de carbono.

Etapas de trabajo:

- Aplicaciones de genómica y microbiología para la identificación de cepas de bacterias de acuerdo a la genoma y capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.
- Desarrollo de un microencapsulado ideal que permita el almacenamiento eficiente del biofertilizante y una liberación de las las bacterias en forma prolongada y oportuna en campo.
- Pruebas de campo para comprobar en las condiciones de los pequeños agricultores su efectividad como una alternativa a la fertilización química inorgánica.
- Desarrollo de un prototipo de producto que sea escalable comercialmente para que, en conjunto a la articulación de un emprendimiento, los beneficios lleguen a los productores que integran la cadena de valor de la proteína vegetal en el sur de Chile.

El conocimiento generado en este proyecto establecerá las bases para desarrollar nuevos variantes de biofertilizantes para otros cultivos.

Más información en www.cgna.cl / contacto@cgna.cl

CGNA
CENTRO DE GENÓMICA NUTRICIONAL
AGRICULTURA, DESARROLLO Y BIOTECNOLOGÍA

BIORÉN - UFRO
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

CANPOCOOP

Generación de un biofertilizante microencapsulado para lupino súperproteico



CGNA
CENTRO DE GENÓMICA NUTRICIONAL
AGRICULTURA, DESARROLLO Y BIOTECNOLOGÍA

Proyecto:

Generación de un biofertilizante mediante el uso de genómica y microencapsulados para contribuir al desarrollo competitivo y sostenible del cultivo de lupino de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile.

FICHA:
Período de ejecución: 2012-2015
Ejecuta: Centro de Genómica Nutricional, Universidad, CGNA.
Asocia: BIORÉN-UFRO y CANPOCOOP
Financiamiento: Fundación para la Innovación Agraria, FIA

¿Por qué un biofertilizante microencapsulado?

La aplicación de un biofertilizante microencapsulado (compuesto por cepas seleccionadas de bacterias fijadoras de nitrógeno) que irá adherido a la semilla en el momento de la siembra, podrá disminuir la fertilización nitrogenada química en el emergente cultivo del lupino, superintensiva, aumentando con ello la competitividad de estos alternarios productivos, beneficiando a los agricultores de la zona sur.

Innovaciones a desarrollar en este producto tecnológico:

- Bacterias fijadoras de nitrógeno específicas para el cultivo de lupino amarillo, adaptadas a las condiciones climáticas y de suelo de la zona sur de Chile. Su utilización valorará la biodiversidad de nuestras cepas nativas.
- Utilización de la genómica para identificar cepas bacterianas de mayor eficiencia en la fijación de nitrógeno.
- Bacterias microencapsuladas permitirán una liberación controlada en el tiempo para asegurar su presencia cuando la planta inicia su actividad fotosintética. Así una alta cantidad de bacterias podrán estar presentes alrededor de las raíces del cultivo cuando la planta lo requiere, permitiendo una mayor eficiencia del biofertilizante.
- Condiciones simples de almacenaje y uso brindadas por el microencapsulado.



- Invitaciones Lanzamiento Proyecto



INVITACIÓN

Haroldo Salvo Garrido, Director de I&D del Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola -CGNA-, tiene el agrado de invitar a usted a participar de la Presentación del Proyecto **"Generación de un biofertilizante mediante el uso de genómica y microencapsulación para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile"**, que se realizará el día miércoles 30 de enero de 2013, a las 10.30 horas, en el Hotel Bayern Temuco

Este proyecto, ejecutado por el CGNA, está financiado por la Fundación para la Innovación Agraria, FIA, y tiene como instituciones asociadas a BIOREN-UFRO y CAMPOCOOP.

Se solicita confirmar asistencia



- Programa Lanzamiento Proyecto

PROGRAMA

10.30 hrs. Exposición de Presentación del Proyecto. Dra. Veronique Amiard, directora del Proyecto.

10.45 hrs. Rol de BIOREN en la ejecución del Proyecto. María de la Luz Mora, directora de BIOREN.

10.55 hrs. Importancia del proyecto para la agricultura familiar campesina. Daniel Rebolledo, presidente de Campocoop.

11.05 hrs. Compromiso del CGNA en la generación de nuevos productos para contribuir al desarrollo agroindustrial. Dr. Haroldo Salvo, Director I&D CGNA.

11.15 hrs. Ronda de preguntas de los presentes.

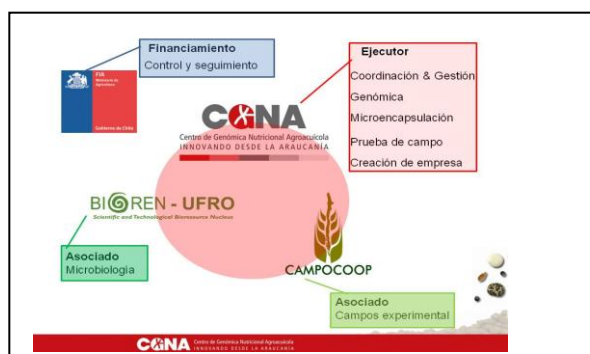
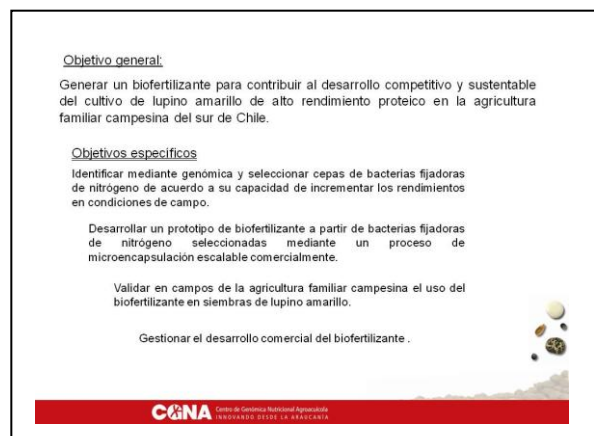
11.30 hrs. Cierre de la actividad. Coffe.

- Listado de Asistentes

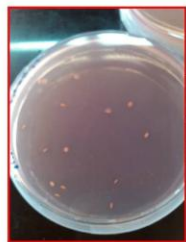
Nombre		Cargo
Miguel	Ellena	INIA Carillanca
Gustavo	Kausel Kroll	Consejero Regional
Fernando	Arancibia	FIA
Claudio	Soler	Ejecutivo FIA Región de La Araucanía
Jorge	Rathgeb Schifferli	Seremi de Agricultura
Guido	Pérez	Encargado Regional de Semillas SAG
Carlos	Jorquera	Copeval
Rodrigo	Arroyo Melin	Coord. Proyectos Fomento COPEVAL Agroindustrias
Daniel	Rebolledo	Presidente Campocoop
Alejandro	Curiche	Cooperativa Wull Agro
Javiera	Espoz	Profesional
Francisca	Acevedo	Investigador CGNA
Mónica	Rubilar	Investigador UFRO-CGNA
María Laura	Federico	Coordinadora unidad CGNA
Iván	Maureira	Investigador CGNA
Véronique	Amiard	Directora Proyecto
Constanza	Espinoza	

Paula	Mora	Investigador Ayudante
Haroldo	Salvo	Director CGNA
Loreto	Moya	Periodista
Milko	Jorquera	Co Investigador Proyecto FIA (BIOREN-UFRO)
Daniela	Campos	universitario
Patricio	Barra	universitario
Lorena	Lagos	universitario
Paola	Durán	universitario
Jonathan	Fortt	universitario
Jacqueline	Acuña	universitario
Carolina	Contreras	INIA
Francisco	Carrasco	Periodista (Seremi de Agricultura)

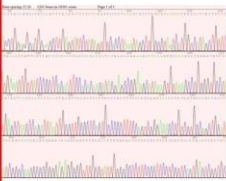
- Presentación en PPT del Proyecto



Caracterización & Identificación de las cepas bacterianas



Microbiología



Genómica

Microencapsulación



✓ Protección

✓ Liberación progresiva

Prueba de campo



Creación de una empresa y Producción de biofertilizante



Ventajas

Económicas: Reducción de gastos al no requerir nitrógeno químico y al evitar las labores de su aplicación

Ambientales: Producto natural y biodegradable, amigable con el ambiente, que reemplazará a un producto químico contribuyendo positivamente en la huella de carbono.



C&NA
Centro de Genómica Nutricional Agropecuaria
INNOVANDO DESDE LA ARAUCANÍA

BI@REN - UFRO
Scientific and Technological Bioresource Nucleus



CAMPOCOOP

Tiempo de ejecución: 3 años

Generación de un biofertilizante microencapsulado para lupino súperproteico



BI@REN - UFRO
Scientific and Technological Bioresource Nucleus



CAMPOCOOP

- **Comunicado de Prensa**

Desarrollarán innovador biofertilizante que sustituirá la fertilización química nitrogenada en lupino

Con el apoyo de FIA se dio comienzo a esta iniciativa que ejecutará el Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola, CGNA.

Biofertilizantes microencapsulados de avanzada tecnología para el cultivo del lupino amarillo súperproteico, que evitarán realizar labores de fertilización química nitrogenada, reduciendo gastos y efectos sobre el medio ambiente, es lo que espera desarrollar el Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola, CGNA.

El Proyecto en el que se enmarca esta iniciativa fue presentado hoy (miércoles 30 de enero) en Temuco a agricultores, empresas y autoridades del agro encabezadas por el Seremi de Agricultura de La Araucanía, Jorge Ratgheb.

Con financiamiento del Fundación para la Innovación Agraria (FIA) este proyecto denominado “Generación de un biofertilizante mediante el uso de genómica y microencapsulación para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile”, cuenta con la participación del Núcleo Científico Tecnológico de Biorecursos – BIOREN- de la Universidad de La Frontera y CAMPOCOOP, y es liderado por el CGNA bajo la coordinación de la Dra. Véronique Amiard.

La investigadora indicó que se espera aplicar toda la tecnología disponible para lograr en menos de tres años (que dura el proyecto) tener un producto innovador a partir de bacterias fijadoras de nitrógeno las cuales serán microencapsuladas, para ser aplicadas junto a la semilla en el momento de la siembra y así evitar la fertilización química nitrogenada.

Es así como este biofertilizante permitirá una liberación controlada de bacterias que ayudarán a fijar nitrógeno atmosférico en el momento en que la planta más lo requiera, convirtiéndose en una alternativa a la fertilización nitrogenada tradicional, sin que ello signifique pérdida de rendimiento ni de proteína por hectáreas, con el consiguiente efecto positivo en costos productivos e impacto para el medio ambiente.

CIENCIA AL SERVICIO DEL SECTOR PRODUCTIVO

Claudio Soler, representante de FIA en la Región de La Araucanía, señaló que “en este proyecto se puede ver cómo la ciencia es una fuente de soluciones para el sector productivo y también lo necesario que es formar redes para realizar innovaciones en el agro”.

El proyecto tiene una duración de tres años. Al inicio se trabajará en genómica y microbiología para identificar cepas de bacterias de acuerdo a su genoma y capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, como a su vez se desarrollará un microencapsulado ideal que permita el almacenamiento eficiente del biofertilizante y una liberación de las bacterias en forma controlada y oportuna en campo. Seleccionadas las cepas y el microencapsulado, se realizarán pruebas de campo para comprobar en las condiciones de los agricultores su efectividad como una alternativa a la fertilización química nitrogenada, en esta etapa será crucial la participación de pequeños agricultores ya que se trabajará en sus predios y bajo sus condiciones de producción en la prueba de este producto. Finalmente, se desarrollará el producto para que sea escalable comercialmente y se gestionará un emprendimiento que desarrolle el producto para que sus beneficios lleguen a los productores.

Con respecto a este punto el Presidente de CAMPOCOOP, Daniel Rebolledo, destacó el trabajo conjunto del centro de investigación con los pequeños productores “las expectativas que se tienen de este proyecto son

muy grandes y creemos que estamos avanzando con esta inclusión de la ciencia y el conocimiento en el mejoramiento de la productividad de nuestros campesinos, creo que esta experiencia va a ser un gran ejemplo a seguir”.

El Seremi de Agricultura de La Araucanía señaló que “es una muy buena iniciativa que se pueda hacer una fertilización que no sea atentatoria contra el medio ambiente, que permita que en la parte económica el agricultor no tenga que invertir grandes recursos para tener productividad y llevar adelante una agricultura que le podemos llamar ‘del futuro’. Estoy muy feliz y esperanzado de que sea la posibilidad de apoyar a la agricultura familiar campesina que tanto lo requiere”.

Además de la presentación de la iniciativa en la jornada también quedó conformado el directorio del proyecto compuesto por los representantes de las instituciones asociadas, FIA y el CGNA.

“El uso de este biofertilizante en el cultivo del lupino amarillo permitirá un ahorro importante en los costos de producción para los pequeños agricultores y, por ende, incrementar sus ingresos. Además, el proyecto realizará un aporte medioambiental al disminuir y/o eliminar la fertilización nitrogenada”, resaltó el ejecutivo de innovación de FIA y supervisor del proyecto, Fernando Arancibia.

En tanto el Director de I&D del CGNA, Dr. Haroldo Salvo Garrido, agradeció el apoyo de FIA a este proyecto señalando que espera que una vez finalizado los agricultores se beneficien con este innovador producto desarrollado por el centro de investigación.

El CGNA con 7 años de trabajo tiene como objetivo agregar valor a los cultivos convencionales, utilizando la biotecnología y bioprocesos, con el fin de ser incorporados desde La Araucanía a la industria de los alimentos. Está ubicado en Temuco y fue fundado por INIA y la U. de La Frontera, con financiamiento base del Programa Regional de CONICYT y el Gobierno Regional de La Araucanía.

- Publicaciones



Revista GTT.

Marzo 2013

Novedoso insumo se desarrollará a partir de bacterias fijadoras de nitrógeno a nivel de suelo

Diseñan biofertilizante para el lupino

BARBARA LÓPEZ FERRAZ

Científicos sureños están trabajando para generar un biofertilizante que contribuya al desarrollo sostenible y sustentable del cultivo de lupino austral de alto rendimiento en la agricultura familiar campesina del sur de Chile una leguminosa que tiene buenas perspectivas, por la alta concentración de proteína (16%) lo que resulta atractivo como alternativa para la alimentación animal.

Se trata de un novedoso biofertilizante microencapsulado de azulada tecnología que evaluará realizar labores de fertilización química sin necesidad de reducir rendimientos y efectos sobre el medio ambiente. La investigación está siendo llevada adelante por el Centro de Genética Nutricional Agrícola, (CGNA) con financiamiento de la

Iniciativa que se lleva adelante en el sur de Chile apunta a disminuir el uso de fertilizantes químicos, pero sin afectar rendimientos.

Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y cuenta con la participación del Núcleo Científico Tecnológico de Biotecnología, REDIN de la Universidad de La Frontera y la Asociación Campesina Campesino.

La investigadora, Vronique Amador a cargo del proyecto, dijo durante la presentación de la iniciativa que se espera aplicar toda la tecnología disponible para lograr en menos de tres años un producto innovador a partir de bacterias fijadoras de nitrógeno las cuales serán microencapsuladas para ser aplicadas directamente al momento de la siembra y así evitar la fertilización química convencional.

Este biofertilizante permitirá una liberación controlada de bacterias que ayudarán a fijar nitrógeno atmosférico en el momento en que la planta está creciendo, pero sin que ello implique pérdida de rendimiento de proteína por hectárea, con el consiguiente efecto positivo en costos de producción e impacto sobre el medio ambiente.

Para Claudio Solís, representante de FIA en la Región de La Araucanía, comentó que "se puede ver cómo la técnica es una fuente de soluciones para el sector productivo y también lo importante que es formar redes para realizar innovaciones en el agro".



Suplemento Agrícola Campo Sureño del Diario Austral.

25 de febrero de 2013

- Cuadro de publicaciones en páginas web

	TITULO DE LA PUBLICACIÓN	FECHA	NOMBRE DEL MEDIO	LINK
1	Desarrollarán innovador biofertilizante que sustituirá la fertilización química nitrogenada en lupino	31-01	Viveagro	http://bit.ly/11k0CmH
2	Desarrollarán innovador biofertilizante que sustituirá la fertilización química nitrogenada en lupino	31-01	Aqua.cl	http://www.aqua.cl/noticias/index.php?doc=56704
3	Desarrollarán innovador biofertilizante que sustituirá la fertilización química nitrogenada en lupino	31-01	Redagricola.com	http://www.redagricola.com/noticias/chile/developaran-innovador-biofertilizante-que-sustituira-la-fertilizacion-quimica-nitro
4	Araucanía: Desarrollarán biofertilizante para mejorar producción del lupino	31-01	Terra.cl	http://noticias.terra.cl/terra-verde/araucania-developaran-biofertilizante-para-mejorar-produccion-del-lupino,ec256040a398c310VgnCLD200000dc6eb0aRCRD.html
5	Desarrollarán innovador	31-01	Lacomuna.cl	http://www.lacomuna.cl/portal/developar

	biofertilizante que sustituirá la fertilización química nitrogenada en lupino			an-innovador-biofertilizante-que-sustituira-la-fertilizacion-quimica-nitrogenada-en-lupino/
6	Biofertilizante sin fertilización química nitrogenada	31-01	Agro20.com	http://www.agro20.com/forum/topics/agro20-biofertilizante-sin-fertilizaci-n-quimica-nitrogenada

- **ACTIVIDAD 2**

Stand de Difusión Avances del Proyecto en el Marco del “Foro Innovando con identidad regional en el sector agroindustrial de La Araucanía; 16 de oct. 2013; Salón de Convenciones Dreams Temuco



- **ACTIVIDAD 3**

Stand de Difusión Avances del Proyecto en el Marco del IV Día de Campo Anual del CGNA; 28 de Nov 2013; Ensayos experimentales CGNA.



- ACTIVIDAD 4
Día de campo en cooperativa Huichahue



- PUBLICACIÓN CIENTÍFICA

Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules

Daniela C. Campos · Francisca Acevedo · Eduardo Morales ·
Javiera Aravena · Véronique Amiard · Milko A. Jorquera ·
Nitzza G. Inostroza · Mónica Rubilar

Received: 11 February 2014 / Accepted: 1 May 2014 / Published online: 8 May 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Plant growth promoting bacteria and nitrogen-fixing bacteria (NFB) used for crop inoculation have important biotechnological potential as a sustainable fertilization tool. However, the main limitation of this technology is the low inoculum survival rate under field conditions. Microencapsulation of bacterial cells in polymer matrices provides a controlled release and greater protection against environmental conditions. In this context, the aim of this study was to isolate and characterize putative NFB associated with lupin nodules and to evaluate their microencapsulation by spray drying. For this purpose, 21 putative NFB were isolated from lupin nodules and characterized (16S rRNA genes). Microencapsulation of bacterial cells by spray drying was studied using a mixture of sodium alginate:maltodextrin at different ratios (0:15, 1:14, 2:13) and concentrations (15 and 30 % solids) as the wall material. The microcapsules were observed under scanning electron

microscopy to verify their suitable morphology. Results showed the association between lupin nodules of diverse known NFB and nodule-forming bacteria belonging to *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Bacteroidetes*. In microencapsulation assays, the 1:14 ratio of sodium alginate:maltodextrin (15 % solids) showed the highest cell survival rate (79 %), with a microcapsule yield of 27 % and spherical microcapsules of 5–50 µm in diameter. In conclusion, diverse putative NFB genera and nodule-forming bacteria are associated with the nodules of lupine plants grown in soils in southern Chile, and their microencapsulation by spray drying using sodium alginate:maltodextrin represents a scalable process to generate a biofertilizer as an alternative to traditional nitrogen fertilization.

Keywords Polymer · Sodium alginate · Maltodextrin · Enterobacter · Diazotrophic bacteria

D. C. Campos · F. Acevedo (✉) · E. Morales · M. Rubilar
Technology and Processes Unit, Agri-aquaculture Nutritional
Genomic Center, CGNA, 4791057 Temuco, Chile

D. C. Campos · M. A. Jorquera · N. G. Inostroza · M. Rubilar
Department of Chemical Engineering, Scientific and
Technological Bioresource Nucleus, BIOREN, Universidad de
La Frontera, Temuco, Chile

J. Aravena
The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in
Agriculture, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food
and Environment, The Hebrew University of Jerusalem,
76100 Rehovot, Israel

V. Amiard
Genomics and Bioinformatic Unit, Agri-aquaculture Nutritional
Genomic Center, CGNA, 4791057 Temuco, Chile

Introduction

Legumes are considered a rich source of protein for human and animal nutrition, and yellow lupin (*Lupinus luteus*) represents an economically relevant crop for agriculture in southern Chile. Lupin plants are characterized by their high protein content (30–57 %) (Pettersen et al. 1997; Glencross 2001) in seeds compared with other legumes, such as peas (*Pisum sativum*, 22 %) and beans (*Vicia faba*, 25 %) (Lampart-Sczapa 2001). Unfortunately, the excessive and continued use of chemical fertilizers to improve lupin yields involves various environmental concerns, such as low soil fertility, low soil biodiversity, eutrophication of water bodies, etc. Thus, novel fertilization strategies are needed to reduce fertilizer inputs and their environmental

RESUMEN GENERAL DE LA PROPUESTA (máximo 500 palabras, letra Times New Roman 12 y espacio 1)

Los inoculantes que contienen bacterias fijadoras de nitrógeno capaces de asociarse de manera simbiótica con lupino, permiten reducir el uso de fertilizantes químicos e incrementar el rendimiento del cultivo. Sin embargo, la sobrevivencia de los microorganismos se ve disminuida bajo las diferentes condiciones que presentan los suelos y por la presencia de microorganismos depredadores y de una microflora nativa a menudo mejor adaptada.

Hasta la fecha, la mayoría de los inoculantes bacterianos son comercializados a base de turba, formulaciones utilizadas para cubrir las semillas. Generalmente, los resultados son satisfactorios

pero posee varios inconvenientes los cuales se originan a partir de la gran variabilidad en la calidad de la turba, afectando en gran medida el producto final. Además este producto no se encuentra disponible en muchos países.

Se han evaluado inoculantes alternativos para corregir los problemas existentes, formulaciones basadas en polímeros se muestran como potenciales portadores de bacterias que ofrecen una serie de ventajas; pueden ser almacenadas a temperatura ambiente durante periodos prolongados, ofreciendo mayor calidad y un mejor entorno para las bacterias, y pueden ser manipuladas fácilmente y protegen a células vivas frente a condiciones ambientales.

La formulación más común de encapsulados utilizados como inoculantes bacterianos corresponde a macropérlas con un diámetro de 1-4 mm. Sin embargo, su gran tamaño resulta desventajoso para su uso en la agricultura.

En este sentido, el secado por atomización (secado spray) consiste en un proceso económico para la preparación de cantidades a escala industrial de microcápsulas ofreciendo altas tasas de producción a bajo costo y protección de las células. Además se han estudiado sistemas mixtos de matrices poliméricas con la finalidad de obtener propiedades físico-químicas combinadas, permitiendo realizar el proceso de encapsulación de manera más eficiente tanto para la protección como para la liberación controlada de bacterias.

El plan de trabajo consiste en una primera instancia seleccionar a partir de 16 cepas bacterianas una cepa fijadora de nitrógeno con una alta tasa de crecimiento y posteriormente mejorar la mezcla polimérica de alginato- maltodextrina y la cantidad del inóculo para realizar el proceso de microencapsulación utilizando la técnica de secado spray.

Se espera que la cepa microencapsulada mantenga su viabilidad en condiciones de almacenamiento bajo distintas condiciones de temperatura durante un tiempo determinado. Esto con el fin de generar a futuro un biofertilizante que contribuya al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones del proceso de microencapsulación por secado spray que permitan maximizar la viabilidad de una cepa bacteriana fijadora de nitrógeno en condiciones de almacenamiento

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Seleccionar una cepa bacteriana fijadora de nitrógeno con una alta tasa de crecimiento
- 2- Estudiar el efecto de las variables: concentración de material encapsulante, tipo de material encapsulante y cantidad de inóculo en el proceso de microencapsulación mediante secado spray
- 3- Caracterizar el producto optimizado mediante pruebas de estabilidad en condiciones de almacenamiento y por microscopía electrónica de barrido

Anexo 3: Participantes del Proyecto

Ficha del Ejecutor (entidad responsable)

Nombre o razón social	Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola			
Giro / Actividad	Investigación Científica y Tecnológica			
RUT				
Tipo de entidad (1)	Centro Científico Tecnológico			
Ventas totales (nacionales y exportaciones) de la empresa durante el año pasado, indique monto en UF en el rango que corresponda	Micro empresa menos de 2400 UF/ año	Pequeña 2.401 a 25.000 UF / año	Mediana 25.001 a 100.000 UF / año	Grande más de 100.001 UF / año
Exportaciones, año 2010 (US\$)				
Número total de trabajadores				
Usuario INDAP (sí / no)				
Dirección (calle y número)				
Ciudad o Comuna				
Región	La Araucanía			
País	Chile			
Teléfono fijo				
Fax				
Teléfono celular				
Email				
Dirección Web	www.cgna.cl			

Ficha representante(s) Legal(es) del Ejecutor (entidad responsable)

Nombre	Haroldo Edinson
Apellido paterno	Salvo
Apellido materno	Garrido
RUT	
Cargo en la organización	Director de Investigación y Desarrollo
Género	Masculino
Etnia (2)(clasificación al final del documento)	
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional

Ficha del Asociado N°1.

Nombre o razón social	Confederación Nacional de Federaciones de Cooperativas Campesinas Ltda, CAMPOCOOP LTDA.			
Giro / Actividad	Asesorías y capacitaciones gremiales			
RUT				
Tipo de entidad (1)	Organización o Asociación de productores			
Ventas totales (nacionales y exportaciones) de la empresa durante el año pasado, indique monto en UF en el rango que corresponda	Micro empresa (menos de 2400 UF/ año)	Pequeña (2.401 a 25.000 UF / año)	Mediana (25.001 a 100.000 UF / año)	Grande (más de 100.001 UF / año)
Exportaciones, año 2010 (US\$)				
Número total de trabajadores				

Usuario INDAP (sí / no)	
Dirección (calle y número)	
Ciudad o Comuna	
Región	Región metropolitana
País	Chile
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Dirección Web	www.campocoop.cl

Ficha representante(s) Legal(es) de Asociado(s) N°1.

Nombre	Daniel Roberto
Apellido paterno	Rebolledo
Apellido materno	Mercado
RUT	
Cargo en la organización	Presidente
Género	Masculino
Etnia (2) (clasificación al final del documento)	
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Sin clasificar

Ficha del Asociado N°2.

Nombre o razón social	Universidad de La Frontera - Nucleo científico Tecnológico Biorecursos (BIOREN)			
Giro / Actividad	Educación			
RUT				
Tipo de entidad (1)	Universidad Nacional			
Ventas totales (nacionales y exportaciones) de la empresa durante el año pasado, indique monto en UF en el rango que corresponda	Micro empresa (menos de 2400 UF / año)	Pequeña (2.401 a 25.000 UF / año)	Mediana (25.001 a 100.000 UF / año)	Grande (más de 100.001 UF / año)
Exportaciones, año 2010 (US\$)				
Número total de trabajadores				
Usuario INDAP (sí / no)				
Dirección (calle y número)				
Ciudad o Comuna				
Región	La Araucanía			
País	Chile			
Teléfono fijo				
Fax				
Teléfono celular				
Email				
Dirección Web	www.ufro.cl ; www.bioren.cl			

Ficha representante(s) Legal(es) de Asociado(s) N°2.

Nombre	Sergio
--------	--------

Apellido paterno	Bravo
Apellido materno	Escobar
RUT	
Cargo en la organización	Rector
Género	Masculino
Etnia (2) (clasificación al final del documento)	
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional

Fichas de los Coordinadores

Nombres	Véronique	
Apellido paterno	Amiard	
Apellido materno		
RUT		
Profesión	Bióloga, Dr. en Ciencias Biológicas	
Empresa/organización donde trabaja	Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola	
RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador	
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	La Araucanía	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Femenino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	

Nombres	Paula Elizabeth (Coordinador Alterno)	
Apellido paterno	Mora	
Apellido materno	Ortega	
RUT		
Profesión	Ingeniero Agrónomo, Mg en Ciencias Vegetales	
Empresa/organización donde trabaja	Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola	
RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador	
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)

Dirección laboral (calle y número)	
Ciudad o Comuna	
Región	La Araucanía
País	Chile
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Género	Femenino
Etnia (2) (clasificación al final del documento)	
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional

Nombres	Iván Jorge	
Apellido paterno	Maureira	
Apellido materno	Butler	
RUT		
Profesión	Ing. Agrónomo. Ph.D.	
Empresa/organización donde trabaja	Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola	
RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador	
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Si es investigador responda
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	La Araucanía	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Masculino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	

Ficha Equipo Técnico.

Nombres	Francisca
Apellido paterno	Acevedo
Apellido materno	Echevarría
RUT	
Profesión	Químico Farmacéutico
Empresa/organización donde trabaja	Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola
RUT de la empresa/organización	
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador

Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	La Araucanía	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Femenino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	

Nombres	Milko	
Apellido paterno	Jorquera	
Apellido materno	Tapia	
RUT		
Profesión	Ingeniero Acuicola	
Empresa/organización donde trabaja	Bioren – Universidad de La Frontera	
RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador	
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	La Araucanía	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	masculino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	

Nombres	Moisés
Apellido paterno	Torres
Apellido materno	Romero
RUT	
Profesión	Contador Público y Auditor
Empresa/organización donde trabaja	Centro de Genómica Nutricional Agroacuicola
RUT de la empresa/organización	

Cargo o actividad que desarrolla en ella	Gerente de Administración y Finanzas	
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	La Araucanía	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Masculino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	

Nombres	Loreto	
Apellido paterno	Moya	
Apellido materno	González	
RUT		
Profesión	Periodista	
Empresa/organización donde trabaja	Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola	
RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Encargada de Comunicaciones	
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	La Araucanía	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Femenino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	

Nombres	Yilian	
Apellido paterno	Rojas	
Apellido materno	Acuña	
RUT		
Profesión	Ingeniero Comercial	
Empresa/organización donde trabaja	Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola	

RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Encargada Control y Seguimiento de Proyectos	
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	La Araucanía	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Femenino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	