

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 662**

21 Número de solicitud: 201031655

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 17/16 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **10.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
17.10.2012

71 Solicitante/s:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:
**LANDA DEL CASTILLO, BLANCA B.;
ARANDA OCAMPO, SERGIO;
MONTES BORREGO, MIGUEL y
CASTILLO CASTILLO, MIGUEL**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **NUEVAS CEPAS DE DUGANELLA AISLADAS DE LA RIZOSFERA DE OLIVO SILVESTRE Y CULTIVADO Y SU USO EN LA PRODUCCIÓN DE VIOLACEÍNA.**

57 Resumen:

Nuevas cepas de duganella aisladas de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado y su uso en la producción de violaceína.

La presente invención se refiere a unas cepas bacterianas de Duganella spp. obtenidas de la rizosfera de olivos silvestres y cultivados. Preferentemente las cepas son CECT 7779, CECT 7780 y CECT 7781 y más preferentemente la cepa bacteriana es CECT 7780. Además, la presente invención se refiere a sus combinaciones con otros microorganismos y a las composiciones que comprenden los productos anteriores, así como a un procedimiento para la producción de violaceína y a la violaceína producida para su aplicación biotecnológica y agronómica.

ES 2 388 662 A1

DESCRIPCION

NUEVAS CEPAS DE *DUGANELLA* AISLADAS DE LA RIZOSFERA DE OLIVO SILVESTRE Y CULTIVADO Y SU USO EN LA PRODUCCIÓN DE VIOLACEÍNA.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología y agronomía. En concreto, la presente invención se refiere a unas cepas bacterianas de *Duganella* spp. obtenidas de la rizosfera de olivos silvestres y cultivados. Preferentemente las cepas son CECT 7779, CECT 7780 y CECT 7781 y más preferentemente la cepa bacteriana es CECT 7780. Además, la
10 presente invención se refiere a sus combinaciones con otros microorganismos y a las composiciones que comprenden los productos anteriores, así como a un procedimiento para la producción de violaceína y a la violaceína producida para su aplicación biotecnológica y agronómica.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

En las últimas décadas, las interacciones planta-microorganismo que ocurren en la rizosfera han sido objeto de considerables estudios ya que la rizosfera se considera un potencial reservorio para el descubrimiento de especies
20 microbianas de diverso interés biotecnológico (Wen-Jun et al., 2004. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 1811-1814; Ryan et al., 2009. Plant & Soil 321, 363-383). Los microorganismos del suelo y la rizosfera han evolucionado funciones que les permiten sobrevivir y poder soportar la fuerte competición que caracteriza la mayoría de esos
25 hábitats. Las bacterias de la rizosfera pueden producir metabolitos secundarios novedosos con potencial uso como fármacos y antibióticos los cuales pueden tener aplicación en humanos, veterinaria, medicina, agricultura o industria.

La rizosfera de árboles leñosos silvestres, es un medio ambiente inexplorado
30 que puede constituir una buena fuente de nuevas bacterias productoras de compuestos bioactivos. Entre los árboles silvestres y cultivados, el olivo es una de las especies de mayor longevidad y de mayor riqueza en biodiversidad

genética. Por miles de años, el olivo cultivado ha sido cultural y económicamente el principal cultivo oleaginoso en la cuenca del Mediterráneo, donde se encuentran cerca de 9.5 millones de hectáreas de cultivo. El olivo contiene una alta fuente de variabilidad genética, y ésta en la cuenca del
5 Mediterráneo se puede encontrar principalmente en dos formas: olivo silvestre (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* (Miller) Hegi) y olivo cultivado (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* L.) (Green, 2002, Kew Bulletin 57, 91-140). La larga historia del cultivo del olivo (más de 8.000 años) (Zohary y Spiegel-Roy, 1975, Science 187, 319–327) y la amplia hibridación entre árboles
10 silvestres y cultivados de olivo hacen del occidente Mediterráneo, y fundamentalmente del sur de la Península Ibérica (Besnard et al., 2002, Theoretical & Applied Genetics 104, 1353–1361) la región con mayor diversidad genética para este árbol (Lumaret y Ouazzani 2001, Nature 413, 700).

15

La longevidad y alta diversidad genética del olivo puede favorecer la selección de poblaciones microbianas específicas y bien adaptadas a la rizosfera de este cultivo que pueden constituir reservorios únicos de microorganismos con interés biotecnológico.

20

Por otro lado, las moléculas pigmentadas producidas por algunos de estos microorganismos, han sido objeto de considerables investigaciones que han ayudado a revelar cómo esas moléculas pueden proveer a ciertos microorganismos una ventaja para sobrevivir en su medio ambiente (Liu y
25 Nizet, 2009. Trends in Microbiology 17, 406-413).

Entre estos pigmentos se encuentra la violaceína, un metabolito secundario con coloración azul-morada producido por bacterias con importantes aplicaciones biológicas, biotecnológicas e industriales. Entre las actividades
30 biológicas se incluyen: actividad antibacteriana, anti-viral, anti-tripanicida, anti-protozoa y anti-ulcerogénica (Durán y Menck, 2001. Critical Reviews in Microbiology 27, 201-222; Durán et al., 2007. Biotechnology & Applied

Biochemistry 48, 127-133). Además, puede tener una prometedora aplicación clínica en el tratamiento del cáncer ya que es efectivo contra leucemia, cáncer pulmonar y linfoma celular (De Azevedo et al., 2000. Phenomena and Macrocyclic Chemistry 37, 93-101; Durán et al., 2007. Biotechnology & Applied Biochemistry 48, 127-133), puede ser usada en terapias dermatológicas contra la radiación ultravioleta (UV) (Dessaux et al., 2004. La Revue de Medicine Interne 25, 659-662), como tinte biológico en la industria para la tinción de fibras naturales y sintéticas (Shirata et al., 2000. Japan Agricultural Research Quarterly 34, 131-140) y puede proporcionar una ventaja para la supervivencia de ciertos microorganismos en su medio ambiente natural.

La violaceína es producida por varias bacterias Gram-negativas que habitan suelos y mares en medio ambientes tropicales, subtropicales y glaciares entre las que se incluyen *Chromobacterium violaceum*, la primera y más estudiada bacteria descrita como productora de violaceína (Durán y Menck, 2001. Critical Reviews in Microbiology 27, 201-222), *Collimonas sp.* (Hakvåg et al., 2009. Marine Drugs 7, 576-588), *Duganella sp.* B2 (Wang et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 44, 119-124), *Iodobacter fluviatile* (Logan, 1989. International Journal of Systematic Bacteriology 39, 450-456), *Janthinobacterium lividum* (Shivaji et al., 1991. Polar Biology 11, 267-271; Lu et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 43, 135-141), *Microbulbifer sp.* (Matz et al., 2008. PLoS ONE 3, e2744. doi:10.1371/ journal.pone.0002744), *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Pseudoalteromonas tunicata* y *Pseudoalteromonas ulvae* (Matz et al., 2008. PLoS ONE 3, e2744. doi:10.1371/ journal.pone.0002744; Yang et al., 2007. Letters in Applied Microbiology 44, 625-630).

Sin embargo, la ineficiente producción de violaceína ha restringido las aplicaciones industriales de este pigmento, y por tanto persiste el problema de encontrar nuevas fuentes productoras de violaceína en cantidades susceptibles de explotación comercial.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a las cepas bacterianas que tienen una identidad de entre un 98,6% y un 99,3% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 1 del gen de ADNr 16S, de entre un 93,7% y un 95,7% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 2 del gen *gyrB* y de entre un 89,8% y un 90,8% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 3 del gen *vioA*. Preferentemente la cepa bacteriana se selecciona de entre las cepas CECT 7779, CECT 7780 y CECT 7781 y más preferentemente la cepa bacteriana es CECT 7780. Además, la presente invención se refiere a sus combinaciones con otros microorganismos y a las composiciones que comprenden los productos anteriores, así como a un procedimiento para la producción de violaceína y a la violaceína producida para su aplicación biotecnológica y agronómica.

15

Las cepas aisladas en la presente invención han sido obtenidas de la rizosfera de olivo, una de las especies de más larga longevidad y riqueza en biodiversidad genética, y han sido caracterizadas fisiológica, bioquímica y genéticamente como nuevas cepas pertenecientes al género *Duganella* spp. productoras de violaceína (ejemplo 3). Estas cepas pudieron ser diferenciadas en base a los análisis fenotípicos y genéticos, en dos grupos de acuerdo al huésped de origen (olivo silvestre *versus* olivo cultivado) (ejemplo 2 y 3). Los olivos silvestres representan un cluster genético diferenciado constituyendo un *pool* genético independiente de los cultivares de olivo locales (Belaj et al., 2010. Scientia Horticulturae 124, 323-330).

25

Así, las cepas aisladas en la presente invención, CICYT-60 (con número de depósito CECT 7780), LO-22 (con número de depósito CECT 7779), Mico-M (con número de depósito CECT 7781), LOBA-24, Baetica-33, Mico-C y Mico-M2, pueden ser agrupadas según su origen en cepas de *Duganella* spp. procedentes de olivos silvestres (LOBA-24, Baetica-33 y LO-22) y cepas de

30

Duganella spp. procedentes de olivos cultivados (CICYT-60, Mico-M, Mico-C y Mico-M2).

Todas las cepas aisladas y preferentemente las cepas CECT 7779, CECT 7780
5 y CECT 7781 fueron capaces de producir violaceína a altos niveles de forma natural, es decir, sin intentar ninguna optimización del proceso, característica que las hace muy atractivas en aplicaciones biotecnológicas y agronómicas debido a que los bajos rendimientos de violaceína se consideran una de las principales limitaciones de las cepas silvestres para su producción y explotación comercial. Es de destacar que todas las cepas aisladas y, en
10 especial, las cepas CECT 7779, CECT 7780 y CECT 7781 tuvieron niveles de producción natural de violaceína más altos (del orden de 1,2 hasta 65 veces más) que los niveles citados previamente para otras bacterias productoras de violaceína cuando éstas crecieron en condiciones óptimas tales como la cepa de la Amazonia *Chromobacterium violaceum* (0,43 g/l) (Mendes et al., 2001. Biotechnology Letters 23, 1963-1969), *Janthinobacterium lividum* (3,50 g/l) (Lu et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 43, 135-141) o la primera
15 *Duganella* sp. B2 productora de violaceína (1,62 g/l) (Wang, H. et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 44, 119-124). Sin embargo, la cepa CECT 7780 de *Duganella* sp. fue la que mostró los mayores rendimientos produciendo casi 18 veces más que *Duganella* sp. B2, que alcanzó su máxima producción de violaceína (1.62 g/l) en el mismo medio óptimo usado en este estudio y que contenía almidón soluble como única fuente de carbono (Wang, H. et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 44, 119-124) (ejemplo 4, figura
20 5).
25

En la presente invención se revela además el potencial que poseen las cepas aisladas así como el extracto crudo de violaceína (extracto bacteriano que comprende violaceína) producido por las mismas, contra bacterias Gram-positivas. Los ensayos realizados donde se evalúa el efecto antimicrobiano
30 contra las bacterias Gram-positivas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (fitopatógena) y una cepa de *Bacillus subtilis* antagonista de

Verticillium dahliae aislada de la rizosfera de olivo, pone de manifiesto la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas frente a estas bacterias (ejemplo 5). Además, según un estudio de Barreto et al., 2008, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35, 783-790, que revela la actividad antifúngica de cepas productoras de violaceína y de su sobrenadante, es de esperar que las cepas aisladas en la invención sean capaces de actuar frente a hongos patógenos.

Por otro lado, la violaceína, como se cita en el estado de la técnica del presente documento, posee otras actividades biológicas entre las que destacan: actividad anti-viral, anti-tripanicida, anti-protozoa, anti-ulcerogénica, anti-cancerígena, actividad en terapias dermatológicas contra la radiación ultravioleta (UV) o actividad como tinte biológico en la industria para la tinción de fibras naturales y sintéticas.

Independientemente de la producción de violaceína, también se observó que las cepas aisladas de *Duganella* spp. de olivos silvestres y cultivados y, en especial, las cepas CECT 7779, CECT 7780 y CECT 7781 mostraron actividad proteolítica, lipolítica y producción de sideróforos. Es conocido que rizobacterias productoras de sideróforos mejoran el estado sanitario de las plantas a varios niveles, tales como la nutrición por hierro, y dificulta el crecimiento de patógenos, generalmente hongos, a través de limitar el hierro disponible para el crecimiento del patógeno (Kloepper et al., 1980. Nature 286, 885-886). Por lo tanto, el hecho de que las cepas de *Duganella* spp. de olivo mostraran actividad proteolítica, lipolítica y de producción de sideróforos implicaría una mejor capacidad de competencia de las cepas como habitantes de la rizosfera del olivo.

Hasta la fecha, la única cepa del género *Duganella*, productora de violaceína, conocida en el estado de la técnica es la cepa B2. La diferencia de dicha cepa B2 con respecto a cualquiera de las cepas aisladas de la presente invención es que las cepas de la invención producen entre 2,5 a 17,5 veces más violaceína.

Este hecho constituye un efecto inesperado que representa una clara mejora del estado de la técnica.

Por todo ello, la presente invención resuelve el problema técnico que plantea la
5 dificultad de encontrar una cepa bacteriana capaz de producir eficazmente violaceína, un pigmento morado con importantes aplicaciones agronómicas y biotecnológicas. En resumen, estas cepas bacterianas aisladas poseen, entre otras actividades:

- 10 - Actividad antimicrobiana, anti-viral, anti-tripanicida, anti-protocista, anti-ulcerogénica, anti-cancerígena, actividad en terapias dermatológicas contra la radiación ultravioleta (UV) o actividad como tinte biológico en la industria para la tinción de fibras naturales y sintéticas del extracto crudo de violaceína (extracto bacteriano que
15 comprende violaceína), y
- actividad proteolítica, lipolítica y producción de sideróforos, que les permiten mejorar el estado sanitario de las plantas y dificultar el crecimiento de patógenos, generalmente hongos, además de incrementar su capacidad de competencia en la rizosfera de los
20 olivos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una cepa bacteriana con una identidad de entre un 98,6% y un 99,3% con respecto al fragmento de ADN de
25 SEQ ID NO: 1 del gen de ADNr 16S, de entre un 93,7% y un 95,7% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 2 del gen *gyrB* y de entre un 89,8% y un 90,8% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 3 del gen *vioA*. Preferentemente la cepa bacteriana procede de la rizosfera de olivos cultivados y/o de olivos silvestres. Más preferentemente la cepa bacteriana es
30 bacteriana es CECT 7779, CECT 7780 o CECT 7781, y aún más preferentemente la cepa bacteriana es CECT 7780.

El término "% de identidad" entre dos secuencias de nucleótidos, tal como se entiende en la presente invención, se refiere al número de posiciones nucleotídicas sobre la longitud total de la secuencia que se compara, donde todos los nucleótidos en esa posición son idénticos.

5

Una realización preferida de la presente invención se refiere a una cepa derivada de cualquiera de las cepas descritas en el párrafo anterior donde dicha cepa mantiene o mejora las capacidades descritas a lo largo de la presente invención. El microorganismo derivado puede producirse de forma natural o bien de forma intencionada, por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo pero sin limitarse, el crecimiento de dicho microorganismo original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación de genes específicos. Preferentemente la cepa derivada es un mutante genéticamente modificado. Los términos cepa mutante o cepa derivada pueden ser utilizados indistintamente.

En la Tabla 1 se representa un análisis comparativo de los genes de ADNr 16S, *gyrB* y *vioA* de las cepas seleccionadas de la invención frente a la cepa de *Duganella violaceinigra* YIM 31327, que según los análisis filogenéticos se considera grupo basal de todas las cepas de *Duganella* spp. de olivo (ejemplo 3). Así, las cepas que presenten un porcentaje de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 (secuencia de ADN del gen ADNr 16S de la cepa *Duganella violaceinigra*), SEQ ID NO: 2 (secuencia de ADN del gen *gyrB* de la cepa *Duganella violaceinigra*) y SEQ ID NO: 3 (secuencia de ADN del gen *vioA* de la cepa *Duganella violaceinigra*, secuenciada por los investigadores) de entre un 98,6% y un 99,3%, de entre un 93,7% y un 95,7% y de entre un 89,8% y un 90,8% respectivamente, son cepas cuyos genes ADNr 16S, *gyrB* y *vioA* son homólogos a dichos genes de cualquiera de las cepas seleccionadas en la presente invención.

Tabla 1. Estudio comparativo de los genes ADNr 16S, *gyrB* y *vioA* de las cepas aisladas de la invención respecto de la cepa *Duganella violaceinigra* con nº de cepa YIM 31327.

Secuencia ADN analizada	SEQ ID NO. <i>Duganella violaceinigra</i>	Cepas de olivo	SEQ ID NO. Cepas	% Identidad respecto de <i>Duganella violaceinigra</i>
ADNr 16S	1	CICYT-60	4	98,6
		MICO-C	19	99,1
		MICO-M	10	99,0
		MICO-M2	22	99,1
		Baetica-33	16	98,9
		LO-22	7	98,9
		LOBA-24	13	99,3
<i>gyrB</i>	2	CICYT-60	5	93,7
		MICO-C	20	93,8
		MICO-M	11	94,6
		MICO-M2	23	95,3
		Baetica-33	17	95,1
		LO-22	8	94,6
		LOBA-24	14	95,7
<i>vioA</i>	3	CICYT-60	6	90,5
		MICO-C	21	90,7
		MICO-M	12	90,5
		MICO-M2	24	90,8
		Baetica-33	18	89,8
		LO-22	9	89,8
		LOBA-24	15	89,8

5

Por otro lado, en la Tabla 2 se representa un análisis comparativo de los genes de ADNr 16S, *gyrB* y *vioA* de distintas cepas, seleccionadas por poseer un

mayor grado de homología con respecto a *Duganella violaceinigra* con nº de cepa YIM 31327. A raíz de los resultados obtenidos en dicha tabla se puede afirmar que no existen en el estado de la técnica otras cepas que se encuentren dentro del rango de porcentajes de identidad, con respecto a las
5 secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 de *Duganella violaceinigra*, definido para las cepas aisladas de la invención.

Tabla 2. Estudio comparativo de los genes ADNr 16S, *gyrB* y *vioA* de distintas cepas respecto de la cepa *Duganella violaceinigra* con nº de cepa YIM 31327.

CEPAS	% IDENTIDAD RESPECTO <i>DUGANELLA</i> <i>VIOLACEINIGRA</i>		
	ADNr 16S	<i>GyrB</i>	<i>VioA</i>
<i>Duganella</i> _sp._B2	96,2	86,6	77,9
<i>Duganella zoogloeoides</i> IAM 12670	95,3	87,5	
<i>Duganella nigrescens</i> EF584756	98,7		
<i>Janthinobacterium lividum</i> EU714410	95,8	86,9	77,1
<i>Janthinobacterium lividum</i> cepa SKVTC8 EU732703			77,1
<i>Janthinobacterium lividum</i> DSM1522 DQ074977			77,1
<i>Janthinobacterium lividum</i> EU330449	95,6		76,9
<i>Janthinobacterium lividum</i> cepa BP01 EF063591			76,9
<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille CP000269		83,9	
<i>Zoogloea ramigera</i> AB014955		79,1	
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> UST011230-013		61,7	
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> ATCC 33492		69,2	
<i>Collimonas</i> _sp. CT_MP11 E6 GQ160909			77,3
<i>Collimonas</i> sp. GU062792			77,5
<i>Chromobacterium violaceum</i> JCM 1249 AB032799			62,1
<i>Chromobacterium violaceum</i> cepa ATCC 12472 AE016825			62,1
<i>Chromobacterium violaceum</i> AF172851			62,0

Como se muestra en la Tabla 2, las dos únicas cepas que poseen los genes ADNr 16S, *gyrB* y *vioA* son *Duganella* sp. B2 y *Janthinobacterium lividum* EU714410. Estas cepas poseen una homología respecto al gen ADNr 16S no mayor al 96,2%, respecto al gen *gyrB* no mayor al 86,1% y respecto al gen *vioA* no mayor al 77,9%.

De aquí en adelante, para hacer referencia a cualquiera de las cepas bacterianas descritas en párrafos anteriores que tienen entre un 98,6% y un 99,3% de identidad con la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, entre un 93,7% y un 95,7% de identidad con la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2 y entre un 89,8% y un 90,8% de identidad con la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 o cualquier fragmento de las mismas, se puede emplear el término “cepa/s bacteriana/s de la invención” o “cepa/s de la invención”. Preferentemente la cepa bacteriana de la invención es la cepa con número de depósito CECT 7779, CECT 7780 o CECT 7781. Más preferentemente la cepa bacteriana de la invención es CECT 7780.

Las cepas de *Duganella* spp. LO-22 y CICYT-60 han sido depositadas en la colección española de cultivos tipo (CECT) el 14 de septiembre de 2010 y les correspondieron los n^{os} de depósito CECT 7779 y CECT 7780 respectivamente, y la cepa de *Duganella* spp. Mico-M ha sido depositada en la colección española de cultivos tipo (CECT) el 13 de octubre de 2010 y le correspondió el n^o de depósito CECT 7781. La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Universidad de Valencia / Edificio de investigación / Campus de Burjassot / 46100 Burjassot (Valencia).

La clasificación científica de las cepas CECT 7779, CECT 7780 y CECT 7781 de la presente invención es: Reino: *Bacteria* / Filo: β -Proteobacteria / Orden: *Burkholderiales* / Familia: *Oxalobacteraceae* / Género: *Duganella* / Especie: se han identificado dos grupos genéticos diferentes que pueden ser separados de la especie tipo *Duganella violaceinigra* en función del huésped de origen (olivo cultivado (CECT 7780 y CECT 7781) y silvestre (CECT 7779)). (Descripción

científica en base la caracterización fisiológica y bioquímica (ejemplo 2), y al análisis filogenético de los genes 16S, *gyrB* y *vioA* (ejemplo 3)).

Las características de las cepas son:

5

- CONDICIONES DE CULTIVO ÓPTIMAS: Estriado en placa, medio R2A agar (*Biolofo*, Milan, Italia); Incubación a 25 °C/ 48-72 h;

Fórmula R2A (*Biolofo*) agar (g/l): Extracto de levadura: 0,5; Proteosa peptona: 0,5; Caseína ácida: 0,5; Glucosa: 0,5; Almidón soluble: 0,5; Fosfato dipotásico: 10 0,5; Sulfato magnésico: 0,024; Piruvato sódico: 0,3; Agar: 12; pH final: 7,2 ± 0,2.

- CONDICIONES DE MANTENIMIENTO: Suspensión celular en medio TSB (Caldo Soja-Triptona) + Glicerol 40% solución acuosa. (-80°C); Suspensión

15 celular en medio KMB (Medio Kings B) + Glicerol 40% solución acuosa. (-80°C)
Fórmula medio KMB (g/l): Proteosa peptona: 20; Fosfato de potasio: 1,2; Fosfato dipotásico: 1,5; Sulfato de magnesio: 1,5; Glicerol: 10; Agar: 20; pH 7,0 (hidróxido de sodio).

20 - CONDICIONES PARA LA COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD: Estriado en placa, medio R2A agar o medio KMB; Incubación a 25 °C/ 48-72 h; Sin condiciones de aireación específicas (aerobia).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la combinación de
25 microorganismos que comprende al menos una de las cepas de la invención. La combinación de microorganismos es un conjunto de células de microorganismos de al menos una de las cepas de la invención, o al menos una célula de al menos una de las cepas de la invención junto con un conjunto de células de microorganismos de otra de las cepas de la invención o de otra
30 cepa diferente de la misma especie o de diferente especie. Las células de la combinación de microorganismos pueden ser viables o no viables, en cualquier

fase del estado de desarrollo y en cualquier fase de crecimiento, estacional o estacionaria, independientemente de la morfología que presente.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a la combinación
 5 de microorganismos donde dicha combinación comprende al menos otro microorganismo diferente a las cepas de la invención, por ejemplo, pero sin limitarse, el microorganismo que puede formar parte de dicha combinación es, sin que ello suponga una limitación:

- 10 - al menos otra bacteria del género *Duganella*, donde dicha bacteria se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse *Duganella violaceinigra* (por ejemplo pero sin limitarse la cepa *Duganella violaceinigra* YIM 31327), *Duganella nigrescens* sp. nov. (por ejemplo pero sin limitarse la cepa *Duganella nigrescens* sp. nov. EF584756),
 15 *Duganella* sp. B2, *Duganella zoogleoides* o *Duganella* sp. tsz33;
- al menos una bacteria productora de violaceína, donde dicha bacteria se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse *Chromobacterium violaceum*, *Collimonas* sp., *Iodobacter fluviatile*, *Janthinobacterium lividum*, *Microbulbifer* sp., *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Pseudoalteromonas tunicata* o *Pseudoalteromonas ulvae*;
- 20 - al menos una cepa de otros grupos filogenéticos, géneros o especies de procariotas como por ejemplo pero sin limitarse a *Archaea*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Metanobacteria*, *Spirochaetes*, *Fibrobacters*,
 25 *Deferribacteres*, *Deinococcus*, *Thermus*, *Cianobacteria*, *Methanobrevibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum*, *Dorea*, *Bulleidia*, *Anaerofustis*, *Gemella*, *Roseburia*, *Catenibacterium*, *Dialister*, *Anaerotruncus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Enterobacteriaceae*,
 30 *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Bacillus*, *Butyrivibrio* o *Clostridium*.

En adelante se podrá hacer referencia a cualquiera de las combinaciones de microorganismos descritos en el párrafo anterior como la “combinación de microorganismos de la presente invención” o la “combinación de microorganismos de la invención”.

5

Otro aspecto de la invención se refiere a la violaceína producida por al menos una de las cepas de la invención o por la combinación de microorganismos de la invención, en adelante, violaceína de la invención.

10 Y otro aspecto se refiere al extracto bacteriano que comprende la violaceína de la invención, en adelante, extracto bacteriano de la invención. El término “extracto bacteriano” hace referencia tanto a los extractos propiamente dichos como a las biomasas obtenidas después del cultivo de las bacterias. Si se desea, estas biomasas pueden ser, al menos parcialmente, deshidratadas y/o
15 molidas.

Tal y como se demuestra en la presente invención, todas las cepas de *Duganella* sp. aisladas de olivo y en concreto las cepas con número de depósito CECT 7779, CECT 7780 ó CECT 7781, crecieron y produjeron
20 violaceína. Como ya se ha mencionado, todas las cepas aisladas de olivo tuvieron niveles de producción natural de violaceína, sin intentar ninguna optimización del proceso, más altos (de 1,2 hasta 65,8 veces más) que los niveles citados previamente para otras bacterias productoras de violaceína cuando éstas crecieron en condiciones óptimas (ejemplo 4).

25

Y, considerando que el rendimiento de violaceína obtenida en la producción del pigmento es un importante parámetro para la producción de la violaceína a escala industrial, la presente invención provee de un conjunto de cepas que se muestran altamente adecuadas para futuras investigaciones y aplicaciones
30 biotecnológicas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición, en adelante composición de la invención, que comprende la cepa o cepas de la invención; o la combinación de microorganismos de la invención; o la violaceína de la invención; o el extracto bacteriano de la invención; o cualquiera
5 de sus combinaciones.

La composición, definida de forma general, es un conjunto de componentes que está formado al menos por una cepa de la invención; o al menos por la combinación de microorganismos de la invención; o al menos por la violaceína
10 de la invención; o al menos por el extracto bacteriano de la invención; o cualquiera de sus combinaciones. Por tanto, dicha composición puede ser, pero sin que sirva de limitación, una composición farmacéutica o un producto fitosanitario o un producto que puede constituir la base para la elaboración de los productos anteriores.

15 La violaceína es un metabolito secundario que ha sido objeto de muchos estudios debido a sus importantes aplicaciones biológicas, biotecnológicas e industriales (citadas en el estado de la técnica del presente documento), por su potencial uso como fármacos y antibióticos los cuales pueden tener aplicación
20 por ejemplo, pero sin limitarse, en humanos, veterinaria, medicina, agricultura o industria.

Así, una realización preferida de la presente invención se refiere a la composición de la invención, donde dicha composición es una composición
25 farmacéutica. En una realización aún más preferida, la composición farmacéutica además comprende, al menos, un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

El término “composición farmacéutica” hace referencia a todo producto
30 destinado al uso humano o animal presentado en su forma farmacéutica, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico, fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una mejora del estado general de su

salud, por ejemplo una aplicación cosmética, aunque puede no implicar un efecto fisiológico en el organismo, implica una mejora en el bienestar del sujeto relacionada con su psicología. Por tanto, las composiciones farmacéuticas pueden ser cosméticos, alimentos que posean acción terapéutica; preparaciones farmacéuticas con base en recursos naturales, productos generados por biotecnología, productos biológicos, productos homeopáticos o un producto que puede constituir la base para la elaboración de los productos anteriores o la base para la elaboración de un medicamento. Preferiblemente la composición farmacéutica se usa para la elaboración de un medicamento.

10

El término “cosmético” hace referencia a una formulación de aplicación local, fundamentada en conceptos científicos, destinada al cuidado y mejoramiento de la piel humana y sus anexos, sin perturbar las funciones vitales, sin irritar, sensibilizar, o provocar efectos secundarios indeseables atribuibles a su absorción sistemática o su aplicación local. Esta sustancia o preparado está destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, y/o corregir los olores corporales, y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado.

15

20

El término “preparación farmacéutica con base en recursos naturales” hace referencia al producto medicinal empaquetado y etiquetado, cuyos ingredientes activos están formados parcialmente con recursos naturales de uso medicinal o asociaciones de éstos, en estado bruto o en forma farmacéutica y que se utiliza con fines terapéuticos.

25

El “vehículo” o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en la composición farmacéutica para diluir cualquiera de los componentes de la composición de la

30

invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente
5 aceptable es el diluyente.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición
10 farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección de la composición farmacéutica como por ejemplo para aislarla del aire y/o la
15 humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que,
20 incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición de la invención y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de
25 la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes.

La “forma galénica o forma farmacéutica” es la disposición a la que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir una composición
30 farmacéutica. Se define por la combinación de la forma en la que la composición es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo estén permitidos y evaluados de modo que no causen daño a los organismos a los que se administra.

5 La actividad antimicrobiana demostrada por las cepas aisladas de olivo y por el extracto bacteriano de la invención (extracto crudo de violaceína) contra bacterias fitopatógenas Gram-positivas (ejemplo 5), así como la actividad antifúngica que han demostrado varias cepas productoras de violaceína junto con otras actividades que poseen las cepas de la invención como por ejemplo
10 pero sin limitarse, actividad proteolítica, lipolítica y producción de sideróforos, que pueden conferir a estas cepas un importante papel en el biocontrol de las enfermedades de las plantas, una mejor capacidad de competencia como habitantes de la rizosfera del olivo, y un potencial antagonista contra, pero sin limitarse, hongos del suelo, bacterias fitopatógenos, nematodos fitoparásitos y
15 protozoos en la rizosfera del olivo, las hacen especialmente útiles para la elaboración de productos fitosanitarios.

Por ello, otra realización preferida de la presente invención se refiere a la composición de la invención, donde dicha composición es un producto
20 fitosanitario.

El término "producto fitosanitario" hace referencia a aquella sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir la acción de, o destruir directamente, insectos (insecticidas), ácaros (acaricidas), moluscos (molusquicidas), roedores
25 (rodenticidas), hongos (fungicidas), malas hierbas (herbicidas), bacterias (antibióticos y bactericidas) y otras formas de vida animal o vegetal perjudiciales para la salud pública y también para la agricultura (es decir, considerados como plagas y por tanto susceptibles de ser combatidos con plaguicidas); durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y
30 elaboración de productos agrícolas y sus derivados. Entre los productos fitosanitarios se incluyen también los plaguicidas, defoliantes, desecantes y las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o fitorreguladores.

Una realización más preferida de la presente invención se refiere al producto fitosanitario donde dicho producto es un bactericida, que preferentemente actúa frente a bacterias Gram-positivas, o un fungicida.

- 5 En otra realización aún más preferida, la composición de la invención además comprende otra sustancia activa. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, donde dicha composición puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de al menos una de
10 las cepas de la invención, la combinación de microorganismos de la invención o la violaceína, y otro agente terapéutico.

El término “sustancia activa” es toda materia, cualquiera que sea su origen, humano, animal, vegetal, químico o de otro tipo, a la que se atribuye una
15 actividad apropiada para constituir una composición farmacéutica o un producto fitosanitario.

La forma de presentación de la composición farmacéutica o del producto fitosanitario en cada caso se adaptará al tipo de administración utilizada, por
20 ello, la composición de la invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad
25 terapéuticamente efectiva” se refiere a aquella cantidad de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de la violaceína producida por la cepa o cepas de la invención; o cualquiera de sus combinaciones que cuando se administra a un sujeto, preferentemente animal o vegetal y más preferentemente una planta o un mamífero, con preferencia un
30 humano, es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o condición patológica de interés en dicho sujeto. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo,

según la actividad de la cepa de la invención; o la combinación de microorganismos de la invención; o la violaceína producida por la cepa o cepas de la invención; o cualquiera de sus combinaciones, en cualquier forma de presentación. La cantidad terapéuticamente efectiva variará también según la

5 estabilidad metabólica y duración de la acción del compuesto; y, en el caso de que el paciente sea un mamífero, según la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la

10 gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un experto en la materia según su propio conocimiento y esta descripción.

El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una

15 enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la
- 20 regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la

25 enfermedad o la condición patológica en el sujeto, en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

Preferentemente, la composición farmacéutica se presenta en una forma

30 adaptada a la administración oral. Otra posibilidad es que la composición farmacéutica se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

Preferentemente el producto fitosanitario se presenta, en una forma adaptada a la aplicación en forma de pulverización, el método más frecuente de administración del producto fitosanitario, ya que la mayoría de estos productos son formulados para su dispersión en agua, es decir, se pueden formular en
5 forma de polvo, granulado, cápsulas, polvo soluble, polvo mojable, líquido soluble, líquido emulsionable o suspensión coloidal.

La cepa de la invención; la combinación de microorganismos de la invención; la violaceína o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa de
10 la invención, o a partir de la combinación de microorganismos de la invención; pueden ir asociados, por ejemplo, pero sin limitarse, con liposomas o micelas. Un liposoma es una vesícula esférica con una membrana fosfolipídica. El liposoma contiene un núcleo de solución acuosa. La micela es un lípido esférico que contiene material no acuoso. Tanto los liposomas como las
15 micelas pueden utilizarse como transportadores de diversas sustancias entre el exterior y el interior de la célula.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención donde el producto fitosanitario previene la acción de al menos una
20 bacteria Gram-positiva o provoca la muerte de dicha bacteria.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de la violaceína de la invención; o del extracto bacteriano de la invención; o de la
25 composición de la invención; para la fabricación de un medicamento. El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario.

El término "medicamento" tiene un significado más limitado que el significado
30 de "composición farmacéutica", tal como se define en la presente invención, ya que el medicamento implica necesariamente un efecto terapéutico es decir, un efecto fisiológico en el metabolismo del sujeto.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia obtenida a partir de principios activos, con o sin sustancias auxiliares, usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento, curación o rehabilitación de enfermedades en el hombre y los animales.

- 5 También se incluyen en esta definición los alimentos que posean una acción o se administren con finalidad terapéutica o se anuncien con propiedades medicinales.

Por tanto, el medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán “medicamentos veterinarios” las “premezclas para piensos medicamentosos” elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

- 25 La forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, el medicamento se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva.

- 30 Preferentemente el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral, cutánea, oral, epidural, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

El término "forma adaptada" hace referencia al modo de adecuar el medicamento, la composición farmacéutica o el producto fitosanitario de la presente invención para que puedan ser administrados.

- 5 La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de
- 10 administración parenteral. La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral, es decir, se puede formular en forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa. Dicha forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea,
- 15 solución, vial bebible, comprimido, cápsula, polvo, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado. La forma adaptada a la administración rectal se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, supositorio, cápsula rectal, dispersión rectal o pomada rectal. La forma adaptada a la administración transdérmica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, parche
- 20 transdérmico o iontoforesis.

- El medicamento puede formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en
- 25 disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y
- 30 nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, el medicamento puede prepararse para su administración en forma sólida. El medicamento puede combinarse con varios vehículos o

excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio; deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Por otro lado, investigaciones previas han demostrado que la producción de violaceína para las bacterias productoras de violaceína incluyendo *Chromobacterium violaceum*, *Duganella sp. B2*, *Janthinobacterium lividum* y *Pseudoalteromonas luteoviolacea* es afectada por diversos factores de crecimiento y condiciones de cultivo tales como la temperatura, agitación, volumen de cultivo, componentes del medio y pH (Inniss y Mayfield, 1979. Microbial Ecology 5, 51-56; Stephens, 2004. Current Biology 14, R65-R66; Pantanella et al., 2007. Journal of Applied Microbiology 102, 992-999; Yang et al., 2007. Letters in Applied Microbiology 44, 625-630; Lu et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 43, 135-141; Wang et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 44, 119-124).

Así, otro aspecto de la presente invención se refiere al método, en adelante método de la invención, para la producción de violaceína o para la producción del extracto bacteriano que contiene violaceína, donde dicho método comprende los pasos de:

- a. Seleccionar una cepa bacteriana de la invención o la combinación de microorganismos de la invención,
- b. cultivar la cepa o la combinación de microorganismos del paso (a) en condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento y desarrollo del microorganismo, y
- c. extraer la violaceína o el extracto bacteriano del cultivo del paso (b).

En una realización preferida del método de la invención, la cepa o combinación de microorganismos según el paso (a) se selecciona de una muestra procedente de la rizosfera de olivos cultivados y/o de olivos silvestres.

5 La evaluación *in vitro* para la producción de violaceína (ejemplo 1) determinó que todas las cepas bacterianas aisladas de olivo crecieron mejor y produjeron pigmento morado a 25°C en comparación con el resto de temperaturas ensayadas (incluyendo 4, 10, 25, 28, 30, 37 y 40±1°C) después de cinco días de incubación en medio R2A (ejemplo 1, Tabla 4). Cuando se evaluaron
10 diferentes medios de cultivo a 25°C (R2A agar, triptona soja agar (TSA), 1/10 caldo triptona soja (TSB) suplementado con antibióticos, extracto de levadura malta agar (YMA), y agar nutritivo (NA)) el mejor crecimiento ocurrió en el medio R2A donde todas las cepas mostraron una fuerte producción del pigmento morado después de 48h de incubación, seguido por los medios TSA,
15 y 1/3x KMB con y sin antibióticos (ejemplo 1, Tabla 5). Otras condiciones utilizadas específicamente para la producción de violaceína fueron en medio líquido: pH 6,7, nitrato de potasio, sulfato de amonio ferroso, fosfato dipotásico, sulfato de magnesio, extracto de carne, L-triptofano y almidón soluble según se describe en (Wang et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 44, 119-124).

20

La extracción de violaceína o del extracto bacteriano del cultivo del paso (b) se realiza por cualquier técnica descrita en el estado de la técnica y que conoce el experto en la materia. En el ejemplo 4 de la presente invención se describe una de las técnicas que puede ser usada para la extracción.

25

Además, la violaceína cruda puede ser separada y, si se desea, purificada por métodos convencionales, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución (ver ejemplo 4).

30 La presente invención también contempla la violaceína o el extracto bacteriano que comprende violaceína, obtenidos por el método descrito en párrafos anteriores.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

10

Fig. 1. Muestra la relación filogenética (*Neighbor-Joining*) de las secuencias ADNr 16S de las cepas de *Duganella* spp. de olivo silvestre y cultivado con otras bacterias productoras de violaceína.

15 Las secuencias de ADN más cercanas del gen ADNr 16S en el *GenBank* fueron usadas para comparación. Las cepas marcadas en negrita son cepas tipo o referidas específicamente a lo largo del presente documento. La secuencia AJ496445 de *Collimonas fungivorans* CTE227 fue usada como grupo externo. Delante del nombre de cada una de las cepas se muestran los
 20 números de depósito obtenidos de la base de datos de *GenBank*. Solo se indican los valores *Bootstrap* mayores de 50% en los nodos de los cluster principales.

Fig. 2. Muestra la relación filogenética (*Neighbor-Joining*) de las secuencias de los genes *gyrB* (Fig. 2A) y *vioA* (Fig. 2B) de las cepas de *Duganella* spp. de olivo silvestre y cultivado con otras bacterias productoras de violaceína.

Las secuencias de ADN de ambos genes disponibles en el *GenBank* fueron
 30 usadas para comparación. Las secuencias del gen *gyrB* de *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (Fig. 2A) y *vioA* de *Collimonas* sp. (Fig. 2B) fueron usadas como

grupo externo. Solo se indican los valores *Bootstrap* mayores de 50% en los nodos de los cluster principales.

Fig. 3. Muestra el análisis de Cluster de los datos fisiológicos de la Tabla 6 (ejemplo 2), y resultados APIZYM y Biolog GN2 tratados de forma independiente de *Duganella* spp. de olivos silvestres y cultivados.

El algoritmo UPGMA fue aplicado a la matriz de similaridad generada para cada experimento de forma independiente usando el coeficiente Dice (binario) (Fig. 3A) o el coeficiente de correlación de Pearson (datos APIZYM y Biolog) (Fig. 3B y 3C, respectivamente). Valores en los nodos indica el soporte de *Bootstrap*.

El color blanco-negro en los datos correspondientes a la tabla 6 en la figura 3 indican valores de 0 (no actividad) y 1 (actividad), respectivamente, y la mayor intensidad de color gris denota mayores valores de actividad (datos APIZYM y Biolog).

Fig. 4. Muestra el análisis de Cluster combinando los datos fisiológicos de la Tabla 6 (ejemplo 2), resultados APIZYM y Biolog GN2 de *Duganella* spp. de olivos silvestres y cultivados.

El algoritmo UPGMA fue aplicado al consenso de la matriz de similaridad generada al combinar la matriz obtenida en cada experimento de forma independiente usando el coeficiente Dice (binario) (Fig. 3A) y el coeficiente de correlación de Pearson (datos APIZYM y Biolog) (Fig. 3B y 3C, respectivamente). Valores en los nodos indica el soporte de *Bootstrap*.

El color blanco-negro en los datos correspondientes a la tabla 6 en la figura 4 indican valores de 0 (no actividad) y 1 (actividad), respectivamente, y la mayor intensidad de color gris denota mayores valores de actividad (datos APIZYM y Biolog).

Fig. 5. Muestra la producción de violaceína por las cepas de *Duganella* spp.

Fig. 5A. Muestra la producción de violaceína por *Duganella* spp. creciendo en
5 el medio descrito por Wang et al., 2009, Biochemical Engineering Journal 44,
119-124, usando 10% o 20% v/v de inicio del cultivo.

Barras con diferente letra sobre ellas en mismo color y forma o con un asterisco
(*) indicaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre cepas o entre cultivos
10 iniciales, respectivamente, de acuerdo al contraste protegido de Fisher de las
mínimas diferencias significativas. Los resultados son valores de medias \pm
desviación estándar de tres repeticiones.

Fig. 5B. Muestra el espectro visible-UV de la violaceína comercial y extracto
15 crudo en etanol de cultivos de *Duganella* spp. de olivo silvestre (LO-22) y
cultivado (CICYT-60 y MICO-M).

Para evitar repetición, únicamente tres espectros UV-vis de HPLC de las cepas
seleccionadas son mostrados.

20

Fig. 6. Muestra la actividad antibacteriana de las cepas de *Duganella* spp. frente a una cepa de *Bacillus subtilis* aislada de la rizosfera de olivo.

La actividad antibacteriana se determinó mediante ensayos en cultivo-duales *in*
25 *vitro* utilizando el medio *Waskman* agar.

comercial, violaceína comercial.

EJEMPLOS

30

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por
los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de distintas

cepas provenientes de la rizosfera de olivos silvestres y cultivados para producir violaceína, un pigmento morado que ha mostrado importantes aplicaciones biotecnológicas y agronómicas.

5 A lo largo de los distintos ejemplos se demuestra cómo las cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado (CICYT-60 (con número de depósito CECT 7780), LO-22 (con número de depósito CECT 7779), Mico-M (con número de depósito CECT 7781), LOBA-24, Baetica-33, Mico-C y Mico-M2) y que fueron caracterizadas fisiológica, bioquímica y genéticamente
 10 (mediante análisis filogenéticos de los genes ADNr 16S, *gyrB* y *vioA*) como nuevas cepas de *Duganella* spp. producen violaceína con un rendimiento mayor respecto del resto de bacterias productoras de violaceína previamente documentadas cuando éstas crecieron en condiciones óptimas. Además, estas cepas pudieron ser diferenciadas en base a los análisis fenotípicos y genéticos
 15 en dos grupos de acuerdo al huésped de origen (olivo silvestre *versus* olivo cultivado).

Por otro lado, también se ha evaluado la actividad antimicrobiana de las bacterias y del extracto crudo de violaceína obtenido de las mismas contra
 20 bacterias fitopatógenas, encontrando efecto antimicrobiano frente a las dos bacterias Gram-positivas evaluadas, la fitopatógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y una cepa de *Bacillus subtilis* antagonista de *Verticillium dahliae* aislada de la rizosfera de olivo.

25 Independientemente de la producción de violaceína, se ha observado que las cepas aisladas de *Duganella* spp. de olivos silvestres y cultivados mostraron actividad proteolítica y lipolítica y producción de sideróforos, lo que implicaría que dichas cepas poseerían una mejor capacidad de competencia como habitante de la rizosfera del olivo, debido a que serían capaces de mejorar el
 30 estado sanitario de las plantas a varios niveles, tales como la nutrición por hierro, y dificultar el crecimiento de patógenos, generalmente hongos, a través de limitar el hierro disponible para el crecimiento del patógeno.

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones de la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. AISLAMIENTO Y CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS CEPAS CON PIGMENTACIÓN MORADA.

10

Las raíces de olivo de 92 fincas comerciales localizadas en las principales áreas olivareras de las provincias de Córdoba, Jaén, Sevilla y Granada y de 11 zonas con olivos silvestres localizados en el área potencial donde se pueden localizar tanto acebuches verdaderos (por ejemplo, formas silvestres en áreas naturales) como formas asilvestradas (por ejemplo, derivados sexuales secundarios de clones cultivados o productos de hibridación entre árboles cultivados y acebuches cercanos) (Lumaret y Ouazzani, 2001, Nature 413, 700), localizados en las provincias de Córdoba y Cádiz, fueron muestreados en Andalucía, sur de España en la primavera del 2009 (Tabla 3). Suspensiones bacterianas de la rizosfera fueron diluidas en serie y sembradas en medio R2A agar (*Biolife*, Milan, Italia) e incubadas a $28\pm 1^\circ\text{C}$ por 72h en oscuridad.

20

Tabla 3. Localización, altitud y características climáticas de los sitios de origen de las cepas aisladas de *Duganella* spp.

Cepa	Plantas olivo	Localización	Coordenadas	Alt ^a	Características climáticas ^b		
					Clasificación	°C	mm
LO-22	Silvestre >200 años	8,0 Km SO Benalup- Casas Viejas, Cádiz	36°18'43,65"N 5°54'1,14" O	53	Mediterráneo Marítimo	17- 19	600-800
LOBA-24	Silvestre >200 años	7,4 Km SO Benalup- Casas Viejas, Cádiz	36°18'26,64"N 5°52'56,01" O	47	Mediterráneo Marítimo	17- 19	600-800
Baetica-33	Silvestre >200 años	1,5 km E Vejer, Cádiz	36°14'32,64"N 5°57'1,63" O	14	Mediterráneo Marítimo	17- 19	1200- 1600
MICO-C MICO-M	Cultivado cv. Arbequina 5 años	6,03 Km S Villafranca, Córdoba	37°54'27,53"N 4°34'3,52"O	160	Mediterráneo Subtropical	15- 17	400-600
MICO-M2	Cultivado cv. Arbequina 4 años	3,05 Km SO, Córdoba	37°51'24,54"N 4°48'5,32"O	175	Mediterráneo Subtropical	15- 17	400-600
CICYT-60	Cultivado cv. Picual >100 años	3,2 Km SE Alcaudete, Jaén	37°36'17,65"N 4°7'8,95"O	530	Mediterráneo Subtropical	15- 17	400-600

^a Altitud por encima del nivel del mar (m).

^b Clasificación climática (J. Papadakis, 1966), temperatura media anual en °C, y precipitación anual en mm. fueron obtenidos de *SigMapa*, Sistema de Información Geográfica del Ministerio Español de "Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino" (<http://sig.mapa.es/geoportal/>).

CV., cultivar.

Después del periodo de incubación, se observó la aparición de colonias bacterianas con pigmentación morada en cerca del 10% de las muestras que fueron purificadas para su posterior caracterización fisiológica, bioquímica y molecular.

5

Las bacterias con pigmentación morada fueron identificadas en 27,3% de las muestras de las raíces tomadas de olivos silvestres en la provincia de Cádiz, y únicamente en 4,4% de las muestras de raíces de 92 fincas comerciales de olivo muestreados en toda Andalucía. Es de destacar que a pesar de que ocho variedades diferentes crecidas sin patrón fueron muestreadas en las fincas comerciales, las bacterias con pigmentación morada fueron aisladas únicamente de los cvs. (cultivares) Arbequina y Picual (Tabla 3).

Siete cepas de las bacterias pigmentadas fueron seleccionadas para estudios posteriores. De éstas, tres cepas (Baetica-33, LO22 y LOBA-24) provinieron de la rizosfera de acebuches centenarios (edad mayor de 200-años basados en el diámetro del tronco; Michelakis, 2002. Proceedings of International Symposium, Sitia, Crete, Greece) localizados en diferentes áreas geográficas; dos cepas (MICO-C, MICO-M) provinieron de la misma finca comercial a partir de la rizosfera de olivos del cv. (cultivar) Arbequina con una edad de 5 años inoculados (MICO-M) o no (MICO-C) con un producto comercial a base de micorrizas (*Mycosim-TRITON*, *MYCOSIM International AG*, *Basel Switzerland*) durante su fase de producción en vivero; la cepa MICO-M2 provino de un campo comercial diferente a partir de la rizosfera de olivos del cv. Arbequina de 4 años de edad inoculados con el mismo inóculo micorrízico; y la cepa CICYT-60 provino de una finca comercial con olivos centenarios del cv. Picual (>100 años de edad).

1.1. Condiciones de cultivo óptimas.

El crecimiento y la producción del pigmento morado de todas las cepas bacterianas fue evaluado en diferentes medios sólidos y líquidos a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48h. en oscuridad. Los medios evaluados fueron: R2A agar, triptona soja agar (TSA), 1/10

caldo triptona soja (TSB) suplementado con antibióticos (Landa et al., 2003. Phytopatology 93, 982-994), extracto de levadura malta agar (YMA), y agar nutritivo (NA). Todos los medios fueron adquiridos a *Difco Laboratories* (Detroit, Michigan, USA). Adicionalmente, se evaluó el crecimiento y producción de violaceína de las siete cepas bacterianas en medio R2A a diferentes temperaturas incluyendo 4, 10, 5 25, 28, 30, 37 y 40 ±1°C y en condiciones de oscuridad.

Todas las cepas bacterianas crecieron mejor y produjeron pigmento morado a 25°C en comparación con las temperaturas de 15, 20, 28, 30, y 34°C; sin embargo, 10 ninguna de las cepas creció a 40°C después de cinco días de incubación en medio R2A. Las cepas MICO-M, MICO-M2, y CICYT-60 fueron capaces de crecer a 4 y 37°C, pero no fue evidente la producción del pigmento morado (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción del pigmento morado en medio R2A de las cepas aisladas de la rizosfera de olivo silvestre y 15 cultivado

T ^a (°C)	Olivo silvestre			Olivo cultivado			
	LO-22	LOBA-24	Baetica-33	Mico-C	Mico-M	Mico-M2	CICYT-60
4	-/- ^a	±/-	-/-	-/-	±/-	±/-	±/-
15	+/+	+/+	+/+	+/-	+±	+±	+±
20	++/++	++/±	+/+	+/-	++/±	++/±	++/+
25	++/++	++/++	++/++	++/±	++/++	++/++	++/++
28	++/+	++/+	++/+	++/±	++/+	++/+	++/+
30	++/+	++/±	++/±	++/-	++/-	++/-	++/+
34	+/-	+/-	±/-	+/-	+/-	+/-	+/-
37	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
40	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

^a Crecimiento/producción de pigmento morado (++)= fuerte, (+)= positivo, (±)= débil 20 ó (-)= negativo.

Cuando se evaluaron diferentes medios de cultivo a 25°C, el mejor crecimiento ocurrió en el medio R2A donde todas las cepas mostraron una fuerte producción del pigmento morado después de 48h de incubación, seguido por los medios TSA, y 1/3x KMB con y sin antibióticos (Tabla 5). Adicionalmente, todas las cepas fueron capaces de crecer en medio líquido 1/3x KMB+++ (suplementado con los antibióticos ampicilina, cloranfenicol y cicloheximida) y en 1/10x TSB+ (suplementado con cicloheximida).

Tabla 5. Crecimiento/producción de color morado en medio de cultivo (25°C) de las cepas de *Duganella* spp. aisladas de la rizosfera de olivos silvestres y cultivados y de dos *Duganella* spp. descritas hasta la fecha

Medios de cultivo ^a	Olivos silvestres			Olivos cultivados				Cepas de referencia ^b	
	LO-22	LOBA-24	Baetica-33	Mico-C	Mico-M	Mico-M2	CICYT-60	<i>D. violaceinigra</i> YIM 31327	<i>D. zoogloeoides</i> IAM 12670
R2A	++/++	++/++	++/++	++/±	++/++	++/++	++/++	nr	nr
1/3x King's B agar (1/3x KMB)	++/++	++/++	++/++	++/±	++/++	++/++	++/++	nr	nr
1/3x KMB+++ agar	++/+	++/+	++/+	++/±	++/+	++/+	++/+	nr	nr
Tripton soja agar (TSA)	++/+	++/+	++/+	++/±	++/+	++/+	++/+	nr	nr
Levadura malta agar (YMA)	+/±	+/±	+/±	+/±	+/±	+/±	+/±	+/+	nr
Agar nutritivo (NA)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-

^a Pruebas de crecimiento, asimilación, o producción (++)= fuerte, (+) = positivo, (±)= débil, (-)= negativo.

^b Datos de *Duganella violaceinigra* YIM 31327T fueron tomados de Li et al. 2004, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 1811-1814 y de *Duganella zoogloeoides* IAM 12670T de Hiraishi et al. 1997, International Journal of Systematic Bacteriology 47:1249-1252. nr= no citado.
 5 (+*) Referido como utilización de fuentes de carbono en Li et al. 2004, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 1811-1814.

Fórmula medio R2A (Biolife) agar (g/l): extracto de levadura: 0,5; proteosa
 10 peptona: 0,5; caseína ácida: 0,5; glucosa: 0,5; almidón soluble: 0,5; fosfato dipotásico: 0,5; sulfato magnésico: 0,024; piruvato sódico: 0,3; agar: 12; pH final: 7,2 ± 0,2. Fórmula medio 1/3 KMB (g/l): proteosa peptona: 6,7; fosfato de potasio: 0,4; fosfato dipotásico: 0,5; sulfato de magnesio: 0,5; glicerol: 3,3; agar: 20; pH 7,0 (hidróxido de sodio). Fórmula medio TSA (g/l): peptona de caseína:
 15 15; peptona de soja: 5; cloruro de sodio: 15; agar: 15; pH final: 7,3. Fórmula medio TSB (g/l): digestivo pancreático de caseína: 17; digestivo enzimático de soja: 3; cloruro de sodio: 5; fosfato dipotásico: 2,5; dextrosa: 2,5 g; agar: 15; pH final: 7,3. Fórmula medio YMA (g/l): extracto de levadura: 3; extracto de malta: 3; peptona: 5; glucosa: 10; agar: 20, pH final: 7,3. Fórmula medio NA (g/l):
 20 peptona de gelatina: 5,0; extracto de carne: 3 g; agar: 15; pH final: 7,2.

EJEMPLO 2. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA.

La prueba de oxidación-fermentación de la glucosa (O-F) y la habilidad de producir
 25 ácido a partir de carbohidratos y compuestos relacionados fue monitorizado por el método de Hugh, R. y Leifson, E.,1953, Journal of Bacteriology 66, 24-26. La actividad de catalasa y oxidasa fue determinada siguiendo los procedimientos descritos por Bergey, D.H., 1994, Baltimore: Williams & Wilkins, 636-642. La tinción de Gram fue realizada utilizando cultivos bacterianos puros de 48h. de edad. La
 30 actividad proteolítica fue evaluada utilizando el ensayo en placas con un medio semi-cuantitativo utilizando leche desnatada-agar, mientras que la actividad lipolítica fue evaluada utilizando el medio *Tween* 80-agar; ambas actividades se

detectaron por la presencia de halos claros y halos turbios respectivamente alrededor del crecimiento de las colonias bacterianas. La producción de sideróforos fue evaluada bajo condiciones de limitación de hierro utilizando el ensayo universal para la producción de sideróforos (Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Analytical Biochemistry 160, 47-56). Todas las pruebas fisiológicas y bioquímicas fueron realizadas a 28°C en condiciones de oscuridad.

Para el ensayo de utilización de fuentes de carbono y enzimas utilizando el sistema de microplacas Biolog GN2 (Biolog, Barcelona, España) y el sistema APIZYM (Biomérieux, Madrid, España) se usaron suspensiones bacterianas acuosas en 0.85% NaCl.

Para las placas APIZYM, los cultivos fueron incubados a $28\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24h. Posteriormente, las galerías fueron activadas agregando 30 μl de cada reactivo (ZYM A y ZYM B; BioMérieux), y tras un periodo de 5 min a temperatura ambiente se realizó una evaluación semi-cuantitativa de la actividad enzimática utilizando como referencia una tabla colorimétrica estándar asignando un valor numérico de 0 a 5 (equivalente de 0 a 40 nmol) (Sciancalepore et al., 1996. Toxicological & Environmental Chemistry 55, 145-158), dependiendo de la intensidad de color del sustrato cromogénico producido por la reacción de hidrólisis.

Las placas Biolog fueron incubadas durante 5 días a $28\pm 1^\circ\text{C}$ midiendo periódicamente la absorbancia a 585 nm. utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia *Tecan Safire* (Tecan España, Barcelona, España). El promedio del desarrollo de color de todos los pocillos (*Average Well Colour Development*) (AWCD) de cada placa fue calculado como la media de los valores de absorbancia para todas las respuestas de los pocillos por cada tiempo de lectura. La cinética de AWCD fue usada para determinar la velocidad y el nivel asintótico de asimilación de los sustratos. Se realizó un análisis de 'cluster' o agregación en el que los dendrogramas fueron construidos utilizando la matriz de similaridad a partir de los datos de caracterización fenotípica utilizando el coeficiente de *Dice* (datos binarios) o el coeficiente de correlación de *Pearson* (datos cuantitativos). Se utilizó el análisis

UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) para el análisis de agregación con el paquete *Bionumerics* 6.1 (*Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium*). La significancia de los nodos fue evaluado por análisis *Bootstrap* o de soporte sobre 1.000 aleatorizaciones.

5

Las cepas aisladas de olivo silvestre y cultivado fueron Gram-negativas, no fermentativas (catabolizaron la glucosa en forma oxidativa en la prueba O-F), catalasa +, oxidasa +, y la mayoría de ellos mostraron actividad proteolítica y lipolítica. Además, todas las cepas mostraron producción de sideróforos. La mayoría de las cepas produjeron ácido a partir de galactosa, pero en general, no lo hicieron cuando se utilizaron otras fuentes de carbono. Las cepas difirieron en muchas características con respecto a la especie tipo de *Duganella* (*D. zooglooides*) (Hiraishi, A., et al., 1997. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 1249-1252) y en algunas características con respecto a *Duganella violaceinigra* (Wen-Jun et al., 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1811-1814), principalmente en la producción de ácido a partir de glucosa en forma oxidativa y en la actividad oxidasa. También todas las cepas difirieron de *Duganella violaceinigra* en al menos dos de las cinco actividades enzimáticas determinadas por el sistema *API* comparadas con las citadas en Wen-Jun et al., 2004, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1811-1814 (Tabla 6).

10
15
20

Tabla 6. Características fenotípicas diferenciales de las cepas de *Duganella* spp. aisladas de la rizosfera de olivos silvestres y cultivados y de dos *Duganella* spp. descritas hasta la fecha.

5

Características	Olivos silvestres				Olivos cultivados				Cepas de referenci	
	LO-22	LOB-24	Baetica-33	Mico-C	Mico-M	Mico-M2	CICYT-60	<i>D. violaceinigra</i> YIM 31327	<i>D. zooglucoides</i> IAM 12670	
Reacción Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Producción oxidativa de ácido de glucosa (O/F test)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Actividad proteolítica	+	+	+	+	+	-	+	NI	NI	
Actividad lipolítica en Tween 80	+	+	+	-	-	-	-	NI	NI	
Producción de sideróforos	±	±	±	±	±	±	±	NI	NI	
Pigmentación de colonias	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Violeta-negro	Amarillo	
Producción de ácido de:										
L(+)-arabinosa	-	-	-	+	+	+	+	NI	+	
D(+)-glucosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
D(+)-galactosa	-	+	+	-	-	+	+	+	+	
D(+)-trehalosa	-	+	-	-	-	-	+	NI	NI	
L(-)-sorbitosa	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	
α-D-metil glucósido	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	
Maltosa	-	-	+	-	-	-	-	+	+	
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
D (-) manitol	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	NI	-	
meso- inositol	-	-	-	-	-	-	-	NI	-	

^a Pruebas de crecimiento, asimilación, o producción (++)= fuerte, (+) = positivo, (±)= débil, (-)= negativo.

^b Datos de *Duganella violaceinigra* YIM 31327T fueron tomados de Li et al. 2004, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1811-1814, y
 5 de *D. zoogloeoides* IAM 12670T de Hiraishi et al. 1997, *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:1249-1252.

nr= no citado. (+*) Referido a la utilización de fuentes de carbono en Li et al. 2004, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1811-1814.

10 Basados en el análisis cluster de características fenotípicas (Tabla 6), en las pruebas de APIZYM y Biolog GN2, las siete cepas pudieron ser claramente diferenciadas y fueron consistentemente agrupadas en dos clusters principales según el origen de las cepas, bien cuando los datos de cada una de ellas fueron procesadas independientemente (Fig. 3) o cuando los datos de los tres
 15 experimentos fueron combinados (Fig. 4).

EJEMPLO 3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES ADN_r 16S, *gyrB* y *vioA*.

20 El ADN de las cepas bacterianas fue aislado utilizando el kit de extracción *UltraCleanTM microbial DNA kit* (MoBio Laboratories, Inc., CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, se utilizó ADN de la cepa tipo de *Duganella violaceinigra* CCUG 50881T (igual a *Duganella violaceinigra* YIM 31327T) en los estudios moleculares.

25

Las cepas fueron identificadas a nivel de género/especie mediante la secuenciación de la región ADN_r 16S usando los iniciadores 8f (SEQ ID NO: 25) y 1492r (SEQ ID NO: 26) según Landa et al., 2003, *Phytopatology* 93, 982-994. El gen *gyrB* fue amplificado con los iniciadores Up-1G- (SEQ ID NO: 27) y Up-2G-
 30 (SEQ ID NO: 28) descritos por Mavrodi et al. 2010, *Applied & Environmental Microbiology* 76, 866-879. Además, se utilizaron el par de iniciadores degenerados VPA3 (SEQ ID NO: 29) /VPA4 (SEQ ID NO: 30) (Hakvåg et al., 2009. *Marine*

Drugs 7, 576-588) para amplificar un segmento de aproximadamente 1,0 kb del gen *vioA* que codifica la flavoenzima *vioA*, que se seleccionó debido al mayor número de secuencias disponibles en la base de datos *GenBank* para este gen en comparación con otros genes para la síntesis de violaceína en diferentes géneros de bacterias.

Las secuencias amplificadas fueron purificadas utilizando el kit *PureLink PCR* (*Invitrogen*, Barcelona, España). La práctica totalidad de la longitud de los genes amplificados ADNr 16S (de aproximadamente 1,5 kb), *gyrB* (de aproximadamente 1,0 kb) y *vioA* (de aproximadamente 1,0 kb) fue directamente secuenciada usando los mismos iniciadores que se utilizaron para la amplificación en las instalaciones de *STABVIDA* (Caparica, Portugal). Todas las secuencias 16S fueron analizadas mediante el programa NCBI-BLAST, y las secuencias más cercanas a la secuencias de las cepas fueron extraídas y alineadas utilizando el software *Bionumerics* 6.1 para análisis filogenético. Los árboles filogenéticos fueron contruidos utilizando análisis de *Neighbor Joining* (NJ) o del vecino más próximo. La robustez de los grupos originados fue testada mediante análisis *Bootstrap* o de soporte sobre 1.000 aleatorizaciones.

El análisis de la práctica totalidad de la longitud de las secuencias ADNr 16S de todas las cepas mostraron que éstas están estrechamente relacionadas entre ellas (>99.3% similitud de las secuencias) y pudieron ser asignadas a la clase β -*Proteobacteria*, orden *Burkholderiales*, familia *Oxalobacteraceae*, con el género más cercano *Duganella*. Basado en la homología de los genes ADNr 16S de las bacterias se construyó el árbol filogenético mediante análisis de *Neighbor Joining* (NJ) conteniendo la secuencia del gen 16S de las siete cepas bacterianas obtenidas de olivo, las cepas de referencia de *Duganella* spp. y *Janthinobacterium lividum* y varias secuencias relacionadas de organismos no cultivables contenidas en clones procedentes de la base de datos del *GenBank* (Fig. 1). El análisis filogenético del gen ADNr 16S indicó que las siete cepas con pigmentación morada fueron identificadas como *Duganella* spp. Esta es la primera cita de *Duganella* spp. en la rizosfera de plantas leñosas y como habitante específico de la rizosfera de

- olivos silvestres y cultivados. Todas la secuencias ADNr 16S de *Duganella spp.* de olivos silvestres y cultivados mostraron una homología más baja (95,5-96,0%) con respecto a la de la especie tipo de *Duganella (D. zooglooides)* y del aislado de *Duganella sp. B2*, la primera *Duganella sp.* productora de violaceína citada hasta el momento (Wang et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 44, 119-124). Es de destacar que a pesar de que la cepa B2 ha sido citada como una *Duganella sp.*, en nuestro estudio, los análisis filogenéticos mostraron que está más estrechamente relacionada a *Janthinobacterium lividum* debido a que su secuencia ADNr 16S se agrupó con *Duganella sp. tsz33* (una cepa aislada de un Glaciar en China) como un grupo hermano de todas las secuencias de *Janthinobacterium lividum* del GenBank (58% de soporte). Por el contrario, la secuencia de los genes ADNr 16S de las cepas de olivo silvestre y cultivado mostraron una homología del 98,6-99,3% con la cepa tipo de *Duganella violaceinigra* YIM 31327 (Tabla 1) y se agruparon con otras cepas y secuencias de organismos no cultivados en un cluster hermano diferente al de la especie tipo (58% de soporte). A pesar de que las siete cepas de olivo mostraron alta homología en la secuencia ADNr 16S (99,4-100%), dos subgrupos pudieron ser diferenciados entre ellos de acuerdo a su huésped de origen (olivo silvestre *versus* olivo cultivado).
- El análisis filogenético del gen *gyrB* usando un set de datos menor mostró resultados similares a los obtenidos con el gen ADNr 16S, con la cepa *Duganella sp. B2* siendo genéticamente diferente de la cepa tipo de *Duganella violaceinigra* YIM 31327 y de las cepas de olivo (99% de soporte), las cuales se agruparon nuevamente de acuerdo a su origen (Fig. 2A). Así, las tres cepas de olivo silvestre se agruparon como un grupo basal de la cepa tipo *Duganella violaceinigra* YIM 31327 (54% de soporte; 93,7-95,7% de similaridad, Tabla 1) y todas estas cepas formaron un grupo hermano de las cuatro provenientes de olivo cultivado (100% de soporte).
- El análisis filogenético del gen parcial *vioA* agrupó a *Duganella sp. B2* como un grupo basal de las secuencias restantes de *Duganella spp.* (soporte de 62%) mostrando una similaridad más alta en la secuencia del gen *vioA* con todas las

secuencias de *Janthinobacterium lividum* (80,4-81,2%) que con todas las *Duganella* spp. incluyendo las cepas de olivo y la cepa tipo de *Duganella violaceinigra* (77,3-77,9%). *Duganella violaceinigra* fue un grupo basal de todas las cepas aisladas de *Duganella* spp. de olivo y de una muestra de suelo de
5 *Ithaca*, Nueva York, EE.UU. (89% soporte; 89,8-90,8% similaridad, Tabla 1) (Brady et al., 2001. Organic Letters 3, 1981-1984.). Dentro de este cluster, las siete *Duganella* spp. se agruparon de acuerdo a su huésped de origen, olivo silvestre (LOBA-24, LO-22, Baetica-33) o cultivado (CICYT-60, MICO-C, MICO-M, MICO-M2) con homología en las secuencias en un rango de 91,6 a 91,8%
10 entre ambos grupos (Fig. 2B).

EJEMPLO 4. DETECCIÓN, PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE VIOLACEÍNA.

La evaluación *in vitro* para la producción de violaceína fue realizada utilizando
15 las condiciones y medio de cultivo óptimas descritas con anterioridad para una *Duganella* sp. (Wang et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 44, 119-124) (pH 6,7, nitrato de potasio 1,18 g/L, sulfato de amonio ferroso 0,08 g/L, fosfato dipotásico 0,25 g/L, sulfato de magnesio 0,75 g/L, extracto de carne 1,53 g/L, L-triptofano 0,74 g/L, almidón soluble 13 g/L, 25 ml del medio en matraces de 250
20 mL) con un tamaño de inóculo inicial del 10% (v/v) o 20% (v/v) de un cultivo bacteriano en el mismo medio en una fase de crecimiento estacionario. Los cultivos fueron incubados en un agitador rotatorio a 60 rpm y 25±1°C durante 5h (cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria).

25 La violaceína cruda fue extraída de las células utilizando el método de extracción de etanol de acuerdo a Wang et al., 2009, Biochemical Engineering Journal 44, 119-124. La producción de violaceína cruda fue medida basada en la absorbancia de la solución de etanol a 585 nm utilizando un espectrofotómetro ultravioleta-visible (*Metertek SP-850; Metertech Inc., Taipei, Taiwan*) (Mendes et al., 2001. Biotechnology Letters 23, 1963-1969). Además,
30 la violaceína cruda obtenida por el proceso de extracción anteriormente descrito fue separada y purificada mediante cromatografía líquida de alta

resolución, en un sistema HPLC *Agilent* 1200 equipado con un detector de diodos (DAD) (*Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*) con una columna de octadecilsilano (ODS) (*Tracer Excel 120 ODS-B, 5 mm, 250 x 46 mm*), para medir la composición y compararlo con la violaceína comercial obtenida de *Janthinobacterium lividum* (*Sigma-Aldrich, Madrid, España*) y con datos
5 previamente publicados (Retori y Durán, 1998. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14, 685-688.; Sánchez et al., 2006. *ChemBioChem* 7, 1231-1240; Wang et al., 2009. *Biochemical Engineering Journal* 44, 119-124; Jiang et al., 2010. *Applied Microbiology & Biotechnology* 86, 1077-1088).

10

La longitud de onda de medida fue de 570 nm y la fase móvil consistió en metanol 70% a un porcentaje de flujo de 1 ml/min a una temperatura de 30°C (Jiang et al., 2010. *Applied Microbiology & Biotechnology* 86, 1077-1088). Las diferencias en la producción de violaceína cruda fueron analizadas por análisis
15 de varianza estándar y la comparación de medias entre tratamientos mediante el contraste protegido de *Fisher* de las mínimas diferencias (LSD) ($P \leq 0.05$) utilizando el programa *STATISTIX 9.0* (*Analytical Software, St. Paul, MN, USA*).

20

Todas las cepas aisladas de olivo y la cepa *Duganella violaceinigra* CCUG
50881T (igual a *Duganella violaceinigra* YIM 31327) poseen el gen *vioA* para la producción de violaceína (determinada por la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1,0 kb utilizando el par de iniciadores VPA3 (SEQ ID NO: 29)/VPA4 (SEQ ID NO: 30)). Hasta donde sabemos, esta es la primera
25 demostración que *Duganella violaceinigra* posee genes para la producción de violaceína. También todas las cepas aisladas de olivo produjeron violaceína, evidenciada por la determinación cuantitativa mediante espectrofotometría y cromatografía líquida (LC) (Fig. 5 A, B). Cuando los extractos crudos de violaceína fueron examinados por HPLC, la fracción colectada consistió en un pico principal (6,5 min) para todas las cepas bacterianas.

30

El espectro visible de UV de los extractos de violaceína cruda fue similar a la observada para la violaceína comercial obtenida de *Janthinobacterium lividum*

(Sigma, Madrid, España) y para la citada para otras bacterias productoras de violaceína incluyendo *Duganella* sp. B2, y *Chromobacterium violaceum* (Retori y Durán, 1998. World Journal of Microbiology & Biotechnology 14, 685-688; Sánchez et al., 2006. ChemBioChem 7, 1231-1240; Wang et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 44, 119-124; Jiang et al., 2010. Applied Microbiology & Biotechnology 86, 1077-1088) con una fuerte absorción en la región visible debido a la resonancia de la violaceína (Riveros et al., 1988. Archivos de Biología e Tecnología 31, 475-487) (Figura 5B). Además de lo anterior, la adición de ácido sulfúrico al 10% a los extractos de violaceína cruda en etanol, cambió el color violeta a verde, y cuando se agregó NaOH, cambió a un color café rojizo, tal como fue descrito para la solución de violaceína en etanol de *Janthinobacterium lividum* (Shivaji et al., 1991. Polar Biology 11, 267-271).

Las cepas bacterianas difirieron significativamente ($P < 0,0001$) en su habilidad para producir violaceína cuando ésta fue determinada para un número similar de células/ml ($OD_{600} 1.280 \pm 0,1879$) en la fase estacionaria de crecimiento después de 48h de incubación a 25°C (Fig. 5A). Las cepas Baetica-33, CICYT-60, y LO-22 produjeron significativamente cantidades más altas ($P < 0,0001$) de violaceína cuando el cultivo fue iniciado con 10% (v/v) que con 20% (v/v) de un cultivo bacteriano en la fase estacionaria. Cuando el cultivo bacteriano se inició con 10% (v/v) para algunas cepas (Baetica-33, LO-22), la producción de violaceína fue evidente sin embargo no abundante ($OD_{585} = 0,230-0,405$; equivalente a 4,10-7,22 mg/L). En contraste, cuando el cultivo se inició con 20% (v/v), la cepa CICYT 60 produjo cantidades significativamente ($P < 0.0001$) más altas de violaceína cruda ($OD_{585} = 1,585$; equivalente a 20,30 mg/L) en comparación con las otras seis cepas.

EJEMPLO 5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO*

30

La actividad antibacteriana de las cepas aisladas de olivo se determinó mediante ensayos en cultivo-duales *in vitro* utilizando el medio *Waskman* agar

(Berg et al., 2002. Applied & Environmental Microbiology 68, 3328-3338) frente a una cepa de bacteria fitopatógena (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), y una cepa de *Bacillus subtilis* aislada de la rizosfera de olivo.

5 Las suspensiones bacterianas se ajustaron hasta alcanzar una concentración aproximada de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc) y fueron utilizadas para inocular completamente la superficie del medio *Waskman* agar contenido en placas petri de 9 cm de diámetro. Se inocularon discos de papel filtro con 30 μ l de las cepas bacterianas *Bacillus subtilis* y *Clavibacter michiganensis*
 10 creciendo en el medio de cultivo óptimo para la producción de violaceína (Wang et al., 2009. Biochemical Engineering Journal 44, 119-124) y fueron colocadas sobre las placas a 1 cm de distancia del borde de la placa.

Por otra parte, los filtrados de violaceína cruda (10 μ l) provenientes de las seis
 15 cepas bacterianas aisladas (MICO-M, MICO-M2, LOBA-24, CICYT 60, LO-22 y Baetica-33) y una solución de violaceína comercial (50 μ M) en etanol fueron inoculados sobre el medio *Waskman* agar que previamente se habían inoculado con las bacterias *Bacillus subtilis* y *Clavibacter michiganensis* de la forma anteriormente descrita. Como control se utilizó etanol. Se realizaron tres
 20 repeticiones por cepa bacteriana. Las placas fueron incubadas a 25°C y se realizó una evaluación cualitativa de la inhibición basada en la presencia/ausencia de halos de inhibición alrededor del punto de inoculación (Figura 6).

25 Las cepas bacterianas productoras de pigmento morado de olivo y los filtrados de la violaceína cruda mostraron de moderada (2 mm inhibición del halo de crecimiento) a fuerte inhibición (1 cm diámetro de halo en el punto de inoculación) respectivamente, frente a la bacteria Gram-positiva (*Bacillus subtilis*) evaluada en nuestro estudio.

30 Además, los filtrados crudos de la violaceína de las cepas LOBA-24, LO-22, Baetica-33 y CICYT-60 inhibieron el crecimiento de *Clavibacter michiganensis*

subsp. michiganensis. Los halos de inhibición de los filtrados de violaceína cruda fueron similares para todas las cepas bacterianas y equivalentes a la observada cuando se utilizó la violaceína comercial (50 μ M).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa bacteriana del género *Duganella* spp. productora de violaceína aislada de la rizosfera de olivos cultivados y/o silvestres con una identidad:
- 10 a. de entre un 98,6 % y un 99,3% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 1 del gen de ADNr 16S,
- b. de entre un 93,7 % y un 95,7% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 2 del gen *gyrB*, y
- c. de entre un 89,8 % y un 90,8% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 3 del gen *vioA*.
- 15 2. Cepa bacteriana según la reivindicación 1, donde dicha cepa se selecciona de entre las cepas CECT 7779, CECT 7780 o CECT 7781.
3. Cepa bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la cepa es CECT 7780.
- 20 4. Combinación de microorganismos que comprende al menos una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Combinación de microorganismos según la reivindicación 4, que además comprende al menos otro microorganismo.
- 25 6. Violaceína producida por la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o por la combinación de microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.
- 30 7. Extracto bacteriano que comprende la violaceína según la reivindicación 6.

8. Composición que comprende la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; la combinación de microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5; la violaceína según la reivindicación 6; o el extracto bacteriano según la reivindicación 7.
- 5
9. Composición según la reivindicación 8, donde dicha composición es una composición farmacéutica.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, donde además comprende un vehículo y/o un excipiente farmacológicamente aceptables.
- 10
11. Composición según la reivindicación 8, donde dicha composición es un producto fitosanitario.
- 15
12. Composición según la reivindicación 11, donde el producto fitosanitario es un bactericida.
13. Composición según la reivindicación 11, donde el producto fitosanitario es un fungicida.
- 20
14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, donde además comprende otra sustancia activa.
- 25
15. Uso de la composición según la reivindicación 12, para prevenir la acción de al menos una bacteria Gram-positiva o para provocar la muerte de dicha bacteria.
- 30
16. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; de la combinación de microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5; de la violaceína según la reivindicación 6; del

extracto bacteriano según la reivindicación 7; o de la composición según la reivindicación 8, para la fabricación de un medicamento.

5 17. Método para la producción de violaceína o para la producción del extracto bacteriano que contiene violaceína, que comprende:

- a. Seleccionar una cepa bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la combinación de microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5,
- 10 b. cultivar la cepa o la combinación de microorganismos del paso (a) en condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento y desarrollo del microorganismo, y
- c. extraer la violaceína o el extracto bacteriano del cultivo del paso (b).

15

FIG. 1

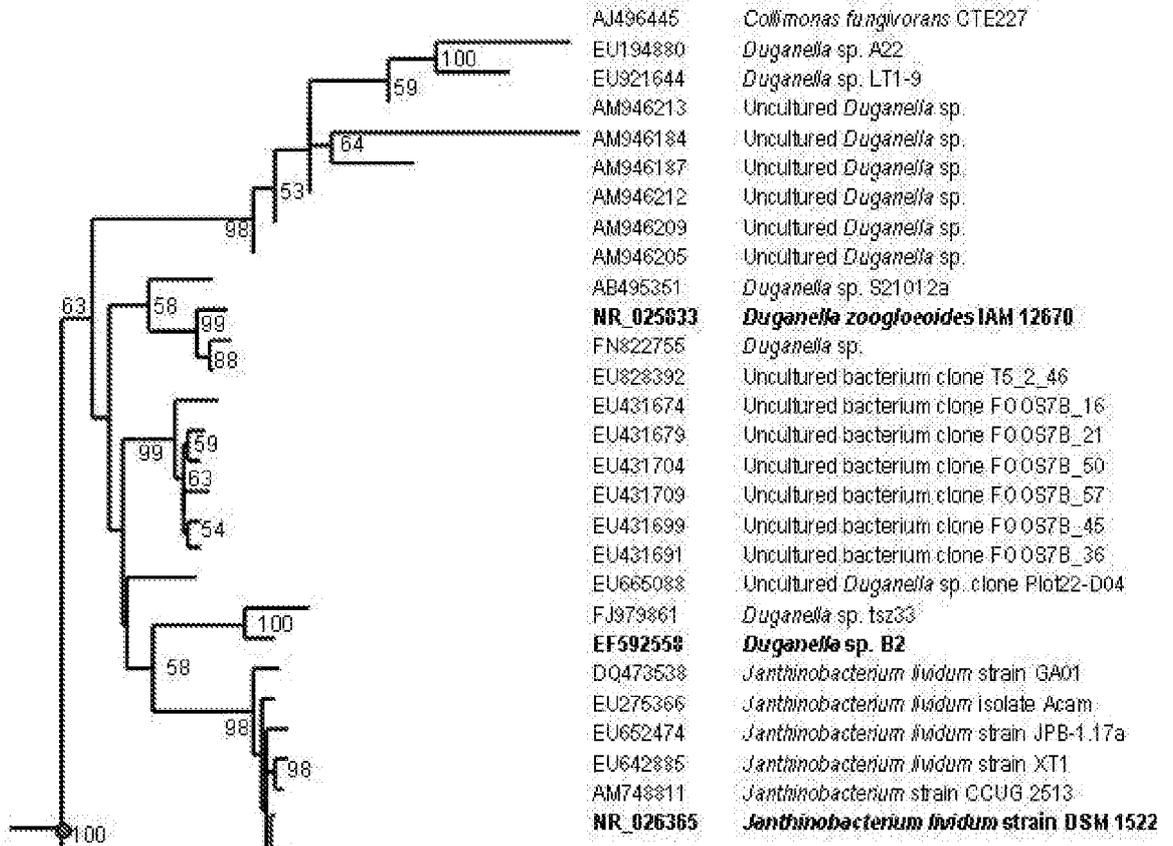


FIG. 1 cont.

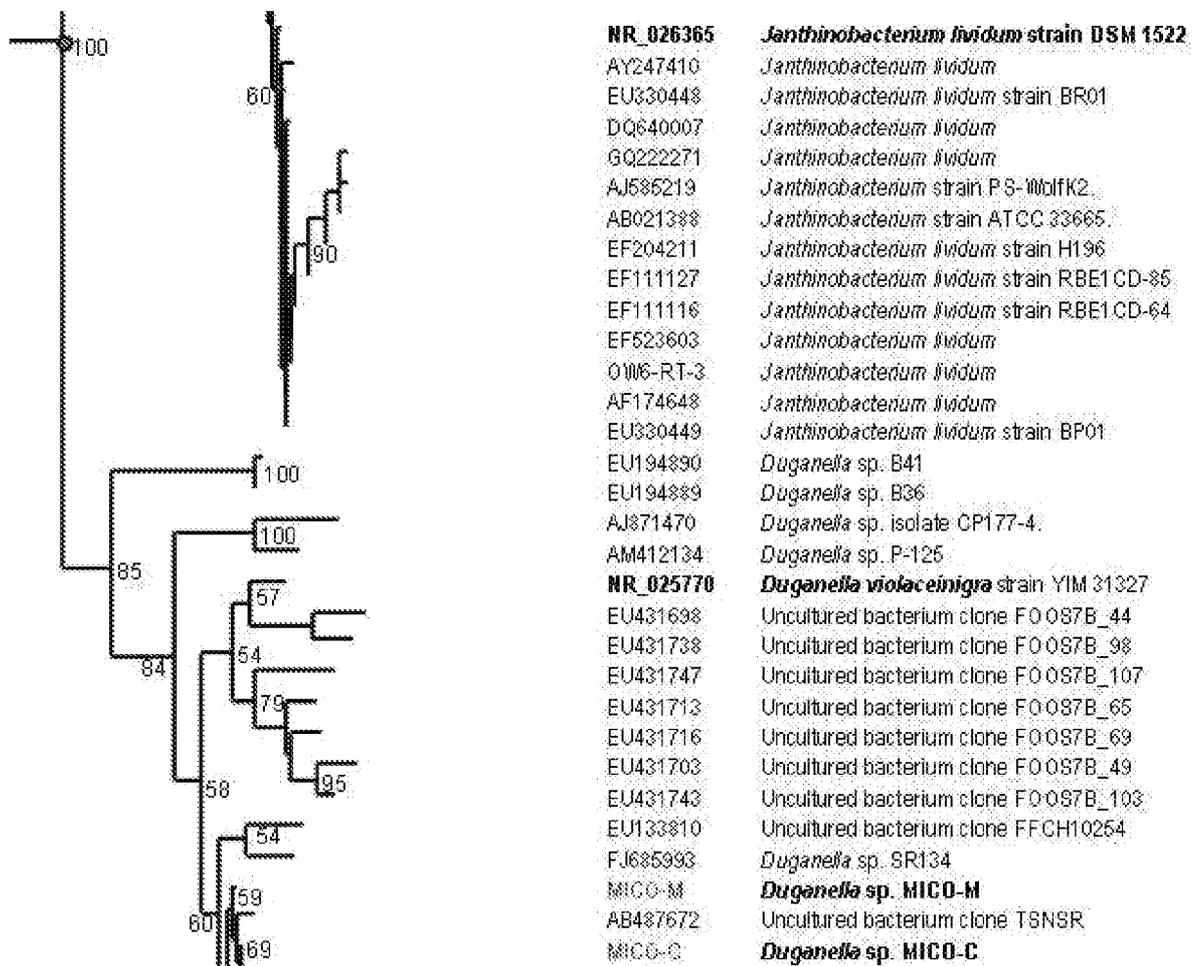


FIG. 1 cont.

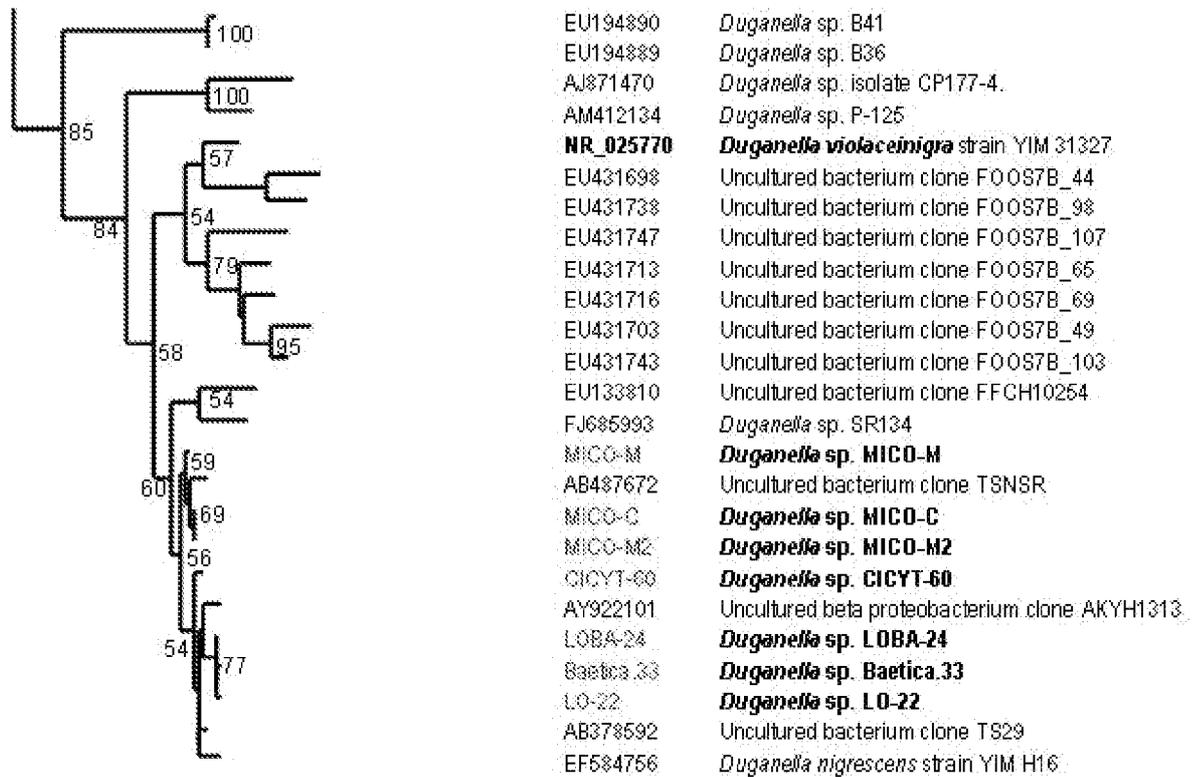
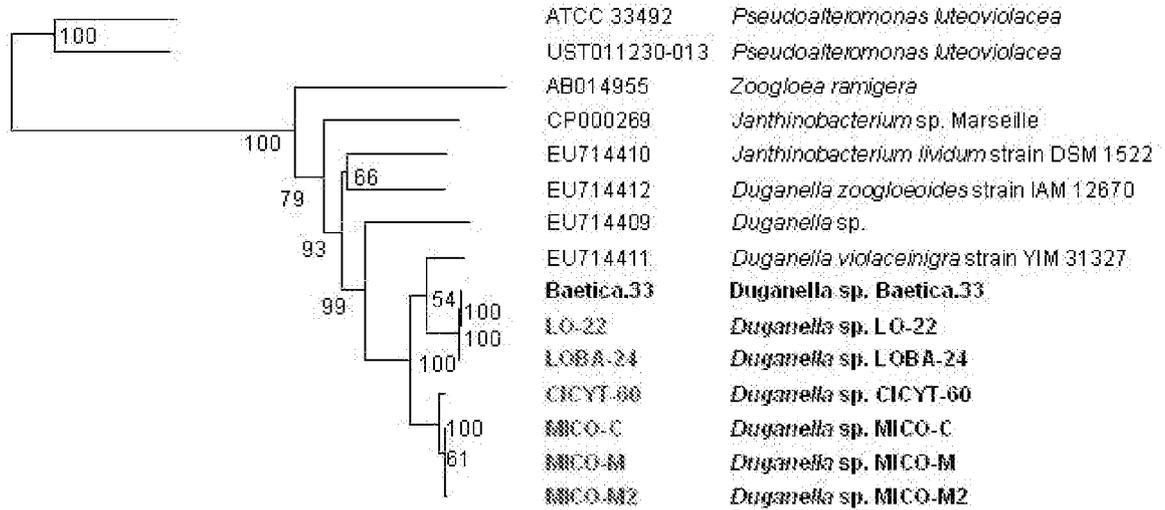


FIG. 2

A.



B.

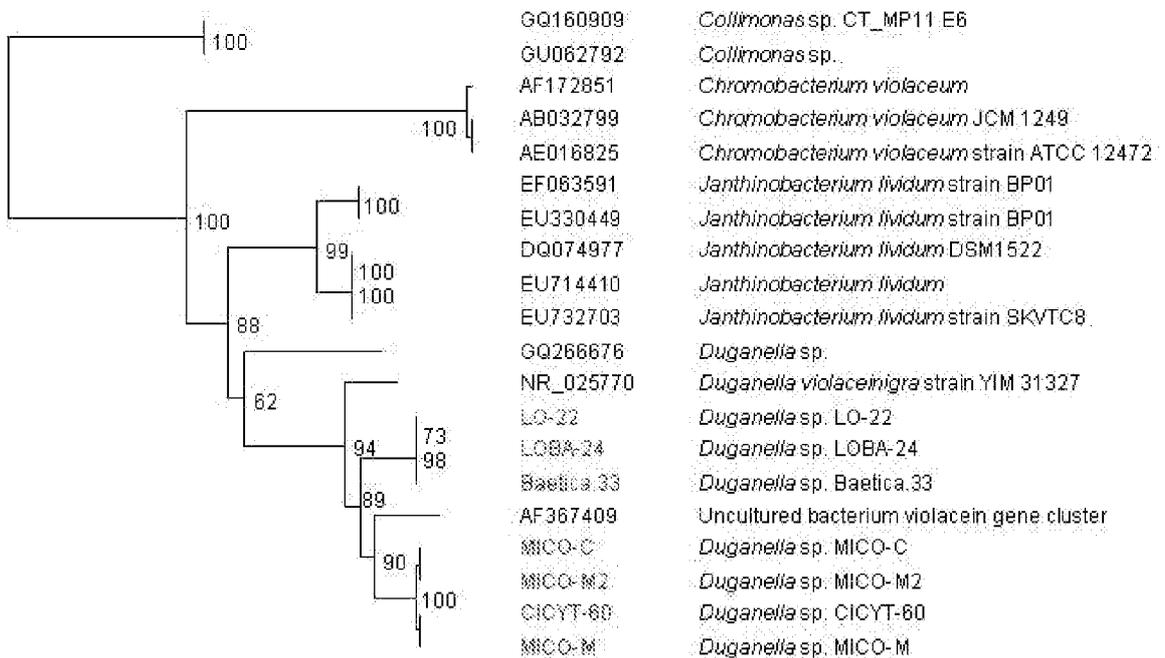


FIG. 3

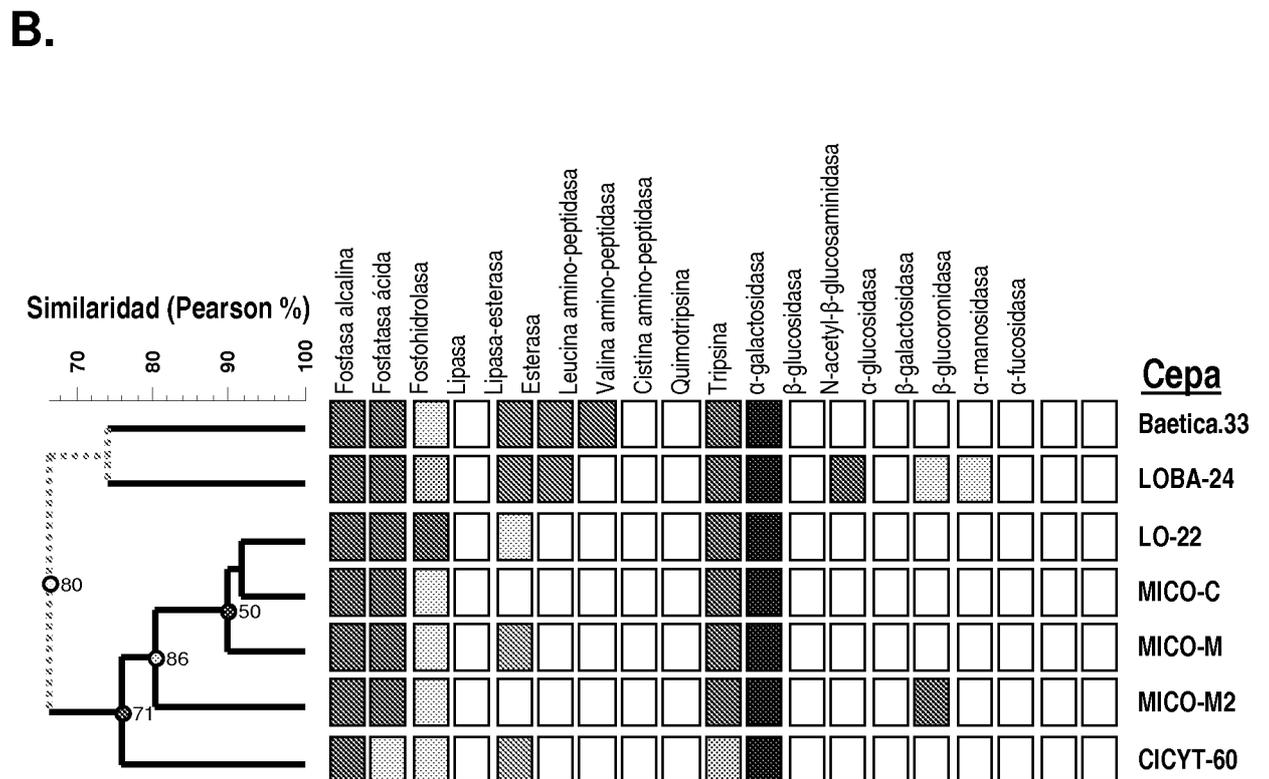
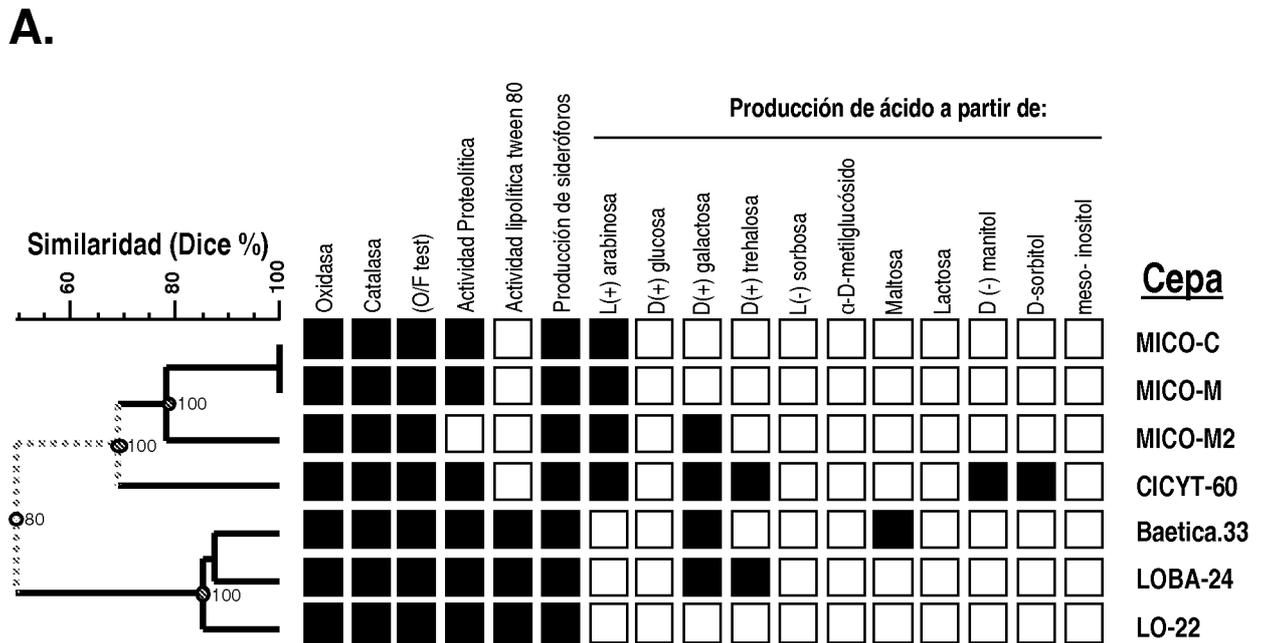


FIG. 3 cont.

C. cont.



FIG. 3 cont.

C. cont.



FIG. 4

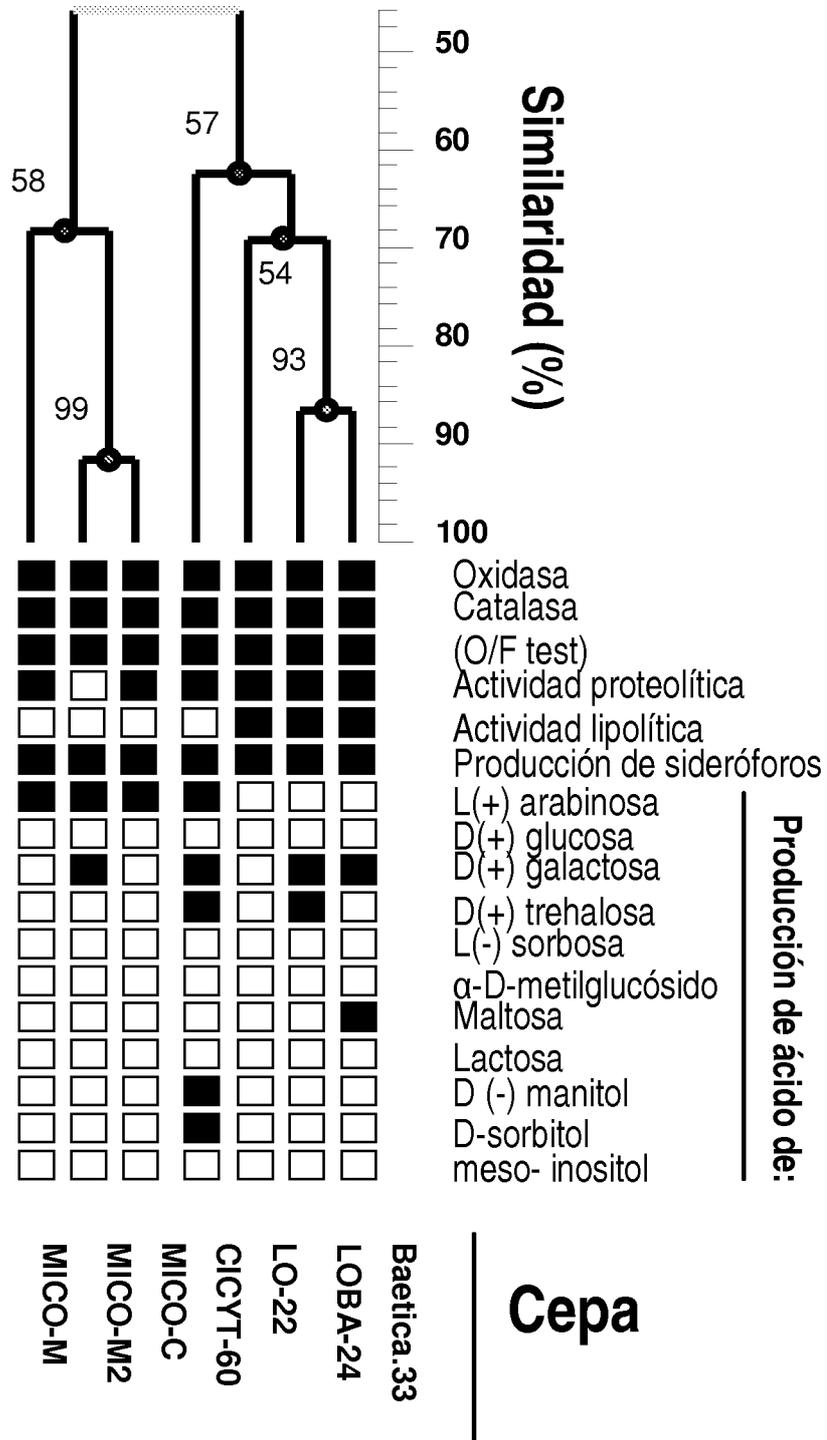


FIG. 4 cont.

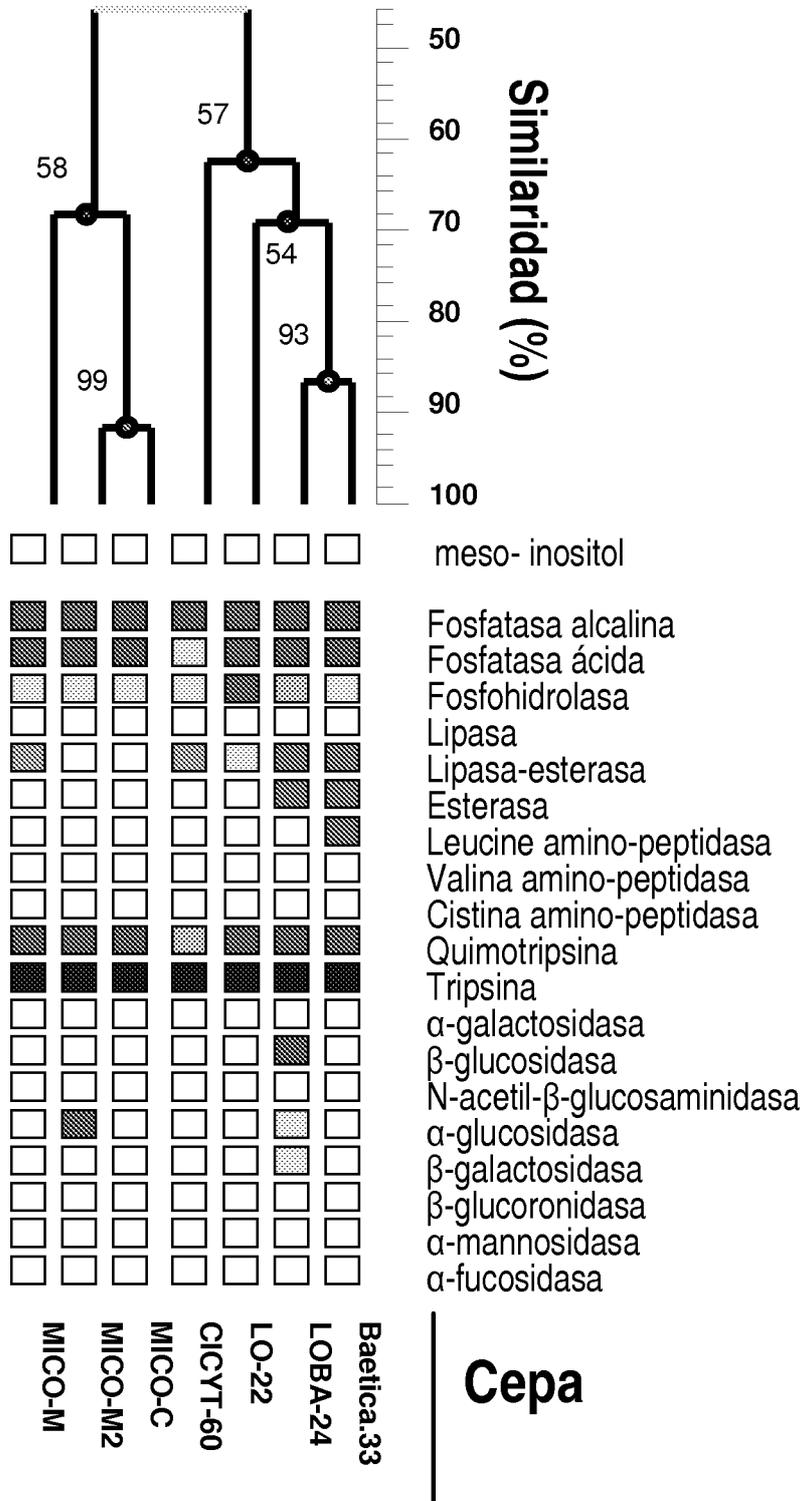
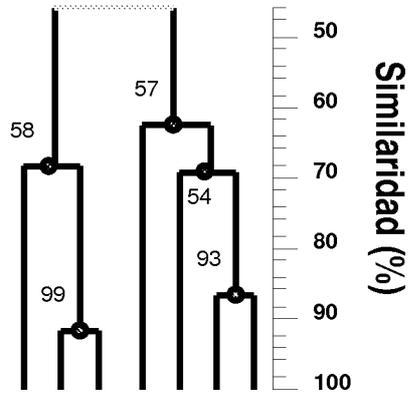


FIG. 4 cont.



Baetica.33
LOBA-24
LO-22
CICYT-60
MICO-C
MICO-M2
MICO-M

Cepa

FIG. 4 cont.

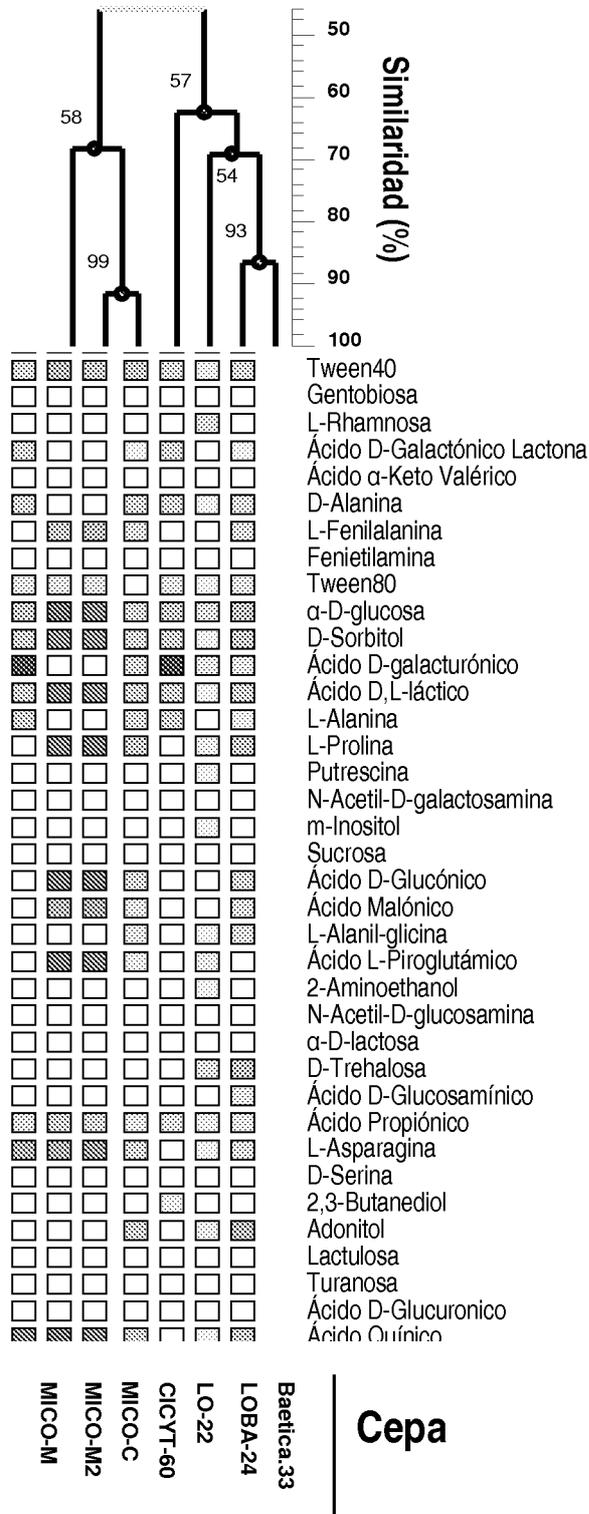


FIG. 4 cont.

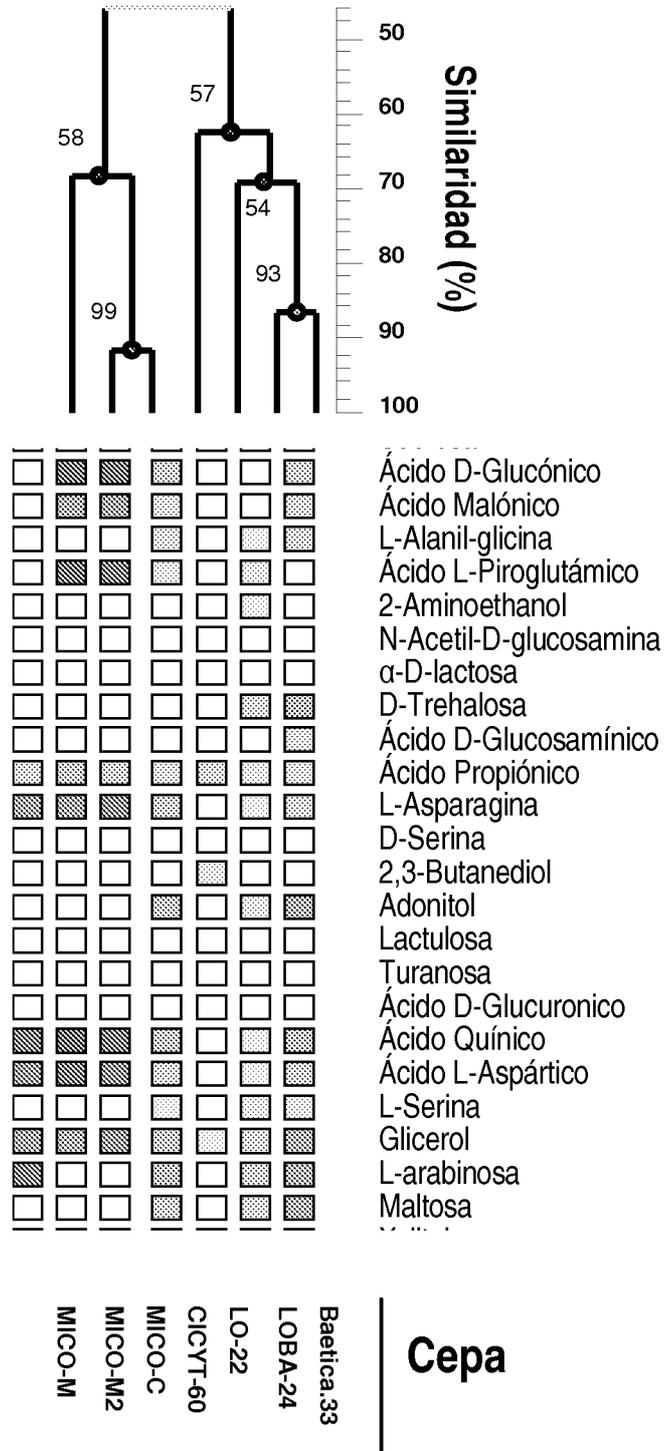


FIG. 4 cont.

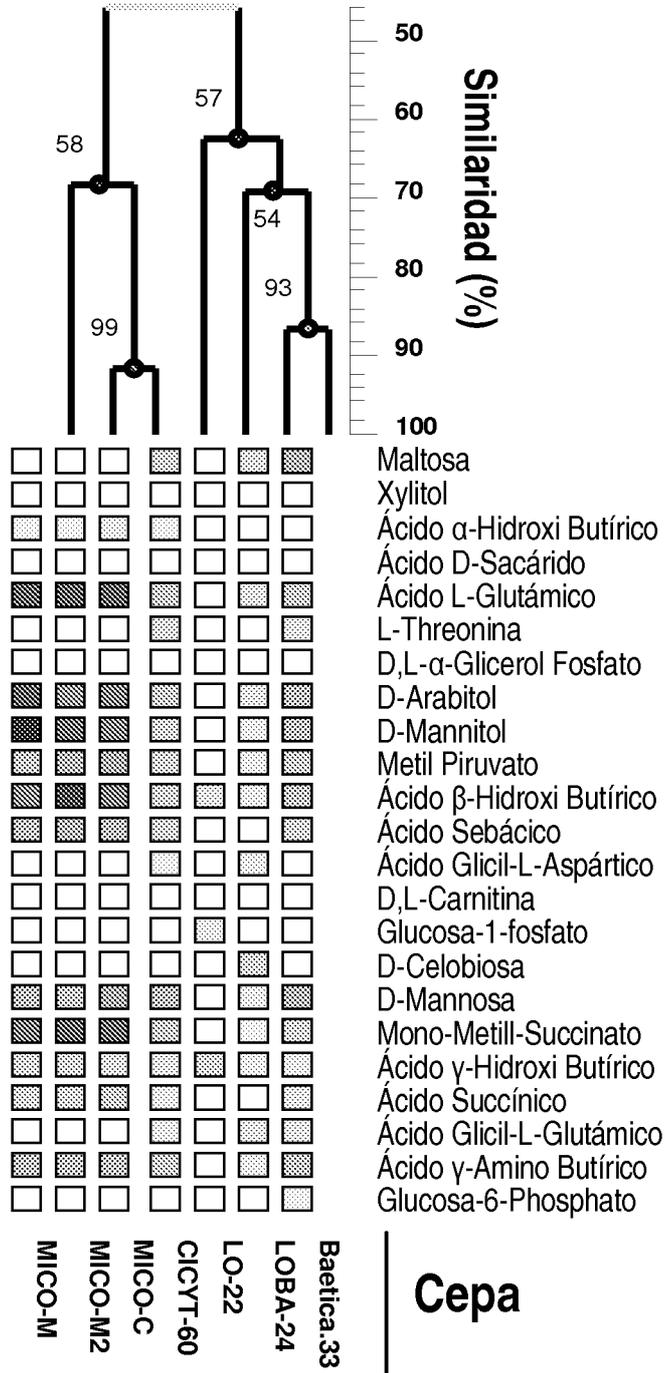
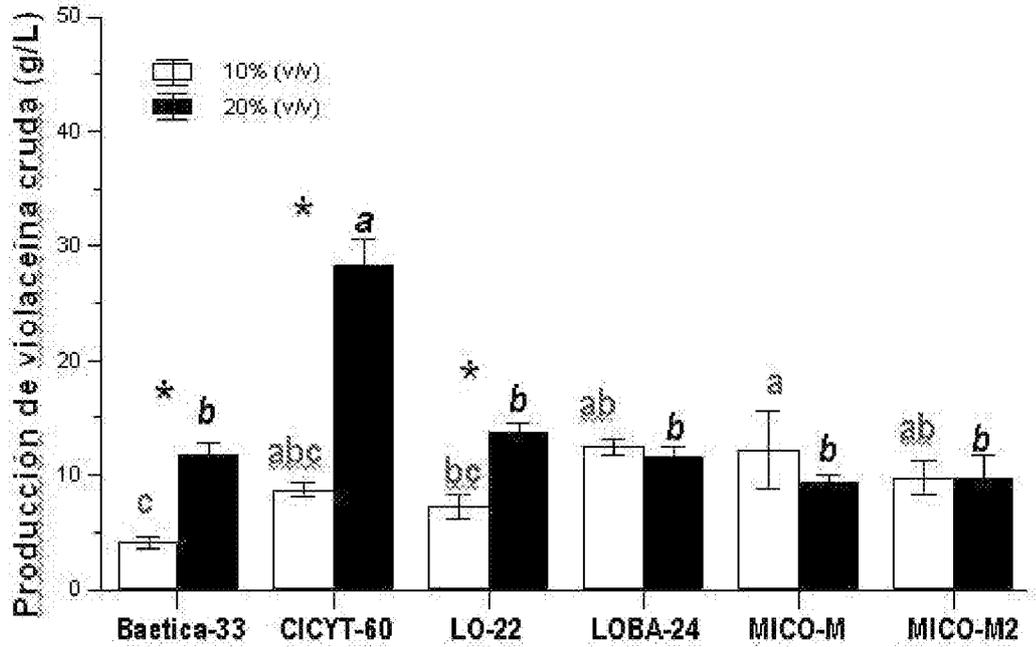


FIG. 5

A.



B.

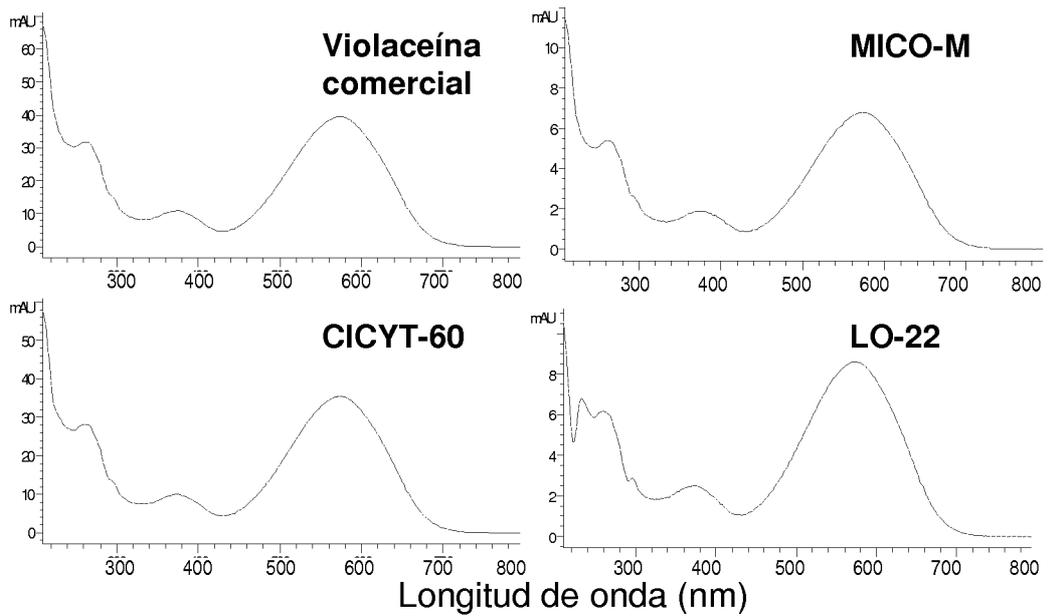
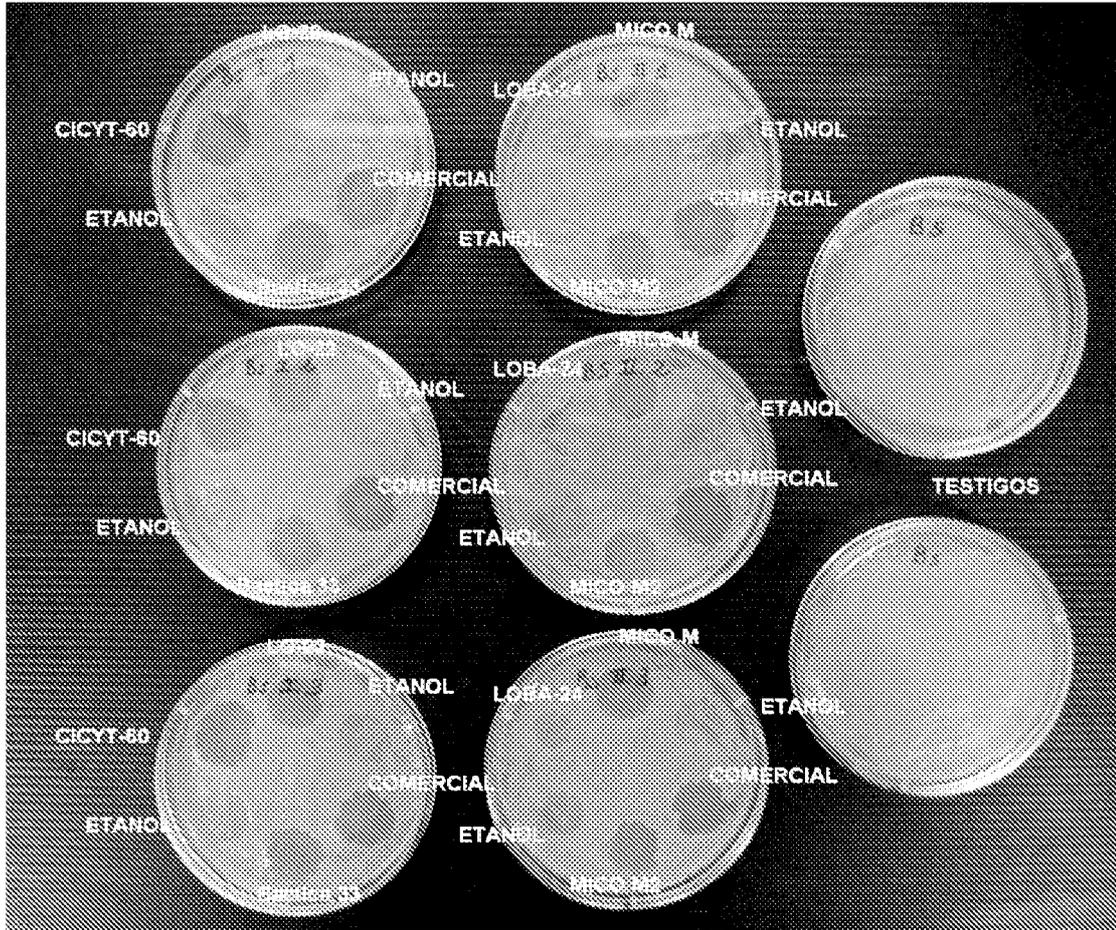


FIG. 6



ES 2 388 662 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
 <120> Nuevas cepas de *Duganella* aisladas de la rizosfera de olivo silvestre y cultivado y su uso en la producción de violaceína
 <130> 1641.791
 <160> 30
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1439
 <212> DNA
 <213> *Duganella violaceinigra*

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (942)..(942)
 <223> n es a, c, g, or t

 <400> 1
 tgcaagtcga acggcagcgc gggggcaacc gtggcggcga gtggcgaacg ggtgagtaat 60
 atatcggaac gtaccaaga gtgggggata acgtagcgaa agttacgcta ataccgcata 120
 cgatctaagg atgaaagcag gggatcgcaa gaccttgtgc tcctggagcg gccgatatct 180
 gattagctag ttggtggggt aaaggccac caaggcaacg atcagtagct ggtctgagag 240
 gacgaccagc cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtggg 300
 gaattttgga caatgggggc aaccctgatc cagcaatgcc gcgtgagtga agaaggcctt 360
 cggggtgtaa agctcttttg tcaggaaga aaaggctgtg gctaatatcc acagctgctg 420
 acggtacctg aagaataagc accggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg 480
 gtgcaagcgt taatcggaat tactgggctg aaagcgtgcg caggcggttt cgtaagtctg 540
 tcgtgaaatc cccgggctta acctgggaat ggcgatggag actgcgaagc tagagtttgg 600
 cagagggggg tagaattcca cgtgtagcag tgaatgcgt agagatgtgg aggaacaccg 660
 atggcgaagg cagccccctg ggtcaaaact gacgctcatg cacgaaagcg tggggagcaa 720
 acaggattag atacctggt agtccacgcc ctaaacgatg tctactagtt gttgggtcct 780
 aattgactta gtaacgcagc taacgcgtga agtagaccgc ctggggagta cggtcgcaag 840
 attaaaactc aaaggaattg acggggacc gcacaagcgg tggatgatgt ggattaattc 900
 gatgcaacgc gaaaaacctt acctaccctt gacatggcag gnatcccgga gagatttggg 960
 agtgctcga agagaacctg cacacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga 1020
 gatgttgggt taagtcccg c aacgagcgca acccttgtca ttagttgcta cgcaagagca 1080
 ctctaattg actgccggtg acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca agtcctcatg 1140
 gcccttatgg gtagggcttc acacgcata caatggtaca tacagagggc cgccaaccgc 1200
 cgagggggag ctaatcccag aaagtgtatc gtagtccgga ttgtagtctg caactcgact 1260
 acatgaagtt ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcatgt cgcgggtaac acgttcccgg 1320

ES 2 388 662 A1

gtcttgtaca caccgcccgt cacaccatgg gagcgggttt taccagaagt aggtagctta 1380
accgcaagga gggcgcttac cacggtagga ttcgtgactg ggggtgaagtc gtaacaagg 1439

<210> 2
<211> 1212
<212> DNA
<213> *Duganella violaceinigra*

<400> 2
atgatgatgc ggtggtagcg cagcttttcg atattgaatt cgtcggcgcc gatgctggtg 60
cccagggtgg cgatcagggt ggtgatctgc tcggacgaca gcatcttctc gaagcgcgcc 120
ttctccacgt tcagcacctt accgcgcagg ggcagaatcg cctggaactt gcggtcgcgg 180
ccctgcttgg cggagccgcc tgcggagtca ccctcgacga tgtacagttc ggacagggca 240
gggtcttttt cctggcagtc ggccagcttg gcggacagggc ccaggccgtc catgatgcct 300
ttgcggcggg tcaggtcgcg ggccttgccg gctgcttcac gggcgcgcgc tgcttccacg 360
atcttgccgc agatgatctt ggcgtcgttc ggcttttcca tcaggaagtc ggtcagcgtc 420
ttggcgacga tttcttccac cgggccgcgc acttcggacg agaccagctt gtccttggtc 480
tgggacgaga acttcggttc cggcaccttc acggacagca cgcaggtcag gccttcgcgc 540
atgctgctgc cgctgatttc taccttggcc ttcttggcga agtcgttctc gtcgatgtac 600
ttgttgatca cgcgcgtcat tgccgcgcgc aggccggta ggtgggtgcc gccgtcgcgc 660
tgcggaatgt tgttggtgaa gcagagtacc tgttcgttga aggcgtcgtt ccattgcatg 720
gagacgtcga ccgaaatggt ggtgttctgg tcggactggc gctcgcgggt ggcctggaac 780
acggtcgggt gcaggacggt cttggctttg ttgatgtatt caacgaagcc gcgggtgccg 840
ccttcaagg cgaagatttc ttccttgccg ttgcgctggt cggtcagctt gatgttgacg 900
ccgttgttca ggaaggacag ttcgcggata cgcttgcca ggatctcgta gtggaattcc 960
acgtgggtga agatctcttc gtcggcccag aagtgcacgt cggtgccgcg tttgtcggtt 1020
tcgccgatca cttgatcgg ggagaccgcc acgccgtcga gcatttcgat ttcgcggttc 1080
tgcgcggcgc cgcgcacgaa ttccatctgg tgcactttgc cgtcgcggcg gatggtcacg 1140
cgcagcagtt tggacagtgc gttcacgcag ctgacccca cgcctgacg gccgcccggag 1200
actttgtagg cg 1212

<210> 3
<211> 902
<212> DNA
<213> *Duganella violaceinigra*

<400> 3
gcacgcagtc taccctttca ctgacgtggt atcccaggag cgcgagcagc aagagttgaa 60
gaaaccctg ctgagcttgc agcctatggt gaaagagcat ccgcaagaat ccttccttga 120
tttctcagc cattatctgg gcgccgacga agcgatccgc atcctcgagg ccacaggtta 180
cgacgccctg cagctgccga tcgtcacggc cgccatggcg tacgacatca ttaaaaagca 240

ES 2 388 662 A1

tccggaacg caaaactgca ccgagaacgc cggcaatgaa tggcgctatg ccaccgatgg 300
ctatggcgag ctgctggagc agctgaaacg gcaggccag gctgccgggg tcgagttccg 360
cctcgaacac cgcttgctgt cgctggagaa gtccgggtgcc gaccatctgc ttgccttcag 420
ccatcagggc gagatccaga tgcagcgtgc gcaccatgtg atcctggcca tcccccgtc 480
cgccatgatg ggtctgaaca tggatttccc agccacctgg agccctttcc agtacgactc 540
cctgcctttg ttcaagggct tcctgacgtt cgagaaaaaa tggttcgagt gcatggggct 600
gggcgacaaa atgctgatgg ccaataatcc cctgcgcaag atctacttca agagcgataa 660
atacctgctc ttttataccg acagcaaaag cgcgacctat tggcgcgaca gtgtggagca 720
gggcaagag atttacctgg agcgcgtgcg cagccacctg gagcaagcgc taccgctcaa 780
cggccagccg ctgccgccga tccaatcgca tttctacaag cactggccgc acggcgtcga 840
gttctatctg gaacccgaag ccaagcatcc gacggccctg gtgcatccga gcggcatcat 900
tt 902

<210> 4
<211> 1374
<212> DNA
<213> Duganella CICYT-60

<400> 4
gcgcgggcctt cggcctggcg gcgagtggcg aacgggtgag taatatatcg gaacgtaccc 60
aagagtgggg gataacgtag cgaaagttac gctaataccg catacgatct aaggatgaaa 120
gcaggggatc gcaagacctt gtgctcctgg agcggccgat atctgattag ctagttagtg 180
aggtaaaggc tcaccaaggc aacgatcagt agctggctctg agaggacgac cagccacact 240
ggaactgaga cacggtccag actcctacgg gaggcagcag tggggaattt tggacaatgg 300
gggcaaccct gatccagcaa tgccgcgtga gtgaagaagg ccttcggggt gtaaagctct 360
tttgtcaggg aagaaaaggt cgtggctaata atccacgact gctgacggta cctgaagaat 420
aagcaccggc taactacgtg ccagcagccg cggaataacg taggggtcaa gcgttaatcg 480
gaattactgg gcgtaaagcg tgcgcaggcg gtttcgtaag tctgtcgtga aatccccggg 540
cttaacctgg gaatggcgat ggagactgcg aggctagagt ttggcagagg ggggtagaat 600
tccacgtgta gcagtgaaat gcgtagagat gtggaggaac accgatggcg aaggcagccc 660
cgtgggtcaa aactgacgct catgcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 720
tggtagtcca cgccctaaac gatgtctact agttgttggg tcttaattga cttagtaacg 780
cagctaacgc gtgaagtaga ccgcctgggg agtacggctc caagattaaa actcaaagga 840
attgacgggg acccgcaaaa gcggtggatg atgtggatta attcgatgca acgcgaaaaa 900
ccttacctac ccttgacatg gcaggaatcc gggagagatc tgggagtgct cgaaagagaa 960
cctgcacaca ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgct gtgagatggt gggttaagtc 1020
ccgcaacgag cgcaaccctt gtcattagtt gctacgcaag agcactctaa tgagactgcc 1080

ES 2 388 662 A1

ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcct catggccctt atgggtaggg 1140
 cttcacacgt catacaatgg tacatacaga gggccgcaa cccgcgaggg ggagctaadc 1200
 ccagaaagtg tatcgtagtc cggattgtag tctgcaactc gactacatga agttggaatc 1260
 gctagtaatc gcggatcagc atgtcgcggt gaatacgttc ccgggtcttg tacacaccgc 1320
 ccgtcacacc atgggagcgg gttttaccag aagtaggtag cttaacgta agga 1374

<210> 5
 <211> 1145
 <212> DNA
 <213> Dugane11a CICYT-60

<400> 5
 tcctgctga cgcactgtcc aactgctgcg cgtgaccatc cgccgagcgc gcaaagtgca 60
 ccagatggaa ttcgtcaaag gcgtggcaca gaaccgagc atcgaaatga tcgacggcgt 120
 cgccacctcc ccgatcaagg tgatcggcga aaccgacaag cgcggcaccg acgtgcactt 180
 ctgggccgac gaagagatct tcaccacgt ggaattccac tacgagatcc tggccaagcg 240
 tatccgagc ctgtccttc tgaacaacgg cgtcaacatc aagctgaccg accagcgcac 300
 cggcaaggaa gaaatcttc cattcgaagg cggcaccgc ggcttcggtg aatacatcaa 360
 caaagccaag accgtcctgc acccgaccgt attccaggca accggcgaac gccagtccga 420
 ccagggcacc accatctcgg tggacgtgtc gatgcaatgg aacgacgcct tcaacgaaca 480
 ggtactctgc ttcaccaaca acattccgca gcgagcggc ggcaccacc tgaccggcct 540
 gcgagcggca atgaccgcg tgatcaaca gtacatcgac gaaaacgact tcgccaagaa 600
 ggccaagggt gaaatcagc gcgacgacat gcgcaaggc ctgacctgcg tgctgtccgt 660
 gaaagtgcg gaaccgaagt tctcgtcga gaccaaagc aagctggtat cgtccgaagt 720
 gcgagcggc gtcgaagaga tcgtcgcca gacgctgacc gacttctga tggaaaagcc 780
 gaacgagcc aagatcatct gcggcaagat cgtggaagca gcgagcggc gtgaagcagc 840
 gcgcaaggcc cgcgacctga cccgcccga aggcacatg gacggcctgg gcctgagcgc 900
 caagctggcc gactgccagg aaaaagacc ggcaactgtc gaactgtaca tcgtcgaggg 960
 tgactccgca ggaggctcc ccaagcagg ccgagaccgt aagttccagg ccatcctgcc 1020
 gctgcgaggt aaggtgctga acgtggagaa ggcagcctc gaaaagatgc tgtcttccga 1080
 gcagatcacc accctgatcg ccaccctggg caccagcatc ggcgcccagc aatcaatc 1140
 gaaaa 1145

<210> 6
 <211> 905
 <212> DNA
 <213> Dugane11a CICYT-60

<400> 6
 cgcagcgtgt ctaccgctt actgaagtgg tatcccagga gcgagcagc caagagttga 60
 aggataccct gctcagcttg cagccatgg tgaagagca tccagaggaa tccttccttg 120

ES 2 388 662 A1

atttcgtcag ccattatctg ggtgctgccg aagctctccg catcctcaag gccaccggtt 180
 acgacgcgct gcaactgccg atcgtcacgg ccgccatggc ttacgacatc atcaaaaagc 240
 atccggaaac acaaaaactgc accgagaacg ccggtaatga atggcgctat gccaccgatg 300
 gctatggcca gctgctggtc cagctgcaac ggcaggccca ggccgacggg gtggagttcc 360
 gcctcgagca ccgcttgctg tcggtggaaa agtccggcgc cgaccatctg ctggccttca 420
 gccatcacgg tgaagtccag atgcagcgtg cgcgccatgt gatcctggct gttcctccca 480
 ccgccatggc gggactgaac ctggatttcc cgtccgcctg gagcccattc cagtacgact 540
 cgctgccttt gttcaagggc ttcctgacgt ttgagaaaag ctggttcgag tgcattgggtc 600
 tgaccgaaa aatgctcatg tccagcaatc ccctgcgcaa gatctacttc aagagcgata 660
 aatacctgct cttctatacc gacagccaaa gcgccctcta ttggcgggac agcgtggagc 720
 agggcgaaga gatttacctg gagcgcgtgc gccgccacct ggaggaagca ttgccgctca 780
 acggcaagcc gctgccgccg atccagtcgc atttctacaa gcaactggccg cacggcgtcg 840
 agttttacct ggaacccgaa gccaagcatc ctgctgcctt cgtgcatccg agcggcatca 900
 tcgca 905

<210> 7
 <211> 1392
 <212> DNA
 <213> Dugane11a LO-22

<400> 7
 gtcgaacggc agcgcgggct tcggcctggc ggcgagtggc gaacgggtga gtaatatatc 60
 ggaacgtacc caagagtggg ggataacgta gcgaaagtta cgctaatacc gcatacgatc 120
 taaggatgaa agcaggggat cgcaagacct tgtgctcctg gagcggccga tatctgatta 180
 gctagttagt ggggtaaagg cccaccaagg caacgatcag tagctgggtc gagaggacga 240
 ccagccacac tggaaactgag acacgggtcca gactcctacg ggaggcagca gtgggggaatt 300
 ttggacaatg ggggcaacc tgatccagca atgccgcgtg agtgaagaag gccttcgggt 360
 tgtaaagctc ttttgtcagg gaagaaaagg tcgtggctaa tatccacgac tgctgacggt 420
 acctgaagaa taagcaccgg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggggtgc 480
 aagcgttaat cggaattact gggcgtaaag cgtgvcgagg cggtttcgta agtctgtcgt 540
 gaaatccccg ggcttaacct gggaatggcg atggagactg cgaggctaga gtttggcaga 600
 ggggggtaga attccacgtg tagcagtgaa atgcgtagag atgtggagga acaccgatgg 660
 cgaaggcagc ccctgggtc aaaactgacg ctcatgcacg aaagcgtggg gagcaaacag 720
 gattagatac cctggtagtc cacgccctaa acgatgtcta ctagtgttg ggtcttaatt 780
 gacttagtaa cgcagctaac gcgtgaagta gaccgcctgg ggagtacggg cgcaagatta 840
 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcgggtgga tgatgtggat taattcgatg 900
 caacgcgaaa aaccttacct acccttgaca tggcaggaat cctgaagaga tttgggagtg 960
 ctcgaaagag aacctgcaca caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg 1020

ES 2 388 662 A1

ttgggttaag tccccgaacg agcgcgaacc ttgtcattag ttgctacgca agagcactct 1080
aatgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc ctcatggccc 1140
ttatgggtag ggcttcacac gtcatacaat ggtacataca gagggccgcc aaccgcgag 1200
ggggagctaa tcccagaaag tgtatcgtag tccggattgt agtctgcaac tcgactacat 1260
gaagttggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgtcgcg gtgaatacgt tcccgggtct 1320
tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagc gggttttacc agaagtaggt agcttaaccg 1380
taaggagggc gc 1392

<210> 8
<211> 1144
<212> DNA
<213> Duganella LO-22

<400> 8
ctgctgacg cactgtccaa gctgctgcg gtgaccatcc gccgcgacgg caaagtccac 60
cagatggaat tcgtccgcg cgccgcgcaa aaccgtgaaa tcgaaatgat cgacggcgtg 120
gctgtctccc cgatcaaagt gatcggcgaa accgacaagc gcggtaccga cgtgcacttc 180
tgggccgacg aagagatttt cacgcacgtg gaattccact acgagatcct ggccaagcgt 240
atccgcgaac tgtccttct gaacaacggc gtcaacatca agctgaccga ccagcgcaac 300
ggcaaggaag aaatcttcgc cttcgaaggc ggcacccgcg gcttcgttga atacatcaac 360
aaagccaaga ccgtgctgca cccgaccgtg ttccaggcca ccggcgaacg ccagtccgac 420
cagaacacca cgatcaccgt tgacgtctcc atgcaatgga acgacgcctt caacgaacag 480
gtactctgct tcaccaacaa cattccgag cgcgacggcg gcacccacct gaccggcctg 540
cgcgcggcaa tgacccgct gatcaacaag tatatcgacg aaaacgactt cgccaagaaa 600
gccaaagtcg aaatcagcgg cgacgacatg cgcaaggcc tgacctgctg gctgtccgtg 660
aaagtgccgg agccaaaatt ctccagccag accaaggaca agctggtctc ctccgaagtg 720
cgcgggcccag tggaagaaat cgtcgccaag acgctgacgg acttctgat ggaaaagccg 780
aacgacgcca agatcatttg cggcaagatc gtggaagcag cacgcgcccg tgaagcagcg 840
cgcaaggccc gcgacctgac ccgccgcaa ggcacatg acggcctggg cctgagcgcc 900
aagctggccg actgccagga aaaagacca gccctgtccg aactgtacat cgtcgagggg 960
gactccgag gcggtccgc caagcaaggc cgcgaccgta agttccaggc catcctgcca 1020
ctgctgggta aagtgtgaa cgtggagaag gcgcttcg aaaagatgct gtcgtccgag 1080
cagatcacca ccctgatcgc caccctggg accagcattg gcgccgacga atcaatatcg 1140
aaaa 1144

<210> 9
<211> 889
<212> DNA
<213> Duganella LO-22

ES 2 388 662 A1

<400> 9
 ccgcacgctg tctaccctt cactgacgtg gtatcccagg agcgcgagca acaagagctg 60
 aaagaaacct tgctgagcct gcagcccatg gtgaaagagc atccgcagga atccttcctc 120
 gatttcctca gccagtatct gggcgccgcc gaagccagcc gcatcctgaa tgccaccggt 180
 tacgacgcg tgcaactgcc gatcgtcacg gccgccatgg cttacgacat catcaagaag 240
 catccggaaa cgcaaaactg caccgagaac gccggtaatg aatggcgcta tgccaccgat 300
 ggctatggcc acctgctggg ccagctgcaa cggcaggccc tggccgccgg ggtggagttc 360
 cgctcgaac atcgctgct gtcgatggaa cagtccggcg ccgatcatct gctgaccttc 420
 agccacaagg gcgaagtcca gatgcagcgt gcgcgccatg tgatcctggc catgcccccc 480
 accgccatgg cgggcctgaa cctggacttc ccggccgcct ggagtccttt ccagtacgat 540
 tcctgcctt tgttcaaggg tttcctgacg ttcgagaaga gctggttcca gtgcttgggg 600
 ctgagcgaca aatgctgat ggctaataat cccctgcgca agatctactt caagagcgat 660
 aaatacctgc tcttctatac cgacagccaa agcgcctctt attggcggga cagcgtggag 720
 cagggcgagg agatttacct ggagcgcgtg cgccgccatc tggaggaggc gttgccgctc 780
 atgggcaagc cgctgcccgc cgatccagtc gcatttctat aacattggc cgcatggcgt 840
 cgagttctac ctggaaccg aagccaagca tccgactgcc ctggtgcat 889

<210> 10
 <211> 1372
 <212> DNA
 <213> Dugane11a MICO-M

<400> 10
 gcagcgcggg cttcggcctg gcggcgagtg gcgaacgggt gagtaatata tcggaacgta 60
 cccaagagtg ggggataacg tagcgaaagt tacgctaata ccgcatacga tctaaggatg 120
 aaagcagggg atcgaagac cttgtgctcc tggagcggcc gatatctgat tagctagttg 180
 gtgaggtaaa ggctcaccaa ggcaacgatc agtagctggt ctgagaggac gaccagccac 240
 actggaactg agacacggtc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa ttttgacaa 300
 tgggggcaac cctgatccag caatgccgcy tgagtgaaga aggccttcgg gttgtaaagc 360
 tcttttgtca gggaagaaaa ggccgtggct aatatccaca gctgctgacg gtacctgaag 420
 aataagcacc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggggtg caagcgtaa 480
 tcggaattac tgggcgtaaa gcgtgcgag gcggtttcgt aagtctgtcg tgaaatcccc 540
 gggcttaacc tgggaatggc gatggagact gcgaggctag agtttggcag aggggggtag 600
 aattccacgt gtagcagtga aatgcgtaga gatgtggagg aacaccgatg gcgaaggcag 660
 cccctgggt caaaactgac gctcatgcac gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 720
 ccctgtagt ccacgccta aacgatgtct actagttggt gggctttaat tgacttagta 780
 acgcagctaa cgcgtgaagt agaccgcctg gggagtacgg tcgcaagatt aaaactcaaa 840
 ggaattgacg gggaccgca caagcgggtg atgatgtgga ttaattcgat gcaacgcgaa 900

ES 2 388 662 A1

aaaccttacc tacccttgac atggcaggaa tcccggagag atctgggagt gctcgaaaga 960
 gaacctgcac acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 1020
 gtcccgaac gagcgcaacc cttgtcatta gttgctacgc aagagcactc taatgagact 1080
 gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaagt cctcatggcc cttatgggta 1140
 gggcttcaca cgtcatacaa tggtaacatac agagggccgc caaccgcga gggggagcta 1200
 atcccagaaa gtgtatcgta gtccggattg tagtctgcaa ctcgactaca tgaagttgga 1260
 atcgctagta atcgcggatc agcatgtcgc ggtgaatacg ttcccgggtc ttgtacacac 1320
 cgcccgtcac accatgggag cgggttttac cagaagtagg tagcttaacc gt 1372

<210> 11
 <211> 1075
 <212> DNA
 <213> Duganella MICO-M

<400> 11
 gcactgtcca actgctgctg gtagcattcc gccgcgacgg caaagtgcac cagatggaat 60
 tcgtcaaagg cgtggcacag aaccgcgaga tcgaaatgat cgacggcgtc gccacctccc 120
 cgatcaaggt gatcggcgaa accgacaagc gcggcaccga cgtgcacttc tgggccgacg 180
 aagagatctt caccacgtg gaattccact acgagatcct ggccaagcgt atccgcgagc 240
 tgtccttctt gaacaacggc gtcaacatca agctgaccga ccagcgcacc ggcaaggaag 300
 aaatcttcgc attcgaaggc ggcacccgcg gcttcgttga atacatcaac aaagccaaga 360
 ccgtcctgca cccgaccgta ttccaggcaa ccggcgaacg ccagtccgac cagggcacca 420
 ccatctcggg ggacgtgtcg atgcaatgga acgacgcctt caacgaacag gtactctgct 480
 tcaccaaaa cattccgag cgcgacggcg gacccacct gaccggcctg cgcgcgga 540
 tgacccgctg gatcaacaag tacatcgacg aaaacgactt cgccaagaag gccaaaggtt 600
 aaatcagcgg cgacgacatg cgcgaaggcc tgacctgctg gctgtccgtg aaagtgccgg 660
 aaccgaagt ctcgtcgcag accaaagaca agctggatc gtccgaagtg cgcggcccgg 720
 tcgaagagat cgtcgccaag acgctgaccg acttcctgat ggaaaagccg aacgacgcca 780
 agatcatctg cggcaagatc gtggaagcag cgcgcgcccg tgaagcagcg cgcaaggccc 840
 gcgacctgac ccgcccga aa ggcattatgg acggcctggg cctgagcgc aagctggccc 900
 actgccagga aaaagatcca gcattgtccg aactgtatat cgtcgagggt gactccgcag 960
 gcggctccgc caagcagggc cgcgaccgta agttccaggc catcctgccg ctgcgcggtg 1020
 aggtgctgaa cgtggagaag gcacgcttcg aaaagatgct gtcttccgag cagat 1075

<210> 12
 <211> 944
 <212> DNA
 <213> Duganella MICO-M

<400> 12
 gtctgcccga cgctgtctac ccgttactg aagtggatc ccaggagcgc gagcagcaag 60

ES 2 388 662 A1

agttgaagga taccctgctc agcttgacgc ccatggtgaa agagcatcca gaggaatcct 120
 tccttgattt cgtcagccat tatctgggtg ctgccgaagc tctccgcatc ctcaaggcca 180
 ccggttacga cgcgctgcaa ctgccgatcg tcacggccgc catggcttac gacatcatca 240
 aaaagcatcc ggaaacacaa aactgcaccg agaacgccgg taatgaatgg cgctatgcca 300
 ccgatggcta tggccagctg ctggtccagc tgcaacggca ggcccaggcc gacgggggtgg 360
 agttccgcct cgagcaccgc ttgctgtcgg tggaaaagtc cggcgccgac catctgtctg 420
 ccttcagcca tcacggtgaa gtccagatgc agcgtgacgc ccatgtgatc ctggctgttc 480
 ctcccaccgc catggcggga ctgaacctgg atttcccgtc cgcctggagc ccattccagt 540
 acgactcgtc gcctttgttc aagggttcc tgacgtttga gaaaagctgg ttcgagtgca 600
 tgggtctgac cgacaaaatg ctcatgtcca gcaatcccct gcgcaagatc tacttcaaga 660
 gcgataaata cctgctcttc tataccgaca gccaaagcgc cctctattgg cgggacagcg 720
 tggagcaggc cgaagagatt tacctggagc gcgtgacgcc ccacctggag gaagcattgc 780
 cgctcaacgg caagccgctg ccgccgatcc agtcgcattt ctacaagcac tggccgcacg 840
 gcgtcgagtt ttacctggaa cccgaagcca agcatcctgc tgccctcgtg catccgagcg 900
 gcatcatcgc ctgttcggac gcgtacacct cgcactgcgg ctgg 944

<210> 13
 <211> 1346
 <212> DNA
 <213> Duganella LOBA-24

<400> 13
 ggccctggcgg cgagtggcga acgggtgagt aatatacgg aacgtacca agagtggggg 60
 ataacgtagc gaaagttacg ctaataccgc atacgatcta aggatgaaag caggggatcg 120
 caagaccttg tgctcctgga gcggccgata tctgattagc tagttggtgg ggtaaaggcc 180
 caccaaggca acgatcagta gctggtctga gaggacgacc agccacactg gaactgagac 240
 acggtccaga ctctacggg aggcagcagt ggggaatctt ggacaatggg ggcaaccctg 300
 atccagcaat gccgcgtgag tgaagaaggc cttcgggttg taaagctctt ttgtcagggg 360
 agaaaaggcc gtggctaata tccacgactg ctgacggtac ctgaagaata agcaccggct 420
 aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggggtgcaag cgttaatcgg aattactggg 480
 cgtaaagcgt gcgcaggcgg tttcgttaagt ctgtcgtgaa atccccgggc ttaacctggg 540
 aatggcgtat gagactgcga ggctagagtt tggcagaggg ggggtagaat tccacgtgta 600
 gcagtgaaat gcgtagagat gtggaggaac accgatggcg aaggcagccc cctgggtcaa 660
 aactgacgct catgcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca 720
 cgccctaaac gatgtctact agttgttggg tcttaattga cttagtaacg cagctaacgc 780
 gtgaagtaga ccgctgggg agtacggctg caagattaaa actcaaagga attgacgggg 840
 acccgacaaa gcggtgatg atgtggatta attcgatgca acgcgaaaaa ccttacctac 900
 ccttgacatg gcaggaatcc tgaagagatt tgggagtgct cgaaagagaa cctgcacaca 960

ES 2 388 662 A1

ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatggt gggttaagtc ccgcaacgag 1020
 cgcaaccctt gtcattagtt gctacgcaag agcactctaa tgagactgcc ggtgacaaac 1080
 cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcct catggccctt atgggtaggg cttcacacgt 1140
 catacaatgg tacatacaga gggccgcaa cccgcgaggg ggagctaadc ccagaaagtg 1200
 tatcgtagtc cggattgtag tctgcaactc gactacatga agttggaatc gctagtaatc 1260
 gcggatcagc atgtcgcggt gaatacgttc ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc 1320
 atgggagcgg gttttaccag aagtag 1346

<210> 14
 <211> 1127
 <212> DNA
 <213> Dugane11a LOBA-24

<400> 14
 aacgcactgt ccaagctgct gcgctgacc atccgccgag acggcaaagt ccaccagatg 60
 gaattcgtcc gcggcgccgc gcaaacctg gaaatcgaag tgatcgacgg cgtggctgtc 120
 tccccgatca aagtgatcgg cgaaaccgac aagcgcggta ccgacgtgca cttctgggccc 180
 gacgaagaga ttttcacgca cgtggaattc cactacgaga tcctggccaa gcgtatccgc 240
 gaactgtcct tcctgaacaa cggcgtcaac atcaagctga ccgaccagcg caacggcaag 300
 gaagaaatct tcgcttcga aggcggcacc cgcggcttcg ttgaatacat caacaaagcc 360
 aagaccgtgc tgcacccgac cgtgttccag gccaccggcg aacgccagtc cgaccagaac 420
 accacgatca ccgttgacgt ctccatgcaa tggaacgacg cttcaacga acaggtactc 480
 tgcttcacca acaacattcc gcagcgcgac ggcggcacc acctgaccgg cctgcgcgag 540
 gcaatgacc gcgtgatcaa caagtatatc gacgaaaacg acttcgcaa gaaagccaaa 600
 gtcgaaatca gcggcgacga catgcgcgaa ggctgacct gcgtgctgtc cgtgaaagtg 660
 ccggagccaa aattctccag ccagaccaag gacaagctgg tctcctccga agtgcgcggc 720
 ccagtggaag aaatcgtcgc caagacgtg acggacttcc tgatggaaaa gccgaacgac 780
 gccaagatca tttgcggcaa gatcgtgga gacgacgag cccgtgaagc agcgcgcaag 840
 gcccgcgacc tgacccgccg caaaggcatc atggacggcc tgggcctgag cgccaagctg 900
 gccgactgcc aggaaaaaga cccagccctg tccgaactgt acatcgtcga gggtgactcc 960
 gcaggcggct ccgccaagca aggccgagc cgtaagtcc aggccatcct gccactgagc 1020
 ggtaaagtgc tgaacgtgga gaaggcgcgc ttcgaaaaga tgctgtcgtc cgagcagatc 1080
 accaccctga tcgccaccct gggcaccagc attggcgcgg acgaatc 1127

<210> 15
 <211> 904
 <212> DNA
 <213> Dugane11a LOBA-24

<400> 15
 cacgctgtct accccttcac tgacgtggta tcccaggagc gcgagcaaca agagctgaaa 60

ES 2 388 662 A1

gaaaccttgc tgagcctgca gcccatggtg aaagagcatc cgcaggaatc cttcctcgat 120
 ttcctcagcc agtatctggg cgccgccgaa gccagccgca tcctgaatgc caccggttac 180
 gacgcgctgc aactgccgat cgtcacggcc gccatggctt acgacatcat caagaagcat 240
 ccggaaacgc aaaactgcac cgagaacgcc ggtaatgaat ggcgctatgc caccgatggc 300
 tatggccacc tgctgggcca gctgcaacgg caggccctgg ccgccggggg ggagttccgc 360
 ctcgaacatc gcctgctgtc gatggaacag tccggcgccg atcatctgct gaccttcagc 420
 cacaagggcg aagtccagat gcagcgtgcg cgccatgtga tcctggccat gccccccacc 480
 gccatggcgg gcctgaacct ggacttcccg gccgcctgga gtcctttcca gtacgattcc 540
 ctgcctttgt tcaagggttt cctgacgttc gagaagagct ggttccagtg cttggggctg 600
 agcgacaaaa tgctgatggc taataatccc ctgcgcaaga tctacttcaa gagcgataaa 660
 tacctgctct tctataccga cagccaaagc gccctctatt ggcgggacag cgtggagcag 720
 ggcgaggaga ttacctgga gcgcgtgcbc cgccatctgg aggaggcgtt gccgctcatg 780
 ggcaagccgc tgccgccgat ccagtcgat ttctataaac attggccgca tggcgtcgag 840
 ttctacctgg aaccggaagc caagcatccg actgccctgg tgcattccgag cggcatcatc 900
 gcct 904

<210> 16
 <211> 1384
 <212> DNA
 <213> Duganella Baetica-33

<400> 16
 gcagcgcggg cttcggcctg gcggcgagtg gcgaacgggt gagtaatata tcggaacgta 60
 cccaagagtg ggggataacg tagcgaaagt tacgctaata ccgcatacga tctaaggatg 120
 aaagcagggg atcgaagac cttgtgctcc tggagcggcc gatatctgat tagctagttg 180
 gtggggtaaa ggcccaccaa ggcaacgatc agtagctggt ctgagaggac gaccagccac 240
 actggaactg agacacggtc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa ttttgacaa 300
 tgggggcaac cctgatccag caatgccgcg tgagtgaaga aggccttcgg gttgtaaagc 360
 tcttttgtca gggaagaaaa ggtcgtggct aatatccacg actgctgacg gtacctgaag 420
 aataagcacc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggggtg caagcgtaa 480
 tcggaattac tgggcgtaaa gcgtgcbcag gcggtttcgt aagtctgtcg tgaaatcccc 540
 gggcttaacc tgggaatggc gatggagact gcgaggctag agtttggcag aggggggtag 600
 aattccacgt gtagcagtga aatgcgtaga gatgtggagg aacaccgatg gcgaaggcag 660
 cccctgggt caaaactgac gctcatgcac gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 720
 ccctggtagt ccacgcccta aacgatgtct actagttggt gggctttaat tgacttagta 780
 acgcagctaa cgcgtgaagt agaccgctg gggagtacgg tcgcaagatt aaaactcaaa 840
 ggaattgacg gggaccgca caagcgggtg atgatgtgga ttaattcgat gcaacgcgaa 900

ES 2 388 662 A1

aaaccttacc tacccttgac atggcaggaa tcctgaagag atttgggagt gctcгаааага 960
 gaacctgcac acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttggggttaa 1020
 gtcccгcaac gagcgcaacc cttgtcatta gttgctacgc aagagcactc таатgagact 1080
 gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaagt cctcatggcc cttatgggta 1140
 gggcttcaca cgtcatacaa tggtacatac agagggccgc caaccгcga gggggagcta 1200
 atcccagaaa gtgtatcгta gtccgгattg tagtctgcaa ctcgactaca tgaagttgга 1260
 atcgctagta atcgcgгatc агcatgtcgc ggtгаатacг ttcccгggtc ttgtacacac 1320
 cгcccгtcac accatgggag cgggttttac cagaagtagg tagcttaacc gyaaggaggг 1380
 cgct 1384

<210> 17
 <211> 1133
 <212> DNA
 <213> Duganella Baetica-33

<400> 17
 ctgсgtgacг cactgtccaa gctgctgсgc gtgaccatcc gccгcгacгg caaagttccac 60
 cagatggaaт tcgtccгcгg cгcccгcгcaa aaccgtgaaa tcгaaatgat cгacгgгcгtg 120
 gctgtctccc cгatcaaagt gatcгgгcгaa accгacaagc гcгgгtaccга cgtgcacttc 180
 tggгccгacг aagagatttt cacгcacгtg gaattccact acгagatcct ggccaagcгt 240
 atccгcгaaс tgтccttctt gaacaacгgc gtcaacatca агctгaccга ccagcгcaaс 300
 ggcaaggaag aaatcttcгc cttcгаaggc ggcacccгcг gcttcгttга atacatcaac 360
 aaagccaaga ccgtgctgca cccгaccгtg ttccaggcca ccгgгcгаacг ccagttccгac 420
 cagaacacca cгatcaccgt tgacgtctcc atgcaatgга acгacгcctt caacгаacag 480
 gtactctgct tcaccaaaa cattccгcag cгcгacгgгcг gcaccacct gaccгgгcctg 540
 cгcгcгgгcaa tgaccгcгt gatcaaaaг tatatcгacг aaaacгactt cгccaagaaa 600
 gccaagtcг aaatcagcгg cгacгacatg cгcгаaggcc tgacctгcгt gctgtccгtg 660
 aaagtgccгg агccaaaatt ctccagccag accaaggaca агctгgгtctc ctccгаagtg 720
 cгcгgгcccгg tgгаagaaat cgtcгccaag acгctгacгg acttctgat ggaaaagccг 780
 aacгacгcca агatcatttg cгgгаagatc gtgгаagcag cacгcгcccг tгаagcagcг 840
 cгcaaggccc гcгacctgac ccгccгcaaa ggcatcatgг acгgгcctggg cctгagcгcc 900
 aagctggccг actgccagga aaaagacca gccctgtccг aactgtacat cgtcгagggгt 960
 gactccгcag гcгgгtccгc caagcaaggc cгcгaccгta агttccaggc catcctгcca 1020
 ctгcгcгgгta aagtgctgaa cgtggagaag гcгcгcttcг aaaagatgct gtcgtccгag 1080
 cagatacca ccctgatcгc caccctggгc accagcattg гcгccгacга atc 1133

<210> 18
 <211> 962
 <212> DNA
 <213> Duganella Baetica-33

ES 2 388 662 A1

<400> 18
 gcgggctgcc gcacgctgtc tacccttca ctgacgtggt atcccaggag cgcgagcaac 60
 aagagctgaa agaaaccttg ctgagcctgc agcccatggt gaaagagcat ccgaggaat 120
 ccttcctcga tttcctcagc cagtatctgg gcgccgccga agccagccgc atcctgaatg 180
 ccaccggtta cgacgcgctg caactgccga tcgtcacggc cgccatggct tacgacatca 240
 tcaagaagca tccggaaacg caaaactgca ccgagaacgc cggtaatgaa tggcgctatg 300
 ccaccgatgg ctatggccac ctgctgggcc agctgcaacg gcaggccctg gccgccgggg 360
 tggagttccg cctcgaacat cgcctgctgt cgatggaaca gtccggcgcc gatcatctgc 420
 tgacctcag ccacaagggc gaagtccaga tgcagcgtgc gcgccatgtg atcctggcca 480
 tgccccccac cgccatggcg ggcctgaacc tggacttccc ggccgcctgg agtcctttcc 540
 agtacgattc cctgcctttg ttcaaggggt tcctgacgtt cgagaagagc tggttccagt 600
 gcttggggct gagcgacaaa atgctgatgg ctaataatcc cctgcgcaag atctacttca 660
 agagcgataa atacctgctc ttctataccg acagccaaag cgccctctat tggcgggaca 720
 gcgtggagca gggcgaggag atttacctgg agcgcgtgcy ccgccatctg gaggaggcgt 780
 tgccgctcat gggcaagccg ctgccgccga tccagtcgca tttctataaa cattggccgc 840
 atggcgtcga gttctacctg gaacccgaag ccaagcatcc gactgccctg gtgcatccga 900
 gcggcatcat cgctgctcg gacgcgtata cctgcactg cggctggatg gggggccagc 960
 ct 962

<210> 19
 <211> 1365
 <212> DNA
 <213> Duganella MICO-C

<400> 19
 cgaacggcag cgcgggcttc ggcctggcgg cgagtggcga acgggtgagt aatatatcgg 60
 aacgtacca agagtggggg ataacgtagc gaaagttacg ctaataccgc atacgatcta 120
 aggatgaaag caggggatcg caagacctg tgctcctgga gcggccgata tctgattagc 180
 tagttggtga ggtaaaggct caccaaggca acgatcagta gctggtctga gaggacgacc 240
 agccacactg gaactgagac acggtccaga ctctacggg aggcagcagt ggggaatfff 300
 ggacaatggg ggcaaccctg atccagcaat gccgcgtgag tgaagaaggc cttcggggtg 360
 taaagctctt ttgtcagga agaaaaggct gtggctaata tccacagctg ctgacggtac 420
 ctgaagaata agcaccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggggtgcaag 480
 cgtaaatcgg aattactggg cgtaaagcgt gcgcaggcgg tttcgtaagt ctgtcgtgaa 540
 atccccgggc ttaacctggg aatggcgatg gagactgcga ggctagagtt tggcagaggg 600
 gggtagaatt ccacgtgtag cagtgaaatg cgtagagatg tggaggaaca ccgatggcga 660
 aggcagcccc ctgggtcaaa actgacgctc atgcacgaaa gcgtggggag caaacaggat 720
 tagataccct ggtagtccac gccctaaacg atgtctacta gttggtgggt ctttaattgac 780

ES 2 388 662 A1

ttagtaacgc agctaacgcg tgaagtagac cgcctgggga gtacggtcgc aagattaata 840
ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cgggtgatga tgtggattaa ttcgatgcaa 900
cgcgaaaaac cttacctacc cttgacatgg caggaatcct ggagagatct gggagtgctc 960
gaaagagaac ctgcacacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgctg tgagatgttg 1020
ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg tcattagttg ctacgcaaga gcaactta 1080
gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaagtcctc atggccctta 1140
tgggtagggc ttcacacgtc atacaatggt acatacagag ggccgccaac ccgaggggg 1200
gagctaatac cagaaagtgt atcgtagtcc ggattgtagt ctgcaactcg actacatgaa 1260
gttgaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgtcgcgggtg aatacgttcc cgggtcttgt 1320
acacaccgcc cgtcacacca tgggagcggg ttttaccaga agtag 1365

<210> 20
<211> 1140
<212> DNA
<213> Duganelia MICO-C

<400> 20
gtgacgcact gtccaactgc tgcgcgtgac catccgccgc gacggcaaag tgcaccagat 60
ggaattcgtc aaaggcgtgg cacagaaccg cgagatcgaa atgatcgacg gcgtcgccac 120
ctccccgatc aaggatgatc gcgaaaccga caagcgcggc accgacgtgc acttctggggc 180
cgacgaagag atcttaccac acgtggaatt ccaactacgag atcctggcca agcgtatccg 240
cgagctgtcc ttctgaaca acggcgtcaa catcaagctg accgaccagc gcaccggcaa 300
ggaagaaatc ttgcattcg aaggcggcac ccgcggttc gttgaataca tcaacaaagc 360
caagaccgtc ctgcaccga ccgtattcca ggcaaccggc gaacgccagt ccgaccaggg 420
caccaccatc tcggtggacg tgtcgatgca atggaacgac gccttcaacg aacaggtact 480
ctgcttcacc aacaacattc cgcagcgcga cggcggcacc cacctgaccg gcctgcgcgc 540
ggcaatgacc cgcgtgatca acaagtacat cgacgaaaac gacttcgcca agaaggccaa 600
ggttgaaatc agcggcgacg acatgcgcga aggcctgacc tgcgtgctgt ccgtgaaagt 660
gccggaaccg aagttctcgt cgcagaccaa agacaagctg gtatcgtccg aagtgcgcgg 720
cccggtcgaa gagatcgtcg ccaagacgct gaccgacttc ctgatggaaa agccgaacga 780
cgccaagatc atctgcggca agatcgtgga agcagcgcgc gcccgatgaag cagcgcgcaa 840
ggcccgcgac ctgacccgcc gcaaaggcat catggacggc ctgggcctga gcgccaagct 900
ggccgactgc caggaaaaag atccagcatt gtccgaactg tatatcgtcg aggggtgactc 960
cgcaggcggc tccgccaagc agggccgcga ccgtaagtcc caggccatcc tgccgctgcg 1020
cggtaaagtg ctgaacgtgg agaaggcacg cttcgaaaag atgctgtctt ccgagcagat 1080
caccaccctg atcgccacc tgggcaccag catcggcgcc gacgaatcaa tctcgaaaag 1140

<210> 21

ES 2 388 662 A1

<211> 895
 <212> DNA
 <213> Dugane11a MICO-C

<400> 21
 ctgtctaccc gttcactgaa gtggtatccc aggagcgcga gcagcaagag ttgaaggata 60
 ccctgctcag cttgcagccc atggtgaaag agcatccaga ggaatccttc cttgatttcg 120
 tcagccatta tctgggtgct gccgaagctc tccgcatcct caaggccacc ggttacgacg 180
 cgctgcaact gccgatcgtc acggccgcca tggcttacga catcatcaaa aagcatccgg 240
 aacacaaaa ctgcacccga gaacgccggg aatgaatggc gctatgccac cgatggctat 300
 ggccagctgc tgggtccagct gcaacggcag gcccgaggcc cgggggtgga gttccgcctc 360
 gagcaccgct tgctgtcggg gaaaaagtcc ggcgccgacc atctgctggc cttcagccat 420
 cacggtgaag tccagatgca gcgtgcgcgc catgtgatcc tggctgttcc tcccaccgcc 480
 atggcgggac tgaacctgga tttcccgtcc gcctggagcc cattccagta cgactcgctg 540
 cttttgttca agggcttctt gacgtttgag aaaagctggg tcgagtgcac gggcctgacc 600
 gacaaaatgc tcatgtccag caatcccctg cgcaagatct acttcaagag cgataaatac 660
 ctgctcttct ataccgacag ccaaagcgc ctctattggc gggacagcgt ggagcagggc 720
 gaagagattt acctggagcg cgtgcccgc cacctggagg aagcattgcc gctcaacggc 780
 aagccgctgc cgccgatcca gtcgcatttc tacaagcact ggccgcacgg cgtcgagttt 840
 tacctgaacc cgaagccaag catcctgctg ccctcgtgca tccgagcggc atcat 895

<210> 22
 <211> 1391
 <212> DNA
 <213> Dugane11a MICO-M2

<400> 22
 gtcgaacggc agcgcgggct tcggcctggc ggcgagtggc gaacgggtga gtaatatac 60
 ggaacgtacc caagagtggg ggataacgta gcgaaagtta cgctaatacc gcatacgatc 120
 taaggatgaa agcaggggat cgcaagacct tgtgtcctc gagcggccga tatctgatta 180
 gctagttagt gaggtaaagg ctcaccaagg caacgatcag tagctggtct gagaggacga 240
 ccagccacac tggaactgag acacggtcca gactcctacg ggaggcagca gtgggggaatt 300
 ttggacaatg ggggcaacc tgatccagca atgccgcgtg agtgaagaag gccttcgggt 360
 tgtaaagctc ttttgtcagg gaagaaaagg ctgtggctaa tatccacagc tgctgacggg 420
 acctgaagaa taagcaccgg gctaactacg tgccagcagc cgcggtataa cgtaggggtgc 480
 aagcgtaaat cggaattact gggcgtaaag cgtgcccagg cggtttcgta agtctgtcgt 540
 gaaatccccg ggcttaacct gggaatggcg atggagactg cgaggctaga gtttggcaga 600
 ggggggtaga attccacgtg tagcagtgaa atgcgtagag atgtggagga acaccgatgg 660
 cgaaggcagc cccctgggtc aaaactgacg ctcatgcacg aaagcgtggg gagcaaacag 720
 gattagatac cctggtagtc cacgccctaa acgatgtcta ctagttgttg ggtcttaatt 780

ES 2 388 662 A1

gacttagtaa cgcagctaac gcgtgaagta gaccgcctgg ggagtacggt cgcaagatta 840
 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcgggtgga tgatgtggat taattcgatg 900
 caacgcgaaa aaccttacct acccttgaca tggcaggaat cctggagaga tctgggagtg 960
 ctcgaaagag aacctgcaca caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg 1020
 ttgggttaag tcccgaacg agcgaaccc ttgtcattag ttgctacgca agagcactct 1080
 aatgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc ctcatggccc 1140
 ttatgggtag ggcttcacac gtcatacaat ggtacataca gagggccgcc aaccgcgag 1200
 ggggagctaa tcccagaaag tgtatcgtag tccggattgt agtctgcaac tcgactacat 1260
 gaagtggaa tcgctagtaa tcgcgatca gcatgtcgcg gtgaatacgt tcccgggtct 1320
 tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagc gggttttacc agaagtaggt agcttaaccg 1380
 caaggagggc g 1391

<210> 23
 <211> 1140
 <212> DNA
 <213> Duganella MICO-M2

<400> 23
 cgtctcctgc gtgaacgcac tgtccaactg ctgcgctga ccatccgccg cgacggcaaaa 60
 gtgcaccaga tggaattcgt caaaggcgtg gcacagaacc gcgagatcga aatgatcgac 120
 ggcgtcgcca cctccccgat caaggtgatc ggcgaaaccg acaagcgcgg caccgacgtg 180
 cacttctggg ccgacgaaga gatcttcacc cacgtggaat tccactacga gatcctggcc 240
 aagcgtatcc gcgagctgtc cttcctgaac aacggcgtca acatcaagct gaccgaccag 300
 cgcaccgggc aaggaagaaa tcttcgcatt cgaaggcggc acccgcggct tcgttgaata 360
 catcaacaaa gccaaagaccg tcctgcaccg gaccgtattc caggcaaccg gcgaacgcca 420
 gtccgaccag ggcaccacca tctcggtgga cgtgtcgatg caatggaacg acgccttcaa 480
 cgaacaggta ctctgettca ccaacaacat tccgcagcgc gacggcggca cccacctgac 540
 cggcctgctc gcggcaatga cccgcgtgat caacaagtac atcgacgaaa acgacttcgc 600
 caagaaggcc aaggttgaaa tcagcggcga cgacatgctc gaaggcctga cctgctgtgt 660
 gtccgtgaaa gtgccggaac cgaagttctc gtcgcagacc aaagacaagc tggatcgtc 720
 cgaagtgcgc ggcccggctc aagagatcgt cgccaagacg ctgaccgact tctgatgga 780
 aaagccgaac gacgccaaga tcatctgcgg caagatcgtg gaagcagcgc gcgcccgtga 840
 agcagcgcgc aaggcccgcg acctgaccgg ccgcaaaggc atcatggacg gcctgggctt 900
 gagcgccaag ctggccgact gccaggaaaa agatccagca ttgtccgaac tgtatatcgt 960
 cgaggggtgac tccgcaggcg gctccgcca gaggggccgc gaccgtaagt tccaggccat 1020
 cctgccgctg cgcggtgaagg tgctgaacgt ggagaaggca cgcttcgaaa agatgctgtc 1080
 ttccgagcag atcaccaccg tgatgccac cctgggcacc agcatcggcg ccgacgaatc 1140

ES 2 388 662 A1

<210> 24
 <211> 899
 <212> DNA
 <213> Dugane11a MICO-M2

<400> 24
 gcacgctgtc tacccgttca ctgaagtggg atcccaggag cgcgagcagc aagagttgaa 60
 ggataccctg ctcagcttgc agcccatggg gaaagagcat ccagaggaat ccttccttga 120
 tttcgtcagc cattatctgg gtgctgccga agctctccgc atcctcaagg ccaccggtta 180
 cgacgcgctg caactgccga tcgtcacggc cgccatggct tacgacatca tcaaaaagca 240
 tccggaaaca caaaactgca ccgagaacgc cggtaatgaa tggcgctatg ccaccgatgg 300
 ctatggccag ctgctgggcc agctgcaacg gcaggcccag gccgccgggg tggagttccg 360
 cctcgagcac cgcttgctgt cggtggaana gtccggcgcc gaccatctgc tggccttcag 420
 ccatcacggg gaagtccaga tgcagcgtgc gcgccatgtg atcctggctg ttcctcccac 480
 cgccatggcg ggactgaacc tggatttccc gtccgcctgg agcccattcc agtacgactc 540
 gctgcctttg ttcaagggtc tcctgacgtt tgagaaaagc tggttcgagt gcatgggctc 600
 gaccgacaaa atgctcatgt ccagcaatcc cctgcgcaag atctacttca agagcgataa 660
 atacctgctc ttctataccg acagccaaag cgccctctat tggcgggaca gcgtggagca 720
 gggcgaagag atttacctgg agcgcgtgcg ccgccacctg gaggaagcat tgccgctcaa 780
 cggcaagccg ctgccgccga tccagtcgca tttctacaag cactggccgc acggcgctca 840
 gttttacctg gaacccgaag ccaagcatcc tgctgcctc gtgcatccga gcggcatca 899

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador 8f

<400> 25
 agagtttgat cctggctcag 20

<210> 26
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador 1492r

<400> 26
 acggctacct tggtagact t 21

<210> 27
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador Up-1G

<400> 27 ygcsggcggy aagttcga	18
<210> 28 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Cebador UP-2G	
<400> 28 ccrtcgcacgt cvgcrtcggg	20
<210> 29 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Cebador VPA3	
<400> 29 ccrcagctsc ayccgcattt ccag	24
<210> 30 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Cebador VPA4	
<400> 30 caggcygccc tccatccagc crca	24



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031655

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WANG H. et al., "Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of <i>Duganella</i> sp B2". <i>Biochemical Engineering Journal</i> (2009), vol. 44 (2-3), pág. 119-124. Todo el documento.	6,8-16
A		1-5,7,17
A	LI WEN-JUN et al., " <i>Duganella violaceinigrasp. nov.</i> , a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil" <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> (2004), vol. 54, pág. 1811-1814, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.09.2012

Examinador
M. Hernández Cuellar

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)
C12P17/16 (2006.01)
A61K31/40 (2006.01)
A61P31/00 (2006.01)
C12R1/01 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P, A61K, A61P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.09.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5, 7-17	SI
	Reivindicaciones 6	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-5, 7 y 17	SI
	Reivindicaciones 8-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WANG H. et al., "Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of Duganella sp B2". Biochemical Engineering Journal (2009), vol. 44 (2-3), pág. 119-124. Todo el documento.	
D02	LI WEN-JUN et al., "Duganella violaceinigrasp. nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil" International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2004), vol. 54, pág. 1811-1814, todo el documento. Citado en la solicitud.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a unas cepas bacterianas de Duganella spp. productoras de violaceína obtenidas de la rizosfera de olivos silvestres y cultivados. Las cepas bacterianas tienen una identidad de entre un 98,6% y un 99,3% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 1 del gen de ADNr 16S, de entre un 93,7% y un 95,7% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 2 del gen gyrB y de entre un 89,8% y un 90,8% con respecto al fragmento de ADN de SEQ ID NO: 3 del gen vioA. Preferentemente las cepas son CECT 7779, CECT 7780 y CECT 7781 y más preferentemente la cepa bacteriana es CECT 7780. Además, la presente invención se refiere a sus combinaciones con otros microorganismos y a las composiciones que comprenden los productos anteriores, así como a un procedimiento para la producción de violaceína y a la violaceína producida para su aplicación biotecnológica y agronómica.

El documento D01 describe un estudio de optimización de producción de violaceína a partir de la cepa Duganella sp. B2. De esta forma, a partir de un inóculo de 10% (v/v), en condiciones óptimas después de 32h de cultivo, los autores obtienen 162g/L de violaceína cruda, lo que constituye una producción de violaceína mucho mayor que las descritas hasta esa fecha.

En este documento también se hace referencia a diversas clases de bioactividad atribuidas a la violaceína como por ejemplo su actividad antibactericida, antitumoral, antiviral, antioxidante y anti-protozoos.

El documento D02 describe el aislamiento de la cepa YIM 31327T a partir de una muestra de la flora microbiana de la tierra del bosque de la provincia Yunnah de China. El análisis filogenético de esta cepa, basado en la secuencia completa del gen 16S rRNA, demostró que estaba estrechamente relacionada con la especie Duganella zoogloeoides. Sobre la base de las diferencias fenotípicas y genéticas existentes entre Duganella zoogloeoides y la cepa YIM 31327T los autores la proponen como una nueva especie del género Duganella denominada Duganella violaceinigras. Esta cepa produce un pigmento violeta-negro que no difunde

1.- NOVEDAD

Ninguno de los documentos describe cepas de Duganella productoras de violaceína que coincidan con los porcentajes de identidad de secuencias de la reivindicación 1. En este sentido, en opinión de esta Oficina las reivindicaciones 1-5, 7-17 cumplen con el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP 11/1986.

La violaceína como producto ya ha sido descrito con anterioridad en el estado de la técnica como por ejemplo en el documento D01. En consecuencia la reivindicación 6 no cumple el requisito de novedad del Art. 6.1 LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

El documento D01 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención. Este documento describe un estudio de optimización de producción de violaceína a partir de la cepa Duganella sp. B2. En este sentido, el problema que plantea la invención es la provisión de cepas alternativas de Duganella productoras de violaceína. La solución que aporta la invención son las cepas de Duganella productoras de violaceína aisladas de la rizosfera de olivos silvestres o cultivados que cumplen las condiciones de identidad de secuencias de la reivindicación 1. En particular las cepas son CECT 7779, CECT 7780 y CECT 7781. La diferencia entre la cepa Duganella sp B2 y las cepas de la solicitud radica en que la cepa Duganella sp B2 no presenta las identidades de secuencia indicadas en la reivindicación 1. El efecto técnico que resulta de esta diferencia es que las cepas de la invención producen entre 2,5 y 17,5 veces más violaceína que la cepa Duganella sp. B2. Ninguno de los documentos del estado de la técnica tomados solos o en combinación permiten deducir de manera obvia que tales porcentajes de identidad genómica sean responsables de la sobreproducción de violaceína. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-5 y 7 y 17 cumplen con el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986

Por otra parte el documento D01 hace referencia a las distintas clases de bioactividad atribuidas a la violaceína y por tanto el objeto de las reivindicaciones 8-16 no implica ningún esfuerzo inventivo por parte de un experto en la materia. En consecuencia las reivindicaciones 8-16, en tanto en cuanto se refieren a la violaceína, no cumplen el requisito de actividad inventiva recogido en el Art. 8.1 LP 11/1986