

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 351 142**

21 Número de solicitud: 200930325

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **17.06.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2011**

Fecha de la concesión: **11.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **23.01.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.01.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSIDAD DE GRANADA
CUESTA DEL HOSPICIO, S/N
18071 GRANADA, ES**

72 Inventor/es:
**MOLINA HIDALGO, CARLOS ALFONSO;
CAÑA ROCA, JUAN FRANCISCO;
OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ, ANTONIO y
VILCHEZ TORNERO, SUSANA**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **CEPA CECT 7462 DE BACILLUS PUMILUS Y MÉTODO PARA INCREMENTAR SUS EFECTOS ENTOMOPATÓGENOS.**

57 Resumen:

Cepa CECT 7462 de *Bacillus pumilus* y método para incrementar sus efectos entomopatógenos.

La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana de *Bacillus pumilus* (CECT 7462 ó *B. pumilus* TCC). Dicha cepa se puede tratar con exposiciones a bajas temperaturas dando lugar a un incremento de sus efectos entomopatógenos. La cepa en su totalidad, o sus estructuras cristalinas, ya haya sido tratada o no por el método de la invención, pueden ser utilizadas bien directamente para el control biológico de plagas, bien para la producción de bioinsecticidas que ayuden a este control. La presente invención también se refiere a las secuencias nucleotídicas que dan lugar a las proteínas entomopatógenas, así como a los plásmidos presentes en la cepa. También se refiere al uso de la cepa para la producción de enzimas de interés industrial.

ES 2 351 142 B1

DESCRIPCIÓN

Cepa CECT 7462 de *Bacillus pumilus* y método para incrementar sus efectos entomopatógenos.

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, específicamente a una nueva cepa bacteriana de *Bacillus pumilus* (CECT 7462 o *B. pumilus* TCC), además de a un método para incrementar sus efectos entomopatógenos al someterla a exposiciones a temperaturas inferiores a su temperatura óptima de crecimiento. Además se refiere a composiciones que incluyan la cepa original o ya tratada por el método de la invención, y/o sus estructuras cristalinas, y a sus usos para el control biológico de plagas o producción de bioinsecticidas. También se refiere a cualquier plásmido obtenible a partir de la cepa que contenga secuencias nucleotídicas, o bien a las propias secuencias, que den lugar a proteínas entomopatógenas, así como al uso de la cepa para la producción de enzimas de interés industrial.

Estado de la técnica anterior

Ceratitis capitata o mosca de la fruta del Mediterráneo, constituye una de las plagas más extendidas a nivel mundial, y es considerada una de las plagas más destructivas en frutas y verduras. Esta plaga genera la pérdida de cosechas enteras de productos de elevado interés agroalimentario. Debido a ello, a nivel internacional, se ha desarrollado legislación en torno a los procedimientos de control de los productos provenientes de países que sufren esta plaga. Uno de los mecanismos que se han postulado para evitar la expansión de la plaga es el sometimiento a cuarentena a los productos cuyo origen se encuentra en países con este problema. Estos periodos de cuarentena generan en muchas ocasiones grandes pérdidas económicas.

Además de la elevada destructividad de la plaga de *C. capitata*, este organismo presenta dificultades para su control. Esto se debe fundamentalmente a que los métodos existentes no son totalmente efectivos. La mayoría de los métodos llevados a cabo se basan en el uso de compuestos químicos que no permiten un control de la plaga que minimice las pérdidas económicas, sino que simplemente provocan una pequeña reducción de las mismas sin llegar a ser totalmente efectivos en su control. Además el uso de compuestos químicos de síntesis lleva aparejado, en multitud de casos, la posibilidad de producir algún problema de impacto ambiental y fenómenos de resistencia de insectos.

Estos tratamientos químicos se realizan fundamentalmente de dos formas, bien mediante la fumigación aérea de los cultivos con la consiguiente inespecificidad del tratamiento y su dificultad de alcanzar todas las áreas del mismo, o bien mediante el uso de insecticidas para el tratamiento del suelo. Ambos tratamientos presentan como dificultad añadida la inespecificidad de su acción con respecto al organismo a erradicar, produciendo daño sobre especies que pueden no tener ningún efecto nocivo sobre los cultivos, y que son esenciales para mantener el equilibrio ecológico.

Otra desventaja que presentan estos tratamientos con productos químicos es la aparición de resistencias en las poblaciones sobre las que se aplica. En la actualidad es fácil encontrar poblaciones de insectos con una mayor tolerancia a altas concentraciones de insecticidas de la que presentaban antes del uso de estos compuestos sobre los cultivos. Esto se observa por ejemplo en poblaciones de *C. capitata* recogidas en lugares donde se han realizado tratamientos con el insecticida organofosforado Malatión. Los individuos de poblaciones de zonas tratadas son entre 6 y 201 veces más resistentes que ejemplares de laboratorio, y entre 2 y 30 veces más resistentes que ejemplares recogidos en campos donde no se ha usado este insecticida (Magaña *et al.* 2007. *J. Econ. Entomol.*; 100: 1836-1843).

Debido a estos problemas que presentan los insecticidas de síntesis, a nivel internacional, cada vez se restringe más su uso. Un claro ejemplo es la eliminación del insecticida Malatión por parte de la Unión Europea, en verano de 2007, de la lista de elementos autorizados para el control de plagas. Este insecticida organofosforado era, en ese momento, el compuesto más utilizado para el control de la plaga de *C. capitata*. Estas restricciones hacen por lo tanto cada vez más complejo el control de esta plaga por parte de los agricultores.

Para tratar de solucionar la aparición de plagas en cultivos sin la utilización de compuestos químicos, se han realizado muchas aproximaciones en lo que se conoce con el nombre de control biológico. Una estrategia seguida ha sido la introducción en el hábitat de individuos estériles que evitasen la reproducción y propagación del organismo que representa una plaga. Esta aproximación permite el control sobre la población mediante una reducción del tamaño poblacional de la especie problema, pero normalmente va acompañado de otros sistemas de control para la eliminación de la plaga.

Otra de las soluciones que se han puesto en marcha para el control biológico de plagas, es el uso de organismos naturales con actividad entomopatógena. Uno de los ejemplos más claros de este desarrollo es el organismo *Bacillus thuringiensis*, ampliamente estudiado para el control de plagas de ciertos insectos (Roh *et al.* 2007. *J. Microbiol. Biotechnol.*; 17:547-559). Para este control se está utilizando tanto el microorganismo completo como partes del mismo (normalmente las proteínas Cry o los cristales que forman, o las proteínas Cyt) tanto de forma independiente, como en composiciones que los incluyan (WO2006042404).

Existe por tanto una necesidad de controlar la población de *C. capitata* en cultivos debido a los grandes perjuicios económicos que genera. Este control se ha de realizar de forma que se resuelvan las limitaciones y los inconvenientes que generan los actuales controles químicos de la plaga.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Bacillus pumilus*, así como a un método para aumentar de forma significativa sus efectos entomopatógenos y las cepas así obtenidas. También se refiere a una composición que contenga la cepa original, o ya tratada por el método de la invención, y/o sus estructuras cristalinas para su uso como bioinsecticida o para el control de plagas. También se refiere a cualquier plásmido que codifique secuencias, o bien a las propias secuencias, que den lugar a proteínas entomopatógenas obtenibles a partir de la cepa, tratada o no, y al uso de la cepa para la producción de enzimas de interés industrial.

El género *Bacillus* es reconocido como un grupo de agentes potenciales para el control de poblaciones de insectos debido a los efectos tóxicos que presentan muchos de sus representantes sobre diversas especies de insectos.

En la presente invención se analiza inicialmente la toxicidad de varias cepas de la especie *B. pumilus* sobre los individuos de la Mosca de la fruta del Mediterráneo (*C. capitata*). Mediante estos estudios se demuestra que existe una leve toxicidad de las diversas cepas estudiadas sobre los individuos de dicha especie. Esta toxicidad es similar por parte de todas las cepas cuando se suministran a larvas de *C. capitata* junto a la dieta de forma directa tras su cultivo. Sorprendentemente, cuando estas cepas se mantienen 96 horas a 4°C mezcladas con la dieta de las larvas de *C. capitata*, se produce un aumento de hasta un 70% en la muerte inducida en dichas larvas por parte de la cepa CECT 7462 (o *Bacillus pumilus* TCC). Por su parte, el resto de las cepas no presentan efectos significativos en su toxicidad sobre *C. capitata*, y mantienen o aumentan muy levemente la toxicidad mostrada sin el pretratamiento con frío.

La cepa CECT 7462 de la presente invención, por lo tanto, puede ser utilizada para controlar plagas de la mosca de la fruta del Mediterráneo. El uso de cepas naturales con alta actividad entomopatógena, como ocurre con la cepa de la presente invención, contribuye al correcto desarrollo de los cultivos, evitando las pérdidas producidas por la plaga, de forma que se ayuda al desarrollo agronómico de las regiones que las sufren. Además, su uso permite una mayor disponibilidad de estos recursos alimentarios para la población. Por ello, el desarrollo y uso de estos organismos representa una buena opción de futuro para el desarrollo de zonas agrícolas.

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención es una cepa bacteriana, la cepa CECT 7462 de *B. pumilus* clasificada por comparación de la secuencia de RNA 16S con las existentes en la base de datos de secuencias genéticas del National Institute of Health de Estados Unidos (NIH), es decir, de la base de datos GenBank. Se trata de un bacilo esporulante Gram positivo cuya designación taxonómica propuesta incluye la cepa CECT 7462 dentro del reino Eubacteria, phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae, género *Bacillus*, especie *B. pumilus*. La cepa CECT 7462 puede ser cultivada aunque sin limitarse, en medio LB (Luria-Bertani) líquido a una temperatura de 30°C en condiciones aerobias y agitación a 250 r.p.m. También puede ser cultivada aunque sin limitarse en medio sólido LB a 30°C y condiciones aerobias. Las condiciones de mantenimiento de dicha cepa son, pero sin limitarse, mediante una solución estéril al 40% de glicerol y congelando a -80°C, o mediante placas de cultivo con medio LB sólido a 4°C. Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende la cepa bacteriana CECT 7462.

El término “cepa” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una variante genotípica de una especie, y cuya población de organismos que descende de un único organismo o de una sola célula.

En la presente invención se entiende por “entomopatógeno” todo aquel organismo, elemento o efecto que provoca daño en los insectos sobre los que actúa, derivando en el mal desarrollo y/o en la muerte del insecto.

Es conocido que la regulación de muchos genes, así como la actividad de diversas moléculas en bacterias, se encuentra fuertemente influenciada por las condiciones ambientales a las que se encuentran expuestas en cada momento. En las bacterias patógenas, la regulación en función del ambiente en el que se encuentren se convierte en un elemento indispensable debido a las condiciones únicas que ofrece el hospedador para el ciclo vital de estas bacterias. Esta regulación es fundamental a la hora de expresar los genes de virulencia así como muchos otros genes, y de regular la actividad de sus productos, ya que su expresión en momentos inadecuados puede conllevar la muerte del individuo, la detención del ciclo vital o una desventaja adaptativa frente a otras especies.

Entre los factores ambientales reguladores de estos genes y de la actividad de sus productos, se encuentran aunque sin limitarnos, temperatura, pH, osmolaridad, tensión de oxígeno, concentración de metales o humedad. Dentro de estos factores, la temperatura es uno de los más importantes y que ha demostrado mayor eficacia en esta regulación. De esta forma la temperatura es un factor regulador fundamental en muchas especies bacterianas para determinar en qué condiciones se encuentran y cuales son los genes que han de expresar.

En este sentido, los resultados de la presente invención muestran que la aplicación de bajas temperaturas a la cepa CECT 7462 generan en la misma un aumento de su patogenicidad en insectos dípteros de la especie *C. capitata*, lo que parece indicar que las bajas temperaturas son un elemento desencadenante de la actividad entomopatógena de *B. pumilus* TCC sobre dicho díptero. En los ejemplos se muestra que la actividad entomopatógena del microorganismo alcanza su máximo nivel tras la incubación a 4°C, pero esta actividad entomopatógena también se encuentra potenciada cuando el tratamiento se realiza a una temperatura de -20°C. Esto indica que la incubación de *B. pumilus* TCC a temperaturas inferiores a la óptima de cultivo (30°C), que genere un estrés en el organismo, le proporciona la capacidad entomopatógena en mayor o menor medida. Por lo tanto esto parece indicar que las temperaturas inferiores a (30°C)

presentan un efecto activador de la actividad entomopatógena. Por ello la exposición a bajas temperaturas, inferiores a la óptima de crecimiento, sería un método de tratamiento para conseguir incrementar la entomopatogenicidad de la cepa CECT 7462 de *B. pumilus*.

Por todo ello otro aspecto de la presente invención se refiere a un método, de ahora en adelante método de la invención, para incrementar la patogenicidad de la cepa CECT 7462 que comprende exponer la cepa a temperaturas inferiores a 25°C. En una realización preferida, la cepa CECT 7462 es expuesta a temperaturas inferiores a 15°C. En una realización más preferida la exposición se realiza a temperaturas iguales o inferiores a 4°C. En una realización aún más preferida la exposición se realiza a una temperatura inferior a -8°C. En una realización particular de la invención las cepas son expuestas a temperaturas iguales o inferiores a -20°C.

Como se demuestra en los ejemplos de la invención 4°C y -20°C son dos temperaturas óptimas en torno a las cuales tratar la cepa de la invención si se pretende maximizar sus efectos entomopatógena. Por ello en una realización preferida del método de la invención la exposición de la cepa CECT 7462 se realiza a temperaturas de entre 2°C y 6°C. En otra realización preferente la exposición de la cepa CECT 7462 a bajas temperaturas se realiza a temperaturas de entre -18°C y -22°C.

En los ejemplos de la presente invención también se pone de manifiesto que el tiempo de exposición de la cepa CECT 7462 a bajas temperaturas puede ser un elemento importante en cuanto a la generación de la actividad entomopatógena del microorganismo y a su virulencia, ya que presenta un alto nivel de actividad tras 96 horas de exposición, y mantiene, al menos en parte, esa actividad entomopatógena al menos hasta las 168 horas de exposición indicando que existen rangos de incubación que proporcionan a su vez rangos de actividad. Por todo ello en una realización preferida del método de la presente invención, la exposición a bajas temperaturas se realiza durante al menos 24 horas. En una realización más preferida la exposición a bajas temperaturas se realiza durante al menos 48 horas. En una realización aún más preferida la exposición a bajas temperaturas se realiza durante al menos 96 horas. En una realización aún más preferida la exposición a bajas temperaturas se realiza durante al menos 132 horas. En una realización particular, la exposición se realiza durante al menos 168 horas.

Gracias a estas exposiciones a bajas temperaturas, se obtienen a partir de la cepa CECT 7462, factores de virulencia cuyos efectos nocivos sobre la especie *C. capitata* están potenciados. De cualquier modo y a pesar de partir de un mismo genotipo, por las condiciones de estrés a las que se somete a la cepa inicial se puede dar lugar microorganismos que tras el tratamiento, muestran distintos niveles de actividad entomopatógena por la activación o no, bien de factores transcripcionales, bien de rutas metabólicas.

Por ello, otro aspecto de la presente invención se refiere a las cepas obtenibles por el método de la invención.

En los ejemplos mostrados en la presente invención se demuestra la aparición de cristales en los cultivos de CECT 7462 cuando esos cultivos se llevan a cabo en medio de esporulación T3 (Travers *et al.*, 1987. *Appl Environ Microbiol.*; 53: 1263-1266). Estos cristales son morfológicamente similares a los producidos por *B. thuringiensis*, los cuales presentan efectos entomopatógenos ya que están formados por las toxinas Cry. Además, el aislamiento de estos cristales mediante el mismo método usado para el aislamiento de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* da lugar a una banda en un gradiente de sacarosa a la misma altura que dichas toxinas. Todo esto parece inferir que los cristales producidos por *B. pumilus* podrían tener una naturaleza similar a los de *B. thuringiensis*, por lo que parece posible que sean los responsables de la entomopatogenicidad de la cepa.

Además, es conocido que la esporulación es un mecanismo de resistencia de algunos microorganismos frente a situaciones de estrés que pueden generarles un daño. La exposición de microorganismos del género *Bacillus* a elementos generadores de estrés da lugar a la formación de formas esporuladas así como de estructuras cristalinas. Las temperaturas adversas son uno de estos factores desencadenantes de la formación de formas de resistencia, y también de la formación de estructuras cristalinas en *B. pumilus*. Por otro lado, es conocido que en múltiples ocasiones la temperatura es capaz de modificar la actividad de diversas rutas metabólicas o producir transformaciones estructurales en sustancias ya sintetizadas, lo que explicaría la capacidad de la exposición a bajas temperaturas para activar la actividad entomopatógena de las estructuras cristalinas formadas en la esporulación de la cepa CECT 7462.

Por todo ello, otro aspecto de la presente invención se refiere a las estructuras cristalinas obtenibles a partir de la cepa CECT 7462 por el método de la invención. Otro aspecto se refiere a una composición que comprenda la cepa bacteriana activada o las estructuras cristalinas obtenibles por el método de la invención.

El término “estructura cristalina” tal como se entiende en la presente invención, se refiere a las inclusiones cristalinas que se encuentran en algunas cepas del género *Bacillus*, y que se encuentran formadas por proteínas con actividad entomopatógena.

Los microorganismos entomopatógenos del género *Bacillus*, como por ejemplo *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus popilliae*, presentan en multitud de ocasiones patogenicidad frente a más de una especie de insectos y, en algunos casos, presentan actividad frente a diversos órdenes de insectos. Esto se debe fundamentalmente a la capacidad de estos microorganismos de generar toxinas (proteínas Cry y proteínas Cyt) que presentan en algunos casos actividad entomopatógena frente a varias plagas. Existen especies de *Bacillus thuringiensis* que generan cristales con actividad frente diversas combinaciones de órdenes, como por ejemplo Lepidoptera y Diptera, Coleóptera e Hymenoptera, Diptera y Coleóptera, Hemiptera e Hymenoptera, e incluso Diptera, Coleóptera y Lepidoptera.

En los resultados de la presente invención se muestra el efecto entomopatógeno de la cepa CECT 7462 sobre los individuos de *C. capitata*, especie perteneciente al orden Diptera.

Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa CECT 7462 tratada o no con el método de la invención para el control biológico de plagas. Otro aspecto se refiere al uso de las estructuras cristalinas obtenibles a partir de la cepa CECT 7462 para el control biológico de plagas. Otro aspecto se refiere a una composición que comprenda la cepa tratada o no por el método de la invención, o las estructuras cristalinas para el control biológico de plagas. Una realización preferida de este aspecto se refiere al uso de la cepa, de las estructuras cristalinas, o de dicha composición para el control biológico de plagas, donde la plaga es producida por organismos pertenecientes a alguno de los órdenes de la lista que comprende aunque sin limitarse a Lepidoptera, Coleóptera, Himenoptera, Hemiptera, Homoptera, Mallophaga, Orthoptera, Thysanoptera, Neuroptera, Isoptera, Trichoptera, Dermaptera, Siphonaptera o Diptera. En una realización más preferida la plaga es de organismos del orden Diptera. En una realización aún más preferida la plaga es de la mosca de la fruta del Mediterráneo (*C. capitata*).

El término “plaga” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una situación en la que un organismo o un conjunto de ellos pertenecientes a la misma o a diferentes especies generan un daño a intereses humanos, generalmente cultivos, cosechas o especies de interés agrícola.

El desarrollo de composiciones para el control de plagas está llevando a la integración de los microorganismos o partes de los mismos en bioinsecticidas, ya que ofrecen mejores resultados que la aplicación directa del microorganismo o partes de los mismos sobre el cultivo. Por ello los bioinsecticidas pueden contener bien la cepa o bien partes de la misma, como por ejemplo aunque sin limitarse toxinas, como compuesto activo, además de otros compuestos independientes del organismo. Estos bioinsecticidas son los que finalmente se aplican sobre las plantaciones para evitar las pérdidas producidas por plagas.

Por todo ello, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la cepa CECT 7462 o una composición que la comprenda para la producción de bioinsecticidas. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la cepa obtenida por el método de la invención, o las estructuras cristalinas para la producción de bioinsecticidas. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el bioinsecticida actúa sobre al menos un organismo de los órdenes de la lista que comprende Lepidoptera, Coleóptera, Himenoptera, Hemiptera, Homoptera, Mallophaga, Orthoptera o Diptera. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el bioinsecticida actúa sobre organismos del orden Diptera. En una realización aún más preferida el bioinsecticida va dirigido a la mosca de la fruta del Mediterráneo (*C. capitata*).

En la presente descripción el término “bioinsecticida” hace referencia a insecticidas que contienen como ingrediente activo un compuesto obtenido de materia natural como plantas, animales o microorganismos.

El término “componente activo” según se entiende en la presente invención hace referencia al compuesto que produce los efectos biológicos deseados al aplicar la composición en la que se encuentra sobre el cultivo o el organismo diana.

En las diversas cepas del género *Bacillus* que presentan genes codificantes para elementos entomopatógenos, los genes que dan lugar a proteínas con capacidad insecticida como las proteínas Cry, se encuentran bien en estructuras extracromosomales como los plásmidos, bien integrados en su cromosoma. Por ello otro aspecto de la invención se refiere a la secuencias nucleotídicas aisladas de la cepa CECT 7462 que codifica para al menos una proteína entomopatógena.

Por otra parte, los plásmidos no se encuentran siempre presentes en las bacterias. En la presente invención se muestra la existencia de plásmidos dentro de la cepa CECT 7462, los cuales podrían presentar los genes que le confieren la entomopatogeneidad a la cepa. Por lo tanto otro aspecto de la invención se refiere a los plásmidos obtenibles a partir de la cepa CECT 7462 que comprenden al menos una secuencia nucleotídica que codifica para una proteína entomopatógena.

En la actualidad existen multitud de enzimas que son producidas a nivel industrial a partir de cepas del género *Bacillus*. Por ejemplo existe producción industrial de proteasas derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* o *Bacillus subtilis*. Además, muchas de las cepas de *B. pumilus* descritas producen enzimas que tienen interés industrial debido a su alta aplicabilidad en industrias como la alimentaria, la producción de detergentes o el procesamiento de tejidos. En la presente invención se demuestra que la cepa CECT 7462 presenta una elevada producción de algunas de estas enzimas como proteasas o catalasa.

Por ello, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la cepa CECT 7462 tratada o no por el método de la invención, para la producción de enzimas. En una realización preferida de este aspecto las enzimas producidas son proteasas. En otra realización preferida de este aspecto de la invención la enzima producida es la catalasa.

Se entiende por “proteasas” en la presente descripción, todas aquellas enzimas capaces de catalizar una reacción que fragmente proteínas o péptidos por ruptura de los enlaces peptídicos entre aminoácidos en partes más pequeñas. Estas enzimas se seleccionan aunque sin limitarse, de la lista que comprende serin-proteasas, treonin-proteasas, cistein-proteasas, aspartil-proteasas, metalo-proteasas, glutamil-proteasas o proteasas mixtas.

Se entiende por “catalasa” en la presente invención la enzima, cuyo número EC (Enzyme Commission number) es 1.11.1.6, y es capaz de catalizar la descomposición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2).

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. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra la mortalidad acumulativa (media $\pm$ DE) de larvas de *C. capitata* a los 4 (barras blancas), 10 (barras grises) y 15 días (barras negras) causada por cultivos de *B. pumilus* TCC (cepa CECT 7462), *B. pumilus* M1, *B. pumilus* M2 con y sin tratamiento de frío. Los datos son la media $\pm$ DE. $n=48$. Las diferencias significativas entre *B. pumilus* TCC y sus controles fueron evaluados mediante un ANOVA después de 15 días de iniciado el experimento ($P < 0.01$).

Figura 2. Muestra imágenes del cultivo de *B. pumilus* TCC en medio de esporulación T3, observado al Microscopio Electrónico de Transmisión. Fig. 2A: Imagen del cultivo de 58 h, con esporas y estructuras cristalinas en el medio. Fig. 2B: detalle de un cristal. Fig. 2C: célula mostrando una estructura cristalina en su interior (cultivo de 74 h).

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (0.8%), del ADN extraído de varias cepas. Calle 1: Marcador peso molecular (250 pares de bases a 12 kilobases); Calles 2, 3 y 4: *B. pumilus* TCC (distintas extracciones) Calle 5: *B. pumilus* M1; Calle 6: *B. pumilus* M2; Calle 7: *B. thuringiensis* IPS 78/11 (curada de plásmido).

Figura 4. Muestra halos de digestión por actividad proteasa extracelular (determinada con caseína) de diversas cepas bacterianas transcurridas 24 h desde el comienzo del ensayo. Las cepas son de izquierda a derecha: *Bacillus pumilus* M2, *Bacillus pumilus* TCC, *Bacillus pumilus* M1, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*.

Ejemplos

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 a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Comparación de la toxicidad de CECT 7462 con otras cepas de B. pumilus frente larvas de C. capitata

La toxicidad de la cepa CECT 7462 (o TCC) frente a larvas de la mosca de la fruta del Mediterráneo, *C. capitata* se manifiesta cuando la bacteria se somete a bajas temperaturas. Para determinar si este efecto de la toxicidad frente a esta plaga es una característica de la cepa TCC o es un comportamiento general de esta especie se llevó a cabo el siguiente experimento con la cepa TCC, y las cepas de *B. pumilus* cepa 15 y cepa 17, proporcionadas por el grupo de la Dra. Calvo (Instituto del Agua, Universidad de Granada) (Uad *et al.*, 2007. XXI Congreso Nacional de Microbiología. Sevilla, Spain), y nombradas en nuestros experimentos de ahora en adelante como M1 y M2 respectivamente. Se realizó un ensayo de toxicidad en dos condiciones distintas. En un caso se usaron las placas para el bioensayo inmediatamente después de mezclar los cultivos bacterianos con la dieta de larva, mientras que la otra fue mantenida durante 96 horas a 4°C. Los resultados de los bioensayos se muestran en la Figura 1. Las larvas de *C. capitata* mostraron alto porcentaje de mortalidad en las placas de aquellos bioensayos con CECT 7462 que permanecieron 96 horas a 4°C, mientras que en las que no tuvieron tratamiento de frío, mostraron una toxicidad baja. La toxicidad de las cepas *B. pumilus* M1 y M2 no superó el 40% en el mejor de los casos, indicando que la toxicidad de CECT 7462 parece ser una característica única de esta cepa y no una característica compartida con otras cepas de *B. pumilus*; las cepas *B. pumilus* M1 y M2 fueron usadas como controles negativos.

Ejemplo 2

Relación de las bajas temperaturas con la toxicidad

Que la exposición del cultivo a bajas temperaturas, aumente la toxicidad de la cepa CECT 7462 induce a plantearse si este efecto se da únicamente a una temperatura de 4°C o es la exposición general a bajas temperaturas la que provoca el aumento en la entomopatogenicidad hacia *C. capitata*. Con el fin de discernir cual de estas hipótesis es la correcta, se incubaron los cultivos durante 4 y 7 días, en los matraces de crecimiento, a dos diferentes temperaturas, 4°C y -20°C.

Después de exponer los cultivos esporulados a estas temperaturas, fueron mezclados con la dieta de larvas y usados directamente en los bioensayos. En estos experimentos las larvas fueron colocadas en la dieta, tan pronto como la placa de bioensayo fue preparada.

Los resultados de estos experimentos mostraron que 10 días después de iniciado el bioensayo, los cultivos de CECT 7462 que fueron mantenidos durante 96 horas a 4°C y -20°C causaron mayor mortalidad en larvas de *C. capitata*, alcanzando más del 90% y 80% respectivamente, mientras los cultivos de *B. pumilus* M1 y medio T3 no alcanzaron el 40% (Tabla 1).

TABLA 1

Mortalidad a los 10 días (media $\pm$ DE) de larvas de *C. capitata* causada por CECT 7462 o sus controles *B. pumilus* M1 o medio de esporulación T3

Cepa bacteriana	Tiempo de exposicion	Cultivo		Cultivo + dieta
		4 °C	-20 °C	4 °C
CECT 7462	0h	22,92 $\pm$ 0,00	–	16,37 $\pm$ 14,45
	96h	93,61 $\pm$ 1,94	84,10 $\pm$ 2,85	67,92 $\pm$ 12,19
	168h	66,67 $\pm$ 10,42	60,42 $\pm$ 18,75	–
<i>B. pumilus</i> M1	0h	16,67 $\pm$ 2,08	–	6,25 $\pm$ 0,00
	96h	37,50 $\pm$ 4,17	30,21 $\pm$ 3,12	21,28 $\pm$ 0,00
	168h	17,71 $\pm$ 1,04	16,67 $\pm$ 6,25	–
T3		11,11 $\pm$ 0,00	16,57 $\pm$ 6,16	15,09 $\pm$ 2,35

Al comparar estos resultados con la mortalidad causada por cultivos de CECT 7462 que no fueron mantenidos a bajas temperaturas, se puede sugerir que la toxicidad de esta cepa se incrementa cuando los cultivos son expuestos a bajas temperaturas, demostrando definitivamente que las bajas temperaturas son las responsables del aumento de la toxicidad.

Ejemplo 3

Observación de un cultivo de CECT 7462 bajo Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

B. pumilus, como cualquier especie del género *Bacillus*, posee dos tipos celulares dependiendo del ambiente. Cuando hay un exceso de nutrientes, las células se encuentran en fase vegetativa, mientras que cuando los nutrientes se agotan o existe algún agente adverso en el medio, la célula produce una forma de resistencia conocida con el nombre de spora. Con objeto de hacer una caracterización morfológica de cada una de las fases de crecimiento de la cepa CECT 7462, se realizó un seguimiento de un cultivo de *B. pumilus* a través de microscopía electrónica.

Una única colonia fue resuspendida en 2 ml de medio de esporulación T3 e incubada durante 72 h a 30°C. El cultivo se calentó 10 min. a 70°C para eliminar células vegetativas. Posteriormente 50 ml de medio T3 se inocularon con 500 μ l de un preinóculo tratado con calor, con objeto de sincronizar el cultivo. El cultivo se mantuvo a 30°C en agitación a 240 rpm y se fue retirando periódicamente volúmenes de 500 μ l a 0 h, 6 h, 11 h, 25 h, 29 h, 33 h, 36 h, 48 h, 58 h y 74 h. Todas estas muestras se fijaron y tiñeron para ser observadas al microscopio electrónico de transmisión (MET). Hasta las 11 horas el 90% de la población presentó el aspecto típico de una célula vegetativa, presentando una longitud de entre 1,80-1,95 mieras y un diámetro de 0,5 mieras. A partir de la hora 25 se observó la producción de esporas en el interior de la célula madre y a la hora 36 la liberación de esporas del esporangio. En las micrografías de 58 h y 74 h se observaron cuerpos geométricos con un tamaño similar al de una spora (Figura 2, flechas blancas) que recuerdan a las estructuras cristalinas tan frecuentes y características de *B. thuringiensis*. Dichas estructuras se observaron tanto en el medio (Figura 2A y 2B) como en el interior de la bacteria (Figura 2C).

Ejemplo 4

Purificación de cristales producidos por CECT 7462

Las estructuras cristalinas observadas en el cultivo esporulado de CECT 7462 se asemejan a los cristales proteicos que produce *B. thuringiensis* cuando esporula, y que son responsables de su actividad entomopatógena. Dada esta similitud se decidió realizar una purificación de los cristales observados utilizando el mismo protocolo de purificación de proteínas Cry de *B. thuringiensis* (Thomas y Ellar, 1983. *FEBS Lett.*; 154:362-368). Para ello se preparó 500 ml de cultivo esporulado, 72 h a 30°C a 240 rpm, en medio de esporulación T3. Posteriormente se le añadió 1 M de NaCl, y se incubó 12 horas a 4°C. Para obtener un precipitado del cultivo se centrifugó 20 min. a 35.000 x g y posteriormente se realizaron tres lavados en 150 ml de PBS (Dulbecco and Vogt, 1954. *J. Exp. Medic.*; 99:167-182). El precipitado resultante fue resuspendido en 2 ml de H₂O Milli-Q. Seguidamente se preparó un gradiente de sacarosa usando tres soluciones cuyas concentraciones fueron 2,3 M, 2,1 M y 1,97 M. La suspensión bacteriana resuspendida en agua Milli-Q fue depositada sobre el gradiente y centrifugada 16 h a 54.000 x g. Tras la centrifugación se pudo observar una banda en la fracción de 2,1 M de sacarosa, en la parte superior del límite de la fracción de 2,3 M de sacarosa. Dicha banda se extrajo para su posterior purificación. Con el objetivo de eliminar la sacarosa, la banda seleccionada fue diluida 1:4 en PBS y centrifugada a 35.000 x g. El pellet resultante se lavó con 20 ml de PBS usando las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en 500 µl de Milli-Q. La muestra fue conservada a -20°C.

La presencia de una banda en la misma fracción que en la que aparecen las toxinas Cry cuando son purificadas, indica que los cristales observados en el cultivo de CECT 7462 (Figura 2A) podrían tener una naturaleza similar a dichas toxinas.

Ejemplo 5

Detección de elementos extracromosómicos en CECT 7462

Frecuentemente las toxinas bacterianas, incluidas las que poseen propiedades insecticidas del tipo de las toxinas Cry, son de codificación plasmídica (de Maagd *et al.*, 2003. *Annu. Rev. Genet.*; 37:409-433; DeNap and Hergenrother, 2005. *Org. Biomol. Chem.*; 3:959-966). Con el fin de comprobar la posible presencia de estos elementos extracromosómicos (plásmidos y/o megaplásmidos) en la cepa CECT 7462, se siguió la metodología propuesta por Reyes-Ramírez y Ibarra (2008) (Reyes-Ramírez, and Ibarra. 2008. *Appl. Environ. Microbiol.*; 74:125-129) para la detección del patrón de plásmidos de *B. thuringiensis*, con algunas modificaciones. Brevemente, las cepas CECT 7462, *B. pumilus* M1, *B. pumilus* M2, *B. thuringiensis* IPS 78/11 se cultivaron en 3 ml de medio LB durante toda la noche, y después se hizo una dilución 1:50 en 50 ml de LB. Los cultivos se conservaron en agitación a 30°C y 240 rpm hasta una densidad óptica a 600 nm de entre 0,5 a 1,1. Las células vegetativas fueron centrifugadas a 20.200 x g durante 15 minutos a 4°C y cada pellet resuspendido en 20 ml de buffer TES (Tris base 30 mM, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM; pH 8,0 ajustado con HCl 3 M) previamente enfriado. Tras centrifugar las células bajo las mismas condiciones, el pellet fue resuspendido en 2 ml de buffer de lisis (20% sacarosa (p/v), 2 mg/ml lisozima y 1 µl/ml de RNasa a partir de una solución stock 10 mg/ml en buffer TES) e incubada a 37°C durante 90 minutos o hasta que la formación de más del 90% de esferoplastos fue alcanzada y monitorizada bajo microscopio. La suspensión de esferoplastos fue suplementada con 3 ml de SDS al 8% (p/v) en buffer TES e incubada a 68°C durante 10 minutos. Luego se añadieron 1,5 ml de acetato sódico 3 M (pH 4,8) y la suspensión se incubó a -20°C durante 30 minutos. La suspensión fue centrifugada a 20.200 x g durante 20 minutos a 4°C o hasta que el sobrenadante quedó completamente translúcido. Dos volúmenes de etanol absoluto (frío previamente) fueron añadidos al sobrenadante e incubado toda la noche a -20°C. El ADN fue centrifugado a 20.200 x g durante 20 minutos a 4°C. Cada pellet fue resuspendido en 100 µL de Tris-EDTA (pH 8,0) (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y fue conservado a -20°C hasta su posterior uso.

Con el fin de separar y visualizar el posible patrón de plásmidos para cada cepa analizada se realizó una electroforesis en gel de agarosa con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio; para ello, 10 µL de la solución de ADN fue mezclada con 2 µl de tampón de carga, y depositada en un pocillo de gel de agarosa 0,8% (p/v) en tampón TBE y migró a 100 V durante 120-180 minutos. Se utilizó un Marcador de Peso Molecular de 250 bp a 12 kb (Stratagene, No. Cat. 201115).

En el gel de agarosa se observaron dos bandas, una por encima de la banda del ADN cromosómico, y otra de aproximadamente 6 kb en los carriles de CECT 7462 (Figura 3), indicando que esta cepa posee un megaplásmido y un plásmido. Estas bandas no se observaron en las cepas control, *B. pumilus* M1, *B. pumilus* M2 y *B. thuringiensis* IPS 78/11. Dado que existe un plásmido y un megaplásmido presente en CECT 7462 y no en los controles M1 y M2, postulamos que el factor de virulencia podría estar presente en alguno de estos elementos extracromosomales.

Ejemplo 6

Ensayo de la actividad proteasa extracelular utilizando caseína

5 Diez microlitros de un cultivo líquido de 24 horas en LB (Medio Luria-Bertani) se colocaron sobre placas de LB-agar suplementado con caseína al 2% (Barbosa *et al.*, 2004. *App. Environ. Microbiol.*; 71:968-978). Junto con CECT 7462 se usaron otras 8 especies bacterianas, tanto Gram negativas como positivas (Tabla 2).

10

TABLA 2

Resultados de la actividad proteasa en placas LB-agar suplementadas con Caseína o leche en polvo a las 24 o 48 horas. Medidas de los halos en mm

15

20

25

30

35

Cepa	Actividad proteasa (Caseína)		Actividad proteasa (Leche en polvo)	
	24h	48h	24h	48h
CECT 7462	6	10	3,5	7
<i>B. pumilus</i> M1	2,5	7	0	2,5
<i>B. pumilus</i> M2	4	6	2,5	4
<i>B. thuringiensis</i>	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	1,5	1,5	2	3
<i>B. cereus</i>	0	0	3	3
<i>E. coli</i>	0	0	0	0
<i>P. putida</i>	0	0	0	0
<i>B. cepacia</i>	0	0	0	0

40

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 y 48 horas, tiempos en los que se midieron los halos aparecidos (Figura 4). Posteriormente, se registró la distancia existente desde el borde de la colonia al extremo más alejado del halo (Tabla 2). CECT 7462 presentó el halo mayor en el ensayo, indicando que la producción de proteasa extracelular es superior que la de las otras cepas ensayadas.

45

Ejemplo 7

Ensayo de la actividad proteasa extracelular utilizando leche en polvo

50

Diez microlitros de un cultivo líquido de 24 horas en LB se colocaron sobre placas de LB-agar suplementado con leche en polvo al 2% (Zaliha *et al.*, 2007. *J. Ind Microbiol. Biotechnol.*; 34:509-517). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 y 48 horas, tiempos en los que se midieron los halos aparecidos. Posteriormente se registró la distancia existente desde el borde de la colonia al extremo más alejado del halo (Tabla 2).

55

Ejemplo 8

Ensayo de actividad catalasa

60

La actividad catalasa se ensayó en las cepas CECT 7462, *B. pumilus* M1 y *B. thuringiensis* 78/11. Para ello se tomó una colonia aislada de cada cepa con asa de siembra, y posteriormente se sumergió en una solución de H₂O₂ al 3%. (Barbosa *et al.*, 2004. *App. Environ. Microbiol.*; 71:968-978). La producción de burbujas (O₂) en la solución fue interpretada como positivo para la actividad catalasa (Tabla 3).

65

TABLA 3

Actividad Catalasa de las diversas cepas testadas. (+): Formación de burbujas de oxígeno. ND: ensayo no determinado

Cepa	Actividad catalasa
CECT 7462	+
<i>B. pumilus</i> M1	+
<i>B. pumilus</i> M2	ND
<i>B. thuringiensis</i>	+
<i>B. subtilis</i>	ND
<i>B. cereus</i>	ND
<i>E. coli</i>	ND
<i>P. putida</i>	ND
<i>B. cepacia</i>	ND

REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana CECT 7462 de *Bacillus pumilus*.
2. Composición que comprende la cepa bacteriana según la reivindicación 1.
3. Método para incrementar la patogenicidad de la cepa CECT 7462 de *B. pumilus* que comprende exponer la cepa a temperaturas inferiores a 25°C.
4. Método para incrementar la patogenicidad según la reivindicación 3 donde la exposición se realiza a temperaturas inferiores a 15°C.
5. Método para incrementar la patogenicidad según la reivindicación 4 donde la exposición se realiza a temperaturas iguales o inferiores a 4°C.
6. Método para incrementar la patogenicidad según la reivindicación 5 donde la exposición se realiza a temperaturas inferiores a -8°C.
7. Método para incrementar la patogenicidad según la reivindicación 6 donde la exposición se realiza a temperaturas iguales o inferiores a -20°C.
8. Método para incrementar la patogenicidad de la cepa CECT 7462 de *B. pumilus* según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 donde la exposición se realiza entre 2°C y 6°C.
9. Método para incrementar la patogenicidad de la cepa CECT 7462 de *B. pumilus* según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 donde la exposición se realiza entre -18°C y -22°C.
10. Método para incrementar la patogenicidad según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 donde el tiempo de exposición es de, al menos, 24 horas.
11. Método para incrementar la patogenicidad según la reivindicación 10 donde el tiempo de exposición es de, al menos, 48 horas.
12. Método para incrementar la patogenicidad según la reivindicación 11 donde el tiempo de exposición es de, al menos, 96 horas.
13. Método para incrementar la patogenicidad según la reivindicación 12 donde el tiempo de exposición es de, al menos, 132 horas.
14. Método para incrementar la patogenicidad según la reivindicación 13 donde el tiempo de exposición es de, al menos, 168 horas.
15. Cepa bacteriana obtenible a partir de la cepa CECT 7462 por el método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 14.
16. Estructuras cristalinas obtenibles a partir de la cepa según la reivindicación 15.
17. Composición que comprende la cepa bacteriana o las estructuras cristalinas según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16.
18. Uso de la cepa bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 15 para el control biológico de plagas.
19. Uso de las estructuras cristalinas según la reivindicación 16 para el control biológico de plagas.
20. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 17 para el control biológico de plagas.
21. Uso de la cepa bacteriana, de las estructuras cristalinas o de la composición, según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde la plaga es de organismos pertenecientes a alguno de los órdenes de la lista que comprende: Lepidoptera, Coleóptera, Himenoptera, Hemiptera, Homoptera, Mallophaga, Orthoptera o Diptera.
22. Uso de la cepa bacteriana, de las estructuras cristalinas o de la composición según la reivindicación 21, donde la plaga es de organismos pertenecientes al orden Diptera.
23. Uso de la cepa bacteriana, de las estructuras cristalinas o de la composición según la reivindicación 22, donde la plaga es de mosca de la fruta del Mediterráneo (*C. capitata*).

24. Uso de la cepa bacteriana o la composición que la comprende según cualquiera de reivindicaciones 1 ó 2, para la producción de bioinsecticidas.

5 25. Uso de la cepa bacteriana, de las estructuras cristalinas o de la composición según cualquiera de reivindicaciones 15 a 17, para la producción de bioinsecticidas.

10 26. Uso de la cepa bacteriana, de las estructuras cristalinas o de la composición según la reivindicación 25, donde el bioinsecticida actúa sobre al menos un organismos perteneciente a alguno de los órdenes de la lista comprende: Lepidoptera, Coleóptera, Himenoptera, Hemiptera, Homoptera, Mallophaga, Orthoptera o Diptera.

15 27. Uso de la cepa bacteriana, de las estructuras cristalinas o de la composición según la reivindicación 26, donde el organismo sobre el que actúa es del orden Diptera.

20 28. Uso de la cepa bacteriana, de las estructuras cristalinas o de la composición según la reivindicación 27, donde el organismo del orden Díptera es la mosca de la fruta del Mediterráneo (*C. capitata*).

25 29. Uso de la cepa bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 15 para la producción de enzimas.

30 30. Uso de la cepa bacteriana según la reivindicación 29 donde la enzima es una proteasa o la catalasa.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

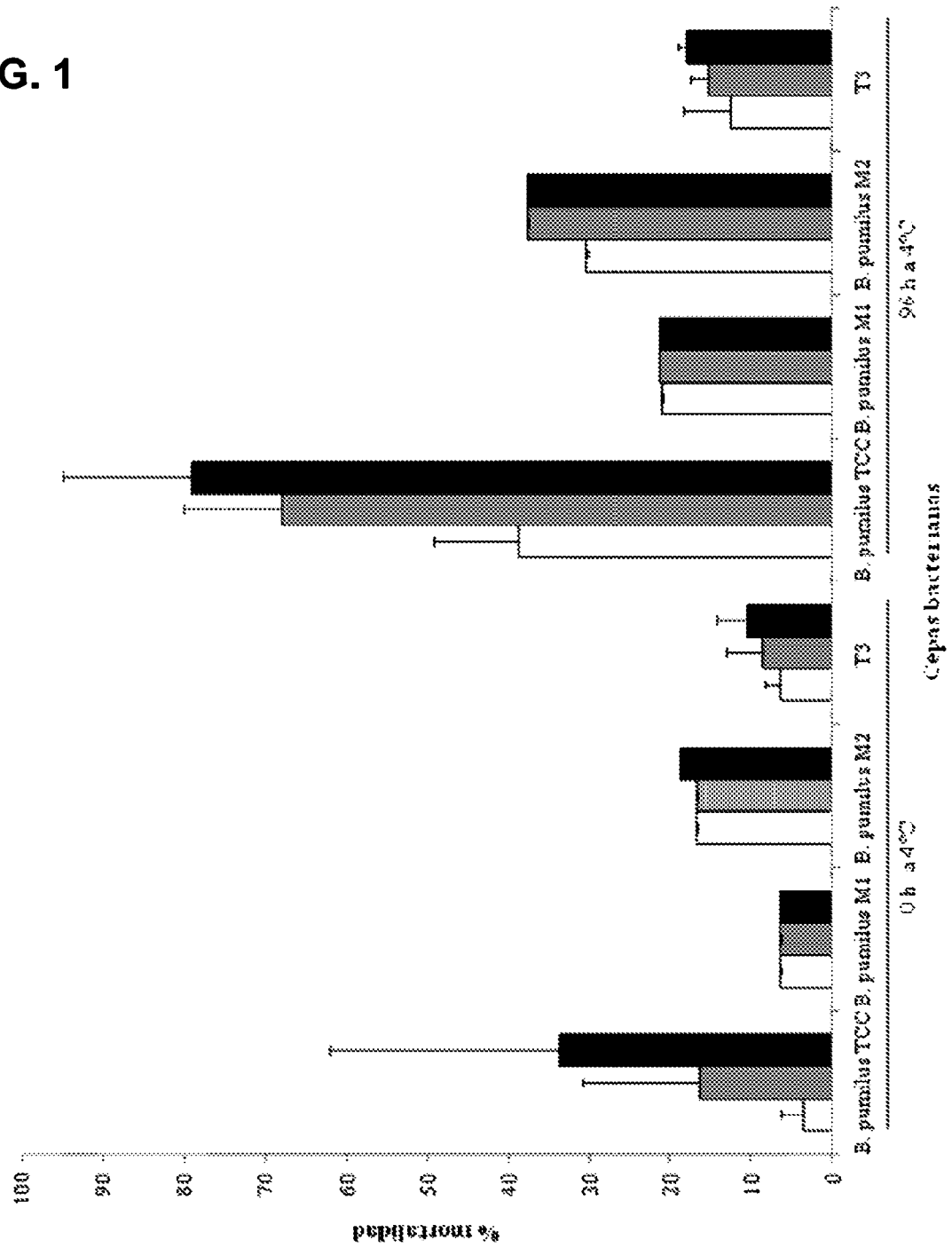


FIG. 2A

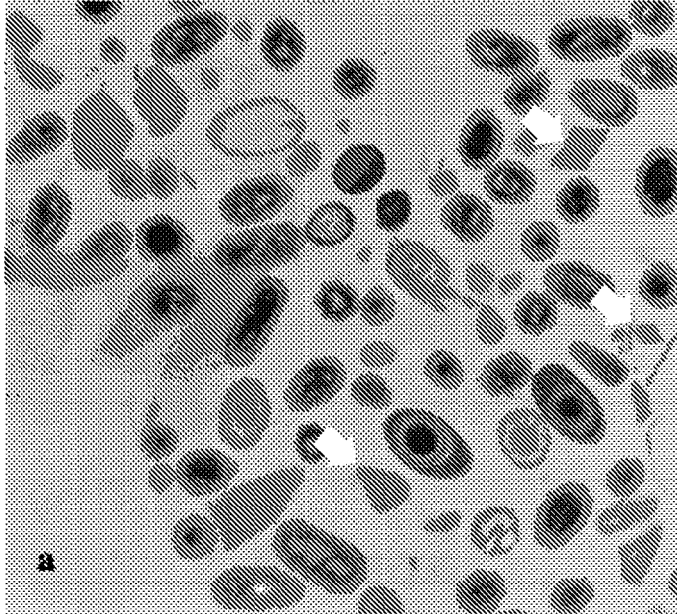


FIG. 2B

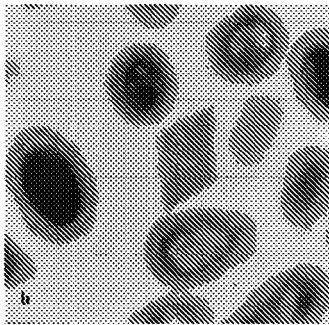


FIG. 2C

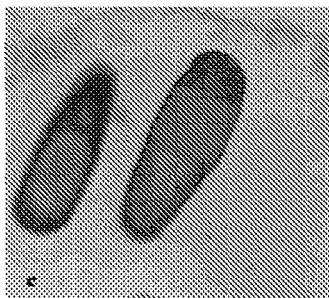


FIG. 3

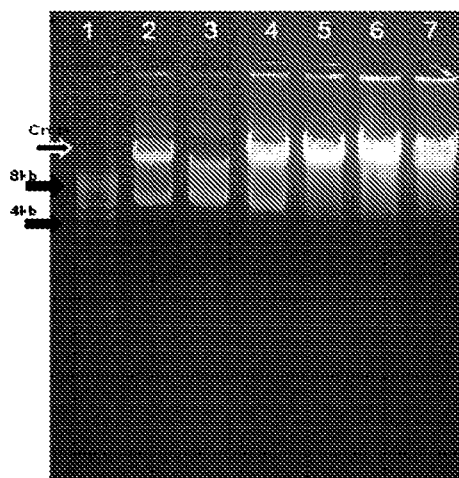
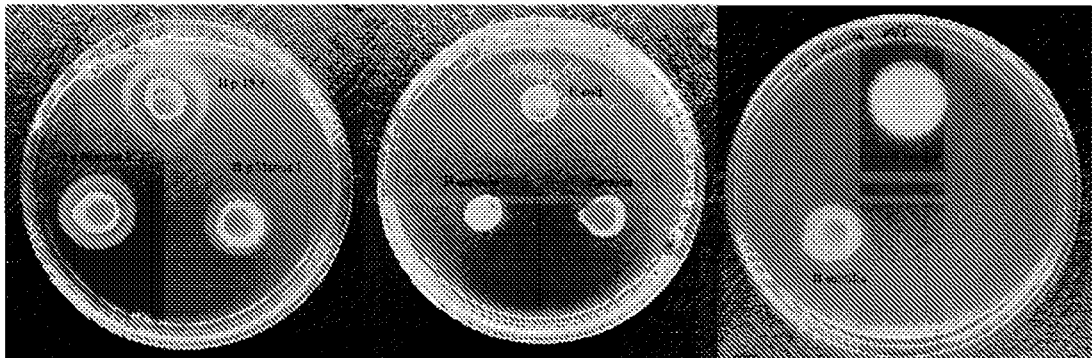


FIG. 4





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930325

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.06.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FINLAY, W.J.J. et al.: 'Bacillus cereus Produces Most Emetic Toxin at Lower Temperatures.' Letters in Applied Microbiology. (2000), vol. 31, 2000, pág. 385–389, todo el documento.	1-32
A	BRESOLIN, G. et al., "Low temperature-induced insecticidal activity of Yersinia enterocolitica". Mol. Microbiol., (2006), vol. 59, no. 2, 2006, pág. 503–512, todo el documento.	1-32
A	GINGRICH, R. E. et al.: 'Demonstration of Bacillus thuringiensis as a Potential Control Agent for the Adult Mediterranean Fruit Fly Ceratitis capitata (Wied.)' Journal of Applied Entomology, (1987), vol. 104, no. 4, pág. 378–385, todo el documento.	1-32
A	HUANG, Y. et al., "Postharvest biological control of penicillium-digitatum decay on citrus fruit by bacillus-pumilus", Ann. appl. Biol. (1992), 120, pág. 367-372, todo el documento.	1-32

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
27.12.2010

Examinador
M. Hernandez Cuellar

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N63/00 (01.01.2006)

C12N1/20 (01.01.2006)

C12R1/07 (01.01.2006)

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

A01N, C12N, C12R

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

EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-32	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-32	SI
	Reivindicaciones	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	FINLAY, W.J.J. et al.: 'Bacillus cereus Produces Most Emetic Toxin at Lower Temperatures.' Letters in Applied Microbiology. (2000), vol. 31, 2000, págs. 385–389, todo el documento.	
D02	BRESOLIN, G. et al., "Low temperature-induced insecticidal activity of Yersinia enterocolitica". Mol. Microbiol., (2006), vol. 59, no. 2, 2006, págs. 503–512, todo el documento.	
D03	GINGRICH, R. E. et al.: 'Demonstration of Bacillus thuringiensis as a Potential Control Agent for the Adult Mediterranean Fruit Fly Ceratitis capitata (Wied.)' Journal of Applied Entomology, (1987), vol. 104, no. 4, págs. 378–385, todo el documento.	
D04	HUANG, Y. et al., "Postharvest biological control of penicillium-digitatum decay on citrus fruit by bacillus-pumilus", Ann. appl. Biol. (1992), 120, págs. 367-372, todo el documento.	

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 invención de la presente Solicitud se refiere a una nueva cepa de *Bacillus pumilus*, CECT 7462, así como a un método de aumentar de forma significativa sus efectos entomopatógenos que comprende exponer la cepa a temperaturas inferiores a 25° C, y las cepas así obtenidas. También se refiere a una composición que contenga la cepa original, o ya tratada por el método de la invención, y/o sus estructuras cristalinas para uso como bioinsecticida o para el control de plagas, en particular de la Mosca de la fruta del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*). También se refiere a cualquier plásmido que codifique secuencias, o bien las propias secuencias, que den lugar a proteínas entomopatógenas obtenibles a partir de la cepa, tratada o no, y al uso de la cepa para la producción de enzimas de interés industrial.

El documento D01 describe un método para aumentar la actividad patogénica de bacterias del género *Bacillus*, en particular *Bacillus cereus*, que comprende exponer la cepa a bajas temperaturas de hasta 12° C. De forma sorprendente, la producción de toxina emética en *Bacillus* es muy superior a 12 y 15° C que a cualquiera de las temperaturas mayores ensayadas (página 387, columna 2).

Por su parte el documento D02 describe un método para inducir la actividad insecticida de *Yersinia enterocolitica* a bajas temperaturas de hasta 10 °C. Indica igualmente que la producción de toxinas (en particular similares a Tc, o Tc-like) a baja temperatura se puede obtener no solo en *Yersinia* sino en otras bacterias que poseen genes Tc (página 508, columna 2). D02 señala igualmente que estas bajas temperaturas inducen en *Yersinia* la síntesis de proteínas con actividad insecticida oral comparables a las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (proteínas similares a Tc, o Tc-like) (página 504, columna 1).

El documento D03 demuestra la utilidad de *Bacillus thuringiensis* como agente de control biológico para plagas del individuo adulto de la Mosca de la fruta del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*).

El documento D04 describe la eficacia del aislado B-PRCA-1 de *Bacillus pumilus* en el control de la infección en los cítricos causada por *Penicillium digitatum*.

1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

No se ha recuperado ningún documento en el estado de la técnica que describa o divulgue la cepa de *Bacillus pumilus*, CECT 7462. Aun considerando la posibilidad de la existencia de una cepa igual en la naturaleza, a la vista del estado de la técnica relativo a la invención de la presente Solicitud Internacional, esta Oficina no puede afirmar que esta cepa no sea nueva. En consecuencia, en opinión de esta Oficina las reivindicaciones 1-32 son nuevas y tienen actividad inventiva según lo estipulado en los Art. 6.1 y 8.1 LP.

Los documentos D01-D04 son los que mejor definen el estado de la técnica relativo a la invención.

Los documentos D01 y D02 sirven para establecer el estado de la técnica relativo a los métodos y productos de la invención. De acuerdo a la información divulgada en estos documentos una bajada de temperaturas hasta los 10° C origina un incremento de la actividad patogénica de *Bacillus cereus* y *Yersinia enterocolitica*. No obstante y como se demuestra en los ejemplos de la memoria de la presente Solicitud Internacional, no todas las cepas de *Bacillus pumilus* expuestas a bajas temperaturas incrementan su efecto entomopatógeno. En este sentido, esta Oficina considera que un experto en la materia, a la luz de D01 y D02, intentaría incrementar la actividad patógena de *Bacillus pumilus* exponiendo las cepas a bajas temperaturas, pero sin embargo dicha exposición no ofrece per se garantía evidente de éxito. En consecuencia, en opinión de esta Oficina las reivindicaciones 1-17 cumplen el requisito de actividad inventiva del Art. 8.1 LP

Los documentos D03 y D04 establecen el estado de la técnica más cercano relativo a los usos de los distintos productos reivindicados en la invención para el control biológico de plagas, en particular de la Mosca de la fruta del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*). Dado que los productos reivindicados en la invención son nuevos y tienen actividad inventiva, los usos de los mencionados productos son también nuevos y tienen actividad inventiva de acuerdo a lo establecido en los Art. 6.1 y 8.1 LP.