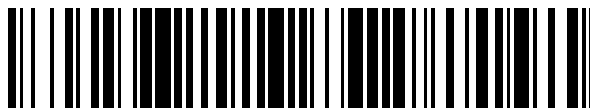


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 395**

21 Número de solicitud: 201330111

51 Int. Cl.:

A01P 5/00

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

31.01.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.09.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070175

71 Solicitantes:

**INVESTIGACIONES Y APLICACIONES
BIOTECNOLOGICAS, S.L. (100.0%)**

Pol. Ind. Moncada III

**Avda. Paret del Patriarca 11-B
46113 MONCADA (Valencia) ES**

72 Inventor/es:

**HINAREJOS ESTEVE, Estefanía;
DEL VAL BUEDO, Raquel;
TARANCÓN VALERA, Nuria y
RIQUELME TERRES, Enrique**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **COMPOSICIÓN MICROBIANA ÚTIL CONTRA NEMATODOS DE CULTIVOS VEGETALES.**

57 Resumen:

La presente invención hace referencia a una composición microbiana, o a un kit para su preparación, que comprende al menos una cepa microbiana con actividad ureasa, preferentemente de la especie *Bacillus*, y un medio líquido fertilizante que comprende una fuente de aminoácidos, una fuente de ácidos fúlvicos, una fuente de nitrógeno ureico y una fuente de nutrientes en solución acuosa. La composición anterior presenta una viabilidad microbiana del 80% durante al menos un año y es útil para prevenir y/o tratar las infestaciones de las plantas por nematodos, preferentemente por *Meloidogyne* spp.. Por ello, la presente invención también protege el uso de la composición microbiana para tal finalidad, así como un método para tratar y/o prevenir una infestación por nematodos en un cultivo de una planta mediante la aplicación de dicha composición en la superficie de cultivo.

ES 2 490 395 A1

DESCRIPCIÓN

Composicion microbiana útil contra nematodos de cultivos vegetales.

Sector de la invención

- 5 La presente invención se enmarca en el campo de los biopesticidas. Más concretamente, esta invención se relaciona con un conjunto de microorganismos, que formulados en un líquido portador mantiene la viabilidad microbiana, y que por sus características, promueve un ambiente desfavorable a los nematodos fitopatógenos.

Estado de la técnica anterior

- 10 Los nematodos son los causantes de los mayores daños a la agricultura en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de todo el mundo. *Meloidogyne spp.* es el género de nematodos parásitos de plantas más significativo; su actividad provoca pérdidas entre el 11% y el 25% de los cultivos en prácticamente todas las regiones tropicales.

- 15 Los nematodos formadores de nódulos o agallas, llegan fácilmente a alcanzar umbrales dañinos en poco tiempo, si se encuentran con cultivos susceptibles, como por ejemplo el tomate. Son tan comunes en cultivos hortícolas de climas subtropicales y tropicales, que a veces se toman como “representantes de los nematodos fitopatógenos” en general (Luc et al., 1990). Los nematodos formadores de nódulos o agallas (*Meloidogyne spp.*) son nematodos sedentarios endoparásitos, por lo tanto, la ausencia de planta huésped durante periodos prolongados, tendería a hacerlos desaparecer.

- 20 En general, condiciones favorables para el crecimiento de las plantas, también serán favorables para la reproducción de *Meloidogyne spp.*, lo que supone un problema para el control de la población de estos parásitos. Por tanto, es interesante desarrollar composiciones que sean capaces de controlar una plaga de nematodos y simultáneamente fertilizar el suelo o la superficie de cultivo de una planta.

- 25 Es conocido que las PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria o bacterias promotoras del crecimiento radicular de las plantas), pueden mejorar el crecimiento de las plantas y rendimiento de los cultivos, de distintas formas, y a través de distintos mecanismos (Nelson, 2007). Algunas de las cepas aisladas por IAB, S.L. (Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas S.L.), consideradas PGPR, han sido identificadas como formas de control biológicas y alternativas al uso de plaguicidas, pero sin estar relacionadas con el control de nematodos. En concreto, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, cepa IAB/BT/01, *Bacillus subtilis*, cepa CECT 7254, *Pseudomonas fluorescens*, cepa CECT 7255, *Trichoderma harzianum*, cepa IAB/TH/01 (Hinarejos, 2008).

- 30 En condiciones naturales, una planta es un huésped potencial para varios microorganismos fitopatógenos, entre los cuales se establecen relaciones que pueden ser de diferente naturaleza. Cabría esperar que, la colonización de raíz de diferentes grupos de PGPR pudiera establecer, respecto a otros organismos fitopatógenos, relaciones de competencia por ocupar el mismo nicho ecológico, o simplemente algún tipo de interacción, que mejorase la resistencia del hospedante, frente a ataques de nematodos fitoparásitos. Cualquier bacteria beneficiosa rizosférica coloniza los mismos tejidos que los nematodos fitoparásitos sedentarios como *Meloidogyne spp.*. A priori, debe de existir algún tipo de relación entre los nematodos fitoparásitos y los microorganismos rizosféricos.

- 35 Un ejemplo de que existen interacciones entre nematodos y PGPR, es la interacción que existe entre *Rhizobium spp.* y *Bradyrhizobium spp.*. Sin embargo, la interacción entre éstos, puede ser estimuladora o inhibidora, tanto de la nodulación como de la fijación del nitrógeno, dependiendo de la especie de nematodo que interactúe. Otro ejemplo son las micorrizas, cuyos mecanismos para incrementar la tolerancia del huésped a los nematodos es la modificación de los exudados de la raíz y su influencia sobre la orientación de los nematodos hacia ésta, así como la eclosión de huevos y el posterior desarrollo de los nematodos dentro de la raíz. No obstante, aunque los exudados radiculares de las plantas hospedantes pueden inhibir la eclosión de huevos o el proceso de infección, repeler e incluso matar a algunas especies de nematodos, también pueden orientar a los nematodos hacia la raíz y estimular a los juveniles para que infecten la planta.

- 45 Asimismo, es conocido que los hongos quitinolíticos y las bacterias que comparten el hábitat de los nematodos, pueden mantener un cierto equilibrio biológico, y de alguna manera limitar la proliferación de los nematodos. De hecho, microorganismos endófitos bacterianos (PGPR) y hongos han sido empleados con fines de biocontrol de nematodos endoparásitos sedentarios y migratorios que atacan a plátano y tomate (Hallman y Sikora, 1994; Hallman et al., 2001; Pocasangre et al., 2000). Estos estudios revelaron que estos microorganismos endófitos de raíz son capaces de dar en múltiples puntos de vulnerabilidad del ciclo de vida de los nematodos, a través de la inhibición de la penetración, reduciendo la capacidad reproductiva y retardando la movilidad de los nematodos y la eclosión de los huevos.

- 5 Varias especies de *Bacillus*, como lo son *B. subtilis*, *B. megatherium* y *B. licheniformis*, han demostrado efecto supresor de hongos patógenos o poblaciones bacterianas del suelo. Además, se han descrito algunas cepas de *Bacillus spp.* que interfieren en el desarrollo normal de poblaciones de nematodos. En concreto, Padgham y Sikora demuestran los modos de acción a través de los cuales *B. megatherium* reduce el daño por *Meloidogyne graminicola* (Padgham y Sikora, 2007). También se conoce que *Bacillus thuringiensis* produce una toxina termoestable que puede ser tóxica a poblaciones de *Meloidogyne spp.* y evita o previene, que las larvas de nematodos formen nódulos en las raíces de tomate (Sayre, 1980). Y por otro lado, Márquez y Fernández han revisado una selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* con efecto nematocida (Márquez y Fernández, 2006).
- 10 *Trichoderma spp.* posee acción enzimática a través de las quitinasas, las cuales degradan quitina, componente presente en los huevos de nematodos (Sharon et al., 2001). *Pseudomonas fluorescens* puede también, ser antagonista de distintos patógenos de suelo, a través de distintos mecanismos, como por ejemplo, la producción de sideróforos, que inhiben a los patógenos de plantas, a través de la competencia por hierro, la emisión de antibióticos supresores de microorganismos competencia, y a través de las quitinasas y glucanasas que
- 15 provocan lisis celular de células microbianas (Sharman et al. 2003).
- Es ampliamente conocido que existen distintos microorganismos PGPR, tanto bacterias como hongos, con capacidad antagonista y supresora de nematodos, entre ellos varios del género *Bacillus spp.* (*B. subtilis*, *B. megatherium*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*...), y que además se encuentran de forma natural en el suelo sano, resultando también de interés desde el punto de vista nutricional y biológico. Sin embargo, en el desarrollo
- 20 de composiciones microbianas con cualquiera de estos tipos de microorganismos, el mantenimiento de la viabilidad microbiana resulta complicado, especialmente cuando existe más de un microorganismo en su composición. Las composiciones microbianas comercializadas hasta el momento para el tratamiento de nematodos comprenden especies y cepas determinadas de dichos microorganismos con otros componentes no microbianos. En dichas composiciones, el efecto contra el parásito se consigue por la propia acción del
- 25 microorganismo, sin que componentes no microbianos empleados se hayan relacionado con un efecto adicional antiparasitario y/o nutricional (p. ej. fertilizante) sobre la planta. Sin embargo, aunque los componentes no microbianos empleados se asocian a un aumento de viabilidad de los microorganismos, estas composiciones no mantienen la viabilidad durante periodos de tiempo largos (inferiores al año).
- Bello y col. han descrito que los contenidos de ureasa y quitinasa en el suelo están inversamente
- 30 correlacionados con el número de nódulos de *M. arenaria* (Bello et al., 1996).
- En general, los bacilos Gram-positivos (Gram +) son susceptibles de utilizar como fuente de nitrógeno, nitrógeno mineral, particularmente amoníaco, nitratos, nitritos, y moléculas de nitrógeno orgánico como urea, aminoácidos, bases nitrogenadas y otros compuestos de bajo peso molecular.
- De todos los productos químicos que pueden tener acción nematocida, obtenidos por la actividad de los
- 35 microorganismos en la descomposición de la materia orgánica, el amonio ha sido el mejor estudiado. Aunque es difícil afirmar que un solo componente sea responsable de la mortalidad de los nematodos, la actividad nematocida del amonio fue reconocida por Eno et al. (Eno et al., 1955), cuando realizaban una serie de trabajos sobre el empleo de amoníaco anhidro como fertilizante nitrogenado, al comprobar que aplicado por inyección a la concentración de 300-900 mg kg⁻¹ de suelo reducía los problemas de nematodos. Experimentos posteriores con
- 40 urea, que se convierte en amonio por acción de la ureasa existente en el suelo, muestran que es un buen nematocida si se aplica en cantidades superiores a 300 mg de N kg⁻¹ de suelo (Huebner et al., 1983).
- Por otra parte, en la búsqueda de alternativas para el control de nemátodos, se ha demostrado que la materia orgánica, con una relación C/N entre 8-20, tiene actividad nematocida sin efecto fitotóxico (Rodríguez-Kabana et al., 1987), y que la incorporación de materiales orgánicos en el suelo, reduce las densidades de nematodos
- 45 formadores de nódulos (Muller y Gooch, 1982). De hecho, se han utilizado con cierto éxito residuos de oleaginosas, serrín y urea (Singh y Sitaramaiah, 1966, 1967; Sikora et al., 1973a). También se han ensayado como enmiendas al suelo para el control de nematodos y otros patógenos de plantas, materiales con alto contenido en nitrógeno que generan amoníaco, el cual actúa como un nematocida en el suelo (Canullo et al., 1992b). Además, Tenuta, Hobbs y Lazarovits han estudiado también los mecanismos asociados con el control de
- 50 organismos patógenos con materia orgánica, indicando que está asociada al NH₃, efecto que se mantiene durante 4 días en suelos arenosos. Según estos autores, los nematodos fitoparásitos se ven afectados en resumidas cuentas, por el uso de urea y otras fuentes de nitrógeno (Tenuta et al., 1997).
- Aunque el uso de enmiendas orgánicas para el control de nematodos reduciría la densidad poblacional de nematodos en diferente grado, su uso está limitado por las grandes cantidades que se necesitan (Luc et al., 1990). Un ejemplo de ello es la remarcable reducción de la actividad y movilidad que se observó en el segundo
- 55 estado de los juveniles de *Meloidogyne spp.* tratados con extractos de emmiendas orgánicas, sugiriendo que esas sustancias se excretan por descomposición de las enmiendas y tienen efecto nematostático (Miano, 1999).

Existen productos en el mercado cuya composición está basada en diversas cepas de microorganismos extraídos del suelo y elementos nutritivos que le aportan un alto contenido de nitrógeno. Concretamente, los microorganismos presentes (PGPRs de las especies *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus circulans*, *Brachyrrhizobium spp.*, *Rhizobium spp.* y *Azotobacter*) son una combinación de hongos y bacterias con propiedades nematocidas conocidas. Sin embargo, este producto no es capaz de mantener viables a lo largo del tiempo a los microorganismos introducidos que contiene.

En consecuencia, actualmente existe la necesidad de preparar composiciones fertilizantes con acción contra nematodos donde cualquier microorganismo sea capaz de mantener su viabilidad durante largos periodos de tiempo en presencia de los elementos nutritivos de la composición, y donde la eficacia del producto venga dada por los elementos fertilizantes y por la acción del microorganismo en la formulación, no por la acción del microorganismo en el nematodo fitopatógeno.

Descripción de la invención

En base a lo anterior, la presente invención propone una nueva formulación viable desde el punto de vista microbiológico, a partir de PGPR adecuados y de un líquido portador, no fitotóxico, que contiene urea, aminoácidos, bases nitrogenadas y/u otros compuestos de bajo peso molecular que sirvan a la planta de nutrientes, y que por la acción del microorganismo en la formulación, una vez diluida en agua, promueve un ambiente desfavorable a los nematodos. Esta formulación produce una disminución significativa del ataque de los nematodos formadores de nódulos (*Meloydogine spp.*) en cultivo de tomate (Tomate Valenciano), como demuestran los resultados obtenidos mediante bioensayo para evaluar el efecto o tipo de interacción que induce la formulación cuando se aplica al suelo de un cultivo expuesto a nematodos. En particular, dicha formulación comprende una rizobacteria del género *Bacillus spp.*, en concreto, especie *subtilis*, seleccionada del cepario de IAB, S.L (*Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas S.L.*), que formulada en un líquido portador, únicamente o en conjunto con otras rizobacterias, mantiene la viabilidad microbiana durante un año. Además, se ha demostrado que mediante ensayos "in vitro" y bioensayo, la formulación de la presente invención produce una disminución significativa del ataque de los nematodos formadores de nódulos (*Meloydogine spp.*) en cultivo de tomate (Tomate Valenciano), debido a algún efecto o tipo de interacción existente. Dicha disminución, queda reflejada a través de la medida del índice de nodulación en raíz, en el bioensayo.

La formulación de la invención es un fertilizante (aportando valores nutricionales al cultivo), y a la misma vez es capaz de mantener al microorganismo viable durante largos periodos de tiempo. Además, la acción del microorganismo sobre los componentes no microbianos que contiene la propia formulación, consigue mantener a la plaga de nematodos por debajo de un umbral, el cual permite mantener el cultivo en condiciones adecuadas de crecimiento.

Los resultados obtenidos aquí presentados, han permitido el diseño de la composición, que una vez probado en campo, ha dado lugar a un producto de notable interés comercial.

En consecuencia, un primer aspecto de la invención hace referencia a una composición microbiana para control de nematodos, útil para prevenir y/o tratar una infestación por nematodos en una planta, caracterizada porque comprende:

a) al menos una cepa microbiana con actividad ureasa capaz de transformar enzimáticamente nitrógeno amoniacal a NH_3 , donde preferentemente dicha cepa es *Bacillus spp.*,

b) un medio líquido fertilizante que comprende:

b.1) una fuente de aminoácidos, preferentemente un hidrolizado de proteínas, y más preferentemente un hidrolizado de proteínas de origen vegetal;

b.2) una fuente de ácidos fúlvicos, preferentemente una fuente de lignosulfato potásico;

b.3) una fuente de nitrógeno ureico, preferentemente urea;

b.4) una fuente de nutrientes, preferentemente melaza; y

b.5) agua.

La composición microbiana anterior, puede ser aplicada para tratar y/o prevenir una infestación por nematodos producida por un tipo de nematodo formador de nódulos (o agallas) en la raíz o raíces de una planta. Preferentemente dicho nematodo es un nematodo sedentario endoparásito que pertenece a una especie de *Meloidogyne*, y más preferentemente es un nematodo de la especie *Meloidogyne incognita*. Los nematodos fitoparásitos, los formadores de agallas pertenecientes al género *Meloidogyne*, son considerados los de mayor importancia económica a nivel mundial por los daños que causan, y están caracterizados por una reducción

notable de los rendimientos y el gran número de especies de plantas que atacan, que incluye la mayoría de los vegetales, frutales, ornamentales y flora arvense. Entre las plantas que comúnmente pueden sufrir este tipo de infestaciones, y por tanto pueden ser tratadas con la composición microbiana descrita en el presente documento, se encuentran, y sin que sirva de limitación, la cebolla, el espárrago, el pimiento, la vid, la zanahoria y otros cultivos hortícolas tan habituales como por ejemplo el tomate (en el caso del ensayo, tomate valenciano).

Para conseguir el efecto deseado contra los nemátodos definidos previamente, la composición microbiana anterior comprende al menos un microorganismo con actividad ureasa, es decir, un microorganismo capaz de transformar enzimáticamente el nitrógeno ureico en amoníaco (NH_3), el cual resulta tóxico para estos nemátodos. De este modo, el microorganismo genera un ambiente desfavorable para la población de nemátodos, que migra a otras zonas, lo que además puede favorecer la colonización de la raíz por parte de dicho microorganismo si es de tipo rizosférico y/o por parte de algún otro microorganismo rizosférico que se encuentre presente en la propia composición microbiana o en la tierra de cultivo. Preferentemente, dicho microorganismo con actividad ureasa es una cepa microbiana de *Bacillus spp.*, como son y sin que sirva de limitación, cepas de las especies *B. subtilis*, *B. megatherium*, *B. thuringiensis* y/o *Bacillus licheniformis*. Más preferentemente, la cepa microbiana es una cepa de *Bacillus subtilis*, y aún más preferentemente una cepa aislada de *Bacillus subtilis* IAB/BS03 depositada en la colección de cultivos tipo Alemana DSMZ con Nº de Acceso DSM 24682, o un mutante de dicha cepa, y también depositada en la Colección de Cultivos Tipo Española con número de acceso CECT 7254, propiedad de la empresa que presenta la presente invención.

Cepa *Bacillus subtilis* DSM 24682

La siguiente cepa ha sido depositada el 06 de junio de 2011, en la Colección de Cultivos Tipo Alemana (DSMZ), Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig (Alemania), por Dña. Estefanía Hinarejos Esteve, IAB, S.L. (Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas S.L.), Avda. Paret del Patriarca 11-B, Ap.30, 46113 Moncada, Valencia (España).

El depósito de la cepa depositada cuya referencia es *Bacillus subtilis* var. *subtilis* designada como IAB/BS03, CECT 7254, fue identificado por la DSMZ con el número de acceso DSM 24682 una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable, bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimiento de Patente.

La cepa DSM 24682 de *Bacillus subtilis*, empleada anteriormente como agente de control biológico en base a su capacidad para producir sustancias antibióticas frente a hongos fitopatógenos, en la presente invención es capaz de actuar sobre el medio líquido fertilizante para transformar el nitrógeno amoniacal en NH_3 , y generar así un ambiente que resulta desfavorable para el nematodo.

Además, como se indica previamente la cepa anterior ha sido depositada el 30 de marzo de 2007, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Raquel del Val Buedo del IAB, S.L.. El depósito de la cepa pura y viable, fue recibido por la CECT con el número de acceso CECT 7253.

En una realización preferida de la composición microbiana anteriormente definida, la cepa microbiana con actividad ureasa comprende al menos una cepa de *Bacillus spp.*, y en una realización más preferida comprende una cepa seleccionada de al menos una del grupo que consiste en: cepa de *Bacillus subtilis* (preferentemente la cepa microbiana de *Bacillus subtilis* DSM 24682), cepa de *Bacillus thuringiensis* (preferentemente *B. thuringiensis* var. *kurstaki*), cepa de *Bacillus megatherium*, cepa de *Bacillus licheniformis* y cualquier combinación de las anteriores. En una realización aún más preferida de la anterior, la cepa microbiana de *Bacillus spp.* comprende una cepa de *Bacillus subtilis* con actividad ureasa, y más preferente es la cepa *B. subtilis* DSM 24682. No obstante, cuando la composición microbiana comprende una cepa de *Bacillus subtilis* con actividad ureasa (como p. ej. la cepa *B. subtilis* DSM 24682), dicha composición puede comprender además al menos una cepa adicional de *Bacillus spp.*. Así, en realizaciones preferidas, la composición microbiana además de la cepa de *Bacillus subtilis* con actividad ureasa, que incluye aquellas composiciones microbianas con la cepa *B. subtilis* DSM 24682, comprende una cepa microbiana adicional de *Bacillus spp.*. Ejemplos de cepas microbianas adicionales de *Bacillus* son, sin que sirva de limitación, alguna cepa seleccionada entre al menos una del grupo compuesto por: cepa de *Bacillus thuringiensis* (preferentemente *B. thuringiensis* var. *kurstaki*), cepa de *Bacillus megatherium*, cepa de *Bacillus licheniformis* y cualquier combinación de las mismas. Resulta aún más preferida, una composición donde la cepa microbiana adicional comprende una combinación de una cepa de *Bacillus thuringiensis* (preferentemente *B. thuringiensis* var. *kurstaki*), una cepa de *Bacillus megatherium* y una cepa de *Bacillus licheniformis*. De hecho, en un ejemplo de realización preferido, la composición microbiana comprende la cepa con actividad ureasa *Bacillus subtilis* DSM 24682, y además, las cepas comerciales *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* IAB/BT/01, *Bacillus megatherium* CECT 7253 y *Bacillus licheniformis* CECT 7252.

Las cepas *Bacillus subtilis* DSM 24682 (CECT 7254), *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* IAB/BT/01, *Bacillus megatherium* CECT 7253 y *Bacillus licheniformis* CECT 7252, anteriormente mencionadas, se mantienen en el cepario de IAB, S.L. y son actualmente producto comercial, deshidratado y liofilizado. Dichas bacterias rizosféricas han sido identificadas por el Colegio Oficial de Pesadores y Medidores Públicos de Barcelona (COPMB) mediante identificación molecular de la secuencia del ARNr 16S en la base de datos del Genbank. Y además, las rizobacterias *Bacillus subtilis* DSM 24682 (CECT 7254), *Bacillus megatherium* CECT 7253 y *Bacillus licheniformis* CECT 7252, una vez identificadas se mantienen depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de Valencia, con los correspondientes números de acceso o de depósito CECT aquí indicados, aunque en estos casos dichos depósitos no se realizaron según el Tratado de Budapest.

- 10 La cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* es una cepa comercialmente accesible de referencia comercial IAB/BT/01.

La cepa *Bacillus megatherium* con número de depósito CECT 7253 ha sido depositada el 30 de marzo de 2007, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Raquel del Val Buedo del IAB, S.L..El depósito de la cepa pura y viable, fue recibido por la CECT con el número de acceso CECT 7253.

- 15

La cepa *Bacillus licheniformis* con número de depósito CECT 7252 ha sido depositada el 30 de marzo de 2007, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Raquel del Val Buedo del IAB, S.L..El depósito de la cepa pura y viable, fue recibido por la CECT con el número de acceso CECT 7252.

- 20 Ventajosamente, y debido a la formulación característica del medio líquido fertilizante, la composición microbiana descrita en la presente invención presenta una viabilidad microbiana del 80% durante un mínimo de al menos un año, un porcentaje de viabilidad difícil de mantener en otras composiciones conocidas en el estado de la técnica una vez transcurridos más de 6 meses desde su preparación. De hecho, dicho medio líquido fertilizante es capaz de mantener la viabilidad microbiana al 100% durante al menos 6 meses, y al menos un 80% durante un año, de distintos microorganismos como pueden ser distintas cepas bacterianas de *Bacillus spp.*, como por ejemplo son entre otras las cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megatherium* y *Bacillus licheniformis* anteriormente mencionadas. Asimismo, el medio líquido fertilizante, es capaz de mantener la viabilidad microbiana al menos a un 80% durante 6 semanas de cepas bacterianas de *Azotobacter vinelandii* y *Rhizobium leguminosarum*. Otros microorganismos de naturaleza fúngica, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, presentan una viabilidad en el medio líquido fertilizante del 100% al menos durante 24 horas.
- 25
- 30

Característicamente, el fertilizante líquido, además de promover un ambiente desfavorable a los nematodos fitopatógenos, es estable y resulta adecuado para soportar la base microbiana (la cepa o cepas de *Bacillus* mencionadas anteriormente, y en su caso también, otras cepas microbianas o de microorganismos fúngicos adicionales, por ejemplo como los previamente indicados), manteniendo la viabilidad de los microorganismos que contiene. El medio líquido de características fertilizantes, se presenta como una formulación interesante, no solo por sus características fertilizantes, sino por la característica de mantener la viabilidad microbiana de distintos géneros y especies microbianas, de forma aislada, o como consorcio microbiano. En consecuencia, la composición microbiana de la invención, puede comprender otros microorganismos que sean viables en dicha formulación, preferentemente otros PRPG conocidos como pueden ser otras cepas de *Bacillus spp.*, por ejemplo *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *Bacillus megatherium* y/o *Bacillus licheniformis*. Por esto, el medio líquido fertilizante puede ser considerado como una formulación novedosa de la presente invención. Las cantidades de los ingredientes de dicho medio líquido pueden variar de tal manera que permitan mantener sus características de estabilidad y/o que permitan su utilidad para soportar la mencionada base microbiana.

- 35
- 40

Típicamente, la fuente de aminoácidos puede estar presente en una cantidad de entre un 45% y un 95% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 60% a un 80% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 70% a un 78% en peso con respecto al volumen total de la composición. El término "fuente de aminoácidos" en la presente invención hace referencia a un material donde se pueden encontrar aminoácidos, no necesariamente purificados, pudiendo encontrarse como mezclas de aminoácidos. En este sentido, el especialista medio del campo puede emplear como fuentes de aminoácidos, por ejemplo y sin limitarse a, un hidrolizado de proteína, aminoácidos obtenidos por fermentación y/o incluso también aminoácidos obtenidos mediante síntesis. Sin que sirva de limitación, la fuente de aminoácidos puede incluir aminoácidos como por ejemplo lisina, alanina, histidina, cistina y cisteína, arginina, valina, hidroxiprolina, metionina, ácido aspártico, isoleucina, treonina, leucina, serina, tirosina, ácido glutámico, fenilalanina, prolina, triptófano, glicina y otros aminoácidos similares. Preferiblemente, la fuente de aminoácidos es de origen vegetal, comprendiendo aminoácidos obtenidos a partir de proteínas de plantas, como por ejemplo es, y sin que sirva de limitación, un hidrolizado de proteína vegetal.

- 45
- 50
- 55

La fuente de ácidos fúlvicos puede estar típicamente presente en una cantidad de entre un 1% y un 20% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 5% a un 15% en peso con respecto al

volumen total de la composición, incluyendo de entre un 10% a un 15% en peso con respecto al volumen total de la composición. El término “fuente de ácidos fúlvicos” en la presente invención hace referencia a un material donde se pueden encontrar ácidos fúlvicos, conocidos por el experto medio de la técnica, tales como el ácido lignosulfónico y/o cualquiera de sus sales, preferentemente sales de cationes alcalinos como por ejemplo potasio o sodio. En una realización preferida, la fuente de ácidos fúlvicos es lignosulfonato potásico.

La fuente de nitrógeno ureico puede estar típicamente presente en una cantidad de entre un 1% y un 20% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 5% a un 15% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 8% a un 12% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 10% a un 11% en peso con respecto al volumen total de la composición. En la presente invención, el término “fuente de nitrógeno ureico” hace referencia a un material donde se puede encontrar nitrógeno de origen ureico, tal como urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), y Calurea ($(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$). Preferentemente, la fuente de nitrógeno ureico es urea.

El término “fuente de nutrientes” en la presente invención hace referencia a un material o sustancia que aporte una mezcla variada de nutrientes que puedan ser empleados por los microorganismos, y que comprende compuestos nutritivos esenciales para el desempeño de las funciones vitales de los microorganismos como son entre otros, azúcares, minerales, oligoelementos, vitaminas y/o aminoácidos. Así, cuando se añade al menos un microorganismo al medio líquido fertilizante, la fuente de nutrientes contribuye al mantenimiento, crecimiento y/o desarrollo de dicho microorganismo. La fuente de nutrientes típicamente se encuentra presente en una cantidad de entre un 1% y un 10% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 1% a un 5% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 2% a un 4% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 2% a un 3% en peso con respecto al volumen total de la composición. Un ejemplo preferido de fuente de nutrientes es la melaza, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en: melaza de caña de azúcar, melaza de remolacha y cualquier combinación de las mismas.

El término melaza, como se entiende en la presente invención, se refiere a un producto líquido espeso derivado de la caña de azúcar y en menor medida de la remolacha azucarera, obtenido del residuo restante en las cubas de extracción de los azúcares. Nutricionalmente presenta un altísimo contenido en hidratos de carbono, además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el hierro, cobre y magnesio. Su contenido de agua es bajo.

El contenido de agua de la composición microbiana está presente en cantidad suficiente para completar el 100% en peso (C.S.P.) con respecto al volumen total de la composición. En función de las cantidades de los componentes anteriores, el agua está presente en la composición en una cantidad que varía de entre un 0% y un 52% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 0% a un 29% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 0% a un 25% en peso con respecto al volumen total de la composición, incluyendo de entre un 0% a un 8% en peso con respecto al volumen total de la composición.

A menos que se especifique otra cosa, todos los porcentajes como se usan en este documento son en peso con respecto al volumen total de la composición total (% p/v), pudiendo ser igualmente entendidos como los pesos expresados en gramos por cada 100 mililitros de composición total. Los intervalos numéricos como se usan en el presente documento pretenden incluir cada número y sub-conjunto de números dentro del intervalo, se haya descrito específicamente o no. Por ejemplo, un intervalo numérico de 45% a 95% debería considerarse como que soporta un intervalo de 60% a 80%, de 70% a 78% y similares.

En una realización preferida, el medio líquido fertilizante de una composición microbiana como cualquiera de las definidas anteriormente comprende:

- b.1)** entre un 45% y un 95%, preferentemente entre un 60% y un 80%, en peso de la fuente de aminoácidos con respecto al volumen total de composición, incluidos ambos límites;
- b.2)** entre un 1% y un 20%, preferentemente entre un 5% y un 15%, en peso de la fuente de ácidos fúlvicos con respecto al volumen total de composición, incluidos ambos límites;
- b.3)** entre un 1% y un 20%, preferentemente entre un 5% y un 15% (y más preferentemente entre un 8% y un 12%), en peso de la fuente de nitrógeno ureico con respecto al volumen total de composición, incluidos ambos límites;
- b.4)** entre un 1% y un 10%, preferentemente entre un 1% y un 5% (y más preferentemente entre un 2% y un 4%), en peso de la fuente de nutrientes con respecto al volumen total de composición, incluidos ambos límites; y
- b.5)** entre un 0% y un 52% (preferentemente entre un 0% y un 29%, y más preferentemente entre un 0% y un 25%), en peso de agua con respecto al volumen total de composición, incluidos ambos límites, de tal manera que la suma total de los porcentajes en peso de todos los componentes de la composición sea del 100%.

En otra realización preferida, el medio líquido fertilizante de la composición microbiana como cualquiera de las definidas anteriormente comprende:

- 5 **b.1)** entre un 60% y un 80%, preferentemente entre un 70% y un 78%, en peso de la fuente de aminoácidos con respecto al volumen total de composición,
- b.2)** entre un 5% y un 15%, preferentemente entre un 10% y un 15%, en peso de la fuente de ácidos fúlvicos con respecto al volumen total de composición,
- b.3)** entre un 8% y un 12%, preferentemente entre un 10% y un 11%, en peso de la fuente de nitrógeno ureico con respecto al volumen total de composición,
- 10 **b.4)** entre un 2% y un 4%, preferentemente entre un 2% y un 3%, en peso de la fuente de nutrientes con respecto al volumen total de composición, y
- b.5)** entre un 0% y un 25%, preferentemente entre un 0% y un 8%, en peso de agua con respecto al volumen total de composición, de tal manera que la suma total de los porcentajes en peso de todos los componentes de la composición sea del 100%.

Y en una realización más preferida de la anterior, el medio líquido fertilizante comprende:

- 15 **b.1)** entre un 70% y un 78%, preferentemente un 70%, en peso de la fuente de aminoácidos con respecto al volumen total de composición,
- b.2)** entre un 10% y un 15%, preferentemente un 10%, en peso de la fuente de ácidos fúlvicos con respecto al volumen total de composición,
- 20 **b.3)** entre un 10% y un 11%, preferentemente un 10%, en peso de la fuente de nitrógeno ureico con respecto al volumen total de composición,
- b.4)** entre un 2% y un 3%, preferentemente un 3%, en peso de la fuente de nutrientes con respecto al volumen total de composición, y
- b.5)** entre un 0% y un 8% en peso de agua con respecto al volumen total de composición, de tal manera que la suma total de los porcentajes en peso de todos los componentes de la composición sea del 100%.

25 Y en una realización aún más preferida de la anterior, el medio líquido fertilizante comprende:

- b.1)** un 70% en peso de la fuente de aminoácidos, preferentemente de un hidrolizado de proteína vegetal, con respecto al volumen total de composición,
- b.2)** un 10% en peso de la fuente de ácidos fúlvicos, preferentemente de lignosulfato potásico, con respecto al volumen total de composición,
- 30 **b.3)** un 10% en peso de la fuente de nitrógeno ureico, preferentemente urea, con respecto al volumen total de composición,
- b.4)** un 3% en peso de la fuente de nutrientes, preferentemente melaza, con respecto al volumen total de composición, y
- 35 **b.5)** un porcentaje en peso de agua con respecto al volumen total de composición (hasta un máximo del 7%) para que la suma total de los porcentajes en peso de todos los componentes de la composición sea del 100%.

Según la presente invención, el contenido microbiano total de la composición microbiana como cualquiera de las definidas anteriormente, está comprendido entre entre 10^3 y 10^9 unidades formadoras de colonias (ufc) por mililitro de composición. El término "unidades formadoras de colonia" (también referido en esta memoria por su abreviatura ufc) hace referencia al número de esporas o células microbianas capaces de ser viables. En 40 realizaciones preferidas, las composiciones microbianas comprenden un contenido microbiano total de entre 10^6 y 10^9 ufc por mL de composición. Estas composiciones pueden prepararse a partir de cepas microbianas de partida de concentración conocida, por ejemplo, comprendida entre 10^{10} y 10^{11} ufc/gramo, de tal manera que en este caso en la composición microbiana la cepa o cepas microbianas de partida están presentes en una cantidad 45 comprendida entre un 0,01% y un 10% en peso con respecto al volumen total de la composición. Más preferentemente, la cepa o cepas microbianas de partida se encuentran presentes en la composición entre un 0,02% y un 1% en peso de dicha cepa o cepas microbianas con respecto al volumen total de la composición.

En una realización preferida, la composición microbiana como cualquiera de las definidas anteriormente comprende un 0,02% en peso de la cepa microbiana de *Bacillus spp.* con actividad ureasa *Bacillus subtilis* DSM 24682 con respecto al volumen total de la composición. En una realización preferida de la anterior, además de la 50 cepa *B. subtilis* DSM 24682, comprende otras cepas microbianas de *Bacillus spp.* hasta alcanzar un contenido microbiano total de un 0,1% en peso de cepas microbianas con respecto al volumen total de la composición, como por ejemplo es una composición que comprende un 0,02% en peso de *B. subtilis* (preferentemente *B. subtilis* DSM 24682), un 0,02% en peso de *B. licheniformis* (preferentemente *B. licheniformis* CECT 7252), un 55 0,02% en peso de *B. megatherium* (preferentemente *B. megatherium* CECT 7253) y un 0,04% de *B. thuringiensis* (preferentemente *B. thuringiensis* var. *kurstaki* IAB/BT/01), con respecto al volumen total de la composición.

Los anteriores porcentajes de la cepa o cepas microbianas, se refieren al peso total de todas las cepas de

microorganismos presentes en la composición microbiana con respecto al volumen total de dicha composición, expresado en tanto por cien, y comprende el porcentaje en peso de la cepa de *Bacillus* capaz de transformar enzimáticamente nitrógeno amoniacal a NH_3 y además, en su caso, el porcentaje en peso de la cepa o cepas microbianas adicionales definidas anteriormente.

- 5 En adelante, todas las composiciones microbianas definidas anteriormente serán denominadas como “composiciones microbianas de la invención”, o simplemente “composiciones de la invención”.

Tal y como se ha demostrado en ensayos *in vitro*, las composiciones microbianas de la invención, diseñadas a partir de PGPR adecuados y de un líquido portador, no fitotóxico, son viables desde el punto de vista microbiológico y promueven como se desea un ambiente desfavorable a los nematodos.

- 10 Por otra parte, se han llevado a cabo pruebas *in vivo*, mediante un bioensayo, para evaluar la eficacia de las composiciones microbianas de la invención. De cara al bioensayo, se utilizó como cultivo susceptible el tomate, empleando la variedad, sensible a los ataques de nematodos, tomate Valenciano. Dicho cultivo crece en condiciones óptimas para que se produzca la infección por parte de los nematodos fitopatógenos, y asimismo asegura una fuente fiable de estos nematodos, concretamente de nematodos de *Meloidogyne spp.*. En general, 15 aquellas condiciones favorables para el crecimiento de las plantas, también serán favorables para la reproducción de *Meloidogyne spp.*. Los resultados del bioensayo muestran que existe algún efecto o tipo de interacción que produce una disminución significativa del ataque de los nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne spp.*) en cultivo de tomate (Tomate Valenciano).

- 20 Por lo tanto, en un segundo aspecto, la invención hace referencia al uso de al menos una de las composiciones microbianas de la invención para tratar y/o prevenir una infestación por un nematodo en un cultivo vegetal.

Cuando la composición de la invención se aplica al suelo de una planta o un cultivo de una planta con una infestación por al menos un nematodo parásito formador de nódulos, preferentemente *Meloidogyne spp.*, se produce una disminución significativa del ataque de dichos nematodos que queda reflejada a través de una disminución en la medida del índice de nodulación de raíz.

- 25 En consecuencia, un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para tratar y/o prevenir una infestación de un nematodo (preferentemente *Meloidogyne spp.*, y más preferentemente, *Meloidogyne incognita*) en un cultivo de una planta (preferentemente tomate, y más preferentemente, tomate valenciano) que comprende aplicar al suelo o a la superficie de dicho cultivo al menos una de las composiciones microbianas de la invención definidas en el presente documento.

- 30 Las plantas o cultivos vegetales a los que se puede aplicar la composición microbiana de la invención, para tratar y/o prevenir la infestación por un nematodo, no están particularmente limitadas, que tal como se mencionó anteriormente incluyen la mayoría de los vegetales, frutales, plantas ornamentales y flora arvense. Como ejemplos de dichas plantas se pueden incluir, y sin limitarse a, cereales (p.ej., arroz, cebada, trigo, centeno, 35 avena, maíz, etc.), verduras y hortalizas (soja, judías, habas forrajeras, guisantes, alubias rojas, cacahuets, col, tomate, espinaca, brécol, lechuga, cebolla, cebolleta, pimentón, berenjena, pimiento, zanahoria, patata, batata, aráceas, rábano, raíz de loto, nabo, bardana, ajo, calabaza, pepino, etc.), frutas/frutales (manzanas, frutas cítricas, pomos, uvas, melocotones, albaricoques, melocotones amarillos, plátanos, fresas, sandía, melón, nueces, castañas, almendras, etc.), productos vegetales para procesar (algodón, cáñamo, remolacha, lúpulo, caña de azúcar, remolacha azucarera, aceituna, goma, café, tabaco, té, etc.), plantas de pasto (pasto ovillo, 40 sorgo, hierba timotea, trébol, alfalfa, etc.), céspedes (césped, agrostis, etc.), plantas ornamentales, tales como plantas de olor (lavanda, romero, tomillo, perejil, pimienta, jengibre, etc.), plantas con flores (crisantemo, rosa, clavel, orquídea, etc.), árboles de jardín (ginkgo, cerezo, laurel Japonés, etc.) y árboles forestales (*Abies sachalinensis*, *Picea jezoensis*, pino, tuya, cedro, ciprés, etc.).

En una realización preferida, la aplicación al suelo de la composición microbiana comprende:

- 45 i) un primer riego de la planta con una disolución acuosa de la composición microbiana, donde dicha disolución presenta una concentración microbiana comprendida entre 10^3 y 10^9 ufc por litro de disolución, a una dosis de riego comprendida entre 10 y 30 litros de la disolución acuosa por hectárea de cultivo.

En una realización más preferida de la anterior, además del primer riego, dicha aplicación también comprende:

- 50 ii) un segundo riego de la planta con una disolución acuosa de la composición microbiana como se definió anteriormente en i), después de un periodo de tiempo comprendido entre 10 y 20 días, respecto del primer riego.

En realizaciones preferidas de uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este aspecto de la invención, el método es para tratar y/o prevenir una infestación de un nematodo formador de nódulos endoparásito de plantas como *Meloidogyne spp.*, y más preferentemente, *Meloidogyne incognita*.

5 En otras realizaciones preferidas del método este aspecto de la invención, la planta del cultivo sobre la que se aplica uno cualquiera de los métodos anteriores, es tomate, y más preferentemente, tomate valenciano.

Un cuarto aspecto de la invención hacer referencia a un kit para preparar una composición microbiana de la invención que comprende al menos una cepa microbiana con actividad ureasa, como cualquiera de las que se han definido anteriormente en el primer aspecto de la invención, y un líquido fertilizante, de acuerdo a los medios líquidos fertilizantes definidos en alguna de las composiciones de la invención anteriormente definidas.

10 **Descripción de las figuras**

FIGURA 1. Raíz de calabacín, fuente de inóculo de nematodos fitopatógenos para los ensayos in vitro.

FIGURA 2. Diluciones seriadas para cálculo de concentraciones y viabilidades.

FIGURA 3. Imagen a las 24h en el test *in vitro*, realizado con 1 ml del producto al 1%v/v en 1 ml de suspensión de nematodos.

15 **FIGURA 4.** Imagen a las 96 h en el test *in vitro* realizado con 1 ml del producto al 1% v/v en 1 ml de suspensión de nematodos.

FIGURA 5. Equipamiento empleado en las aplicaciones.

FIGURA 6. Primera aplicación.

FIGURA 7. Extirpación de raíces para evaluación.

20 **FIGURA 8.** Evaluación previa con apio.

FIGURA 9. Representación del plano de la parcela.

FIGURA 10. Vista general de la parcela donde se ha realizado el ensayo para evaluar la eficacia de la composición microbiana de la invención en el control de *Meloidogyne sp.* en cultivo de tomate.

25 **FIGURA 11.** Índices de nodulación en raíz (en una escala de 0 a 10) obtenidos con los distintos tratamientos evaluados: sin tratamiento (1); tratamiento con la composición microbiana de la invención (*Bacillus spp.* 10^8 ufc/mL) a una dosis de aplicación de 10 L/ha (2); tratamiento con extracto de Quillay al 35% a una dosis de aplicación de 10 L/ha (3); tratamiento con fenamifos al 24% a una dosis de aplicación de 40 L/ha (4); tratamiento con la composición microbiana de la invención (*Bacillus spp.* 10^8 ufc/mL) a una dosis de aplicación de 10 L/ha combinado con extracto de Tagetes fermentado aplicado en dosis de aplicación de 10 L/ha (5).

30 **FIGURA 12.** Eficacia en el nivel de agallamiento calculada mediante la fórmula de Abbott (%) con los distintos tratamientos evaluados: tratamiento con la composición microbiana de la invención (*Bacillus spp.* 10^8 ufc/mL) a una dosis de aplicación de 10 L/ha (2); tratamiento con extracto de Quillay al 35% a una dosis de aplicación de 10 L/ha (3); tratamiento con fenamifos al 24% a una dosis de aplicación de 40 L/ha (4); tratamiento con la composición microbiana de la invención (*Bacillus spp.* 10^8 ufc/mL) a una dosis de aplicación de 10 L/ha combinado con extracto de Tagetes fermentado aplicado en dosis de aplicación de 10 L/ha.

35 **FIGURA 13.** Estado de las raíces al final del ensayo de las plantas no tratadas.

FIGURA 14. Estado de las raíces al final del ensayo de las plantas tratadas con la composición microbiana de la invención.

FIGURA 15. Estado de las raíces al final del ensayo de las plantas tratadas con extracto de Quillay.

40 **Bibliografía**

Bello,A. ,López-Pérez,L., García-Álvarez, (1996). Biofumigation as an alternative to methyl bromide.

- Bezooijen J. 2006.** Revised version. Methods and techniques for nematology. University of Wageningen.
- Bridge J., S. L. J. Page, 1980.** Estimation of root-knot nematodes infestation levels on roots using a rating chart. Tropical pest management 26: 296-298.
- 5 **Canullo, G. H.; R. Rodríguez-Kábana; J. W. Kloepper. 1992b.** Changes in soil microflora associated with control of *Sclerotium rolfsii* by furfuraldehyde. Biocontrol Science and Technology 2, 159-169.
- Eno, C. F.; Blue WG; Good JM. 1955.** The effect of anhydrous ammonia on nematodes, fungi, bacteria, and nitrification in some Florida soils. Proc. Soil Science Society of America 19, 55-58.
- Hallman, J., Sikora, R.A., 1994.** Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte, on *Meloidogyne incognita* infection of tomato. Zeit. Pflanzkrank. Pflanzenschutz. 101, 475-481.
- 10 **Hallman, J., Quadt, H.A. Miller, W.G., Sikora R.A., Lindow, S.E., 2001.** Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. Phytopathology 91, 415-422.
- Hinarejos E, 2008.** IAB, S.L. (*Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas S.L.*).
- Huebner, R A; Rodríguez-Kábana R; Patterson RM. 1983.** Hemicellulosic waste and urea for control of plant parasitic nematodes: effects on soil enzyme activities. Nematropica 13, 37-45.
- 15 **Luc M, Sikora R.A and Bridge J, 1990.** Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical agriculture. C.A.B. International Institute of Parasitology. p.240.
- Márquez Gutiérrez ME y Fernández González E, 2006.** Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con efecto nematocida Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) No. 78.
- 20 **Miano, DW, 1999.** optimization of carbon:nitrogen ratios in organic soil amendments for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) in tomato. Msc.Thesis University of Nairobi.
- Moy, Terence I.; Anthony R. Ball, Zafra Anklesaria, Gabriele Casadei, Kim Lewis, and Frederick M. Ausubel* Contributed by Frederick M. Ausubel, 2006.** Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model.
- Muller, R. and Gooch, P.S., 1982.** Organic amendments in nematode control. An examination of the literature. Nematropica, 12: 319-326.
- 25 **Nelson W, 2007.** A Review on Beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.Vol.60, No1.p.3621-3643.
- Padgham JL and Sikora R.A, 2007.** Biological control potential and modes of action of *Bacillus megatherium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. Crop Protection, Volume 26, Issue 7, July 2007, Pages 971-977. J.L.
- 30 **Pocasangre, L., Sikora, R.A., Vilich, V., Schuster, R.P., 2000.** Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. Act.Hort.531, 283-289.
- Riksen J, 2008.** Laboratory of Nematology. Wageningen University and Research Center. www.nem.wur.nl/UK/Webshop/Products/Nematode+counting+dishes/. (Ref. Dr. Joost Riksen Joost.Riksen@wur.nl).
- Rodriguez-Kabana R., G. Morgan-Jones, 1987.** Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. Plant and Soil 100.
- 35 **Sayre, R.M. 1980.** Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of nematodes. Journal of Nematology. 12: 261-270.
- Sharman, A., B.N. Johri, A.K. Sharma y B.R. Glick. 2003.** Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). Soil Biology and Biochemistry. 35: 887-894.
- 40 **Sharon, E., M. Bar Eyal, A. Herrera Estrella, O. Kleifeld y Y. Spiegel. 2001.** Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology. 91: 687-693.
- Simon J, 2008.** Laboratory of Nematology. Reading University and Research Center.

Singh, R.S. and Sitaramaiah, K (1966). Incidente of root-knot of okra and tomatoes in oil cake amended soil. Plant Disease Reproter, 50:668-672.

Singh R.S. and Sitaramaiah K ,1967. Effect of decomposing green leaves, sawdust and urea on the incidence of root-knot to okra and tomato. Indian phytopatology, 20:349-355.

- 5 **Sikora R.S. and Sitaramaiah K. 1973a.** Control of root-knot through organic and inorganic soil amendments.3. Effect of rice husk and sugarcane bagasse. Haryana Journal of Horticultural Science, 2:123-127.

Tenuta, M.; S. Hobbs & G. Lazarovits ,1997. Mechanisms Associated with Disease Control by Organic Soil Amendments. pp. 4-1 - 4-3 in: 1997 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emission Reductions. San Diego, USA. November 3 - 5, 1997.

- 10 **Zeck W M, 1971.** A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestation. Plazenschutz-Nacht. 24, 141-144.

EJEMPLOS

- 15 A continuación se detallan los materiales y métodos que fueron empleados para el desarrollo de la presente invención, así como sus ejemplos de realización. Dichos 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: Diseño de la formulación y ensayos *in vitro*

1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.1. Identificación de las rizobacterias escogidas

- 20 Se ha realizado un estudio de viabilidad microbiana sobre la composición microbiana de la invención, con la siguiente PGPR del cepario de IAB, S.L.: *Bacillus subtilis*, cepa CECT 7254 (*B. subtilis* DSM 24682).

- 25 Dicha bacteria se mantiene en el cepario de IAB, S.L. y es actualmente producto comercial, deshidratado y liofilizado, por lo que el suministro para los ensayos de rutina, se tomó de lotes determinados e identificados. Por otra parte, dicha bacteria se mantiene en cultivo activo en agar a 4°C para cuestiones de rutina, y congelada a -80°C en 30% de glicerol para almacenamiento a largo plazo. La identificación de la rizobacteria fue llevada a cabo por el COPMB (Colegio Oficial de Pesadores y Medidores Públicos de Barcelona) mediante identificación molecular de la secuencia del ARNr 16S en la base de datos del Genbank. Esta rizobacteria, una vez identificada, se mantiene también depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo de Valencia.

1.1.2. Fuente de nematodos fitopatógenos.

- 30 El inóculo para proceder a los ensayos *in vitro*, se obtuvo de las raíces de calabacín de un invernadero naturalmente infectado, situado en la Cooperativa del Perelló. Las raíces de calabacín se dejaron en agua del grifo, en placa petri (como se ilustra en la Figura 1), y se incubaron durante 24-48 horas a temperatura ambiente hasta que eclosionaron las masas de huevos presentes.

1.1.3. Desarrollo del medio líquido fertilizante (fórmula fertilizante).

- 35 Se diseñó un fertilizante líquido, a partir de urea (como fuente de nitrógeno ureico), lignosulfonato potásico (como fuente de ácidos fúlvicos), proteínas hidrolizadas (como fuente de aminoácidos, obtenidos de proteína vegetal) y melaza (como fuente de nutrientes). Este fertilizante líquido se enriqueció con la cepa *B. subtilis* DSM 24682, dando como resultado, una fórmula compuesta con distintas PGPR y un alto contenido en materia orgánica, alto contenido en nitrógeno total, y alto contenido en nitrógeno ureico.

- 40 Para trabajar la fórmula, se escogieron las siguientes materias primas:

- AMINOÁCIDOS OBTENIDOS DE PROTEÍNA VEGETAL (aporte de materia orgánica y aminoácidos)
- LIGNOSULFONATO POTÁSICO (aporte de ácidos fúlvicos)
- UREA (aporte de N ureico)
- MELAZA (fuente orgánica y aporte de nutrientes)
- 45 - AGUA

Con estas materias primas, se preparó la fórmula fertilizante en un volumen total final de 250 ml, según los porcentajes peso/volumen (% p/v, expresado como porcentajes de la concentración en g/mL) que se detallan a continuación:

FORMULA	% p/v
AMINOÁCIDOS.....	70
LIGNOSULFONATO POTÁSICO.....	10
UREA.....	10
MELAZA.....	3
AGUA.....	C.S.P

- 10 De esta fórmula, antes de añadir los microorganismos, se midieron los pH a tiempo 0 y a las 24 horas, para comprobar que son estables y adecuados para soportar la base microbiana, y que no sufren cambios con el tiempo.

- 15 Se llevó a cabo un análisis de viabilidad en la fórmula fertilizante, según el método de análisis general que se describe a continuación. Para ello se añadió primeramente la cantidad de microorganismo por mililitro que se indica en la Tabla 3. Teniendo en cuenta que en este estudio se trabajó con un producto mínimo de 10^{10} ufc/g, se utilizó una cantidad que varió entre 0,1 a 0,2 gramos/ml. No obstante, dependiendo de las concentraciones microbianas de partida, estas cantidades podrían variar

1.1.4. Método de análisis microbiano general y cálculo de viabilidad microbiana:

- 20 Para la determinación de la viabilidad microbiana de cada cepa en la fórmula fertilizante preparada anteriormente, se emplearon los siguientes materiales:

- tubos de vidrio con rosca de 10 ml de solución salina estéril,
- puntas azules (1 ml) estériles,
- 9 placas de medio de cultivo correspondientes al microorganismo a evaluar;

y se siguió un procedimiento que consta de los siguientes pasos:

- 25 1. Recoger 1 ml del producto líquido de la fórmula fertilizante a analizar que contiene una determinada cepa, donde dicha cepa está presente en una concentración microbiana teórica inicial ($C_{teórica}$) calculada según la siguiente expresión matemática:

$$C_{teórica} \text{ (ufc/ml)} = [M_{microbiana} \times C_{microbiana \text{ partida}}] / V_{formulación}$$

- 30 donde $M_{microbiana}$ se refiere al peso del inoculante microbiano expresada en gramos, $C_{microbiana \text{ partida}}$ se refiere a la concentración microbiana de partida del inoculante microbiano o cultivo puro del microorganismo expresada en ufc/g, y $V_{formulación}$ se refiere al volumen sobre el que se pone el microorganismo expresado en mililitros.

- 35 2. Disolver el producto líquido recogido en un tubo de rosca de 10 ml de solución salina (NaCl 0,9% en agua) estéril.
3. Realizar diluciones seriadas 1/10 en tubos de rosca de 10ml de solución salina estéril hasta la concentración teórica menos una unidad (Figura 2), agitando 30 segundos cada vez con vórtex.
4. Plaquear en césped 0,1 ml de las tres últimas diluciones por triplicado en placa.
5. Incubar a 27°C el tiempo necesario para cada microorganismo.
6. Lectura de resultados mediante lectura de aquellas placas que contengan entre 5-50 colonias crecidas.
- 40 7. Calcular la concentración microbiana observada (o experimental) de la formula fertilizante, expresada en unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml), de acuerdo a la fórmula matemática:

$$\text{Concentración microbiana observada (ufc/ml)} = (X_{observado} * Y_{observado})/0,1$$

donde $X_{observado}$ es el número de colonias contadas en el paso anterior, e $Y_{observado}$ es el factor de dilución en positivo (es decir, la potencia a la que está elevada la concentración microbiana, pero con

signo +; que p. ej. para 10^{-6} el factor de dilución en positivo sería 6).

8. Calcular la viabilidad microbiana (V) en la formulación, que es:

- $V = 100 \%$, si $Y_{\text{teórico}} - Y_{\text{observado}}$ es menor o igual a cero,
- $V = (100 - R) \cdot (1 + r_x) \%$, si $Y_{\text{teórico}} - Y_{\text{observado}}$ está comprendido entre 0 y 3,
- $V = \text{No Viable}$, si $Y_{\text{teórico}} - Y_{\text{observado}}$ es mayor que 3;

donde:

$Y_{\text{teórico}}$ es el exponente o factor en positivo, que debería llevar la concentración microbiana, es decir, que si teóricamente la concentración en ufc/ml debía ser 10^7 ufc/ml, el $Y_{\text{teórico}}$ es 7,

$Y_{\text{observado}}$ es el exponente o factor que sale por recuento, es decir, la concentración en ufc/ml que se puede leer en las placas,

R es el porcentaje de pérdida de viabilidad microbiana calculado según la fórmula matemática:

$$R = 10 \cdot (Y_{\text{teórico}} - Y_{\text{observado}}),$$

r_x es igual a 0,05 si $X_{\text{teórico}} - X_{\text{observado}}$ es mayor o igual a 10, o r_x es igual a 0 si $X_{\text{teórico}} - X_{\text{observado}}$ es menor que 10, siendo $X_{\text{teórico}}$ el número de colonias que teóricamente tenían que leerse en las placas, y $X_{\text{observado}}$ el número de colonias que efectivamente se lee en las placas.

Es decir, en general se hizo un recuento en ufc/ml, conforme a los procedimientos habituales de laboratorio.

El medio empleado fue: Agar nutriente II (NUTRIENT AGAR II) para cepas de *Bacillus spp.*, preparado según la siguiente fórmula general (para 1 L de medio), y ajustando finalmente el pH a 7,2:

<i>Extracto de carne</i>	1g
<i>Extracto de levadura</i>	2g
<i>Tryptona</i>	5g
<i>NaCl</i>	5g
<i>Agar</i>	20g
<i>Agua destilada</i>	1L

Se ha determinado la viabilidad de la fórmula fertilizante, desde el punto de vista microbiano a las 24 horas, a las 6 semanas, a los 6 meses y a los 12 meses de la preparación de la composición. Las viabilidades para todos los *Bacillus spp.* se calcularon de forma global, sin tener en cuenta la especie, pues no es posible, morfológicamente y de visu, el estudiar las concentraciones microbianas de las diferentes especies por separado.

1.1.4. Método de recuperación y conteo de nematodos.

La forma más sencilla de aislar nematodos de su planta hospedante, es sumergiendo la muestra en agua y seleccionando los nematodos bajo el microscopio, aunque ésta es una labor tediosa, y solamente puede hacerse si se necesita recoger pequeñas muestras (Bezooijen, 2006).

Los nematodos vivos pueden ser fácilmente identificados y estudiados en una preparación con agua. En este tipo de preparación, ciertas estructuras, como el estilete, el lumen y el aparato excretor, se pueden ver más fácilmente que en nematodos fijados y muertos (Bezooijen, 2006).

El procedimiento empleado para conseguir fijar un nematodo consistió en lavar un trocito de raíz con una solución al 0,5% de hipoclorito sódico, y dejar en una placa Petri, con 10 ml de agua del grifo. Dejar 24 horas e intentar con una aguja extraer el nematodo.

Para el conteo de nematodos, se empleó una cámara desarrollada en el Departamento de Nematología de la Universidad de Wageningen. El modelo contiene una capacidad máxima de 10 ml de suspensión, con una cuadrícula de 7,5 por 3,5 mm y un diámetro total de 6,3 cm. La pendiente de la circunferencia permite una visión completa, y la cuadrícula está hecha en la parte posterior de la placa, de forma que el lado en el que se deposita la suspensión se puede limpiar fácilmente. Debido a que el microscopio del que se dispone, es un microscopio óptico, y no de disección, esta cámara se redujo mediante placa petri de 3 cm de diámetro, para poder trabajar

con menores volúmenes de agua (2 ml), un campo de visión más reducido, y agilizar de esta forma el conteo.

Para realizar el conteo de nematodos, se emplearon las recomendaciones seguidas directamente por el Doctor Joost Riksen (Laboratorio de Nematología de la Universidad de Wageningen, Holanda; www.nem.wur.nl/UK/Webshop/Products/Nematode+counting+dishes/; Ref. Dr. Joost Riksen – Joost.Riksen@wur.nl–), utilizando el aumento 4X. Para obtener mejores resultados, se procede de la forma siguiente (Bezooijen, 2006), pero ajustado al volumen de nuestra cámara de conteo (2 ml):

- Recoger la suspensión de nematodos, extraída directamente de las raíces noduladas por nematodos (según recomendaciones de Dr. Simon, profesor de la Universidad de Reading, Reino Unido, 2008 – Simon, 2008–). Una vez tenemos la suspensión recogida, en una probeta de 20 ml, dejar los especímenes durante 10 minutos.
- Ajustar el volumen de la suspensión a 10ml añadiendo o quitando agua.
- Agitar la suspensión soplando con una pipeta, durante 15 segundos.
- Inmediatamente coger una submuestra de 2 ml de la suspensión con una pipeta graduada de 2 ml y pasar directamente a la cámara de conteo.
- Bajo el microscopio, identificar y contar con un contador de mano.
- Volver a dejar la muestra en su lugar, y contar 2 veces más.
- Calcular la media de especímenes/ml.

1.1.5. Metodología para el test *in vitro* de actividad nematicida/nematostática.

Se determinó la actividad nematicida/nematostática de la composición microbiana y del filtrado de dicha composición. Para determinar el efecto en los nematodos, se tomó independientemente 1 ml de una dilución:

- 1% v/v de la composición microbiana.
- 1% v/v del filtrado, mediante filtro de 20 micras, de la composición microbiana.
- Composición microbiana al 1% v/v dejada fermentar durante 24 horas.

Dichas preparaciones se depositaron en placas petri, de diámetro 3 cm, con 1 ml de agua desionizada, en las cuales existía una suspensión de nematodos contabilizados por la metodología anterior. Los nematodos se contaron en esa misma placa, a las 0 h, 24 h y 96 h, utilizando de base la cámara de Wageningen, y contabilizándolos como muertos cuando no se movían, probando con una fina aguja, y/o cuando presentaban un aspecto rígido (Moy et al., 2006). De hecho, existe una diferente morfología observada al microscopio entre nematodos vivos y nematodos muertos.

1.2. Resultados del ensayo de formulación.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de las lecturas de pH en la fórmula fertilizante.

Tabla 1. Lecturas de pH en el medio líquido fertilizante (fórmula fertilizante definida en el punto 1.1.3).

lecturas	Fórmula fertilizante
pH a t 0h	4,47
pH a t 24h	4,43

Según esta tabla, podemos considerar los pH como estables en la fórmula fertilizante.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de las lecturas de viabilidad microbiana de *B. subtilis* CECT 7254 a las 24 horas.

Tabla 2. Viabilidad de las cepas *B. subtilis* CECT 7254 en la fórmula fertilizante a las 24 horas.

MICROORGANISMOS EN LA FÓRMULA FERTILIZANTE	CONCENTRACIÓN ESPERADA (ufc/ml)	CONCENTRACIÓN OBSERVADA A LAS 24h (ufc/ml)	VIABILIDAD (%)
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 7254	$5 \cdot 10^{(7)}$	$3 \cdot 10^{(8)}$	100

Puesto que las viabilidades de todos los microorganismos fue excelente en la fórmula fertilizante, se escogió como válida y se prepararon 100 ml con la siguiente composición:

COMPOSICION DE LA FÓRMULA FERTILIZANTE ESCOGIDA COMO VÁLIDA:

5	ELEMENTOS	% p/v
	AMINOÁCIDOS.....	70
	LIGNOSULFONATO POTÁSICO.....	10
	UREA.....	10
	MELAZA.....	3
10	AGUA.....	C.S.P.

Sobre la composición de la fórmula fertilizante anterior, se añade una cantidad de microorganismos según se indican en la Tabla 3, dando lugar a la composición microbiana experimental, cuya concentración microbiana se evalúa posteriormente, a las 6 semanas, a los 6 meses y a los 12 meses (Tabla 4) para comprobar la viabilidad de los microorganismos en dicha fórmula.

Tabla 3. Concentraciones teóricas microbianas sobre la fórmula fertilizante en función del microorganismo escogido.

MICROORGANISMO	CANTIDAD %p/v	CONCENTRACION INICIAL
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 7254	0,15 g/ml	$1 \cdot 10^{(10)}$ ufc/g

Tabla 4. Viabilidad de la fórmula fertilizante diseñada con microorganismos de *Bacillus spp.* a las 6 semanas, a los 6 meses y a los 12 meses.

TIEMPO	CONCENTRACIÓN ESPERADA (teórica)	CONCENTRACIÓN OBSERVADA (6 semanas)	VIABILIDAD (%) DE <i>Bacillus spp.</i> (*)
6 semanas	$3 \cdot 10^{(8)}$ ufc/ml	$1 \cdot 10^{(8)}$ ufc/ml	100%
6 meses	$1 \cdot 10^{(8)}$ ufc/ml	$1 \cdot 10^{(6)}$ ufc/ml	80%
12 meses	$1 \cdot 10^{(8)}$ ufc/ml	$2,1 \cdot 10^{(6)}$ ufc/ml	80%

(*) Se refiere a la viabilidad de la cepa *Bacillus subtilis* CECT 7254.

20 Teniendo en cuenta que la concentración de *Bacillus* totales inicial (teórica) estaba comprendida entre $1 \cdot 10^{(8)}$ - $1 \cdot 10^{(9)}$ ufc/ml, y que la concentración de *Bacillus* totales observada a los 6 meses es de $1 \cdot 10^{(6)}$ ufc/ml, esto supone una viabilidad comprendida entre el 70% y 80%. Los resultados muestran que los microorganismos *Bacillus spp.* (*Bacillus subtilis* CECT 7254) son capaces de ser viables durante 6 meses y un año en la fórmula fertilizante.

1.3. Resultados de los ensayos in vitro.

25 A continuación, en las Tablas 5–7 se presentan los resultados por triplicado del ensayo *in vitro* de actividad nematocida/nematostática obtenidos para la fórmula fertilizante anterior que comprende los microorganismos de la especie *Bacillus subtilis* CECT 7254 (DSM 24682).

Tabla 5. Lectura de nematodos vivos y muertos a tiempo 0, 24 y 96 horas con 1 ml del producto fermentado al 1% v/v y filtrado con filtro de 20 µm, en 1 ml de suspensión de nematodos.

Media nematodos	Tiempo		
	0 horas	24 horas	96 horas
vivos	315	95	129
muertos	0	11	19

Tabla 6. Lectura de nematodos vivos y muertos a tiempo 0, 24 y 96 horas con 1 ml del producto al 1% v/v y filtrado con filtro de 20 µm en 1 ml de suspensión de nematodos.

Media nematodos	Tiempo		
	0	24 horas	96 horas
vivos	299	76	106
muertos	0	4	7

Tabla 7. Lectura de nematodos vivos y muertos a t 0, 24 y 96 h con 1 ml del producto al 1% v/v en 1 ml de suspensión de nematodos.

Media nematodos	Tiempo		
	0 horas	24 horas	96 horas
vivos	328	0	TODOS
muertos	0	Todos en general	No detectables

- 5 En la tabla 7, se observa como a las 24 horas se produce una gran reducción en la actividad y/o movilidad de los nematodos (Figura 3), mientras que a las 96 horas (Figura 4), se presenta una alta actividad de esos mismos nematodos.

1.4. Diseño final del producto empleado para evaluar mediante bioensayo

- 10 Se prepara una composición microbiana nematicida de acuerdo a la composición porcentual que se presenta en la Tabla 8, con una concentración microbiana en dicha composición de 1×10^7 ufc/ml.

Tabla 8. Composición porcentual de la fórmula nematicida preparada.

ELEMENTOS	% p/v
PROTEINAS HIDROLIZADAS	70
LIGNOSULFONATO POTÁSICO	10
UREA	10
MELAZA	3
MICROORGANISMOS <i>Bacillus subtilis</i> CECT 7254 (0,1% p/v)	0,1
AGUA	C.S.P.

- 15 Dicha composición microbiana útil para control de nemátodos se trata de un producto de base microbiana, líquido y viable, resultado de la selección de microorganismos benéficos o PGPR, desarrollados en una matriz que aporta macro y micro nutrientes y mantiene la viabilidad microbiana. Por otra parte, se trata de un producto microbiano que no genera resistencias y no produce residuos. Al ser aplicado al suelo, los microorganismos inician un proceso de colonización principalmente en la zona radicular de las plantas. El proceso de colonización durará de 3 a 5 semanas (dependiendo de la dosis de aplicación, tipo de suelo, fertilidad, humedad y temperatura). Una vez que las colonias hayan sido establecidas, el suelo contará con una gran variedad de microorganismos propios de un suelo fértil, en el que los microorganismos podrán actuar directa e indirectamente en la fijación y nitrificación de nitrógeno atmosférico, en la fijación, mineralización y absorción de fertilizantes y otros nutrientes del suelo sean de tipo orgánico, mineral o sintético, actuando como regeneradores de raíz y suelo. A su vez, el producto propicia un ambiente desfavorable para los nematodos.

- 25 Preferentemente, la aplicación de la composición microbiana de la invención se realiza vía suelo mediante riego localizado de 1 a 2 aplicaciones, con intervalos de 10 a 20 días. Para ello, la composición microbiana de la invención se aplica a una dosis comprendida entre 10 y 20 litros por hectárea (L x ha o L/ha).

El propósito de la composición microbiana aquí preparada es la aplicación de la fórmula en un posterior ensayo *in vivo* para mantener controlado a *Meloidogyne spp.* por debajo del umbral económico de daño.

- 30 Como conclusión a los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, y según se demuestra en dichos ensayos, la formulación escogida ejerce una gran reducción en la actividad y/o movilidad de *Meloidogyne spp.* a las 24 horas, sugiriendo que el líquido puede tener algún efecto nematostático, ya que a las 96 horas, esos mismos nematodos vuelven a presentar una alta actividad y/o movilidad.

EJEMPLO 2: Eficacia de la composición microbiana de la invención en el control de *Meloidogyne sp.* en cultivo de tomate.**2.1. Resumen**

Se ha realizado un ensayo en tomate protegido, codificado como SRS09-003-106NE. El objetivo del ensayo fue determinar la eficacia y selectividad nematocida de una composición microbiana de la invención como la definida en la Tabla 8 del ejemplo 1 (*Bacillus* spp, 1×10^8 UFC/ml), aplicada 3 veces a través del riego a goteo en un suelo arenoso. Se ensayó contra *Meloidogyne* spp. a una única dosis (10 l p.f./ha –litros de producto por hectárea, L/ha–) sola y combinada con una aplicación previa de extracto de Tagetes fermentado (Extr. Ferm. Tagetes 100%). Los productos estándar fueron phenamiphos (suspensión de cápsulas –CS, capsule suspension–) en solución acuosa al 24% aplicado a una dosis de 40 l p.f./ha (L/ha) y extracto de Quillay (concentrado soluble) en solución acuosa al 35% aplicado a una dosis 10 l p.f./ha (L/ha).

Para el desarrollo del ensayo, se seleccionó una parcela comercial de tomate protegido cv. Valenciano en El Perelló (Valencia); el suelo era arenoso. Se realizó un diseño en bloques al azar, con 4 repeticiones por tratamiento. Las parcelas elementales eran de 10,8 m², con 22 plantas/parcela.

Para el extracto de Quillay y la composición microbiana de la invención (*Bacillus* spp, 1×10^8 UFC/ml) se realizaron tres aplicaciones, mientras que para el phenamiphos, sólo se realizó una. Todas las aplicaciones se hicieron con una mochila a motor, directamente acoplada al riego por goteo como se ilustra en la Figura 5, con una presión de trabajo de 1,5 atm y 5000 l/ha de volumen de caldo (excepto para las aplicaciones D y E, donde se requirieron 6000 l/ha).

La primera aplicación [22 Mayo 2009 (aplicación A)] se realizó en un estado fenológico de 14 BBCH (4ª hoja completamente desplegada), como se observa en la Figura 6, y la última [19 Junio 2009 (aplicación E)] en un estado fenológico de 51 BBCH (primera inflorescencia visible). Se realizó una evaluación del nivel de agallamiento (el 17/06/2009) mediante extirpación de las raíces (Figura 7). Antes del comienzo del ensayo, se había realizado otra evaluación sobre apio (Figura 8), con el fin de determinar las áreas de infestación y hacer una distribución de bloques adecuada. Se evaluaron también los posibles síntomas de fitotoxicidad. La eficacia se calculó mediante la fórmula de Abbott.

El análisis de los resultados obtenidos, cuyos datos sin tratar se encuentran recogidos en las Tablas posteriormente mostradas, se realizó con el software ARM Revision 7.4.2., de Gylling Data Managment. Los datos se analizaron usando el análisis de la varianza (ANOVA) de los valores no transformados y de los valores transformados cuando el test de Barlett así lo indicó. Si la transformación no mejoró las premisas de homogeneidad de las varianzas, se mantuvieron los valores originales, y por lo tanto, las diferencias significativas (si las hubiera) deben ser interpretadas con precaución. La probabilidad de aparición de diferencias significativas entre tratamientos se calculó como el valor de la probabilidad F (Treatment Prob(F)). El test de Student-Newman-Keuls (S-N-K) se aplicó cuando se encontraron diferencias significativas. La comparación de medias se analizó solo cuando AOV Treatment P(F) fue significativo al nivel seleccionado. Los resultados obtenidos se indicaron mediante letras (valores medios con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test de S-N-K a un intervalo de confianza del 95%. Cuando los datos se transformaron, las letras se incluyeron en esta columna transformada. Los resultados observados fueron:

- Los niveles poblacionales fueron medios durante el ensayo, alcanzando las raíces de las plantas no tratadas un índice de 5 (en una escala de 0-10) al final del ensayo (aprox.2 meses tras el transplante).
- El resto de tratamientos mostraron valores similares. La composición microbiana de la invención (COMP.) sola y combinada con extracto de Tagetes fermentado (COMP. + EXT. TAG.) mostraron los valores de agallamiento más bajos, seguido del estándar químico phenamiphos (PHEN.). El índice más elevado se observó para el estándar biológico de extracto de Quillay (QL). No se hallaron diferencias estadísticas.
- Los mejores resultados de eficacia se obtuvieron con el estándar químico, seguido muy de cerca por la composición microbiana de la invención experimental, tanto sólo (COMP.) como combinada con extracto de Tagetes fermentado (COMP. + EXT. TAG.). El estándar biológico de extracto de Quillay (QL) obtuvo el valor más bajo de eficacia. No se hallaron diferencias estadísticas.
- No se observaron síntomas de fitotoxicidad en ningún tratamiento.
- No se observaron problemas de manejo del producto experimental.

2.2. Tratamientos experimentales

La Tabla 9 recoge todos los datos referentes a los diferentes tratamientos (tratamientos 1 a 5) realizados para llevados a cabo en el ensayo del ejemplo 2. A continuación de la Tabla 9 se indican más detalladamente los datos presentados en la misma.

Tabla 9.

Trt No.	Tipo	Treatment Name	Form Conc	Form Unit	Form Type	Rate	Rate Unit	Other Rate	Other Rate Unit	Appl Code
1	CHK	Untreated Check								
2	INSE	COMP.	10000000	BIOEN/ML	SL	10	L/HA			ACE
3	INSE	QL	35	%	SL	10	L/HA	3500	g A/ha	ACE
4	INSE	PHEN.	24	%	CS	40	L/HA	9600	g A/ha	A
5	INSE	COMP.+ EXTR. TAG.	10000000	BIOEN/ML	SL	10	L/HA			ACE

Información adicional del tratamiento

Tipo ("Type")

CHK = Check o No Tratado ("Untreated")

INSE = Insecticida o Nematicida

5 Nombre del Tratamiento ("Treatment Name")

Untreated Check = No tratado

COMP., 10000000, BIOEN/ML, SL = *Bacillus* spp|10⁸ UFC/ml

QL, 35%, SL = Extracto de Quillay

PHEN., 24%, CS = Fenamifos 24%|PHI (intervalo pre-cosecha) 60 days tomat., cuc., mel; 30 days pepper

10 COMP.+EXTR. TAG., 10000000, BIOEN/ML, SL = *Bacillus* spp+ Extr. Ferm. Tagetes|10000000 UFC/g+100%

Unidades de la formulación ("Form Unit")

BIOEN/ML = Entidades biológicas por mililitro de producto ("Biological Entities per milliliter product")

% = Porcentaje de Ingrediente Activo en el producto formulado en relación peso/peso, %AW/W ("Percent Active Ingredient in formulated product on a weight/weight basis; same as %AW/W".)

15 Tipo de Composición ("Form Type")

SL = Concentrado Soluble ("Soluble concentrate"); Líquido claro a opalescente para ser aplicado como solución del ingrediente activo después de su disolución en agua. El líquido puede contener elementos de la composición insolubles en agua ("A clear to opalescent liquid to be applied as a solution of the active ingredient after dilution in water. The liquid may contain water insoluble formulants").

20 CS = Suspensión de Cápsulas ("Capsule suspension"); Suspensión estable de cápsulas en un fluido, normalmente destinada para disolución en agua previamente a su uso ("A stable suspension of capsules in a fluid, normally intended for dilution with water before use").

Unidad de la Tasa de Aplicación ("Rate Unit")

L/HA = Litros de Producto por Hectárea ("Liters Product per Hectare" (US=QT/A); Q

25 Otra Unidad de la Tasa de Aplicación ("Other Rate Unit")

g A/ha = Gramos de Ingrediente Activo por Hectárea ("Grams Active Ingredient per Hectare")

Modo de aplicación ("Application Directions" o Appl. Code):

A = al transplantar ("at transplanting")

B = 7 días después de A ("7 days after A")

30 C = 15 días después de A ("15 days after A")

D = 7 días después de B ("7 days after B")

E = 15 días después de C ("15 days after C")

35 Repeticiones ("Replications"): 4, Tratamientos no tratados ("Untreated treatments"): 1, Número del tratamiento de referencia ("Reference treatment number"): 3, Realizado bajo directrices de buenas prácticas de laboratorio [GLP]/ directrices de buenas experimentales [GEP] ("Conduct under GLP/GEP"): Sí – GEP sin protección ("GEP with no protection"), Diseño ("Design"): Bloque completo aleatorio ("Randomized Complete Block"), Unidades del tratamiento ("Treatment units"): Tamaño de terreno tratado ("Treated plot size"), Unidad de composición formulada en seco ("Dry Form. Unit"): %, Ancho del tamaño del terreno tratado ("Treated plot size Width"): 3 metros, Longitud del tamaño del terreno tratado ("Treated plot size Length"): 8 metros, Volumen de aplicación ("Application volumen"): 5000 l/ha, Tamaño de mezcla ("Mix size"): 2 litros, Definiciones de formato ("Format definitions"): G-AII7.DEF, G-AII7.FRM

2.3. Descripción del emplazamiento ("Site Description")

2.3.1. Localización del ensayo.

45 El Perelló (Valencia), España. Se sabe que la parcela seleccionada tiene buena infestación por nematodos ya que el cultivo anterior de apio estaba infectado. La evaluación previa y distribución de la parcela se hizo de acuerdo a su infestación inicial.

2.3.2. Directrices de Buenas Prácticas Experimentales (GEP) del ensayo.

Tabla 10.

	Directriz ("Guideline")	Descripción ("Description")
1.	CEB Méthode 44	Eficacia de nematicidas contra <i>Meloidogyne</i> sp. de tomate ("Efficacité de nématicides contre <i>Meloidogyne</i> sp. de tomate")
2.	PP1/152(2)	Diseño y análisis de ensayos de evaluación de eficacia ("Design and analysis of efficacy evaluation trials")
3.	PP1/181(3)	Modo de operación y de informar en ensayos de evaluación de eficacia ("Conduct and reporting of efficacy evaluation trials")

2.3.3. Descripción del cultivo ("Crop Description").

- 5 Cultivo 1 ("Crop 1"): Tomate transplantado. LYPXP *Lycopersicon* es., transplantado
 Variedad ("Variety"): Valenciano Descripción ("Description"): Protegido ("Protected")
 Escala BBCH ("BBCH Scale"): BVSO Fecha de plantado ("Planting Date"): May/21/2009
 Método de plantado ("Planting Method"): Transplantado a mano ("TRANSPLANTED – HAND")
 Espaciado entre filas, unidad ("Row Spacing, Unit"): 1,2 m
 Espaciado en la fila, unidad ("Spacing Within Row, Unit"): 0,4 m

10 2.3.4. Descripción de la plaga ("Pest Description").

Tipo de Plaga 1 (Pest 1 Type): I Código ("Code"): MELGSP *Meloidogyne* sp.
 Nombre Común ("Common Name"): Nemátodos de los nudos de la raíz ("Root-knot eelworms")

2.3.5. Emplazamiento y Diseño ("Site and Design").

- 15 Ancho del terreno, unidad ("Plot Width, Unit"): 1,2 m
 Plot Length, Unit: 9 M
 Tipo de emplazamiento ("Site Type"): Invernadero ("GREENHOUSE")
 Tipo de cultivo ("Tillage Type"): Convencional ("CONVENTIONAL-TILL")
 Repeticiones ("Replications"): 4
 20 Diseño del estudio ("Study Design"): Bloque Completo Aleatorio ("Randomized Complete Block")
 Drenaje de la tierra ("Soil Drainage"): Bueno (G, "Good")

En la Figura 9 se representa la disposición o distribución en la parcela de las diferentes repeticiones (4 repeticiones por tratamiento) de cada uno de los tratamientos realizados (tratamientos 1 a 5), conforme a como se describen en la Tabla 11. La Figura 10 es una imagen general del terreno o parcela cuando se realizó el ensayo.

Tabla 11.

Trt	Treatment	Rate	Plot No. By Rep.				
No.	Name	Rate	Unit	1	2	3	4
1	Untreated Check			103	201	303	404
2	COMP.	10	L/HA	105	205	304	405
3	QL	10	L/HA	101	203	302	403
4	PHEN.	40	L/HA	102	202	301	402
5	COMP. + EXTR. TAG.	10 10	L/HA L/HA	104	204	305	401

- 25 Previamente al ensayo sobre tomate valenciano se hizo una evaluación de la nodulación de la raíz de apio (Figura 8) para identificar áreas de infestación en el terreno y hacer una distribución adecuada por bloques.

2.3.6. Descripción del terreno ("Soil Description").

Textura ("Texture"): Arena ("SAND")
 Nivel de Fertilización ("Fert. Level"): Bueno ("GOOD")

30 2.3.7. Humedad y Condiciones Meteorológicas ("Moisture and Weather Conditions").

Condiciones de Humedad Global ("Overall Moisture Conditions"): NORMAL

Estación climatológica más cercana ("Closest Weather Station"): Polinya del Xuquer Distancia ("Distance"): 5 km

En la Tabla 12 se presentan los datos meteorológicos ("Weather Data") referentes a los valores de temperaturas mínimas, máximas y medias (en °C), de humedades relativas y de precipitaciones (en mm) registrados durante el periodo de tiempo en el que se realizó el ensayo del ejemplo 2.

5 **Tabla 12.**

Fecha	Temp. Media (°C)	Temp. Max. (°C)	Temp. Min. (°C)	Hum. Rel. (%)	Precip. (mm)	Fecha	Temp. Media (°C)	Temp. Max. (°C)	Temp. Min. (°C)	Humedad Relativa (%)	Precip. (mm)
21/05/2009	19,9	25,91	14,41	75,5	0	26/06/2009	25,73	34,48	19,84	56,91	0
22/05/2009	20,04	24,15	16,44	81,9	0	27/06/2009	23,67	27,93	18,67	73,4	0
23/05/2009	21,76	28,48	17,74	71,5	0	28/06/2009	24,74	31,21	19,38	68,41	0
24/05/2009	20,59	23,94	17,55	81,1	0	29/06/2009	23,88	28,91	17,55	75,6	0
25/05/2009	20,72	25	15,39	73	0	30/06/2009	24,66	30,42	18,93	72,1	0
26/05/2009	21,21	27,94	14,73	60,94	0	01/07/2009	25,77	33,5	20,24	67,91	0
27/05/2009	18,54	23,04	12,77	65,48	0	02/07/2009	26,06	32,39	21,09	75,2	0
28/05/2009	19,58	27,28	11,26	53,34	0	03/07/2009	25,59	29,95	21,35	74,6	0
29/05/2009	19,48	25,45	12,77	59,98	0	04/07/2009	25,77	32,78	19,45	70,4	0
30/05/2009	20,66	26,44	13,82	65,05	0	05/07/2009	26,1	31,14	21,41	73,3	0
31/05/2009	19,54	26,13	16,04	82,2	3,8	06/07/2009	26,62	31,07	22,85	74,3	0
01/06/2009	20,16	25,2	14,41	76,3	0,2	07/07/2009	25,82	29,11	23,51	77,6	0
02/06/2009	20,68	25,98	15,26	78,4	0	08/07/2009	22,72	24,94	20,5	87,6	25,2
03/06/2009	21,71	25,91	16,31	77,1	0	09/07/2009	24,06	27,49	21,68	82,3	0
04/06/2009	22,11	26,11	18,07	75,8	0	10/07/2009	25,64	29,77	21,81	78,4	0
05/06/2009	24,43	32,32	18,07	49,82	0	11/07/2009	26,1	29,05	23,11	75	0
06/06/2009	22,62	29,12	15,32	41,72	1	12/07/2009	26,45	32,12	21,03	72,6	0
07/06/2009	21,37	28,6	15,13	49,73	0	13/07/2009	25,52	29,89	21,94	75,1	0
08/06/2009	22,74	28,2	14,87	42,53	0	14/07/2009	25,17	29,57	21,09	80,8	0
09/06/2009	22,79	30,16	14,99	46,98	0	15/07/2009	25,42	29,57	20,96	78,3	0
10/06/2009	23,54	30,88	15,85	51,55	0	16/07/2009	26,01	30,48	22,07	80,5	0
11/06/2009	23,35	30,36	15,59	63,5	0	17/07/2009	27,75	36,96	22,39	49,26	0
12/06/2009	22,48	27,36	17,62	70,1	0	18/07/2009	22,02	26,38	15,52	53,37	0
13/06/2009	23,07	28,53	17,56	71,8	0	19/07/2009	22,94	27,94	17,29	68,63	0
14/06/2009	23,57	29,97	17,55	69,27	0	20/07/2009	23,55	28,33	19	74,6	0
15/06/2009	24,06	29,37	19,06	66,92	0	21/07/2009	24,38	28,46	20,04	79	0
16/06/2009	23,34	26,11	19,25	76,2	0	22/07/2009	26,25	30,09	23,05	80,4	0
17/06/2009	23,55	29,24	18,27	71,3	0	23/07/2009	28,85	39,05	20,95	57,2	0
18/06/2009	24,05	29,27	18,53	70	0	24/07/2009	28,02	34,93	21,35	54,82	0
19/06/2009	24,82	31,22	20,17	63,65	0	25/07/2009	24,97	28,07	20,03	76,3	0
20/06/2009	23,53	27,8	18,34	73,7	0	26/07/2009	25,05	29,77	19,78	69,65	0
21/06/2009	22,63	25,45	19,45	70,6	0	27/07/2009	25,82	30,81	20,63	74	0
22/06/2009	23,87	28,2	19,32	70,8	0	28/07/2009	25,18	28,72	21,02	73	0
23/06/2009	22,99	27,94	17,42	74	0	29/07/2009	26,91	35,98	18,99	71	0
24/06/2009	24,38	34,81	18,47	72	0	30/07/2009	25,67	28,99	21,09	77,2	0
25/06/2009	24,84	30,07	19,97	71,1	0	31/07/2009	25,57	29,24	20,83	75	0

2.3.8. Descripción de la Aplicación ("Application Description"): Tabla 13.

Tabla 13.

	A	B	C	D	E
Fecha de aplicación ("Application Date"):	May/22/2009	May/29/2009	Jun/05/2009	Jun/12/2009	Jun/19/2009
Hora del día ("Time of Day"):	Morning	Morning	Morning	Morning	Morning
Método de aplicación ("Application Method"):	DRIP	DRIP	DRIP	DRIP	DRIP
Regulación de la aplicación ("Application Timing"):	POSPOS	POSPOS	POSPOS	POSPOS	POSPOS
Lugar de la aplicación ("Application Placement"):	BANSOI	BANSOI	BANSOI	BANSOI	BANSOI
Aplicado por ("Applied By"):	MB	MB	MB	MB	MB
Temperatura del aire ("Air Temperature"):	22,5 °C	25,5 °C	24,8 °C	29 °C	27 °C
% Humedad Relativa ("% Relative Humidity"):	82	42	80	65	73
Velocidad del viento ("Wind Velocity"):	0 KPH	0 KPH	0 KPH	0 KPH	0 KPH
Presencia de Rocío ("Dew Presence") (Y/N):	N	N	N	N	N
Temperatura de la tierra ("Soil Temperature"):	20,1 °C	20 °C	22 °C	25 °C	24 °C
Humedad de la tierra ("Soil Moisture"):	ADEQUATE	ADEQUATE	ADEQUATE	ADEQUATE	ADEQUATE
% Nubosidad ("% Cloud Cover"):	70	0	0	0	0

2.3.9. Etapa de cosecha en cada aplicación ("Crop Stage At Each Application"): Tabla 14

Tabla 14.

	A	B	C	D	E
Código cosecha 1, Escala BBCH ("Crop 1 Code, BBCH Scale"):	LYPXP BVSO	LYPXP BVSO	LYPXP BVSO	LYPXP BVSO	LYPXP BVSO
Escala de etapa utilizada ("Stage Scale Used"):	BBCH	BBCH	BBCH	BBCH	BBCH
Mayoría de la etapa, porcentaje ("Stage Majority, Percent"):	14 100	16 100	19 100	23 100	51 100

2.3.10. Equipo de la aplicación ("Application Equipment"): Tabla 15

Tabla 15.

	A	B	C	D	E
Equipo de aplicación ("Appl. Equipment"):	MARU-08-1	MARU-07-1	MARU-07-1	MARU-07-1	MARU-07-1
Presión de operación ("Operating Pressure"):	1,5 ATM	1,5 ATM	1,5 ATM	1,5 ATM	1,5 ATM
Vehículo ("Carrier"):	Agua ("WATER")	Agua ("WATER")	Agua ("WATER")	Agua ("WATER")	Agua ("WATER")
Volumen pulverizado ("Spray Volume"):	5000 L/HA	5000 L/HA	5000 L/HA	6000 L/HA	6000 L/HA
Tamaño de mezcla ("Mix Size"):	2	2	2	2	2
pH ("Spray pH"):	7	7	7	7	7
Propulsor ("Propellant"):	Bomba ("PUMP")	Bomba ("PUMP")	Bomba ("PUMP")	Bomba ("PUMP")	Bomba ("PUMP")
Mezcla en depósito (Y/N) ("Tank Mix"):	N	N	N	N	N

- 5 Las aplicaciones de la composición microbiana experimental de la invención (COMP.) y de extracto de Quillay (QL) se realizaron en los últimos 10–15 minutos del ciclo de riego. El siguiente riego se retrasó al máximo para prevenir el lavado del producto. Dicha aplicación se realizó sobre suelo húmedo.

- 10 De acuerdo con las indicaciones sobre la aplicación del fenamifos (PHEN., *phenamiphos*) en riego por goteo o por franjas, teniendo en cuenta que su dosis es para el tratamiento masivo, la dosis de aplicación del fenamifos se ajustó al área real tratada.

2.4. Resultados

2.4.1. Resumen normalizado ("Standardized Summary"): Tabla 16.

Tabla 16.

Código de plaga ("Pest Code")	MELGSP	MELGSP
Código de cultivo ("Crop Code")	LYPES	LYPES
Parte valorada ("Part Rated")	ROOT C	ROOT C
Fecha de valoración ("Rating Date")	Jul/17/2009	Jul/17/2009
Tipo de datos valorados ("Rating Data Type")	DAMNEM	CONTRO
Unidad de valoración ("Rating Unit")	0-10	%UNCK
Tamaño de muestra ("Sample Size")	10	10
Unidad de tamaño de muestra ("Sample Size Unit")	PLANT	PLANT
Número de nota al pie ("Footnote Number")	1	1
Trt-Eval Interval	28 DA-E	28 DA-E
ARM Action Codes		TAB[2]
Trt Treatment		
No. Name Rate Unit	2	3
1 Untreated Check	5,0	0,0
2 COMP. 10 L/HA	3,5	30,0
3 QL 10 L/HA	5,2	7,0
4 PHEN. 40 L/HA	4,0	30,5
5 COMP. + 10 L/HA EXTR. TAG. 10 L/HA	3,6	26,8

Tabla 16. (cont.)

Standard Deviation	1,41	20,61
CV	33,27	109,21
Grand Mean	4,23	18,87
Bartlett's X2	8,424	2,481
P(Bartlett's X2)	0,077	0,479
Replicate F	0,826	0,207
Replicate Prob(F)	0,5046	0,8899
Treatment F	1,279	1,927
Treatment Prob(F)	0,3317	0,1706

Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ["Means followed by same letter do not significantly differ"] (P=.05, LSD)

Las comparaciones de las medias se llevaron a cabo sólo cuando el tratamiento P(F) AOV es significativo en la comparación con la media OSL ["Mean comparisons performed only when AOV Treatment P(F) is significant at mean comparison OSL"].

Código de plaga ("Pest Code")

MELGSP, = Meloidogyne sp.

Código de cultivo ("Crop Code")

LYPES, BVSO, = Lycopersicon esculentum

Parte considerada ("Part Rated")

ROOT = Raíz

C = El cultivo es considerado en parte ("Crop is Part Rated")

Tipo de datos valorados ("Rating Data Type")

DAMNEM = DAÑOS – NEMATODO ("DAMAGE – NEMATODE")

CONTRO = CONTROL / BURNDOWN or KNOCKDOWN

Unidad de valoración ("Rating Unit")

0-10 = 0-10 INDEX/SCALE

%UNCK = PERCENT OF UNTREATED CHECK

Unidad de tamaño de muestra ("Sample Size Unit")

PLANT = Planta ("Plant")

ARM Action Codes

TAB[2] = Abbott (% de No tratados -% of Untreated-)[2]

Número de nota al pie ("Footnote Number")

Nota al pie nº 1 ("Footnote 1"): Índice de nodulación en raíz en una escala 0-10 ("Root gall Index in a 0-10 scale").

Nota al pie nº 2 ("Footnote 2"): Eficacia Abbott (%) sobre la nodulación en raíz [Abbott efficacy (%) on root galling].

2.4.2. Datos sin tratar ("Raw Data"): Tablas 17 a 21

Tabla 17

Pest Code	MELGSP	MELGSP
Crop Code	APUGV	LYPES
Part Rated	ROOT C	ROOT C
Rating Date	May/06/2009	Jul/17/2009
Rating Data Type	DAMNEM	DAMNEM
Rating Unit	0-10	0-10
Sample Size	10	10
Sample Size Unit	PLANT	PLANT
Footnote Number	1	1
Trt-Eval Interval	-16 DA-A	28 DA-E
ARM Action Codes		
Trt No.	Plot	Sub
1	103	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10

Tabla 18

Pest Code	MELGSP	MELGSP
Crop Code	APUGV	LYPES
Part Rated	ROOT C	ROOT C
Rating Date	May/06/2009	Jul/17/2009
Rating Data Type	DAMNEM	DAMNEM
Rating Unit	0-10	0-10
Sample Size	10	10
Sample Size Unit	PLANT	PLANT
Footnote Number	1	1
Trt-Eval Interval	-16 DA-A	28 DA-E
ARM Action Codes		
Trt No.	Plot	Sub
2	105	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10

Tabla 17 (cont.)				
Pest Code			MELGSP	MELGSP
Crop Code			APUGV	LYPES
Part Rated			ROOT C	ROOT C
Rating Date			May/06/2009	Jul/17/2009
Rating Data Type			DAMNEM	DAMNEM
Rating Unit			0-10	0-10
Sample Size			10	10
Sample Size Unit			PLANT	PLANT
Footnote Number			1	1
Trt-Eval Interval			-16 DA-A	28 DA-E
ARM Action Codes				
Trt No.	Plot	Sub		
1	201	1	4	5
		2	2	7
		3	3	5
		4	2	5
		5	2	8
		6	2	5
		7	2	9
		8	4	6
		9	4	7
		10	3	6
1	303	1	2	6
		2	2	4
		3	2	7
		4	3	3
		5	3	4
		6	2	4
		7	3	4
		8	2	6
		9	4	7
		10	2	8
1	404	1	0	5
		2	1	4
		3	0	4
		4	1	3
		5	1	3
		6	2	5
		7	3	5
		8	2	6
		9	1	4
		10	3	5

Tabla 18 (cont.)				
Pest Code			MELGSP	MELGSP
Crop Code			APUGV	LYPES
Part Rated			ROOT C	ROOT C
Rating Date			May/06/2009	Jul/17/2009
Rating Data Type			DAMNEM	DAMNEM
Rating Unit			0-10	0-10
Sample Size			10	10
Sample Size Unit			PLANT	PLANT
Footnote Number			1	1
Trt-Eval Interval			-16 DA-A	28 DA-E
ARM Action Codes				
Trt No.	Plot	Sub		
2	205	1	2	2
		2	1	1
		3	2	5
		4	1	3
		5	0	2
		6	0	1
		7	1	2
		8	1	5
		9	2	2
		10	2	3
2	304	1	1	1
		2	3	5
		3	2	2
		4	2	6
		5	3	2
		6	2	3
		7	4	5
		8	2	7
		9	0	3
		10	2	6
2	405	1	3	0
		2	3	7
		3	3	5
		4	5	6
		5	3	6
		6	4	8
		7	7	3
		8	3	3
		9	3	6
		10	2	6

Tabla 19

Pest Code	MELGSP	MELGSP
Crop Code	APUGV	LYPES
Part Rated	ROOT C	ROOT C
Rating Date	May/06/2009	Jul/17/2009
Rating Data Type	DAMNEM	DAMNEM
Rating Unit	0-10	0-10
Sample Size	10	10
Sample Size Unit	PLANT	PLANT
Footnote Number	1	1
Trt-Eval Interval	-16 DA-A	28 DA-E
ARM Action Codes		
Trt No.	Plot	Sub
3	101	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10
3	203	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10
3	302	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10
3	403	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10

Tabla 20

Pest Code	MELGSP	MELGSP
Crop Code	APUGV	LYPES
Part Rated	ROOT C	ROOT C
Rating Date	May/06/2009	Jul/17/2009
Rating Data Type	DAMNEM	DAMNEM
Rating Unit	0-10	0-10
Sample Size	10	10
Sample Size Unit	PLANT	PLANT
Footnote Number	1	1
Trt-Eval Interval	-16 DA-A	28 DA-E
ARM Action Codes		
Trt No.	Plot	Sub
4	102	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10
4	202	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10
4	301	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10
4	402	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10

Tabla 21

Pest Code	MELGSP	MELGSP
Crop Code	APUGV	LYPES
Part Rated	ROOT C	ROOT C
Rating Date	May/06/2009	Jul/17/2009
Rating Data Type	DAMNEM	DAMNEM
Rating Unit	0-10	0-10
Sample Size	10	10
Sample Size Unit	PLANT	PLANT
Footnote Number	1	1
Trt-Eval Interval	-16 DA-A	28 DA-E
ARM Action Codes		
Trt No.	Plot	Sub
5	104	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10
5	204	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10
5	305	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10
5	401	1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
		8
		9
		10

2.5. Discusión

2.5.1. Agallamiento de raíz (Figuras 11 y 13 a 15).

5 Los niveles poblacionales del parásito fueron medios durante el ensayo, alcanzando las raíces de las plantas no tratadas un índice de 5 [Figura 11, columna (1); Figura 13] en una escala de 0-10 al final del ensayo (aprox.2 meses tras el transplante).

10 Los tratamientos ensayados mostraron valores similares. La composición microbiana de la invención sola (COMP., columna (2) de la Figura 11) y combinada con extracto de Tagetes fermentado (COMP. + EXT. TAG., columna (5) de la Figura 11 y Figura 14) mostraron los valores de agallamiento más bajos (3,5 y 3,6, respectivamente), seguido del estándar químico phenamiphos (PHEN., columna (4) de la Figura 11) con un

índice de 4,0. El índice más elevado se observó para el estándar biológico de extracto de Quillay (QL), con un índice de agallamiento de 5,2 [Figura 11, columna (3); y Figura 15]. No se hallaron diferencias estadísticas.

2.5.2. Eficacia (Figura 12)

5 Cuando se evaluó la eficacia en el agallamiento de la raíz, los mejores resultados se obtuvieron con el estándar químico phenamiphos (PHEN., 30,5% de eficacia), seguido muy de cerca por la composición microbiana de la invención experimental, tanto sólo (COMP.) como combinada con extracto de Tagetes fermentado (COMP. + EXT. TAG.), con un 30% y un 26,8% de eficacia, respectivamente. El estándar biológico de extracto de Quillay (QL) obtuvo el valor más bajo de eficacia. No se hallaron diferencias estadísticas.

2.5.3. Otros resultados relevantes

10 No se observaron síntomas de fitotoxicidad en ningún tratamiento, ni tampoco se observaron problemas de manejo de la composición microbiana de la invención.

2.6. Conclusión

15 En el ensayo del ejemplo 2 realizado, con una población media de nematodos, una composición de la invención (COMP.) tal como se describe en la Tabla 8 del ejemplo 1 mostró un control en la población de nematodos comparable al obtenido con un estándar químico como el phenamiphos (PHEN.), y mejor que cuando se utiliza el extracto de Quillay (QL). Además, se comprobó que la composición de la invención anterior, aplicada tres veces a una dosis de 10 litros por hectárea, fue segura para el cultivo. Asimismo, la aplicación de un extracto de Tagetes fermentado (EXT. TAG.) previa a la aplicación de la composición de la invención no mejoraron los resultados obtenidos con dicha composición.

20

REIVINDICACIONES

1. Composición microbiana útil para prevenir y/o tratar una infestación por nematodos en una planta, caracterizada por que comprende:

a) al menos una cepa microbiana con actividad ureasa;

b) un medio líquido fertilizante que comprende:

b.1) una fuente de aminoácidos,

b.2) una fuente de ácidos fúlvicos ,

b.3) una fuente de nitrógeno ureico,

b.4) una fuente de nutrientes,

b.5) agua.

2. Composición microbiana según la reivindicación 1, que presenta una viabilidad microbiana de al menos un 80% durante al menos un año.

3. Composición microbiana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la cepa microbiana es *Bacillus spp.*

4. Composición microbiana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cepa microbiana comprende una cepa de *Bacillus subtilis*.

5. Composición microbiana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la cepa microbiana comprende *Bacillus subtilis* DSM 24682.

6. Composición microbiana según una de las reivindicaciones 4 ó 5 que, además de la cepa de *Bacillus subtilis*, comprende una cepa microbiana adicional de *Bacillus spp.* que se selecciona entre al menos una del grupo compuesto por: cepa de *Bacillus thuringiensis*, cepa de *Bacillus megatherium*, cepa de *Bacillus licheniformis* y cualquier combinación de las mismas.

7. Composición microbiana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el medio líquido fertilizante comprende:

b.1) entre un 45% y un 95% en peso de la fuente de aminoácidos con respecto al volumen total de composición,

b.2) entre un 1% y un 20% en peso de la fuente de ácidos fúlvicos con respecto al volumen total de composición,

b.3) entre un 1% y un 20% en peso de la fuente de nitrógeno ureico con respecto al volumen total de composición,

b.4) entre un 1% y un 10% en peso de la fuente de nutrientes con respecto al volumen total de composición, y

b.5) entre un 0% y un 52% en peso de agua con respecto al volumen total de composición, de tal manera que la suma total de los porcentajes en peso de todos los componentes de la composición sea del 100%.

8. Composición microbiana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el medio líquido fertilizante comprende:

b.1) entre un 60% y un 80% en peso de la fuente de aminoácidos con respecto al volumen total de composición,

b.2) entre un 5% y un 15% en peso de la fuente de ácidos fúlvicos con respecto al volumen total de composición,

b.3) entre un 8% y un 12% en peso de la fuente de nitrógeno ureico con respecto al volumen total de composición,

b.4) entre un 2% y un 4% en peso de la fuente de nutrientes con respecto al volumen total de composición, y

b.5) entre un 0% y un 25% en peso de agua con respecto al volumen total de composición, de tal manera que la suma total de los porcentajes en peso de todos los componentes de la composición sea del 100%.

9. Composición microbiana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la fuente aminoácidos es de origen vegetal.

- 10.** Composición microbiana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la fuente de aminoácidos es un hidrolizado de proteína vegetal.
- 11.** Composición microbiana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada porque la fuente de ácidos fúlvicos es una sal de ácido lignosulfónico.
- 5 **12.** Composición microbiana según la reivindicación 11, caracterizada porque la fuente de ácidos fúlvicos es lignosulfonato potásico.
- 13.** Composición microbiana según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada porque la fuente de nitrógeno ureico es urea.
- 10 **14.** Composición microbiana según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada porque la fuente de nutrientes es melaza.
- 15.** Composición microbiana según una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizada porque la cepa o cepas microbianas se encuentran en una cantidad comprendida entre 10^3 y 10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro de composición.
- 15 **16.** Uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para tratar y/o prevenir una infestación por nematodos en un cultivo vegetal.
- 17.** Un método para tratar y/o prevenir una infestación por un nematodo en un cultivo de una planta que comprende aplicar a la superficie de dicho cultivo una composición microbiana de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 18.** El método según la reivindicación 17, caracterizado porque dicha aplicación comprende:
- 20 **i.** un primer riego de la planta con una disolución acuosa de la composición microbiana, donde dicha disolución presenta una concentración microbiana comprendida entre 10^3 y 10^9 ufc por litro de disolución, a una dosis de riego comprendida entre 10 y 30 litros de la disolución acuosa por hectárea de cultivo.
- 25 **19.** Un método según la reivindicación 18, caracterizado porque, además del primer riego, dicha aplicación también comprende:
- ii.** un segundo riego de la planta con una disolución acuosa de la composición microbiana como la definida en **i** para el primer riego, después de un periodo de tiempo comprendido entre 10 y 20 días, respecto del primer riego.
- 30 **20.** Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizado porque el nematodo es *Meloidogyne spp.*.
- 21.** Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, caracterizado porque la planta es tomate.
- 22.** Un kit que comprende una cepa microbiana con actividad ureasa y un líquido fertilizante, según se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.



FIGURA 1.

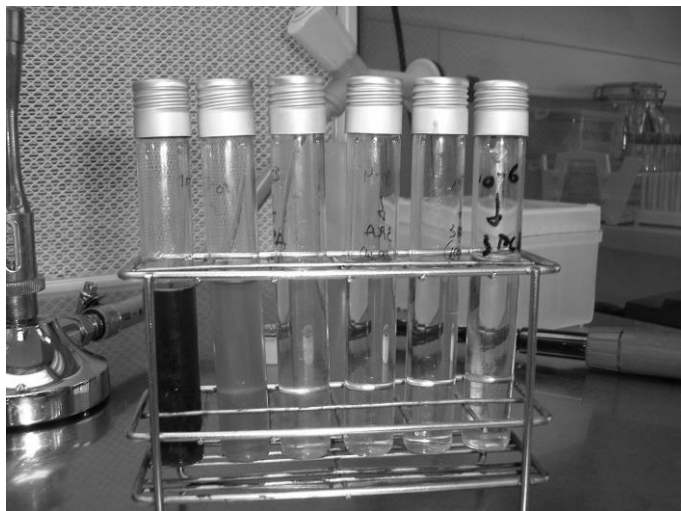


FIGURA 2.

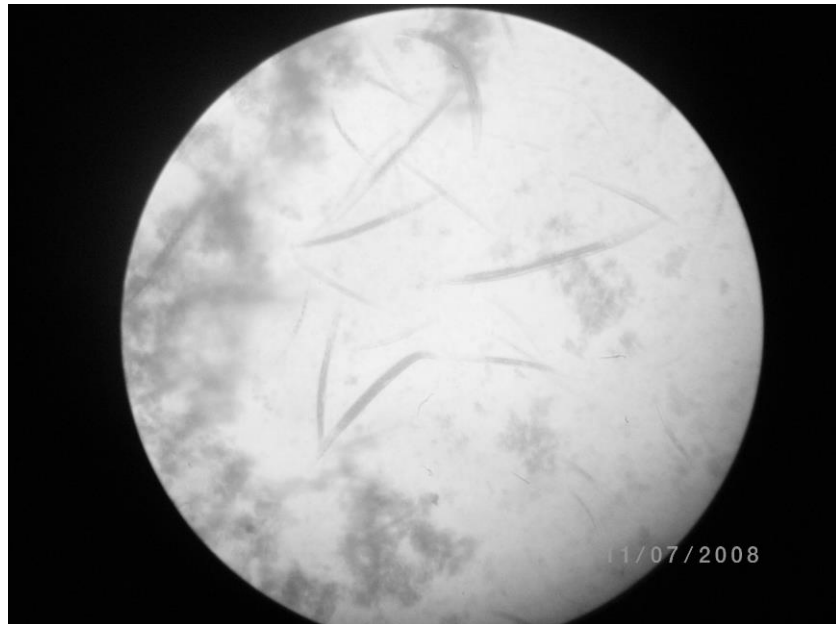


FIGURA 3.



FIGURA 4.



FIGURA 5.



FIGURA 6.



FIGURA 7.



FIGURA 8.

104 5	205 2	303 1	405 2
102 4	201 1	302 3	402 4
101 3	204 5	301 4	401 5
103 1	202 4	305 5	404 1
105 2	203 3	304 2	403 3

FIGURA 9.



FIGURA 10.

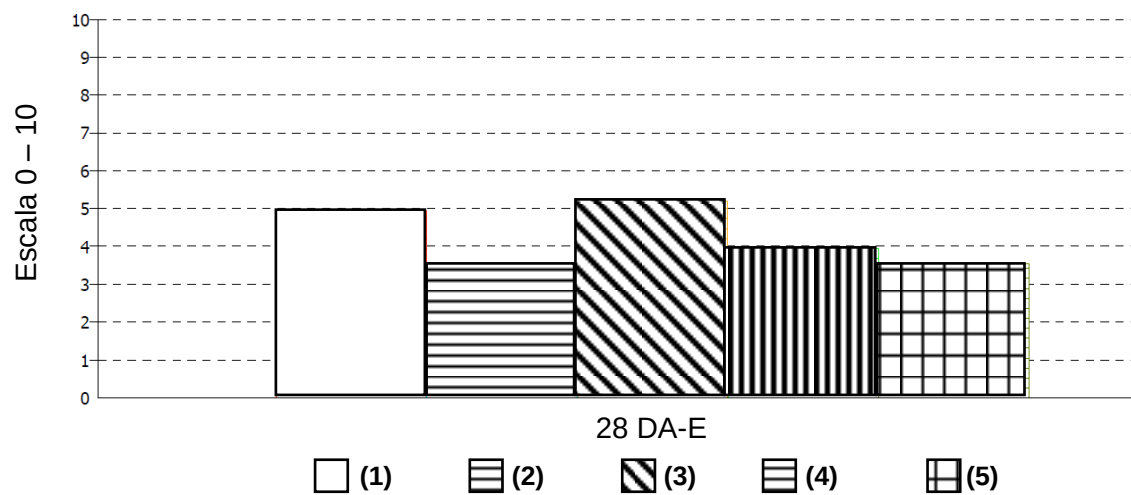


FIGURA 11.



FIGURA 12.

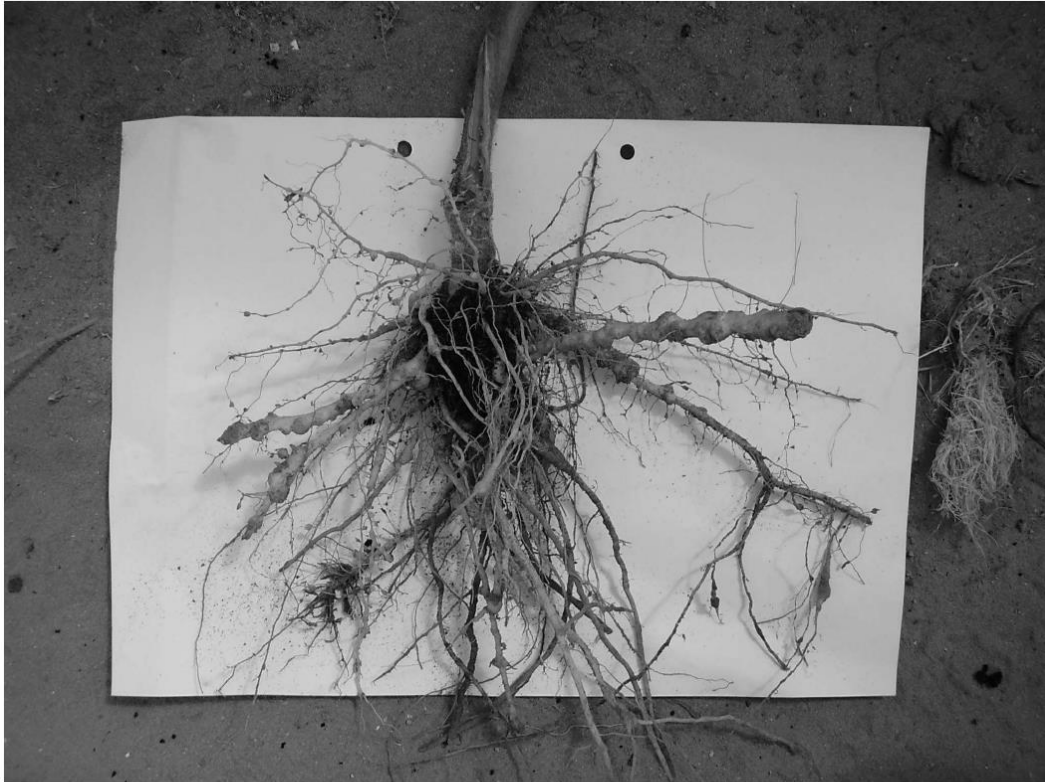


FIGURA 13.



FIGURA 14.



FIGURA 15.